Giuliana Castello Coatti

Avaliação do potencial terapêutico de pericitos
e de células mesenquimais no camundongo
SOD1, modelo animal para esclerose lateral
amiotrófica

Evaluation of the therapeutic potential of pericytes
and mesenchymal stromal cells in SOD1 mice,
animal model for amyotrophic lateral sclerosis

São Paulo

2015

Giuliana Castello Coatti

Avaliação do potencial terapêutico de pericitos
e de células mesenquimais no camundongo
SOD1, modelo animal para esclerose lateral
amiotrófica

Evaluation of the therapeutic potential of pericytes
and mesenchymal stromal cells in SOD1 mice,
animal model for amyotrophic lateral sclerosis

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Castello Coatti, Giuliana

Avaliação do potencial terapêutico de pericitos e de células mesenquimais no camundongo SOD1, modelo animal para esclerose lateral amiotrófica

Número de páginas: 91p

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. esclerose lateral amiotrófica 2. terapia celular 3. pericitos 4. células mesenquimais

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Mayana Zatz

Orientadora

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Giane por todo o amor e apoio incondicional. Sem você, nenhuma conquista valeria a pena.

Epígrafe

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço à **minha orientadora Dra Mayana Zatz**, que me deu esta oportunidade incrível de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Posso afirmar que essa experiência foi a mais complexa que já encarei até aqui. Além do gigantesco enriquecimento científico que esse período me proporcionou, aprendi muitas lições valiosas que levarei comigo para o a vida inteira. Agradeço também por toda a confiança em mim depositada.

À **Nane**, minha amigona, que esteve ao meu lado nesse período, sempre me proporcionando boas risadas e me mostrando as coisas interessantes da vida. A sua presença deixou a minha vida em SP bem mais leve!

À **minha amiga Juliana**, a Jubinha, que sempre ajudou muito a refletir sobre os experimentos, me deu muito apoio moral e sempre foi uma parceira maravilhosa! Vou sentir falta de te ver logo de manhã!

À **minha amiga Mayra**, a Mazinha do meu coração, minha parceira do lab e também das comilanças! Também vou sentir muita saudade das boas risadas e de compartilhar aquele docinho no final do dia!

À **minha amiga Amandita** pela companhia maravilhosa ao longo desse tempo em SP. Você é uma pessoa linda e tem um coração enorme. Sentirei muita saudade!

À **minha amiga Miriam** que passou pouco tempo aqui no Brasil, mas que ganhou um lugar eterno no meu coração! Sinto falta da nossa parceria nos experimentos!

Ao **meu amigo Marcos**, por todos os bons momentos e ensinamentos! Você é um exemplo de pessoa para mim. Deveria existir mais Marcos Valadares no mundo!

Aos meus amigos **Melinda, Michel, Inês, Mônica, Natália, Naila, Thiago, Luis, Ernesto, Mari, Eder e Tati** que me ajudaram a manter o foco e a força nesse período da minha vida! Valeu pessoal!

À FAPESP e CEPID pelo apoio no projeto!

À dra Merari por todos os ensinamentos científicos!

À Neide do IPEN, Helô e Rosi que fazem um trabalho incrível ajudando MUITO a cuidar dos camundongos! Sem a ajuda de vocês, um projeto deste porte seria inviável.

Aos professores e colaboradores **dr Júlio Singer, dr Antonio Carlos Pedroso, dr Giovanni Silva e dr Francisco Marcelo Monteiro**, por terem realizado as análises estatística dos dados com os animais. Com certeza esse cuidado e dedicação que vocês tiveram, ajudaram a tornar este trabalho bem mais elaborado. Foi incrível!

À Vanessa, Wagner, Fernando, Daniel, Roberto e à todos os funcionários do Genoma, por ajudarem a manter a harmonia no Genoma! Adoro vocês!

À minha tia Carla, eterna amiga e parceira!

Aos meus amores: **minha nonna Graziella, meu namorado Daniel, aos meus irmãos Emi, Vana e Nico e ao meu pai Miguel** por proporcionarem a minha existência. Sem vocês não haveria trabalho de doutorado pois não haveria Giuliana. Sou o que sou e estou onde estou graças ao apoio de vocês. Amores eternos!

Agradeço à **minha mãe Giane**, que além de $\frac{1}{2}$ de seus cromossomos, me deu a vida e também força para **JAMAIS DESISTIR**. Obrigada também por me ensinar através de seu próprio exemplo o que julgo mais importante: **sempre buscar o algo mais**. Mãe, te amo infinitamente.

Nota do autor

O objetivo central deste trabalho é a avaliação de uma nova terapia celular para a doença esclerose lateral amiotrófica (ELA), uma doença neurodegenerativa, atualmente sem cura.

Esta tese foi estruturada em cinco capítulos. O primeiro traz uma introdução ao tema do projeto. O segundo capítulo abrange uma revisão bibliográfica relacionada ao tema do projeto, escrita em conjunto com colaboradores do mesmo grupo de pesquisa e publicada em revista internacional. O terceiro capítulo descreve os materiais e métodos utilizados nas fases experimentais. O quarto capítulo descreve e discute os resultados obtidos durante o período de doutoramento. Por fim, o quinto capítulo traz uma discussão geral sobre os achados do período de doutoramento.

Este trabalho pode ser subdividido em três fases experimentais. Na primeira fase, realizaram-se injeções semanais de células mesenquimais (MSCs) obtidas de cordão umbilical com o objetivo de avaliar o efeito terapêutico bem como a melhor via sistêmica de transplante (intraperitoneal ou intravenosa) no camundongo SOD1, modelo para esclerose lateral amiotrófica. Com este experimento não foram observadas melhoras no desempenho físico ou na sobrevivência dos animais no entanto, um resultado importante foi a verificação de que muitos morriam no ato das injeções intravenosas, principalmente durante as injeções realizadas na fase final da vida dos camundongos. Além disso, nesta primeira etapa, os testes físicos utilizados não se mostraram adequados para a avaliação clínica dos animais e dessa forma, a segunda fase do projeto foi a de padronização de tais testes. A terceira fase do projeto consistiu no transplante de pericitos, células nunca antes testadas para esta doença, e de MSCs (ambas obtidas de um mesmo doador), no camundongo SOD1.

Índice

Resumo	10
<i>Abstract</i>	11
Capítulo I - Introdução Geral	12
Capítulo II - Revisão Bibliográfica.....	17
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	33
III.A - Transplante de células mesenquimais humanas derivadas de tecido de cordão umbilical no camundongo SOD1	33
Isolamento e expansão de MSC derivadas de tecido de cordão umbilical	33
III.B – Padronização dos testes físicos no camundongo SOD1	35
III.C – Injeção de MSCs e pericitos no camundongo SOD1	35
Capítulo IV - Resultados.....	44
IV.A - Transplante de células mesenquimais humanas derivadas de tecido de cordão umbilical no camundongo SOD1	44
IV.B – Padronização dos testes físicos no camundongo SOD1.....	48
IV.C – Injeção de MSCs e pericitos no camundongo SOD1	50
Capítulo V – Discussão Geral.....	69
Apêndice I – Detalhamento da análise longitudinal	80

Resumo

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), também conhecida como Doença de Lou Gehrig, é a forma mais comum de doença do neurônio motor. Tem início geralmente tardio (4^a/5^a década de vida), afetando tanto os neurônios motores superiores quanto os inferiores. A degeneração provocada pela ELA é progressiva e irreversível. Em geral, a evolução da doença é rápida, levando os pacientes ao óbito entre 3 e 5 anos após o início dos sintomas, devido principalmente à falência respiratória. Atualmente, o único medicamento liberado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o uso em ELA é o Riluzol, que tem um efeito mínimo na expectativa de vida dos pacientes. Neste cenário, a terapia celular vem sendo avaliada como uma possível alternativa. Estudos pré-clínicos indicam efeitos benéficos do tratamento de camundongos SOD1 (modelo animal para ELA) com células estromais mesenquimais ou simplesmente células mesenquimais (MSCs), atribuída principalmente à ação de fatores solúveis. Aqui propusemos o uso de pericitos, uma linhagem celular ainda não testada para tratamento pré-clínico em modelo murinho de ELA. Pericitos são células perivasculares que circundam células endoteliais e que desempenham importantes funções celulares como por exemplo participação da formação e manutenção da barreira hematoencefálica, essencial para proteger o sistema nervoso central de danos em doenças neurodegenerativas. Dessa forma, este trabalho pretendeu comparar o potencial terapêutico de células mesenquimais e pericitos obtidos do tecido adiposo humano de um mesmo doador, em camundongos SOD1. Para tal, testes físicos (peso, PaGE, *motor score*, *rotarod*) foram aplicados semanalmente e a sobrevida dos animais foi avaliada. Os resultados demonstram que, com exceção dos benefícios observados nos testes do PaGE e do *motor score* em uma fase mais inicial da doença, o tratamento com MSCs ou pericitos não resulta em efeitos significativos no quadro clínico de camundongos SOD1 do sexo feminino. Para os machos, o tratamento com pericitos se destaca em relação aos tratamentos com MSCs ou HBSS (veículo), resultando em efeitos benéficos na sobrevida e em determinadas funções motoras dos animais, com destaque para os testes do *motor score* e do *rotarod*, onde há uma melhora na fase inicial da doença. A análise da expressão gênica no cérebro e na medula de animais em fase final da doença sugere que o tratamento de machos com pericitos é capaz de estimular as defesas antioxidantes do animal. Ainda nestes órgãos, não foram encontrados vestígios das células humanas injetadas, indicando um possível efeito sistêmico das mesmas.

Abstract

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), also known as Lou Gehrig's disease, is the most common form of motor neuron disease. Most cases are characterized by an adult onset of symptoms, usually in the fourth or fifth decade of life, affecting both upper and lower motor neurons. The degeneration caused by ALS is progressive and irreversible. On average, the survival ranges from 3 to 5 years after onset, mainly due to respiratory failure. Currently, the only Food and Drug Administration (FDA)-approved medication for this disorder is Riluzole, but its effects on survival are minimal. In this scenario, cell therapy is being evaluated as a possible alternative. Preclinical studies indicate beneficial effects of treatment of SOD1 mice (animal model for ALS) with mesenchymal stromal cells or simply mesenchymal cells (MSCs), mainly attributed to the action of soluble factors. Here we propose the use of pericytes, a cell line not yet tested for preclinical treatment in of ALS. Pericytes are perivascular cells surrounding endothelial cells and play important cellular roles such as assistance of formation and maintenance of the blood-brain barrier, which is essential to protect the central nervous system from damage in neurodegenerative diseases. Thus, this study sought to compare the therapeutic potential of mesenchymal cells and pericytes, both obtained from the same human adipose tissue, in SOD1 mice. For this purpose, survival and physical performance (weight, PaGE, motor score and rotarod) were evaluated. Except for the benefits observed in PaGE and the motor score tests in an early stage of the disease, treatment with MSCs and pericytes does not result in significant effects on disease progression of SOD1 female mice. For males, treatment with pericytes stands out compared to treatment with MSCs or HBSS (vehicle), resulting in beneficial effects on survival and in certain physical functions of the animals, particularly for the motor score and rotarod tests, where improvement was observed in the initial stage of the disease. The analysis of gene expression in the brain and spinal cord in end-stage animals suggests that treatment of males with pericytes can stimulate the animals' antioxidant defense. No traces of injected human cells were observed in brain or spinal cord of mice, indicating a possible systemic effect of the transplant.

Capítulo I - Introdução Geral

As doenças do neurônio motor (DNM) compreendem um grupo muito heterogêneo de afecções que comprometem a atividade neuromuscular. A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), também conhecida como Doença de Lou Gehrig, é a forma mais comum de DNM. Tem início geralmente tardio (4^a/5^a década de vida) ¹ e afeta tanto os neurônios motores superiores (NMS) quanto os inferiores (NMI).

A degeneração provocada pela ELA é irreversível e em estágios avançados são afetados os quatro membros, musculatura facial, cervical e torácica ². Nas fases mais adiantadas, os pacientes perdem a capacidade de falar e deglutir e dependem de alimentação parenteral e ventilação assistida para sobreviver. A evolução da doença é rápida, levando os pacientes ao óbito entre 3 e 5 anos após o diagnóstico, geralmente devido à falência respiratória ³. Sua incidência atinge 1-2 indivíduos/100.000, com uma prevalência estimada entre 4-13 por 100.000 para a população mundial ⁴. Aproximadamente 90% dos casos são ditos esporádicos (SALS), nos quais não é possível apontar uma causa específica para o desenvolvimento da ELA. Especula-se que fatores genéticos somados a efeitos ambientais possam contribuir para a sua instalação. Os 10% restantes são causados por mutações em genes específicos e transmitidos de uma geração para a outra, sendo denominados casos familiares (FALS) ⁵.

Até o momento, já foram identificados 33 genes responsáveis por ELA familiar ⁶. Dentre estes destaca-se o gene *SOD1*, que codifica a enzima superóxido dismutase 1, responsável por auxiliar na remoção de radicais livres do citoplasma das células. Os estudos envolvendo o *SOD1* identificaram a presença de agregados intracelulares. Entretanto, ainda se discute se estes seriam a causa da doença ou apenas uma consequência do processo degenerativo. Sabe-se que as cadeias polipeptídicas produzidas pelas formas mutantes acabam por apresentar um ganho de função que desestabiliza as vias de estresse oxidativo ⁷. Mais de 100 mutações neste gene já foram associadas à ELA, abrangendo aproximadamente 20% dos casos familiares ⁸.

Como o gene *SOD1*, descrito há mais de 20 anos, foi o primeiro a ser relacionado com a doença ⁹ ele gerou o primeiro modelo de camundongo transgênico. Trata-se do camundongo SOD1, um dos principais e mais utilizados modelos para

esta doença, que possui superexpressão do transgene humano carregando a mutação G93A, já observada em casos familiares ¹⁰. Além de sintomas musculares progressivos, esta linhagem de camundongos apresenta outros fenótipos bastante semelhantes aos encontrados em pacientes de ELA tais como quadro inflamatório no sistema nervoso, ativação de astrócitos e microglia e morte seletiva de neurônios motores ¹¹.

O único medicamento aprovado pelo FDA (*food and drug administration*) para o tratamento da ELA é o Riluzol que atua na redução da excitotoxicidade sobre os neurônios motores através da recaptação do glutamato disponível na fenda sináptica e é capaz de aumentar apenas de 2 a 4 meses a sobrevivência dos pacientes ¹²⁻¹⁴. Desta maneira, a terapia celular para o tratamento desta doença neurodegenerativa devastadora tem sido objeto de muitas pesquisas. Alguns ensaios clínicos já estão sendo realizados em humanos: transplante de células mesenquimais (MSCs) pela companhia Brainstorm (NCT01051882) e de células tronco neurais (NSCs) pela companhia Neuralstem (NCT01730716). No entanto, conforme revisão recente publicada pelo nosso grupo de pesquisa, o uso de células tronco em testes clínicos para ELA ainda é precoce. Os estudos em animais mostram resultados bastante controversos e pontos importantes como a determinação da fonte celular mais eficiente, protocolo de injeção e uso ou não de imunossupressores, ainda necessitam ser estabelecidos ¹⁵.

Atualmente acredita-se que o principal mecanismo de reparo tecidual pelas células injetadas é através da liberação de fatores parácrinos capazes de promover melhorias no microambiente. A lista desses fatores liberados pelas células estromais mesenquimais multipotentes ¹⁶ (aqui referidas apenas por células mesenquimais ou MSCs) aumenta constantemente. Sabe-se que eles exercem diversas funções biológicas, tais como a imunomodulação, quimiotaxia, suporte da angiogênese e efeitos anti-apoptóticos¹⁷. A secreção dessas biomoléculas poderia promover a regulação do remodelamento que ocorre após o dano tecidual e também diminuição da resposta imune indesejável, a fim de tornar o microambiente menos agressivo ¹⁸⁻²¹. Algumas subpopulações de MSCs também secretam moléculas neuroregulatórias tais como o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e *nerve growth factor* (NGF) ²², capazes de suportar a sobrevivência de células neuronais e de estimular a sua regeneração, e outras moléculas que, apesar de não serem

classificadas como "neuroregulatórias", são capazes de proteger as células neuronais (tais como GLP-1^{23,24}).

Além dos estudos clássicos com MSCs e NSCs, uma nova fonte celular vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisa para outras patologias. Os pericitos residem ao redor dos vasos sanguíneos e expressam o marcador de superfície CD146. Possuem características em comum com a população heterogênea de MSCs como por exemplo, a capacidade de diferenciação, expressão de alguns marcadores e secreção de fatores parácrinos^{25,26}. Além destas características, a localização perivascular faz dos pericitos possíveis progenitores das MSCs^{26,27}. O potencial terapêutico de pericitos já foi demonstrado para diferentes patologias, incluindo doenças musculares^{28,29} e cardíacas³⁰.

Pericitos possuem importantes funções celulares tais como, promoção de estabilidade vascular, participação na determinação do arranjo e distribuição dos vasos sanguíneos (angioarquitetura) e controle do fluxo sanguíneo. No sistema nervoso central, auxiliam na formação e manutenção da barreira hematoencefálica (BHC), que tem um papel importante na manutenção do ambiente neuronal. A quebra da BHC faz com que componentes sanguíneos adentrem o ambiente neuronal, acentuando assim a inflamação já existente no sistema nervoso comprometido e acelerando a progressão dos sintomas³¹⁻³³. Recentemente foi observada uma redução de 50% na quantidade de pericitos na barreira medular em pacientes com ELA³². O transplante de pericitos no camundongo SOD1 (modelo para ELA), o principal objetivo deste estudo, representa portanto um tratamento inovador e com vantagens em relação ao uso de MSCs ou NCSs, linhagens celulares que estão atualmente em fase de testes em humanos.

Referências bibliográficas do Capítulo

1. Goodall, E. F. & Morrison, K. E. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): Proposed mechanisms and pathways to treatment. *Expert Rev. Mol. Med.* **8**, 1–22 (2006).
2. Guégan, C. & Przedborski, S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Invest.* **111**, 153–161 (2003).
3. Donkervoort, S. & Siddique, T. Amyotrophic Lateral Sclerosis Overview: Lou Gehrig's Disease. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, eds. *GeneReviews* (2009).
4. ALS Association. *What is ALS?* (2015). at <<http://www.alsa.org/>>
5. Pasinelli, P. & Brown, R. H. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 710–723 (2006).
6. Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis Online genetics Database: Gene report of major ALS genes in ALSod. at <<http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>>
7. Dion, P. A., Daoud, H. & Rouleau, G. A. Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 769–782 (2009).
8. Cudkovicz, M. E. *et al.* Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **41**, 210–221 (1997).
9. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62 (1993).
10. Doble, A. & Kennel, P. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* **1**, 301–312 (2000).
11. Kassa, R. M., Mariotti, R., Bonaconsa, M., Bertini, G. & Bentivoglio, M. Gene, cell, and axon changes in the familial amyotrophic lateral sclerosis mouse sensorimotor cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 59–72 (2009).
12. Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS/Riluzole Study Group. N. Engl. J. Med.* **330**, (1994).
13. Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M. & Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* (2007). doi:10.1002/14651858.CD001447.pub 2
14. Mitchell, J. D. & Borasio, G. D. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **369**, 2031–2041 (2007).
15. Coatti, G. C. *et al.* Stem cells for amyotrophic lateral sclerosis modeling and therapy: Myth or fact? *Cytom. Part A* **2000**, n/a–n/a (2015).
16. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–395 (2005).
17. Meirelles, L. D. S., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 419–27 (2009).
18. Péault, B. *et al.* Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol. Ther.* **15**, 867–77 (2007).

19. Segers, V. F. M. & Lee, R. T. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* **451**, 937–42 (2008).
20. Ballard, V. L. T. & Edelberg, J. M. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ. Res.* **100**, 1116–27 (2007).
21. Lindvall, O. & Kokaia, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* **441**, 1094–6 (2006).
22. Crigler, L., Robey, R. C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D. & Phinney, D. G. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp. Neurol.* **198**, 54–64 (2006).
23. Perry, T., Haughey, N. J., Mattson, M. P., Egan, J. M. & Greig, N. H. Protection and Reversal of Excitotoxic Neuronal Damage by Glucagon-Like Peptide-1 and Exendin-4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 881–888 (2002).
24. During, M. J. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat. Med.* **9**, 1173–9 (2003).
25. Corselli, M., Chen, C.-W., Crisan, M., Lazzari, L. & Péault, B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1104–9 (2010).
26. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–13 (2008).
27. Cossu, G. & Bianco, P. Mesoangioblasts - Vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 537–542 (2003).
28. Dellavalle, A. *et al.* Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 255–67 (2007).
29. Valadares, M. C. *et al.* Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem Cell Rev.* (2014). doi:10.1007/s12015-014-9537-9
30. Chen, C.-W. *et al.* Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* **31**, 305–16 (2013).
31. Winkler, E. a, Bell, R. D. & Zlokovic, B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* **14**, 1398–405 (2011).
32. Winkler, E. a *et al.* Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **125**, 111–20 (2013).
33. Winkler, E. A. *et al.* Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1035–42 (2014).

Capítulo II - Revisão Bibliográfica

Revisão bibliográfica sobre o tema que embasa o projeto de pesquisa de doutoramento

Título: Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Myth or Fact?

Autores: Coatti, G.C.; Beccari, M.S.; Olávio, T.R; Mitne-Neto, M.; Okamoto, O.K.; Zatz, M.

Periódico: Cytometry Part A

Cytometry

PART A
Journal of the
International Society for
Advancement of CytometryStem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis
Modeling and Therapy: Myth or Fact?G. C. Coatti,¹ M. S. Beccari,¹ T. R. Olávio,¹ M. Mitne-Neto,^{1,2} O. K. Okamoto,¹ M. Zatz^{1*}¹Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil²Fleury Group (Research and Development Department), São Paulo, Brazil

Received 8 July 2014; Accepted 28 December 2014

Correspondence to: Mayana Zatz, Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Rua do Matão 106, São Paulo, CEP 05508-030, Brazil.

E-mail: mayazatz@usp.br

Published online 2 February 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22630

© 2015 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease whose pathophysiology is poorly understood. Aiming to better understand the cause of motor neuron death, the use of experimental cell-based models increased significantly over the past years. In this scenario, much knowledge has been generated from the study of motor neurons derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. These methods, however, have advantages and disadvantages, which must be balanced on experimental design. Preclinical studies provide valuable information, making it possible to combine diverse methods to build an expanded knowledge of ALS pathophysiology. In addition to using stem cells as experimental models for understanding disease mechanism, these cells had been quoted for therapy in ALS. Despite ethical issues involved in its use, cell therapy with neural stem cells stands out. A phase I clinical trial was recently completed and a phase II is on its way, attesting the method's safety. In another approach, mesenchymal stromal cells capable of releasing neuroregulatory and anti-inflammatory factors have also been listed as candidates for cell therapy for ALS, and have been admitted as safe in a phase I trial. Despite recent advances, application of stem cells as an actual therapy for ALS patients is still in debate. Here, we discuss how stem cells have been useful in modeling ALS and address critical topics concerning their therapeutic use, such as administration protocols, injection site, cell type to be administered, type of transplantation (autologous vs. allogeneic) among other issues with particular implications for ALS therapy. © 2015 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

Key terms: amyotrophic lateral sclerosis; stem cells; cell therapy; iPSC; ESC; MSC

INTRODUCTION

AMYOTROPHIC Lateral Sclerosis (ALS), or Lou Gherig's Disease, is a neurodegenerative disorder characterized by the death of motor neurons, with symptoms including fasciculation, spasticity, muscle atrophy, and weakness. These signs emerge when axons retract, and denervation of muscles occurs. Initially, the retraction is compensated by more resistant neurons, which sprout and reinnervate some muscles; however, this mechanism eventually fails, and the neuronal cell bodies become visibly abnormal and die (1). In addition to motor neuron symptoms, 15% of patients present also Frontotemporal Dementia (ALS-FTD), with the neurons in the prefrontal and temporal cortexes being affected in the disease (2). The criteria used for diagnosis are mainly clinical, as reported in the *El Escorial*, created in 1994 (3) and revised in 2000 (4). Electromyography data is now considered of equal importance as clinical features, and the signs required for an ALS diagnosis are revised in the Awaji-Shima electrodiagnostic criteria (5).

Most cases are characterized by an adult onset of symptoms, usually in the fourth decade of life. Some juvenile cases have, however, been described, including patients with mutations in *ALS2* (6), *SPG11* (7), *SIGMAR1* (8), genes, and *SETX* (9).

REVIEW ARTICLE

Figure 1. Genes currently known as associated with ALS classified by common molecular pathways involved in the disease pathophysiology. Adapted from Refs. (1) and (15). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

The average survival ranges from 3 to 5 years after onset, but there is a great interfamilial and intrafamilial variability between patients, which suggests the existence of important disease modifiers that contribute to disease progression. Among them, the ephrin receptor EphA4 was described as one of the main modifiers in humans; the higher the expression level of this receptor, the more vulnerable the motor neurons (10).

Another observed correlation with disease progression involves T-regulatory cells (T-regs), which are critically involved in suppressing the inflammation induced by neurotoxic T-lymphocytes and microglia/macrophages in ALS. The analysis of affected patients' blood through flow cytometry (FC) recently showed that CD4+CD25^{High} regulatory T-regs are reduced in patients with a rapid disease progression. Also, FoxP3 (a transcription factor required for T-reg function) levels were shown to be indicative of progression rates and thus could be used to identify rapidly progressing cases (11).

ALS is mainly classified into two groups: FALS (Familial ALS), for the inherited forms of the disease, and SALS for the sporadic cases, in which there are no affected relatives and where in the majority of cases it is not possible to identify a single causative agent. The familial cases have their historical importance in causative gene identification since through these discoveries much has been uncovered about ALS pathogenesis.

Around 33 genes or chromosomal regions have been linked to ALS, providing important clues on the pathophysiological mechanisms of the disease (ALSoD - <http://alsod.iop.kcl.ac.uk>). Recent studies using high-throughput technologies such as exome sequencing have identified not only novel mutations in these known ALS-causing genes, but also additional genetic causes of ALS. A search for de novo mutations

in SALS, for instance, revealed mutations in CREST (12), a protein that associates with FUS; deletions in *SPG11*, a gene associated with hereditary spastic paraplegia, have been found in familial ALS cases as well (13), highlighting the importance of the elucidation of disease modifiers; and last, but not least, mutations in MATR3, a DNA/RNA-binding protein that interacts with TDP-43, have been found in FALS cases (14).

The main pathways in which ALS-associated genes are involved are oxidative stress, RNA processing, endosomal trafficking, cell signaling, glutamate excitotoxicity, proteostasis, and cytoskeleton composition ((15); Fig. 1). However, little is understood about how these pathways converge into the ALS phenotype. Even though they are described as causative for ALS, a large amount of ALS-causing genes are also responsible for other types of neurodegenerative diseases; in other words, the same mutations are able to lead to various phenotypes. Such clinical variability suggests that ALS is indeed a syndrome, and not one single disease (1). Given the fact that the most frequent gene alteration in ALS, *C9ORF72*, is responsible for only ~33% of familial cases and 8% of sporadic cases (16), environmental conditions could play an important role for disease development. Well-designed cohort studies are difficult and costly, but could reveal important information on potential risk factors.

Despite the increasing amount of genes associated with ALS and the consequent elucidation of molecular pathways, other pathophysiological mechanisms contributing to the ALS phenotype are poorly understood. Besides the known neurodegeneration, recent findings also suggest the involvement of an aberrant innate immune system. The percentages of CCR2 and CD62L on CD14+CD16- classical monocytes were significantly lower in ALS patients than in healthy controls (17).

This complex profile hinders progress for important clinical trials, which have been, in most cases, unsuccessful. However, stem cells seem to be the new light at the end of the tunnel, providing important models for molecular pathway studies, drug screening, and even cell therapy, with two clinical trials currently in phase II: one by NeuralStem (18,19), and another by BrainStorm (NCT01051882).

In this review, we will discuss the importance of distinct stem cell types for disease modeling, summarizing new data from embryonic stem cell (ESC) and induced pluripotent stem cell (iPSC) models, their uses, advantages and disadvantages, and how FC has significantly contributed to these cell-based *in vitro* studies. We also review and discuss important issues to be addressed on possibilities of cell therapy, including neural and mesenchymal stem cells.

FC AS AN ALLY FOR CELLULAR AND MOLECULAR STUDIES

Among all available techniques for cellular marker evaluation, FC plays a major role in many aspects of cell-based ALS studies. It allows the search of characteristic ALS markers, such as mentioned above for CD4 lymphocytes and FoxP3, and may provide important insight into patient prognosis. This can help not only the design of a more personalized therapeutic approach, but also selection of patients for clinical trials based on similar progression rate and symptoms. A recent work from Marrali et al. (20) shows that NOX2 activity, evaluated from fresh blood assayed through a special FC protocol, is a modifier of ALS survival. This kind of assay is of special interest for clinical trials due to the accessibility of the studied tissue and its applicability in a high throughput screening. Despite the motor neurons being the main affected cells in ALS, as described above, other cell types can take part in this disease, showing the need for a multicellular evaluation. In this case, not only the cell surface markers are the target of those studies, but also the evaluation of intracellular patterns. As presented by Pickles et al. (21) depositions of protein aggregates in mitochondria is age dependent in mouse models and are found in the lymphoblast fraction of ALS1 patients.

Regarding cell therapy, one great promise is the use of neural stem cells (NSCs) derived from the patient's own iPSC. By sorting the cells of interest, one can select and inject only the desired cell type, and exclude possible tumorigenic (or other harmful) cells.

In short, the importance of FC in this field of study, contributing not only to the understanding of ALS's pathophysiological mechanisms, but also to the elucidation of possible treatments will be discussed in this review as we describe cellular models and proposed cell therapies.

CELL-BASED MODELS FOR UNDERSTANDING ALS

Many transgenic murine models for ALS studies have been described, providing important information on the mechanisms behind motor neuron death. Even though they are very useful and informative, models that mimic human diseases are, biologically speaking, still very limited, since they present very distinct disease progression and drug responses.

Consequently, to understand the precise molecular pathways behind ALS pathogenesis and the effects of different drugs and other potential therapies, recent efforts have been focusing on human cell-based disease models derived from pluripotent stem cells. The difficulties of reaching the cells affected in neurological and psychiatric diseases, for studies *in vitro* or *in vivo*, highlights the importance of cell-based models. Pluripotent stem cells provide models that are more flexible since they may generate different types of specialized neurons as well as supporting glial cells. Some disadvantages, however, accompany different sources of pluripotent stem cells. The pros and cons of ESCs and iPSCs as disease models are discussed below.

Embryonic Stem Cells

ESCs, first isolated in 1998 by Thomson (22), have the capacity to self-renew indefinitely in culture while maintaining a potential to generate any of the hundreds of cell types in the body. The same plasticity that permits ESCs to generate so many different cell types also makes their control quite a challenge (23). Many important and decisive differentiation factors have been discovered, and simple protocols for ES differentiation into motor neurons are available. The first successful differentiation method for mouse ESC-derived motor neurons was described in 2002 (24), and the first protocol for human cells in 2005 (25), all of which turned possible due to previous discoveries of important factors such as Sonic hedgehog (26), Shh factor, and the elucidation of the sequence of differentiation events that culminate in different neuronal populations (27). Later in this same year, in a well-designed study, a human ES lineage was transfected with plasmids encoding GFP placed under the control of a MN-specific enhancer within the 5'-regulatory region of the gene encoding the transcription factor Hb9. After treatment with Shh and retinoic acid (RA), activated Hb9-driven GFP expression permitted the isolation of MN by fluorescence-activated cell sorting, excluding undifferentiated cells and thus making this differentiation protocol a more reliable process (28).

ESCs were firstly used to generate animal models. Clement et al., used mouse ESCs to create chimeric mice composed of mixtures of normal cells and cells that express a human mutant SOD1 polypeptide. Interestingly, non neuronal cells that did not express mutant SOD1 presented delayed degeneration and significantly extended survival of mutant-expressing motor neurons (29).

The differentiation of ES cells into motor neurons or other cell types such as glial cells have also been used as important models for ALS studies, elucidating the main disease mechanisms (cell-autonomous and noncell-autonomous) involved in motor neuron death.

In 2008, two important studies were developed using ES-derived motor neurons. Di Giorgio et al. showed that other cells besides motor neurons play an important role in ALS disease progression. Human motor neurons were cocultured with mice glial cells carrying the G93A mutation in the *SOD1* gene, and were shown to be sensitive to the toxic, noncell-autonomous effect of these cells (30). Marchetto et al.

REVIEW ARTICLE

published a similar work simultaneously, coculturing human ESC-derived motor neurons with astrocytes carrying the G37R mutation in *SOD1*; this coculture caused a 50% reduction in the number of motor neurons when compared with controls. The toxicity of these astrocytes is believed to be generated by an increased inflammatory response, and also the activation of NOX2, consequently producing oxygen radicals. The addition of antioxidants was able to reverse this process and specifically, apocynin could rescue the motor neuron survival in the presence of *SOD1* mutant astrocytes (31).

In these studies, glial cells carried *SOD1* mutations. Since most ALS cases are sporadic, Haidet-Phillips et al. sought to study the effects of FALS and SALS-derived astrocytes cocultured with motor neurons. These astrocytes were derived from neural progenitor cells (NPCs) obtained from postmortem tissues, and cocultured with mouse ESC-derived motor neurons. All patient-derived astrocytes showed great toxicity to these motor neurons, selectively killing them in this coculture model system (32).

Supporting the idea of a toxic environment contributing to this motor neuron disease, the work published by López-González et al. in 2009 showed that transplanting mouse ESC-derived motor neurons into an ALS mouse *SOD1* model (carrying the G93A mutation) was not beneficial. Although the mice showed an initial recovery, the engrafted motor neurons died shortly after transplant, and the disease progression resumed its course (33).

Even though strong noncell autonomous effects are reported in diverse studies, cell autonomous effects also take place in ALS. Wada et al. (2008) described a human ESC-based model for ALS, in this work, the differentiated motor neurons expressed the mutated form of *SOD1*, and were not initially cocultured with other neuronal cell types. Interestingly, the G93A mutation does not affect the differentiation process. What the authors observed was a significantly higher death rate among terminally differentiated motor neurons, showing an intrinsic mechanism (cell-autonomous) behind motor neuron death in ALS. This work also involved the coculture of these differentiated cells with conditioned medium of astrocytes carrying the same mutation, confirming also a noncell-autonomous astrocyte-dependent cell survival mechanism (34).

ESC-based models can be of great importance not only for the understanding of pathophysiological mechanisms behind ALS, but also for the screening of potential therapeutic molecules. Recently Yang et al. (2013) have derived motor neurons from mouse ESCs, and performed a small-molecule screening comparing survival of wild-type motor neurons and those carrying a human transgene with the G93A *SOD1* mutation. A compound named kenpaullone stood out, not only by keeping motor neurons alive for several weeks (in the absence of added trophic support), but also by maintaining neuritic processes, synapses, and normal electrophysiological characteristics (35). Olesoxime and Dexamipexole (36,37), two drugs that recently failed a phase III trial, were also tested in this study, and were shown to be less effective. These two drugs had never been tested in in vitro models, only in vivo,

which supports the concept that both types of study need to be performed to obtain a deeper knowledge of the drug's therapeutic potential, and avoid clinical trial failure.

In summary, cell models based on ES cells have shown that the mere substitution of motor neurons as a cell therapy would not be enough to circumvent the neurodegeneration; besides the cell-autonomous mechanisms, the toxic environment, provided by glial cells, is harmful to motor neurons, and contribute to their death. Even though these findings represent a great advance in ALS understanding, they have been limited to only one gene, *SOD1*. This disease involves multiple pathways, and most likely has multiple etiologies. Even in cases of ALS in which the causative mutation is unknown, proteins such as TDP-43, FUS, and others, are found in cytoplasmic aggregates, suggesting an underlying convergence of cellular processes and pathological effects (38). ESC-based models for other frequent mutations, especially the expansions on *C9ORF72*, may brighten our knowledge as to other potential mechanisms to be aimed for therapy.

Despite these many advantages, the ethical issue related to the destruction of embryos still remains. Although ESC may be obtained for disease modeling and drug screening, a large-scale use of ESC still seems hardly feasible for treatment of all ALS patients

Induced Pluripotent Stem Cells

The development of iPSC in 2006 allowed remarkable changes in stem cell science (39). It made possible to obtain pluripotent stem cells directly from a patient's adult cells [mainly fibroblasts, although other sources have been used (40)], bypassing the large ethical issues behind ESCs and embryo destruction (39) and allowing the study of patient-specific ALS mutations, without the need for genetic engineering cells. Although ESCs with ALS mutations could be obtained through preimplantation diagnosis in familial cases with known mutations, only iPSC obtained from patients allow the analysis of sporadic cases. Since then, many important discoveries with iPSC-derived motor neurons and glial cells have enhanced our (still currently little) understanding of ALS pathophysiology.

The diverse stages of iPSC differentiation into mature motor neurons are well characterized. After iPSC establishment, cells are usually induced to form embryonic bodies and subsequently neural precursor cells (NPCs). Factors such as Shh and RA are used to induce differentiation into mature motor neurons which can be distinguished by the expression of some markers such as Hb9 (Fig. 2).

Somatic cell reprogramming is a stressful process, since it goes against the natural course of a cell's life. The iPSCs generated carry with them imprinting marks from their tissue of origin, and consequently present some altered genetic activity due to the reprogramming process. This possible genetic variation raises concerns about the validity of these models. However, researchers have shown that there is great similarity between iPSCs and ESCs, demonstrating telomere renewal during cell reprogramming into iPSCs and telomere shortening on differentiation into somatic cells (41), teratoma

Cell Type	Markers	Functional Assay
Fibroblasts	TE-7 ⁺	No differentiation
iPSC	SSEA-3 ⁺ / SSEA-4 ⁺ / TRA1-60 ⁺ / TRA1-81 ⁺ / NANOG ⁺	Teratoma Formation
Embryonic Bodies	3 Embryonic Germ Layers: - Endoderm: AFP ⁺ - Mesoderm: desmin ⁺ / αSMA ⁺ - Ectoderm: <i>Id1</i> ⁺ / GFAP ⁺	Differentiation into progenitor cells from the three germ layers.
Neural Precursor Cells (NPCs)	PAX6 ⁺ / Sox1 ⁺	Differentiation into other neural cell lines (oligodendrocytes, astrocytes, etc.)
Motor Neurons	HB9 ⁺ / ISL ⁺ (nuclear coexpression) <i>Olig2</i> ⁺ / Pax6 ⁺ Cholinergic neurons: CHAT ⁺	Patch Clamp

Figure 2. Characterization of cell type, markers, and functional assay of the stages of iPSCs differentiation into motor neurons. Adapted from Refs. (46,151, and 152).

formation, the possibility of derivation into the three kinds of embryonic tissues, epigenetic marks, and transcripts levels (42,43). This similarity suggests that iPSC cells could potentially be considered patient-specific ES cells, and consequently be used without rejection, and eliminate ethical issues.

Another important aspect to consider in the process of iPSC formation is the clonal variation inside iPSC strains, especially when the reprogramming technique used is integrative (44). Recently a shRNA mediated knockdown of the Mbd3 protein was reported (a regulator of gene expression and chromatin remodeling activities (45), generating a highly efficient, nonintegrative method for mouse cells. This represents an important breakthrough which eliminates many important discussed issues. However, this strategy must be tested on human cells as well. The main techniques used for reprogramming somatic cells (e.g., fibroblasts) into a pluripotent state, and their respective reprogramming efficiency, are demonstrated in Figure 3.

The doors opened by iPSC models have brought many interesting discoveries for ALS. Dimos et al. (2008) developed the first strain of ALS-related iPSC. The pluripotent cells derived from an ALS patient's fibroblasts were used to obtain motor neurons with a *SOD1* mutation (46). However, they could not identify any phenotype studying those cells. Afterward, an ALS (47) model developed in our laboratory by Mitne-Neto et al. (48), based on ALS8 patients' cells, has demonstrated that there is a reduction on the VAPB protein levels along motor neuron differentiation from iPSCs. These results complement other studies that show VAPB reduced levels in SALS patients and in *SOD1* mice (49,50). These and other findings (51,52) strengthen the evidences that iPSC-derived

motor neurons can recapitulate the disease phenotype. Interestingly, in this model the typical cytoplasmic inclusions found in overexpression VAPB systems or in patients carrying other mutations such as *TARDBP* (53,54) was not observed. Additionally, patient and control iPSC-derived motor neurons showed perinuclear localization of VAPB (Fig. 4), suggesting that late-onset disease models might not show a full phenotype in these early stages (discussed below). Studies using MNs derived from iPSCs of ALS patients with C9ORF72 hexanucleotide expansion, have correlated many aspects seen in vivo and in vitro as neuronal hyperexcitability (55). Besides the identification of intranuclear RNA foci, Sareen et al. (51) showed that antisense oligonucleotides against the expanded transcript could improve the expression profile of mutant cells.

Cocultivation of mutation-carrying astrocytes and motor neurons was also investigated. Serio et al. (2013) showed that, while astrocytes derived from ES cells and carrying a *SOD1* mutation showed a toxic effect on motor neurons (previously discussed; (34)), astrocytes derived from iPSCs carrying a TDP-43 mutation presented no toxicity for patient iPSC-derived motor neurons (56). The authors reported that the astrocytes derived from iPSC of patients with ALS carrying a TDP-43 mutation die earlier than control iPSC derived astrocytes. The different results observed in cellular and animal models show a clear necessity of understanding the ALS pathophysiology in deeper levels (56,57).

Some of the apparently conflicting results that arise when using iPSCs-derived models for ALS might be due to the fact that ALS is a late-onset disease, usually occurring between the fourth and fifth decades of life. iPSC originate from an

REVIEW ARTICLE

Figure 3. Main reprogramming strategies to transform somatic cells into iPSC, classified as integrative, excisable, nonintegrative, or DNA-free reprogramming vectors. Efficiency of transformation is also shown. Copyright CHS Press. Reproduced with permission (Ref 153).

“identity reset,” taking the cells back to an embryonic stage. Given the short life span of motor neurons in vitro, this may disguise some of the signs observed in tissues from affected individuals and animal models that would appear afterwards. One possible solution to this issue is to graft motor neurons or even neuronal progenitor cells derived from iPSC in mice

models, which could extend the survival of these cells; following these steps, a late recovery of the grafted cells from the mice might allow the visualization of ALS-related signs only seen in in vivo models and postmortem patient tissues. Another interesting (and possibly, more efficacious) strategy to induce aging-related features in iPSC-derived lineages is to

Figure 4. VAPB localization on iPSCs derived motor neurons (A) Perinuclear VAPB distribution on a GFP-positive motor neuron derived from a control iPSC clone and (H) from an ALS8. Bar = 20 μ m (48). Copyright Oxford University Press. Reproduced with permission (Ref 48).

express progerin, a truncated form of Lamin A associated with Progeria (premature aging). This was recently reported for dopaminergic neurons used as a model for Parkinson's disease generating many physiological signatures of the disease (58).

The progress in iPSC is currently extending to drug screenings. Recently, an iPSC-derived ALS model was generated from fibroblasts of patients carrying a mutation in the *TARDBP* gene (52). The resulting motor neurons showed many correlated aspects of the disease, including shorter neurites and a decrease in neurofilament mRNA levels. These motor neurons were also used for testing the efficacy of treatment with anacardic acid. An overall attenuation of the phenotype occurred and this result is most likely linked to the resulting down-regulation of *TARDBP* expression after drug administration (52).

Another recent iPSCs study focused on electrophysiological alterations observed in motor neurons derived from patients with mutations in *SOD1*, *FUS*, and *C9ORF72* (55). These cells presented a neuronal hyperexcitability that is usually observed in these ALS forms in vivo and in vitro. In this same work, the authors used retigabine (a drug already used as an anticonvulsant) to mitigate the disease-related signs in the three types of generated motor neurons, making it so far the study with the broadest drug screening in an iPSC-based model of ALS.

iPSCs could also be used to better understand the molecular pathways involved in sporadic ALS cases, which are the vast majority. Recently, iPSC-derived motor neurons derived from SALS patients were treated with 1757 different compounds in a high-throughput drug screening. In 20% of cases, MNs showed a de novo TDP-43 aggregation, and a correspondent postmortem tissue obtained from one of the patients validated this molecular phenotype. These TDP-43 cells were then used for drug screening, and some FDA-approved drugs such as Digoxin ameliorated this particular phenotype (59). With these high throughput screening advanced technology, and with an ever increasing efficiency of iPSC generation and differentiation, a personalized medicine approach for sporadic patients could become a real possibility. Patient MNs could be derived in vitro, analyzed for ALS hall-mark phenotypes, and consequently submitted to a drug screening that would reveal a possible effective treatment, which in its turn would hopefully stop disease progression.

CELL THERAPY

Stem cells have been considered for therapy purposes in a number of different diseases for which no efficient treatments are available. For ALS therapy, in particular, the most studied types of cells are NSC and mesenchymal stromal cells (MSC).

Neural Stem Cells NSC

One of the most actively studied cells for therapy in ALS are the NSCs. When dividing, these cells give rise to other NSCs and/or progenitor cells which progressively differentiate into neurons, astrocytes, or oligodendrocytes (60). They are characterized by the expression of markers such as Sox2, GFAP, Nestin, and Musashin 1 and 2, but no specific combi-

nation has been found to definitely distinguish NSCs from NPCs (78).

A great number of studies evaluating the therapeutic potential of NSCs in ALS models were performed (61,62). Recently, a well designed meta-analysis using the SOD1 (G93A) transgenic mouse model was performed by a consortium of 11 independent ALS investigators. In these experiments, transplanted NSCs (both mouse and human) were capable of slowing the onset and the progression of clinical signs. Prolonged survival was also seen in ALS mice. The beneficial effects of transplanted NSCs were mediated by a variety of processes, including the cells' ability to produce trophic factors, preserve neuromuscular function, and reduce astrogliosis and inflammation, which differs from the primary hypothesis of motor neuron regeneration (63).

The NSCs have also been used in a recent phase I clinical trial by NeuralStem, completed in 2012. A total of 12 patients were divided in two groups receiving 5 unilateral or 5 bilateral (10 total injections) each, with ~10.000 cells per injection at the lumbar level. These patients were followed for 18 months after treatment, and there was no evidence of disease progression due to the intervention (18). The cell delivery apparatus was patented by NeuralStem. In this delivery procedure, a guide needle is inserted into the spinal parenchyma, followed by the insertion of an injection needle through the guide needle horizontally into the spinal parenchyma; then, the injection needle is withdrawn while delivering substrate into the spinal cord (NeuralStem patent # US2010198189A1). A second phase I trial was concluded in 2013, attesting the safety of cervical and thoracolumbar spinal cord injections with the same cells (64). The phase II dose escalating trial (NCT01730716) was recently concluded in July with an estimated publication of preliminary results in 2015.

iPSC Therapy—Can It Happen?

The idea of transforming adult cells into NSCs is very attractive for therapy. iPSCs can be obtained from the patients' cells, since they share the same MHC molecules as the patient's immune system the risk of rejection is greatly reduced, and the ethical issues concerning the source of ESCs is avoided.

A recent work generated and purified a specific NSC population from human iPSCs, based on high aldehyde dehydrogenase activity, low side scatter, and integrin VLA4 positivity by FC. After intrathecal or intravenous injections of these cells into SOD1-mutated mice, NSCs migrated and engrafted into the central nervous system of the treated ALS mice, which exhibited improved neuromuscular function and motor unit pathology and significantly increased life span. These positive effects are linked to multiple mechanisms, including production of neurotrophic factors and reduction of microglia and macroglia. According to this study, minimally invasive injections (intravenous) of iPSC-derived NSCs could exert a therapeutic effect in ALS (65).

Despite preclinical evidences, the therapeutic use of cells generated from iPSC is still a highly debated issue. First, the safety of this method should be ascertained, since these cells

REVIEW ARTICLE

have a well-known tumorigenic potential (39). Another important issue concerning iPSCs is that there are many reprogramming protocols with different efficiency (66,67). Recent publications including novel transcription factors and chemical compounds (68,69) that substitute a reprogramming factor illustrate the lack of a gold standard protocol ensuring both reprogramming efficiency and safety for therapeutic uses. In addition, a protocol for separation of differentiated and nondifferentiated must be established, since nondifferentiated cells represent serious risk due to their oncogenicity.

Thus far, iPSCs have mostly been employed for the derivation of ALS models, which allow a better understanding of mechanisms behind motor neuron death, and also for drug screening, aiming the selection of compounds that might have the ability to reduce or stop disease progression and/or postpone symptom onset (70). Aiming to circumvent the issues of therapeutic use of iPSCs, Wook Han and coworkers used a combination of transcription factors (Brn4, Sox2, Klf4, and c-Myc) to induce mouse fibroblasts to directly acquire a NSC identity. These induced NSCs (iNSCs), exhibit cell morphology, gene expression, epigenetic features, differentiation potential, self-renewing capacity, as well as in vitro and in vivo functionality similar to those of wild-type NSCs (71). Adult cells might now be used as potential sources of NSCs without the need of an iPSC reprogramming stage.

Mesenchymal Stromal Cells

The terms “stromal stem cells” and “MSCs,” established respectively by Owen in 1988 (72) and Caplan in 1991 (73), refer to a group of cells thought to have a common progenitor in the mesenchyme (74). In 1999, the capacity of these bone-marrow derived mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) to differentiate into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages was firstly demonstrated (75). Subsequently, some parameters had to be established for the correct classification of these cells.

According to the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, there are three minimum criteria for defining human mesenchymal stem cells: (1) MSCs must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions; (2) MSCs must express CD105, CD73, and CD90, and lack expression of CD45, CD34, CD14, or CD11b, CD79a or CD19, and HLA-DR surface molecules, and (3) MSCs must differentiate to osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes in vitro (76,77). MSCs have been isolated from almost all adult tissues, including bone marrow (78), adipose tissue (79), umbilical cord tissue (80), and others. Since these cells are obtained from adult tissue sources, the application of MSCs does not involve ethical concerns (81,82), and because ALS does not affect MSC expansion and differentiation potential (83), cells can be obtained from the own patient, thus avoiding rejection.

Classic Model of Tissue Regeneration Versus MSC Transdifferentiation

The prominent regenerative potential of these adult stem cells in organs such as liver (84), muscle (85) and heart (86) has been widely studied. However, when it comes to neurode-

generative diseases, NSCs may have a therapeutic advantage over MSCs, since the latter have mesodermal origin and thus their ability to transdifferentiate into neuronal cells of ectodermal origin is questionable (87).

Neurogenin 1 (Ngn1) is a proneural basic helix-loop-helix transcription factor, reported to be sufficient for reprogramming the mesodermal cell fate of human MSCs into a neuronal fate (88). In a recent and well-designed experiment, bone marrow-derived MSCs transduced with a retroviral vector encoding Ngn1 (MSCs-Ngn1) were intravenously injected in an ALS murine model carrying a *SOD1* mutation, and the effectiveness of non-neural (unprocessed) and neural-induced MSCs, Ngn1-expressing MSCs (MSCs-Ngn1) was compared, aiming future ALS treatment. In this study, the MSCs-Ngn1, but not the unprocessed MSC, exhibited a neuron-like morphology, and showed expression of the neuron-specific proteins NeuN, NF200, and MAP2 after induced terminal differentiation in vitro. Unlike the unprocessed MSC, the transplantation of MSCs-Ngn1, prevented the loss of ventral motor neurons, and increased cervical and lumbar neuron survival in 38 and 24%, respectively (89).

Furthermore, MSCs-Ngn1 delayed disease onset if transplanted during preonset ages, whereas unprocessed MSCs failed to do so. If transplanted near the onset ages, a single treatment with MSCs-Ngn1 was shown to be sufficient to enhance motor functions during the symptomatic period, whereas unprocessed MSCs required repeated transplantation to achieve similar levels of motor function improvement (89), showing the importance of an early (and, if possible, pre-symptomatic) diagnosis.

Differently from the results obtained by a previous study of this same group (88), most grafted cells in the spinal cord of the *SOD1* mice did not express neuronal, microglial or astrocyte markers, showing that transplanted MSCs-Ngn1 had the potential to efficiently migrate from the circulation into the CNS regions, but persisted as undifferentiated cells (89). These results suggest that the beneficial effect of the MSC-Ngn1 cells in *SOD1* mice were due to a higher tropism for the affected areas in the neuroaxis, differently from what happens to unprocessed MSCs (demonstrated by a migration assay), thereby increasing the amount of released factors and thus extending neuroprotective effects.

Released Factors from MSCs

Besides tissue regeneration stem-cell based tissue repair is currently believed to occur through the paracrine secretion of factors. The list of these MSC-released factors increases constantly and it is known that they exert diverse biological functions, such as immunomodulation, antiscarring, chemoattraction, improvement and support of angiogenesis, antiapoptotic effects, or even proliferation/differentiation potential (90). The secretion of these biomolecules could promote the regulation of postinjury tissue remodeling, activation of endogenous repair/regeneration mechanisms, and attenuation of undesirable immune response (91–97).

It has also been shown that specific subpopulations of MSCs secrete some neuroregulatory molecules, such as brain

derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (98), and other molecules that, despite not being classified as “neuroregulatory,” act on neuronal cells (such as GLP-1; (99,100)). In the CNS, these molecules can promote beneficial effects such as stimulation of intrinsic autocrine survival, neurite outgrowth, and axon guidance. They also promote a correct connectivity in the brain and spinal cord, influence dendrite, and synapse formation, and influence proliferation, migration, and differentiation of stem cells in the developing adult nervous system (reviewed in Ref. 101)).

The neurotrophic factor, BDNF, tested in preclinical studies, and clinical trials was shown to be safe for therapy, but it failed as a potential therapeutic drug (101). Some hypotheses were raised to explain these results. However, it is not clear whether BDNF is able to cross the blood-brain barrier; and on the other, it is possible that the BDNF molecule itself was not the ideal growth factor to be tested clinically (101).

Another MSC-secreted molecule was tested in three Phase III clinical trials. IGF-1 (also classified as neuroregulatory) was injected subcutaneously in patients, but also failed to produce consistent and meaningful effects. After injections, the decaying of motor neuron function was reduced, but not bulbar function, and the patients did not show any vital capacity increase. One hypothesis to explain these results was the gravitational effect acting on the medication, since injections were at the spinal level of intrathecal delivery (102).

Aiming a continuous release of the neurotrophic factor in the CNS, a recent work used an interesting strategy. After human MSCs were transfected with the GLP-1 gene, whose protein has neuroprotective (99,100) and antioxidant (103) properties in the brain, the encapsulation of these cells into a biopolymer material was performed to prevent rejection when transplanted into mice (104). The intracerebroventricular injection of GLP-1 producing MSC capsules in presymptomatic SOD1 (G93A) mice significantly prolonged survival, delayed symptom onset and weight loss, and led to significant improvements in motor performance tests compared to vehicle treated controls (105).

MSC Based Therapy—Clinical Trials

Based on the growing number of studies indicating the safety and feasibility of cell therapy with MSCs isolated from bone marrow (106,107), a Phase I clinical trial was performed with 10 ALS patients. Autologous bone marrow-derived MSCs were transplanted into the spinal cord at a high thoracic level and the patients were regularly monitored before and after transplantation by clinical, psychological, neuroradiological, and neurophysiological assessments. This study confirmed that MSC transplantation into the spinal cord of ALS patients is safe and that MSCs might have a clinical use for future ALS cell based clinical trials (108). No severe morbidity was associated with the surgical procedure. However, to maximize the safety of direct parenchymal injection, the authors suggest the use of a recently standardized microinjection platform (similar to the previously mentioned one patented by NeuralStem) to reduce eventual side effects in the surgery and

facilitate MSC transplantation in the critical regions of the spinal cord (108,109). Hypothesizing that the main activity of the cells should be at the transplanted segments, the authors also suggest the application of cells in the cervical segments of the spinal cord to increase the potential benefit of MSCs therapy (108).

Another Phase I/II clinical trial was performed in the Hadassah Hebrew University Hospital (Jerusalem, Israel), with a total of 34 patients: 15 with intractable multiple sclerosis (MS), and 19 with progressive ALS. To maximize the potential therapeutic benefits by accessing the CNS through the cerebrospinal fluid and the systemic circulation, the autologous injections were combined intrathecally and intravenously. In addition, nine patients received MSCs labeled with ferumoxide (Feridex) to track cell migration after local grafting. Only mild adverse effects were reported during the 6-month follow-up. Meningeal irritation and aseptic meningitis was observed in one patient and the researchers attributed this effect to residual dimethyl sulfoxide in the culture medium. The mean ALSFRS score, an instrument for evaluating the functional status of ALS patients, remained stable during the first six months of observation and the EDSS score (method of quantifying disability in MS) declined gradually, indicating functional improvement. Magnetic resonance imaging (MRI) of the labeled MSCs indicated their possible dissemination from the site of inoculation to the occipital horns, meninges, and spinal cord parenchyma. To assess the immunological effects of MSC transplantation, lymphocyte subsets and cytokine production were also evaluated. Stronger changes than those induced by the conventional immunomodulatory medications were found in the treated patients, pointing to a down-regulation of activated lymphocytes and antigen-presenting cells after MSC transplantation.

Amongst the initiatives with MSC trials, the leading trial is Brainstorm's, which uses NurOwn cells—bone marrow-derived MSCs taken from the patient and induced to produce large amounts of neurotrophic factors (www.brainstorm-cell.com). A phase I (NCT01051882) and a phase IIa (NCT01777646) trial have been recently concluded, and a phase II (NCT02017912) will be carried out with 48 patients in a multicentric study (www.clinicaltrials.org).

From Myth to Fact—Questions to be Addressed

In vivo function of MSCs and heterogeneity. The real in vivo function and physiological role of MSCs is still poorly understood. Recently, Waterman and coworkers observed that the stimulation of specific Toll-like receptors (TLRs) affects the immune modulating responses of human MSCs. The polarization of TLR4 or TLR3 receptors yielded two different MSCs lineages named MSC1 and MSC2, respectively. MSC1 mostly elaborate pro-inflammatory mediators, while MSC2 express mostly immunosuppressive ones (110). Taking these results into account, it is possible that MSCs might act differently according to the microenvironment status of the patient. Indeed, this “priming” of MSCs before transplantation is under consideration for some complex diseases such as cancer. MSC1-based therapy was capable of attenuate tumor growth

REVIEW ARTICLE

in vitro and in vivo while both MSC2-based and unprocessed MSC-based were not (111). Besides evaluating different outcome of these distinct populations, the “priming” of MSCs prior to injection allows a more standardized cell therapy.

Another issue to be considered is that the MSC isolation process itself results in a heterogeneous population composed by distinct cell types with different morphologies, differentiation potential and expression of surface markers. These differences are also related to their biological properties (112,113). Therefore, studies evaluating outcomes of MSC therapy with cells obtained from different donors are very important, especially due to the possibility of using autologous transplants for future treatments.

The cell sorting technique has been used to identify and purify subpopulations of MSCs (114–117). One particular subset of cells, namely, pericytes, which express the CD146 surface marker, could be of great use for ALS. Pericytes surround endothelial cells in capillaries and microvessels (118) and adventitial cells around larger vessels (114). The therapeutic potential of pericytes was attested for some conditions, such as muscle-linked diseases (119,120) and myocardium infarction (121). In these experiments, pericytes were shown to migrate and exert paracrine functions.

In the central nervous system, pericytes assist the formation and maintenance of the blood brain barrier, which, when impaired in neurodegenerative diseases, accelerates progression of symptoms (122). In ALS patients, a 50% reduction of pericytes is found in the blood-spinal cord barrier (123). The evaluation of these cells' therapeutic effect in ALS models is very important and is currently being carried out in our laboratory. These are examples where FC and other cell-sorting techniques are key tools that allow us to better understand the biology of determined cell types, helping to better design an efficient cell therapy.

Cell quantity and injection protocols. Protocols used for cell transplantations in SOD1 mice are quite diverse, and one of the main variations is the number of cells per injection. It was shown that, in SOD1 mice, a high-dose transplant (3.9×10^5 cells) of neuronal hNT cells does not provide any additional benefit when compared with a lower-dose transplant (1.3×10^5 cells; (124), but when it comes to injecting mononuclear human umbilical cord blood cells into the same mouse model, a cell dose of 25×10^6 cells had the most beneficial effect on many therapeutic parameters than a lower (10×10^6) or higher dose (50×10^6) (125). Thus, the optimal amount of cells to be injected may vary according to the cell type.

Another important issue is the number of injections during the treatment period, allowing MSCs (or other cells used in therapy) to remain in contact with the damaged tissue for longer periods of time which could increase their beneficial effects. One previously mentioned study showed that two injections of 10^6 neural-induced MSCs in SOD1 mice led to a higher efficacy when compared with results obtained with a single dose (89). A triple injection of MSCs into the cerebro-

spinal fluid of SOD1 mice yielded significant therapeutic effects, including attenuated weight loss, enhanced motor performance, decreased motor neuron loss, and increased survival whereas a single transplantation did not alter disease progression (126).

Although there is increasing evidence that the optimal amount of cells and the transplantation method are crucial aspects for the therapy to succeed, only a few studies have been specifically designed to investigate these practical issues. Also, these studies illustrate that there are physiological differences among cells obtained from different tissues emphasizing the need to better understand the influence of the original niche in cell interaction and its role in determining what type of cell is the best to be administered.

Site of injection. Some clinical trials involving neurological diseases have shown that intraspinal injection of cells is a safe procedure (108,127). In another scenario, several clinical trials with non-neurological diseases have indicated that intravenous administration of MSCs is also a safe procedure (128,129). New approaches, such as the phase II clinical trial led by Brainstorm Company are also considering intramuscular injection of cells for ALS therapy. An important question to be addressed is which injection site for MSCs could yield the best results.

However, intraspinal (intrathecal) injections may facilitate the migration of MSCs through the neuroaxis since cells would be placed near the damaged tissue. However, intrathecal injections are a risky procedure and can lead to several side effects. Microinjection platforms, like the one patented by NeuralStem, are being developed and standardized to reduce eventual side effects from surgery and optimize the procedure, allowing the delivery of cells along the entire length of the spinal cord with only one injection (109).

Intravenous injection is a simple technique with few risks involved. Despite the lower risks, many cells may eventually end up homing to other tissues such as lungs and lymph nodes (127), interfering with systemic homeostasis and reducing the total number of cells available for engraftment in the damaged tissue (127). Even so, it has been shown that MSCs may migrate through the blood to the damaged areas of the CNS in response to inflammatory signals, and also that they are capable of exerting peripheral immunomodulating effects (130,131). This migration may be a consequence of the breakdown of blood vessels in the region where the tissue degenerates (89), or may occur through transiently formed intercellular gaps on the BBB (132).

Much attention has been given to spinal injections and intravenous injections, and only recently scientists are starting to show interest in injecting cells at the neuromuscular junctions. The motor neurons, before dying, retract, hampering these junctions, and, consequently, muscle function (133). If the neuronal protection is to start at the earliest stages possible, it may be interesting to promote such preservation on the sites that suffer the earliest injuries. The delivery route adopted for cell injection has an important role in

determining whether MSCs will be susceptible to early immunological recognition and rejection (134), and influences therapeutic efficiency, determining the success or failure of a particular treatment. To help circumvent these issues, methods for tracking the injected cells must be included in the research/therapy. MRI, positron emission tomography imaging and other cell imaging techniques are tools that could be extremely useful (135).

Donor age and autologous × allogeneic transplant. MSCs obtained from ALS patients' bone marrow have shown the same expansion and differentiation potential as cells obtained from healthy controls (83). Recently, possible correlations between certain biological markers and efficacy for autologous MSC transplant treatment was investigated. The levels of VEGF, ANG, and TGF- β were significantly higher in cultured autologous MSCs from ALS patients that responded to the therapy than in nonresponders patients (136).

However, in an autologous cell-based therapy for this late-onset disease, another factor must be taken into consideration: MSCs can suffer the effects of ageing (137), limiting the extension of autologous transplant, especially for late-onset diseases such as ALS. An overall decline in efficacy in cell therapy happens with the increase of both the age of the donor and the recipient (138,139). In addition, since a substantial number of ALS cases is genetic, the autologous transplant could be potentially harmful. Some of the proteins mutated in ALS are secreted (such as VAPB, for instance), raising the possibility of an additional motor neuron damage.

Heterologous transplantation is under investigation for NSCs (obtained from an 8-week-old aborted fetus) in ALS patients as mentioned before. In these trials, the immunosuppression protocol was designed based on a standard protocol used for whole organ transplantation, since there was no previous experience with immunogenicity of transplantation of allogeneic fetal-derived stem cells into the nervous system. In these studies, the majority of nonserious adverse events were attributed to the toxicities of the immunosuppressant drugs. Besides of being toxic to patients, steroidal immunosuppressants were found to completely abolish the therapeutic effect exerted by MSCs on a mouse model of liver cirrhosis (140). This specific issue must be better analyzed since it may hinder these trials.

Interestingly, it has been hypothesized that MSCs may have a certain degree of "immunological privilege," since they have been effective for allogeneic cell therapies and xenogeneic transplants as well (141,142). If MSCs have such strong immunomodulatory capacities, they might even be obtained from a young, healthy donor, and administered without any immunosuppressants, benefiting patients significantly.

It was observed that MSCs can modulate both innate and adaptive immunity by releasing molecules such as the Factor H (inhibiting the complement, and thus avoiding acute and hyperacute rejection mechanisms normally mediated through this system); prostaglandins and indoleamine dioxygenase, which suppress the effector functions of NK cells (that play a

key role in the initiation and regulation of adaptive immune responses after transplantation); last but not least, PD1/PDL1, which inhibits B cell activation with a role in chronic rejection (134,143).

MSC transformation after in vitro expansion. MSC transplantation, like all cell therapies, requires the expansion of cells in culture before injection. Although it has been shown that MSC are less prone to genetic abnormalities and malignant transformation during multiple passages in vitro (144,145), other studies show that MSCs can undergo malignant transformation after in vitro expansion (146). A recent study demonstrated that MSCs already show a significant increase in chromosomal aberrations after their fifth passage (147). Thus, routine procedures to check the possible transformation, chromosomal abnormalities and telomere shortening of these cells should be included in preclinical and clinical trials as a quality control to ensure the safety of the method.

Since karyotype analysis before every round of injections is very laborious, focusing on a simpler method for observing DNA abnormalities would be very productive. Some attempts to do so are occurring in the field of cancer research with the high-resolution DNA FC (148), guaranteeing the safety of the cells to be injected in therapy. Cells containing DNA abnormalities have a higher transformation potential.

FINAL CONSIDERATIONS

Finding a therapy for ALS is a great challenge. Different pathways culminating into the same symptoms point out to more than one solution. Even so, many important steps have been made, and there is some consensus regarding the types of therapy best suited for ALS. Cell replacement therapies for motor neurons seem highly unlikely, due to the necessity of the correct engraftment and innervation, the maintenance of a nontoxic environment and the control of the noncell-autonomous pathways that could culminate into motor neuron death. Preclinical studies have been performed transplanting motor neurons into mice with ALS, but without much success. However, neuronal protection seems a very promising therapy. With neurotrophic factors being released by transplanted NSCs or MSCs, the disease onset might be delayed and/or disease progression might decelerate and, hopefully, stop altogether. With this in mind, it is necessary to plan carefully injection protocols, immunosuppressant regimen, injection sites and cell type to be administered to guarantee that these factors will not hamper the trials.

While the therapy with NSCs under investigation by the NeuralStem company seem promising for ALS treatment, one must not forget that the cells were obtained from an 8-week old aborted fetus. Before approval in clinical trials, some ethical questions and discussions may probably arise again. Since the only source of native NSCs is the nervous system, will we be able to use them in a larger scale for all patients? The advantages of MSCs, like the facility to obtain them without ethical issues, their immunomodulatory properties and their production of important neurotrophic factors, turn them into

REVIEW ARTICLE

the best-suited cells for therapy. However, a more profound knowledge of the “black-box” of MSC secretion must be understood before assuming their beneficial effects. What do these cells secrete *in vivo*, and how do these molecules act on motor neurons and their surrounding cells? Do cells obtained from patients have a potential harmful effect?

Another important factor that directly impacts all clinical trials and studies is the fact that the diagnosis for ALS may take up to 14 months (149). Therefore, it is imperative to diagnose the disease in the earliest possible stages. As suggested for Parkinson's disease and Alzheimer's disease, iPSC models could provide excellent tools and opportunities to investigate the course of changes during the disease progression, from the asymptomatic phases through the later stages when the pathology has become prominent (150). Early diagnosis would increase the chances of more successful clinical trials, since neuron degeneration may be well advanced when the symptoms starts.

In summary, preclinical studies with MSCs and NSCs show exciting results. There are, however, parameters that must be reconsidered when it comes to clinical trials in ALS patients, as mentioned above. If overlooked, they may delay therapeutic progress, and even contribute to the lack of positive results reported for most ALS trials. To eventually transform cell therapy for ALS from myth to fact, important issues addressed in the present review should be taken into consideration.

LITERATURE CITED

- Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:248–264.
- Ringholz GM, Appel SH, Bradshaw M, Cooke NA, Mosnik DM, Schulz PE. Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 2005;65:586–590.
- Brooks BR, El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial. *J Neurol Sci* 1994;124 (Suppl):96–107.
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293–299.
- De Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 2008;119:497–503.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001;29:160–165.
- Orlacchio A, Babalini C, Borreca A, Patrono C, Massa R, Basaran S, Munhoz RP, Rogaeva EA, St George-Hyslop PH, Bernardi G, Kawarai T. SPATACIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2010;133:591–598.
- Al-Saif A, Al-Mohanna F, Bohlega S. A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2011;70:913–919.
- Chen Y-Z, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin B, Nicholson G, Auer-Grumbach M, Wagner K, De Jonghe P, Griffin JW, Fischbeck KH, Timmerman V, Cornblath DR, Chance PF. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 2004;74:1128–1135.
- Van Hoeck A, Schoonaert L, Lemmens R, Timmers M, Staats KA, Laird AS, Peeters E, Philips T, Goris A, Dubois B, Andersen PM, Al-Chalabi A, Thijs V, Turnley AM, van Vught PW, Veldink JH, Hardiman O, Van Den Bosch L, Gonzalez-Perez P, Van Damme P, Brown RH, van den Berg LH, Robberecht W. EPHA4 is a disease modifier of amyotrophic lateral sclerosis in animal models and in humans. *Nat Med* 2012;18:1418–1422.
- Henkel JS, Beers DR, Wen S, Rivera AL, Toennis KM, Appel JE, Zhao W, Moore DH, Powell SZ, Appel SH. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol Med* 2013;5:64–79.
- Chesi A, Stahl BT, Jovčić A, Couthous J, Fasolino M, Raphael AR, Yamazaki T, Elias L, Polak M, Kelly C, Williams KL, Fiftita JA, Maragakis NJ, Nicholson GA, King OD, Reed R, Crabtree GR, Blair IP, Glass JD, Gitler AD. Exome sequencing to identify de novo mutations in sporadic ALS trios. *Nat Neurosci* 2013;16:851–855.
- Daoud H, Zhou S, Noreau A, Sabbagh M, Belzil V, Dionne-Laporte A, Tranchant C, Dion P, Rouleau GA. Exome sequencing reveals SPG11 mutations causing juvenile ALS. *Neurobiol Aging* 2012;33:839.e5–839.e9.
- Johnson JO, Piro EP, Boehringer A, Chia R, Feit H, Renton AE, Pliner HA, Abramson Y, Marangi G, Winborn BJ, Gibbs JR, Nalls MA, Morgan S, Shaoi M, Hardy J, Pittman A, Orrell RW, Malaspina A, Sidle KC, Fratta P, Harms MB, Baloh RH, Pestronk A, Weihl CC, Rogaeva E, Zinman L, Drory VE, Borghero G, Mora G, Calvo A, Rothstein JD, Drepper C, Sendtner M, Singleton AB, Taylor JP, Cookson MR, Restagno G, Sabatelli M, Bowser R, Chiò A, Traynor BJ. Mutations in the *Matrin 3* gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2014;17:664–666.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2011;7:616–630.
- Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, Halloran MA, Gleeson PA, Blair IP, Soo KY, King AE, Atkin JD. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet* 2014;23:3579–3595.
- Cui YW, Kawano Y, Yamasaki R, Shi N, Masaki K, Isoe N, Yonekawa T, Matsushita T, Tateishi T, Hayashi S, Kira J. Decreased CCR2 and CD62L expressions on peripheral blood classical monocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Exp Neurol* 2014;5:92–96.
- Glass JD, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Kelly C, Feldman EL. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* 2012;30:1144–1151.
- Feldman EL, Boulis NM, Hur J, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, Bordeau J, Sakowski SA, Glass JD. Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: Phase 1 trial outcomes. *Ann Neurol* 2014;75:363–373.
- Marrali G, Casale F, Salamone P, Fuda G, Caorsi C, Amoroso A, Brunetti M, Restagno G, Barberis M, Bertuzzo D, Canosa A, Moglia C, Calvo A, Chiò A. NADPH oxidase (NOX2) activity is a modifier of survival in ALS. *J Neurol* 2014;261:2178–2183.
- Pickles S, Destroismaisons L, Peyrard SL, Cadot S, Rouleau GA, Brown RH, Julien P, Arbour N, Yande Veldt C. Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Hum Mol Genet* 2013;22:3947–3959.
- Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–1147.
- Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: Lessons from embryonic development. *Cell* 2008;132:661–680.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110:385–397.
- Shin S, Dalton S, Stice SL. Human motor neuron differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2005;14:266–269.
- Echeland Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993;75:1417–1430.
- Briscoe J, Ericson J. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:43–49.
- Roya NS, Nakano T, Xueing L, Kang H, Nedergaard M, Goldman SA. Enhancer-specific GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2005;196:224–234.
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boille S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siewek D, Ferrante RJ, Brown RH, Julien J-P, Goldstein LSB, Cleveland DW. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302:113–117.
- Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 2008;3:637–648.
- Marchetto MCN, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:649–657.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AHM, Kaspar BK. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol* 2011;29:824–828.
- López-González R, Kunkles P, Velasco I. Transient recovery in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of motor neurons derived from mouse embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2009;18:1171–1181.
- Wada T, Goparaju SK, Tooi N, Inoue H, Takahashi R, Nakatsuji N, Aiba K. Amyotrophic lateral sclerosis model derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant superoxide dismutase 1. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:396–402.
- Yang YM, Gupta SK, Kim KJ, Powers BE, Cerqueira A, Wainger BJ, Ngo HD, Rosowski KA, Schein PA, Akeifi CA, Arvanites AC, Davidow LS, Woolf CJ, Rubin LL. A small molecule screen in stem-cell-derived motor neurons identifies a kinase inhibitor as a candidate therapeutic for ALS. *Cell Stem Cell* 2013;12:713–726.
- Cudkowicz M, Bozik ME, Ingersoll EW, Miller R, Mitsumoto H, Shefner J, Moore DH, Schoenfeld D, Mather JL, Archibald D, Sullivan M, Amburgey C, Moritz J, Gribkoff VK. The effects of dexamipexole (KNS-760704) in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 2011;17:1652–1656.
- Sunayach C, Michaud M, Arnoux T, Bernard-Marissal N, Aebischer J, Latyszenok V, Gouarné C, Raoul C, Pruss RM, Bordet T, Pettmann B. Oleosin delays muscle denervation, astrogliosis, microglial activation and motoneuron death in an ALS mouse model. *Neuropharmacology* 2012;62:2346–2352.

38. Blokhuis AM, Groen EJN, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2013;125:777–794.
39. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
40. Shtrichman R, Germanguz I, Eldor JJ. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from different cell sources and their potential for regenerative and personalized medicine. *Curr Mol Med* 2013;13:792–805.
41. Gourronc FA, Klingelhuysen AJ. Therapeutic opportunities: Telomere maintenance in inducible pluripotent stem cells. *Mutat Res* 2013;730:98–105.
42. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1:55–70.
43. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448:318–324.
44. Gore A, Li Z, Fung H-L, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, Lee J-H, Loh Y-H, Manos PD, Montserrat N, Panopoulos AD, Ruiz S, Wilbert ML, Yu J, Kirkness EF, Izpisua Belmonte JC, Rossi DJ, Thomson JA, Eggan K, Daley GQ, Goldstein LSB, Zhang K. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:63–67.
45. Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AA, Caspi I, Lara-astasio D, Blecher-gonen R, Shipony Z, Mukamel Z, Hagai T, Gilad S. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013;502:65–70.
46. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218–1221.
47. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HCA, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JRM, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 2004;75:822–831.
48. Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MCNM, Bengtson MHM, Joazeiro CCA, Tsuda H, Bellen HJH, Silva HHC, Oliveira ASBA, Lazar M, Muotri AAR, Zatz M. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS patients. *Hum Mol Genet* 2011;20:3642–3652.
49. Teuling E, Ahmed S, Haasdjik E, Demmers J, Steinmetz MO, Akhmanova A, Jaarsma D, Hoogenraad CC. Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic reticulum-derived tubular aggregates. *J Neurosci* 2007;27:9801–9815.
50. Anagnostou G, Akbar MT, Paul P, Angelinetta C, Steiner TJ, de Belleruche J. Vesicle associated membrane protein B (VAPB) is decreased in ALS spinal cord. *Neurobiol Aging* 2008;31:969–985.
51. Sareen D, O'Rourke JG, Meera P, Muhammad A, KMG, Grant S, Simpkinson M, Bell S, Carmona S, Ornelas L, Sahabian A, Gendron T, Petrucelli L, Baughn M, Ravits J, Harms MB, Rigo F, Bennett CF, Otis TS, Svendsen CN, Baloh RH. Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9orf72 repeat expansion. *Sci Transl Med* 2013;5:208ra149.
52. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 2012;4:145ra104.
53. Nishihira Y, Tan C-F, Onodera O, Toyoshima Y, Yamada M, Morita T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 2008;116:169–182.
54. Zhang H, Tan C-F, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. TDP-43-immunoreactive neuronal and glial inclusions in the neostriatum in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Acta Neuropathol* 2008;115:115–122.
55. Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SSW, Sandoe J, Perez NP, Williams LA, Lee S, Boulting G, Berry JD, Brown RH, Cudkowicz ME, Bean BP, Eggan K, Woolf CJ. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep* 2014;7:1–11.
56. Serio A, Bilican B, Barnada SJ, Ando DM, Zhao C, Siller R, Burr K, Haghi G, Story D, Nishimura AL, Carrasco MA, Phatnani HP, Shum C, Wilmut I, Maniatis T, Shaw CE, Finkbeiner S, Chandran S. Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:4697–4702.
57. Bilican B, Serio A, Barnada SJ, Nishimura AL, Sullivan GI, Carrasco M, Phatnani HP, Puddfoot CA, Story D, Fletcher J, Park I-H, Friedman BA, Daley GQ, Wyllie DJA, Hardingham GE, Wilmut I, Finkbeiner S, Maniatis T, Shaw CE, Chandran S. Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:5803–5808.
58. Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim J, Kriks S, Taldone T, Fusaki N, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ, Studer L. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 2013;13:691–705.
59. Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, Barnes J, Dang V, Lievers J, Shoukat-Mumtaz U, Martinez R, Gai H, Blake R, Vaisberg E, Grskovic M, Johnson C, Irion S, Bright J, Cooper B, Nguyen L, Griswold-Prenner I, Javaherian A. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2013;56:355–364.
60. De Filippis L, Binda E. Concise review: Self-renewal in the central nervous system: Neural stem cells from embryo to adult. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:298–308.
61. Xu L, Yan J, Chen D, Welsh AM, Hazel T, Johe K, Hatfield G, Koliastos VE. Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation* 2006;82:865–875.
62. Hefferan MP, Galik J, Kakinohana O, Sekerkova G, Santucci C, Marsala S, Navarro R, Hruska-Plochan M, Johe K, Feldman E, Cleveland DW, Marsala M. Human neural stem cell replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis by spinal transplantation. *PLoS One* 2012;7:e42614.
63. Teng YD, Benn SC, Kalkanis SN, Shefner JM, Onario RC, Cheng B, Lachyankar MB, Marconi M, Li J, Yu D, Han I, Maragakis NJ, Llido J, Erkmn K, Redmond DE, Sidman RL, Przedborski S, Rothstein JD, Brown RH, Snyder EY. Multimodal actions of neural stem cells in a mouse model of ALS: A meta-analysis. *Sci Transl Med* 2012;4:165ra164.
64. Riley J, Glass J, Feldman EL, Polak M, Bordeau J, Federici T, Johe K, Boulis NM. Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A phase I trial, cervical microinjection, and final surgical safety outcomes. *Neurosurgery* 2014;74:77–87.
65. Nizzardo M, Simone C, Rizzo F, Ruggieri M, Salani S, Riboldi G, Faravelli L, Zanetta C, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDH1b5SCs/VLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model. *Hum Mol Genet* 2014;23:342–354.
66. Federation AJ, Bradner JE, Meissner A. The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends Cell Biol* 2014;24:179–187.
67. Wolffen K, Michael JP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämaläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung H-K, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009;458:766–770.
68. Romano G, Morales F, Marino IR, Giordano A. A commentary on iPSCs: Potential applications in autologous transplantation, study of illnesses and drug screening. *J Cell Physiol* 2014;229:148–152.
69. Ma T, Xie M, Laurent T, Ding S. Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circ Res* 2013;112:562–574.
70. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:51–59.
71. Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Höing S, Araujo-Bravo MJ, Zaehres H, Wu G, Frank S, Moritz S, Greber B, Yang JH, Lee HT, Schwamborn JC, Storch A, Schöler HR. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012;10:465–472.
72. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63–76.
73. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–650.
74. Caplan AL. Mesenchymal stem cells: Cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198–1211.
75. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
76. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.
77. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FMP, Lacerda SMSN, Lalwani P, Santos AK, Gomes KN, Ulrich H, Khara AH, Resende RR. Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A* 2014;85A:43–77.
78. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71–74.
79. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: Basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int* 2012;2012:461718.
80. Seco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008;26:146–150.
81. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: General, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med* 2010;8:131.
82. Pfeiffer P, Keller T, Hantusch B, Hoffmann TS, Kenner L. [Stem cells-cloning, plasticity, bioethics]. *Wien Med Wochenschr* 2008;158:493–502.
83. Ferrero I, Mazzini L, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, Testa L, Nasuelli N, Oggioni GD, Fagioli F. Bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cell Transplant* 2008;17:255–266.
84. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Hengariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11–16.
85. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AE, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am J Differ Hum Skelet Muscle Cells* 1999;6:22–26.
86. Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol* 2005;100:471–481.
87. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 2004;77:174–191.
88. Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: A review. *J Neurosci Res* 2009;87:2183–2200.
89. Choi C-L, Lee Y-D, Kim H, Kim SH, Suh-Kim H, Kim S-S. Neural induction with neurogenin 1 enhances the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in an ALS mouse model. *Cell Transplant* 2012;21:41.

REVIEW ARTICLE

90. Meirelles LDS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:419–427.
91. Péault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 2007;15:867–877.
92. Segen VFM, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 2008;451:937–942.
93. Ballard VLT, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ Res* 2007;100:1116–1127.
94. Bhagavati S. Stem cell based therapy for skeletal muscle diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:219–228.
95. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* 2009;218:237–245.
96. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006;441:1094–1096.
97. Oliveira SLB, Pillat MM, Cheffer A, Lameu C, Schwindt TT, Ulrich H. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. *Cytometry A* 2013;83A:76–89.
98. Grigler L, Robey RC, Asawaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol* 2006;198:54–64.
99. Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:881–888.
100. During MJ, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 2003;9:1173–1179.
101. Henriques A, Pitzer C, Schneider A. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: Where do we stand? *Front Neurosci* 2010;4:32.
102. Nanette J, Geralyn A, Louisa W, Scott O, Gerhard B, Nolta J, Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolta A. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 2010;5:933–946.
103. Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res* 2003;72:603–612.
104. Lindvall O, Wahlberg LU. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: A novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol* 2008;209:82–88.
105. Sarah Knippenberg, Nadine T, Dengler R, Brinker T, Petri S. Intracerebroventricular injection of encapsulated human mesenchymal cells producing glucagon-like peptide-1 prolongs survival in a mouse model of ALS. *PLoS One* 2012;7:e36857.
106. Ferrari G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528–1530.
107. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Vorkis EM, Papanichail M. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005;65:321–329.
108. Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, Rustichelli D, Gunetti M, Mareschi K, Testa L, Stecco A, Tarletti R, Miglioretti M, Fava E, Nasulli N, Cisar C, Massara M, Vercelli R, Oggioni GD, Carriero A, Cantello R, Monaco F, Fagioli F. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp Neurol* 2010;223:229–237.
109. Riley J, Butler J, Baker KB, McClelland S, Teng Q, Yang J, Garrity-Moses M, Federici T, Boulis NM. Targeted spinal cord therapeutics delivery: Stabilized platform and microelectrode recording guidance validation. *Stereotact Funct Neurosurg* 2008;86:67–74.
110. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010;5:e10088.
111. Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One* 2012;7:e45590.
112. Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev* 2011;7:560–568.
113. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013;83A:134–140.
114. Corselli M, Chen C-W, Crisan M, Lazzari L, Péault B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1104–1109.
115. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P-N, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badyak S, Buhring H-J, Giacobino J-P, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301–313.
116. Morigi M, Rota C, Montemurro T, Montedatici E, Lo Cicero V, Imberti B, Abbate M, Zoja C, Cassis P, Longaretti L, Rebulla P, Introna M, Capelli C, Benigni A, Remuzzi G, Lazzari L. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells* 2010;28:513–522.
117. James AW, Zera JN, Zhang X, Askarinam A, Goyal R, Chiang M, Yuan W, Chang L, Corselli M, Shen J, Pang S, Stoker D, Wu B, Ting K, Péault B, Soo C. Perivascular stem cells: A prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:510–519.
118. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32:687–698.
119. Dellavalle A, Sampaiolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:255–267.
120. Valadares MC, Gomes JP, Castello G, Assoni A, Pellati M, Bueno C, Corselli M, Silva H, Bartolini P, Vainzof M, Margarido PE, Baracat E, Péault B, Zatz M. Human adipose tissue derived pericytes increase life span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx)/J mice. *Stem Cell Rev* (in press).
121. Chen C-W, Okada M, Proto JD, Gao X, Sekiya N, Beckman SA, Corselli M, Crisan M, Saparov A, Tobita K, Péault B, Huard J. Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* 2013;31:305–16.
122. Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* 2011;14:1398–1405.
123. Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2013;125:111–120.
124. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Saporta S, Justen EB, Miziata IE, Dellis J, Sanberg PR. Multiple transplants of hNT cells into the spinal cord of SOD1 mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2006;7:221–226.
125. Garbuzova-Davis S, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, Willing AE, Gemma C, Bickford PC, Miller C, Rossi R, Sanberg PR. Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose. *PLoS One* 2008;3:e2494.
126. Zhang C, Zhou C, Teng J-J, Zhao R-L, Song Y-Q, Zhang C. Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* 2009;11:299–306.
127. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassir L, Bulte JWM, Petrou P, Ben-Hur T, Abramsky O, Slavin S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2011;67:1187–1194.
128. Horvitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick L a, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyritz RE, Brenner MK. Transplantation and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309–313.
129. Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002;30:215–222.
130. Zhang J, Li Y, Lu M, Cui Y, Chen J, Noffsinger L, Elias SB, Chopp M. Bone marrow stromal cells reduce axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neurosci Res* 2006;84:587–595.
131. Kassir L, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrahi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, Abramsky O, Karussis D. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol* 2008;65:753–761.
132. Matsushita T, Kibayashi T, Katayama T, Yamashita Y, Suzuki S, Kawamata J, Honmou O, Minami M, Shimohama S. Mesenchymal stem cells translocate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci Lett* 2011;502:41–45.
133. Fisher LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellan-Sanches A, Khan J, Polak MA, Glass JD. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Exp Neurol* 2004;185:232–240.
134. Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: What have we learned so far? *Immunol Cell Biol* 2013;91:40–51.
135. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: From immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A* 2013;83A:48–61.
136. Kim HY, Kim H, Oh K-W, Oh S-I, Koh S-H, Baik W, Noh MY, Kim KS, Kim SH. Biological markers of mesenchymal stromal cells as predictors of response to autologous stem cell transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis: an investigator-initiated trial and in vivo study. *Stem Cells* (in press).
137. Bellantuno L, Keith WN. Stem cell ageing: Does it happen and can we intervene? *Expert Rev Mol Med* 2007;9:1–20.
138. Scruggs BA, Semon JA, Zhang X, Zhang S, Bowles AC, Pandey AC, Imhof KMP, Kalueff A V, Gimble JM, Bunnell BA. Age of the donor reduces the ability of human adipose-derived stem cells to alleviate symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:797–807.
139. Zhuo Y, Li S-H, Chen M-S, Wu J, Kinkaid HYM, Fazel S, Weisel RD, Li R-K. Aging impairs the angiogenic response to ischemic injury and the activity of implanted cells: Combined consequences for cell therapy in older recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:1286–1294, 1294.e1–2.
140. Chen X, Gan Y, Li W, Su J, Zhang Y, Huang Y, Roberts AI, Han Y, Li J, Wang Y, Shi Y. The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. *Cell Death Dis* 2014;5:e1009.
141. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringdén O, Sylvén C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1293–1330.
142. Peron JPS, Jazedje T, Brandio WN, Perin PM, Maluf M, Evangelista LP, Halpern S, Nisenbaum MG, Czeresnia CE, Zatz M, Câmara NOS, Rizzo LV. Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. *Stem Cell Rev* 2012;8:940–952.
143. English K, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells: Agents of immune modulation. *J Cell Biochem* 2011;112:1963–1968.

REVIEW ARTICLE

144. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006;99:1285–1297.
145. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007;67:9142–9149.
146. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 2005;7:509–519.
147. Froelich K, Mickler J, Steusloff G, Technau A, Ramos Tirado M, Scherzed A, Hackenberg S, Radeloff A, Hagen R, Kleinsasser N. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro. *Cytotherapy* 2013;15:767–781.
148. Giaretti W, Pentenero M, Gandolfo S, Castagnola P. Chromosomal instability, aneuploidy and routine high-resolution DNA content analysis in oral cancer risk evaluation. *Future Oncol* 2012;8:1257–1271.
149. Brooks BR. Risk factors in the early diagnosis of ALS: North American epidemiological studies. ALS CARE Study Group. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2000;1:S19–26.
150. Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: Significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain* 2014;7:22.
151. Hu B-Y, Zhang S-C. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 2009;4:1295–1304.
152. Qu Q, Li D, Louis KR, Li X, Yang H, Sun Q, Crandall SR, Tsang S, Zhou J, Cox CL, Cheng J, Wang F. High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat Commun* 2013;1–13.
153. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: History, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24:2239–2263.

Capítulo III – Materiais e Métodos

Durante o período de doutoramento foram realizados estudos pré-clínicos com o camundongo SOD1, modelo para esclerose lateral amiotrófica.

Na primeira etapa, células mesenquimais obtidas de tecido de cordão umbilical humano foram transplantadas a fim de avaliar seu efeito clínico e estabelecer a melhor via sistêmica de injeção (intravenosa ou intraperitoneal). Nesta etapa, foi possível observar que os testes físicos utilizados não foram adequados para a avaliação da evolução da doença e desta forma, tornou-se necessário, na segunda fase do projeto, padronizar tais testes físicos. Uma vez padronizados os testes funcionais, os camundongos SOD1 receberam transplantes de células mesenquimais ou de pericitos, derivados do tecido adiposo de um mesmo doador, a fim de avaliar e comparar o potencial terapêutico destes dois tipos celulares.

III.A - Transplante de células mesenquimais humanas derivadas de tecido de cordão umbilical no camundongo SOD1

Isolamento e expansão de MSC derivadas de tecido de cordão umbilical

As MSCs derivadas de tecidos de cordão umbilical foram isoladas por métodos previamente descritos^{1,2}. O meio de cultura utilizado foi o DMEM-LG suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) e 1% antibiótico/antimicótico(ATB) e este foi trocado a cada 3 dias. As células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂.

Modelo Animal e Grupos Experimentais

Camundongos SOD1^{G93A} background B6SJL com 12 semanas de idade (sintomáticos) foram divididos em 3 grupos (10 fêmeas e 6 machos por grupo): (grupo 1) injetados com células MSCs de cordão umbilical pela via intravenosa na veia caudal, (grupo 2) injetados com células MSCs de cordão umbilical pela via

intraperitoneal e (grupo 3) controle injetado com HBSS (*Hank's balanced salt solution*, veículo). pela via intraperitoneal ou intravenosa alternadamente.

Transplante de Células

Os animais dos grupos 1 e 2 receberam semanalmente 1.10^6 células pela veia caudal ou pela via intraperitoneal, respectivamente, iniciando-se na 12ª semana de vida (quando já são sintomáticos) até o final natural da vida.

Avaliação Funcional e da Sobrevida

A fim de verificar se as MSCs derivadas de tecido de cordão umbilical melhoraram a habilidade motora dos camundongos tratados, foram aplicados testes físicos para avaliação das funções motoras em todos os grupos experimentais. Este procedimento teve início na 12ª segunda semana de vida dos animais (antes do início dos tratamentos) e foi repetido após um mês de tratamento com a finalidade de observar se havia alguma diferença motora entre os grupos.

Os camundongos foram submetidos aos seguintes testes: (a) o teste *grip force*, em que o animal segura com suas patas dianteiras uma barra de um transdutor de força Grip Strength System (San Diego Instruments) e terá assim avaliada a força máxima aplicada antes deste soltar a barra e (b) o teste *rotarod* que avalia o tempo médio em que o animal é capaz de permanecer em uma roda giratória (IITC Life Science model 755) programada para uma velocidade inicial de 1rpm e velocidade final de 40rpm, 300 segundos depois. Foi considerado como resultado o tempo médio de 3 tentativas diferentes para cada animal ³.

Ainda, tendo em vista a diferença intrínseca de capacidade motora entre os animais, os grupos experimentais foram equalizados pelo valor do teste *grip force*, antes do início dos tratamentos.

Para os testes físicos, a análise estatística de comparações múltiplas foi realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e a análise entre dois grupos realizada pelo teste Mann-Whitney. Para a análise de sobrevida, o teste de Log-rank foi utilizado.

III.B – Padronização dos testes físicos no camundongo SOD1

Abordagem experimental

No total, vinte animais afetados (15 fêmeas e 5 machos) e 14 animais selvagens irmãos sem o transgene (7 fêmeas e 7 machos) foram submetidos a testes físicos e acompanhamento de sobrevivência⁴.

Os testes físicos foram realizados semanalmente a partir da 8ª semana de vida, período em que os camundongos afetados ainda são assintomáticos. Além da pesagem, os testes realizados foram: *paw grip endurance* (PaGE), *rotarod e motor score*⁴, conforme descrito a seguir.

Resumidamente, os camundongos foram avaliados quanto a sinais de déficit motor de acordo com o seguinte sistema de pontuação (*motor score*): 4 pontos para os animais normais (nenhum sinal de disfunção motora), 3 pontos se apresentam tremor nos membros inferiores, quando suspensos pela cauda, 2 pontos se havia anormalidades na marcha, 1 ponto quando havia o arraste evidente de pelo menos um dos membros posteriores e 0 pontos quando os animais eram incapazes de se levantarem da posição deitada no prazo de 30s.

Para o teste do *rotarod*, mede-se o tempo durante o qual o animal permaneceu no cilindro rotativo de um aparelho *rotarod* (IITC Life Science model 755) a uma velocidade inicial de 1rpm e constantemente aumentada até a velocidade final de 30rpm após 180s. Cada animal realizou o teste três vezes em cada semana de avaliação.

Para o teste do PaGE (*paw grip endurance*), cada animal foi colocado sobre a grade convencional de gaiola. A tampa foi gentilmente agitada para fazer com que os camundongos se agarrassem a ela antes da mesma ser rapidamente virada ao contrário. Os animais tiveram três chances para atingir o tempo máximo de 90s e o melhor desempenho de cada um para cada semana foi utilizada nas análises.

Os testes físicos foram avaliados ponto a ponto comparando o desempenho de animais afetados e selvagens pelo teste Mann-Whitney. A sobrevivência foi analisada pelo teste de Log-rank.

III.C – Injeção de MSCs e pericitos no camundongo SOD1

Isolamento e expansão das linhagens celulares

Uma amostra de tecido adiposo de doadora submetida a uma histerectomia total (remoção do útero) foi obtida após consentimento informado, de acordo com o comitê de ética em pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEP).

Para a obtenção de pericitos, o tecido foi processado de acordo com protocolo previamente descrito⁵. Resumidamente, a amostra foi extensivamente lavada com PBS e fragmentada em pequenos pedaços. Após digestão com collagenase tipo IA (Sigma-Aldrich) por 40 minutos as células foram precipitadas (688G por 10 minutos) e ressuspensas em PBS 5mM EDTA para a filtragem em filtro de 70 μ M. Após nova centrifugação, (500G por 5 minutos), o pellet foi ressuspendido em solução de lise de hemácia (*Bloodlysis*) por 5 minutos. Após inativação com 2X o volume de PBS a amostra foi passada pelo filtro de 40 μ M. Uma nova centrifugação foi realizada (500xG por 5 minutos) e o pellet foi ressuspendido em PBS para a realização da contagem das células.

Nesta etapa, a amostra foi dividida em 2 partes: uma, correspondente às células mesenquimais, foi imediatamente plaqueada e a outra, correspondente aos pericitos, foi selecionada por *cell sorting*.

Após a determinação do número de células, a alíquota destinada ao *cell sorting* foi ressuspendida em uma concentração máxima de 10^7 células/mL. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por 30 minutos e com a quantidade titulada de cada anticorpo conjugado (CD34, CD45, CD56 e CD146). Após a incubação, as células foram lavadas e transferidas ao tubo de citometria, passando pelo filtro de 35 μ M. Imediatamente antes de passar as amostras no citômetro de fluxo, foi realizada a incubação com DAPI (5 μ g/mL) para exclusão de células mortas.

As células com a marcação de interesse (CD146⁺/34⁻/45⁻/56⁻) foram separadas da população total e transferidas para uma placa em uma concentração de 2×10^4 células por cm^2 .

Pericitos e MSCs foram mantidos em cultura até atingirem a confluência (80%) e serem tripsinizados. Para a realização das passagens, considerou-se 1.000

células por cm². A MSCs foram cultivadas em meio DMEM-F12 com 1% Glutamax (Gibco), 20% de SFB (Gibco), 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA - Gibco) e 1% ATB (Gibco). Os pericitos foram cultivados em meio EBM-2 (Lonza). Ambas as linhagens foram cultivadas até a 7ª passagem e congeladas. Para as análises e injeções foram utilizadas células em 8ª passagem.

Caracterização das linhagens celulares

MSCs e pericitos foram avaliados de acordo com o seu potencial de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos ⁶ *in vitro* utilizando os meios comerciais *Stem Pro differentiation media kits* (Invitrogen). Concomitantemente, realizou-se a avaliação do perfil imunofenotípico das células por citometria de fluxo⁷. Para as caracterizações, células em 8ª passagem foram utilizadas.

Modelo Animal e Grupos Experimentais

Todos os procedimentos que envolveram o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação – CEUA, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Esta fase do projeto consistiu em realizar injeções semanais de MSCs e pericitos pela via intraperitoneal nos camundongos SOD1^{G93A} durante todo o período de vida destes animais, iniciando-se na 8ª semana de idade (assintomáticos). A via intraperitoneal foi a escolhida por representar um processo menos invasivo e melhor tolerado pelos animais durante a fase final da doença.

Os animais foram divididos em 3 grupos (aproximadamente 11 fêmeas e 11 machos por grupo): injetados com células MSCs, injetados com pericitos e controle injetado com HBSS (*Hank's balanced salt solution*, veículo).

Transplante de Células

Os animais foram injetados semanalmente pela via intraperitoneal com 1.10⁶ células viáveis por injeção em 100µL de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS).

Avaliação Funcional

A fim de verificar se as injeções de MSCs ou de pericitos influenciam no desempenho motor nos camundongos tratados, foram aplicados testes físicos em todos os grupos experimentais.

Os testes físicos foram semanais e realizados a partir da 8ª semana de vida, até o final da vida dos animais. Além da pesagem, os testes realizados foram: *motor score*, *paw grip endurance* (PaGE) e *rotarod*, com base nos protocolos previamente descritos⁴. Para o *motor score* no entanto, realizou-se uma alteração no sistema de pontuação a fim de facilitar a classificação dos animais: 5 pontos para os animais normais (nenhum sinal de disfunção motora), 4 pontos se apresentam leve tremor nos membros superiores, quando suspensos pela cauda, 3 pontos quando havia tremor evidente dos membros posteriores, 2 pontos se havia anormalidades na marcha, 1 ponto quando havia o arraste evidente de pelo menos um dos membros posteriores e 0 pontos quando os animais eram incapazes de se levantarem da posição deitada no prazo de 30s.

Ensaio de proliferação de linfócitos

O ensaio de proliferação de linfócitos foi realizado a fim de avaliar o potencial imunomodulatório das MSCs e de pericitos.

MSCs e pericitos foram cultivadas em uma placa de 96 poços em diferentes concentrações de células (10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 células). Após a adesão das células, estas foram tratadas com mitomicina C (Sigma) por 3 horas para a inativação do ciclo celular. Posteriormente as células foram duas vezes lavadas com PBS.

As células mononucleares (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) foram coletadas a partir do sangue periférico de camundongos SOD1 sintomáticos do sexo feminino e separadas das hemácias por um gradiente de Ficoll-Paque (GE). A marcação das células PMBCs com o corante vital CFDA (Invitrogen) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e as PBMCs foram adicionadas na

concentração constante de 10^4 células à cada poço já contendo MSCs ou pericitos inativados.

O anticorpo anti-mouse-CD3 foi adicionado ao meio de cultura a fim de ativar a proliferação dos linfócitos. O ensaio foi realizado em triplicata e o controle foi realizado com linfócitos ativados e sem co-cultura. As células foram mantidas em meio RPMI a 37°C e 5% de CO_2 durante 5 dias. Depois disso, os linfócitos foram ressuspensos e os picos fluorescentes de divisão celular, obtidos a partir da diluição da marcação do CFDA no citoplasma das células filhas, foram analisados por citometria de fluxo.

Ensaio de fagocitose de macrófagos

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar o potencial de macrófagos obtidos de camundongos SOD1 em fagocitar MSCs ou pericitos humanos. Para tal, os macrófagos foram obtidos após lavagem da cavidade peritoneal de camundongo fêmea SOD sintomática, de acordo com protocolo previamente descrito ⁸. Após a lavagem da cavidade com PBS, as células foram centrifugadas (400G, 5 min) e plaqueadas ($2 \cdot 10^5$ células em cada poço, em placa de 24) em meio RPMI com 10% SBF. No dia seguinte, as células não aderentes foram removidas, restando apenas a população de macrófagos. Neste dia, $2 \cdot 10^4$ MSCs ou pericitos foram plaqueados nestes mesmos poços contendo os macrófagos.

As células foram mantidas na incubadora (37°C , 5% CO_2) por 72 horas. Após este período, foi realizada a técnica de imunofluorescência a fim de marcar seletivamente as células humanas. Para tal, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após 3 lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas em solução 0,2% Triton-X e 1%BSA em PBS por 15 minutos. A seguir realizou-se uma etapa de bloqueio (5%BSA, 10%SBF, 0,1% Triton-X) por 1h, seguida por incubação com anticorpo primário específico para identificação de células humanas (anti-lamina A/C - Vector 1:100) overnight a 4°C .

No dia seguinte, as células foram lavadas 3X com PBS antes da incubação com o anticorpo secundário (Donkey Anti-Mouse Alexa 488, 1:400) por 1h. Nos últimos 15 minutos de incubação, DAPI foi adicionado. Células humanas (marcadas duplamente com lamina A/C e com DAPI) e macrófagos (apenas marcadas

com DAPI), foram observadas em microscópio de fluorescência e quantificadas com auxílio do programa ImageJ.

Extração de RNA e análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Cérebro e medula espinhal de dois machos e duas fêmeas de cada grupo experimental foram coletados no final da vida destes, após realização de eutanásia e foram preservados em RNA later a -70°C. Para a extração do RNA do cérebro, a região aproximada do córtex motor foi excisada e triturada por quebra mecânica no precellys com Qiazol (3 ciclos de 5000 RPM por 5s cada, seguido de um ciclo de 6000 RPM por 5s). A medula foi igualmente triturada.

Após a trituração, o RNA foi extraído pelo método do Qiazol, segundo instruções do fabricante (Qiagen). A integridade do RNA foi verificada a partir de um gel de agarose 1,5% com adição de hipoclorito 2%⁹, seguido da síntese do cDNA com uso da enzima SuperScript III com a adição de *random primers* e primers específicos para a cauda PoliA dos mRNA (primers OligodT).

Foram escolhidos genes murinos relacionados com a quantificação e hipertrofia de microglia (*CD11b*) e astrócitos (*GFAP*)¹⁰, a fim de avaliar se os tratamentos com MSCs ou pericitos influenciaram na ativação da microglia e/ou astrogliose, processo característico deste modelo animal¹⁰ e intimamente relacionado com o nível de inflamação do tecido nervoso. Adicionalmente foram analisados os genes *NF-κB* (relacionado à inflamação)¹⁰, *SOD1* (relacionado ao estresse oxidativo)¹¹ e *CAT* (relacionado ao estresse oxidativo)¹¹.

Para o PCR em tempo real, 20ng de cada cDNA foram misturados a 100nM de cada primer, com adição do SYBR Master Mix 2X. Os ciclos utilizados foram: 2 minutos a 50°C (ativação da enzima), 2 minutos a 95°C (denaturação), seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos (*anealing* do primer e extensão). Análises da curva de dissociação dos produtos de PCR foram realizadas a fim de verificar a amplificação do produto correto. Para tal experimento, utilizou-se o equipamento 7500 FAST (Applied Biosystems).

A eficiência de cada par de primer foi avaliada através da análise da curva de amplificação com concentrações crescentes de cDNA (5; 10; 20; 40; 80ng) e

foram utilizadas para o cálculo da expressão gênica relativa ao gene endógeno *GAPDH* a partir do método de Pfaffl¹².

Análise estatística

O ensaio de fagocitose de macrófagos foi analisado pelo teste não paramétrico Mann Whitney.

Os dados de expressão gênica foram calculados de acordo com os sexos e órgãos (cérebro ou medula). Para cada *set* de análise, a normalização foi realizada pelos dois indivíduos do grupo veículo, separadamente. Os dados de expressão de cada tratamento foram inicialmente avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, teste semelhante à ANOVA, no entanto, sem inferências a respeito da distribuição dos dados (não paramétrico). Quando comprovada diferença significativa, os valores de expressão gênica dos tratamentos foram comparados dois a dois a partir do teste de Mann Whitney. Para todas as análises, o valor de significância considerado foi de $p=0,05$.

A sobrevivência dos camundongos SOD1 submetidos aos tratamentos veículo, MSCs e pericitos foi inicialmente avaliada considerando-se o estimador Kaplan-Meier¹. Comparações das funções de sobrevivência para os grupos de interesse foram realizadas com base no teste log-rank¹³. Com a finalidade de avaliar a influência conjunta do tratamento e do sexo na sobrevivência, considerou-se o modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox¹⁴. A interpretação resultante do modelo ajustado foi feita com base no risco relativo, acompanhado do correspondente intervalo de confiança com 95% de coeficiente de confiança. Todos os testes baseados no modelo de Cox foram realizados através da estatística da razão de verossimilhanças¹³, considerando-se um nível de significância igual a 5%.

O desempenho dos animais nos testes durante o curso da doença foi avaliado em colaboração com pesquisadores do Instituto de Matemática e Estatística da USP. Esses dados têm natureza longitudinal e foram analisados por meio de técnicas de Modelos Lineares Mistos¹⁵. A estratégia de análise envolveu os seguintes passos:

a) identificação dos instantes em que há mudança no fenótipo (início da perda de peso, por exemplo) para os seis grupos definidos por meio das combinações

de tratamento (HBSS, MSCs, pericitos) e gênero (macho, fêmea). Para essa etapa foi utilizado o algoritmo proposto por Muggeo (2003)¹⁶;

b) comparação dos pontos de mudança dos seis grupos e identificação daqueles comuns a dois ou mais grupos;

c) utilização dos pontos de mudança identificados em b) para ajuste de modelos de regressão segmentada com a finalidade de estimação da taxa esperada de variação da resposta (perda de peso semanal, por exemplo) para cada grupo (ou conjunto de grupos);

d) avaliação dos efeitos de tratamento, gênero e de sua possível interação nas taxas esperadas de variação da resposta após o ponto de mudança de comportamento.

Referências Bibliográficas do Capítulo

1. Secco, M. *et al.* Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* **26**, 146–50 (2008).
2. Vieira, N. M. *et al.* SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* **26**, 2391–8 (2008).
3. Bueno, C. R., Ferreira, J. C. B., Pereira, M. G., Bacurau, A. V. N. & Brum, P. C. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *J Appl Physiol* **109**, 702–709 (2010).
4. Weydt, P., Hong, S. Y., Klot, M. & Möller, T. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* **14**, 1051–4 (2003).
5. Valadares, M. C. *et al.* Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem Cell Rev.* (2014). doi:10.1007/s12015-014-9537-9
6. Peron, J. P. S. *et al.* Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. *Stem Cell Rev.* **8**, 940–52 (2012).
7. Jazedje, T. *et al.* Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *J. Transl. Med.* **7**, 46 (2009).
8. Ray, A. & Dittel, B. N. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J. Vis. Exp.* (2010). doi:10.3791/1488
9. Patrick S. Aranda, Dollie M. LaJoie, and C. L. J. Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis* **33**, 366–369 (2013).
10. Kassa, R. M., Mariotti, R., Bonaconsa, M., Bertini, G. & Bentivoglio, M. Gene, cell, and axon changes in the familial amyotrophic lateral sclerosis mouse sensorimotor cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 59–72 (2009).
11. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1761 (2004).
12. Pfaffl, M. in *Real-time PCR* (Dorak, T.) 63–82 (International University Line, 2006).
13. Collett, D. *Modelling Survival Data in Medical Research.* (2003).
14. Cox, D. R. Regression Models and Life Tables. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **34**, 187–220 (1972).
15. Singer, J. M. & Andrade, D. F. in *Handb. Stat. Vol. 18 Bio-Environmental Public Heal. Stat.* (Sen, P. K. & Rao, C. R.) 115–160 (2000).
16. Muggeo, V. M. R. Estimating regression models with unknown break-points. *Stat. Med.* **22**, 3055–3071 (2003).

Capítulo IV - Resultados

IV.A - Transplante de células mesenquimais humanas derivadas de tecido de cordão umbilical no camundongo SOD1

Os testes *grip force* e *rotarod*, frequentemente aplicados para avaliação de estudos pré-clínicos em doenças musculares, foram aplicados com o intuito de avaliar a capacidade motora dos camundongos SOD1 antes e após um mês de tratamento com MSCs obtidas de cordão umbilical.

Para o desempenho obtido no teste do *grip force*, não se observou diferença estatística entre os 3 grupos experimentais, considerando ambos os sexos conjuntamente (figura 1A). Diversos relatos na literatura demonstram que existe diferença intrínseca na progressão da doença entre machos e fêmeas neste modelo animal, tanto em relação a parâmetros eletrofisiológicos e motores como para a sobrevivência, sendo que esta diferença é bastante proeminente na linhagem com background genético B6SJL, a mesma utilizada neste estudo¹⁻³. A fim de avaliar o efeito do tratamento com MSCs de cordão umbilical entre os sexos, as análises foram refeitas separadamente para fêmeas e machos (figura 1B e 1C), no entanto, mesmo após esta estratégia, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre estes grupos.

Todos os animais machos (independente do tratamento) foram incluídos em um mesmo grupo com base na sua semelhança estatística e o mesmo foi realizado para as fêmeas. Para o desempenho no teste do *grip force*, não foram detectadas diferenças entre os sexos, indicando que este teste não apresenta um nível adequado de sensibilidade para aplicação em estudos pré-clínicos, fato que pode ser explicado com base na própria natureza do teste. O *grip force* mede a força dos membros dianteiros do animal e o comprometimento destes só ocorre na fase final da doença nos camundongos SOD1. Desta maneira, nas fases seguintes do presente estudo, o teste *paw grip endurance* (PaGE), uma variação do teste do *grip force*, foi utilizado por ser capaz de avaliar a força do animal dos 4 membros, simultaneamente.

Figura 1: Desempenho dos animais no teste *grip force*. Para tal cálculo, a média das três tentativas de cada animal no primeiro teste (grip inicial) foi diminuída da média das três tentativas de cada animal no segundo teste (grip final), após um mês de tratamento. Os valores foram normalizados pela medida naso-anal dos animais, tanto na primeira como na segunda avaliação. Análise estatística de comparações múltiplas realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e análise entre dois grupos realizada pelo teste Mann-Whitney. Os valores de p estão demonstrados em cada gráfico. (A) Avaliação do desempenho considerando machos e fêmeas conjuntamente; (B) desempenho das fêmeas; (C) desempenho dos machos e (D) desempenho entre os sexos.

O mesmo padrão obtido para o teste do *grip force* foi observado para o desempenho dos animais no teste do *rotarod* (figura 2). Não foram observadas diferenças significativas na análise conjunta dos sexos ou na análise exclusiva para fêmeas e machos. Diferenças intrínsecas entre machos e fêmeas também não foram detectadas. Foi possível observar uma grande variabilidade nos resultados entre os animais, o que pode interferir nas análises. Desta maneira, nas fases seguintes o teste do *rotarod* foi aplicado com tempo máximo de duração de 180 segundos.

Figura 2: Desempenho dos animais no *rotarod*. Para tal cálculo a média das três tentativas de cada animal no primeiro teste (*rotarod* inicial) foi diminuída da média das três tentativas de cada animal no segundo teste (*rotarod* final). Análise estatística de comparações múltiplas realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e análise entre dois grupos realizada pelo teste Mann-Whitney. Os valores de p estão demonstrados em cada gráfico. (A) Avaliação do desempenho considerando machos e fêmeas conjuntamente; (B) desempenho das fêmeas; (C) desempenho dos machos e (D) desempenho entre os sexos.

Os animais morreram naturalmente entre a 18^a e 22^a semana de vida, sem diferença entre os grupos na análise conjunta dos sexos (figura 3A) ou isolada para cada sexo (figura 3B e 3C). Notou-se uma diferença significativa na taxa média de sobrevivência dos machos (aproximadamente 123 dias) em relação à das fêmeas (aproximadamente 139 dias), que foi comprovada estatisticamente pela análise da curva de sobrevivência (figura 3D). Esta observação está em consonância com relatos da literatura que atestam diferenças na progressão da doença entre machos e fêmeas desta linhagem¹⁻³.

Figura 3: Análise de sobrevida pelo teste de Log-rank. (A) Teste aplicado à todos os animais independente do sexo, considerando apenas os tratamentos; (B) considerando apenas fêmeas e (C) considerando apenas machos. (D) Influência do sexo na sobrevida dos camundongos SOD1.

A fim de melhor estabelecer os testes antes de uma nova rodada de injeções, a fase 2 do presente estudo teve como objetivo principal padronizar os testes clínicos. Para tal, utilizou-se como base o trabalho de Weydt e colaboradores (2003)⁴.

Cinco animais morreram num período mais final da doença no ato das injeções intravenosas de MSCs, o que não aconteceu no grupo que recebeu HBSS por esta mesma via, demonstrando assim que animais mais enfraquecidos não suportam facilmente a injeção intravenosa. Existem relatos de que células mesenquimais injetadas pela via intraperitoneal em camundongos modelo para esclerose múltipla foram capazes de migrar até o parênquima cerebral⁵ desta forma, nos grupos subsequentes, as injeções sistêmicas semanais foram realizadas pela via intraperitoneal.

Outro fator a ser considerado é a idade de início das injeções. Nesta etapa as injeções foram iniciadas na idade de 3 meses, quando já existem sintomas visíveis devido à uma perda considerável na quantidade de neurônios motores. Portanto, mesmo que as células tenham algum potencial terapêutico benéfico, a progressão da doença é bastante difícil de ser alterada⁶. Assim, os testes subsequentes foram realizados com animais com 2 meses de idade, ditos como pré-sintomáticos. Nesta idade, já existem

alterações celulares estabelecidas neste modelo animal, semelhante às encontradas em pacientes de ELA^{7,8}.

O tipo celular utilizado também foi alterado. É sabido que a população de MSCs é bastante heterogênea. Tentativas de separar subpopulações mais homogêneas por *sorting* vêm sendo realizadas por diversos grupos científicos⁹⁻¹². Uma subpopulação celular, denominada pericito, localizada ao redor dos vasos sanguíneos, expressa o marcador de superfície CD146 e possui características em comum com a fração não purificada de MSCs como a expressão de alguns antígenos e marcadores⁹.

Pericitos possuem importantes funções celulares como por exemplo, promoção de estabilidade vascular, participação na determinação do arranjo e distribuição dos vasos sanguíneos (angioarquitetura) e controle do fluxo sanguíneo. Ainda, quando no sistema nervoso central, os pericitos participam da formação e manutenção da barreira hematoencefálica, auxiliando assim a manter a homeostase vascular cerebral, importante para proteger o sistema nervoso central de danos em doenças neurodegenerativas¹³. Desta forma, após a etapa de padronização (fase 2), realizou-se a fase 3 cujo objetivo principal foi a avaliação do potencial terapêutico de pericitos nos camundongos SOD1. Um grupo comparativo tratado com MSCs obtidas do mesmo doador também foi realizado.

IV.B – Padronização dos testes físicos no camundongo SOD1

Esta etapa consistiu em padronizar os testes físicos que seriam utilizados na fase seguinte. Para tal, a sobrevivência, o peso e o desempenho nos testes do *motor score*, *paw grip endurance* (PaGE) e *rotarod*⁴ foram aplicados semanalmente a 20 camundongos SOD1 afetados (15 fêmeas e 5 machos) e a 14 camundongos (7 machos e 7 fêmeas) irmãos que não carregam o transgene (selvagens).

A partir dos resultados obtidos com os testes físicos semanais a partir da 8ª semana de vida dos animais (figura 4), observou-se que todos os testes foram capazes de identificar diferenças entre camundongos afetados e selvagens em algum período de vida. A análise de peso e do *rotarod* detectaram diferenças a partir da nona semana de vida e o PaGE e o *motor score* mais tardiamente, a partir da 11ª e 16ª semana, respectivamente. Apesar desta diferença, todos os testes se mostraram adequados para a avaliação funcional dos animais e assim, foram utilizados na fase subsequente com injeção de células MSCs e pericitos. Por se tratar de uma análise longitudinal bastante

complexa, estes dados não foram avaliados detalhadamente conforme análise realizada na etapa 3.

Figura 4: Testes físicos (Peso, *motor score*, PaGE e *rotarod*). Análises realizadas ponto a ponto por comparação entre afetados e selvagens pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Em relação à sobrevivência, os animais afetados sobreviveram em média 135 dias enquanto que nenhum animal selvagem havia morrido até o final da avaliação da sobrevivência dos animais afetados (figura 5A). Assim como na fase anterior, nesta fase do projeto foi possível detectar diferenças significativas entre a sobrevivência das fêmeas e dos machos afetados (figura 5B), sendo que em média as fêmeas viveram 17% a mais do que machos.

Figura 5: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. (A) Afetados *versus* selvagens e (B) fêmeas afetadas *versus* machos afetados.

IV.C – Injeção de MSCs e pericitos no camundongo SOD1

Esta etapa teve como objetivo analisar o potencial terapêutico de MSCs e de pericitos (obtidos do tecido adiposo de um mesmo doador) no camundongo SOD1. Para tal, os camundongos SOD1 receberam semanalmente transplantes de MSCs, pericitos ou HBSS (veículo). O peso e o desempenho nos testes do *motor score*, PaGe e *rotarod* foram avaliados semanalmente. Além da avaliação clínica, realizou-se a análise da sobrevida dos animais.

Estabelecimento e caracterização das linhagens celulares

A partir de uma amostra de tecido adiposo obtida de uma cirurgia de histerectomia total abdominal, foi possível realizar o processamento do tecido e *sorting* para estabelecimento das linhagens celulares de MSCs e pericitos (figura 6). Nesta amostra, a quantidade de pericitos foi de 5%. As linhagens foram caracterizadas na passagem em que foram realizados os transplantes, quanto ao seu perfil

imunofenotípico (tabela 1) e quanto ao potencial de diferenciação *in vitro* (figura 7). Exceto pelo potencial adipogênico nos pericitos, todos os demais foram mantidos.

Diversos estudos relatam a capacidade de diferenciação de pericitos em osteoblastos, condrócitos e adipócitos quando cultivados com meios de cultura específicos^{10,12,14}. No entanto, a capacidade de diferenciação não é um pré-requisito para classificarmos uma população de pericitos, assim como ocorre para MSCs¹⁵. As implicações desta incapacidade de diferenciação adipogênica não são conhecidas para humanos. Para camundongos, uma subpopulação de pericitos sem este potencial já foi descrita e esta apresenta propriedades biológicas distintas da subpopulação de pericitos que é capaz de se diferenciar em adipócitos¹⁶.

Figura 6: Obtenção de pericitos (rosa) por *sorting*. (A) Exclusão de células mortas marcadas DAPI; (B) exclusão de doublets e debris celulares; (C) seleção de população CD34⁺/CD45⁻ e (D) seleção de população CD56⁻/CD146⁺ (pericitos). Após este processo, uma nova alíquota da amostra separada foi novamente analisada no citômetro e a pureza da amostra foi atestada.

Tabela 1: Perfil imunofenotípico das linhagens celulares (MSCs e pericitos). Avaliação realizada na 8ª passagem, mesma na qual os transplantes *in vivo* foram realizados.

Marcador	Comprometimento/relevância	MSCs	Pericitos
		% células marcadas	% células marcadas
CD13	Marcador de MSC	98,50	100,00
CD29	Marcador de MSC/células aderentes	99,00	99,00
CD31	Marcador de células endoteliais	0,00	1,90
CD34	Marcador de linhagem hematopoiética	0,00	2,10
CD44	Marcador de MSC/células aderentes	99,30	99,60
CD45	Marcador de linhagem hematopoiética	3,40	2,70
CD73	Marcador de MSC	99,00	100,00
CD90	Marcador de MSC/células aderentes	99,00	49,30
CD117	Marcador de linhagem hematopoiética	2,90	2,40
CD105	Marcador de MSC	100,00	97,80
HLA DR	HLA	1,60	2,70
HLA ABC	HLA	97,30	87,00
CD56	Marcador de linhagem miogênica	2,60	4,00
CD146	Marcador de pericitos	40,60	75,00

Figura 7: Diferenciação *in vitro* de MSCs e pericitos em adipócitos, osteoblastos e condroblastos. Caracterização realizada na 8ª passagem, mesma utilizada nos transplantes.

Avaliação do potencial imunológico das MSCs e pericitos

Conforme mencionado na etapa anterior, as injeções pela via intraperitoneal foram selecionadas para a etapa de injeção de MSCs e pericitos, por representar um

transplante mais seguro aos animais, principalmente no final da vida, período onde estes se encontram enfraquecidos e morrem com mais facilidade no ato da injeção intravenosa.

Quando transplantadas na cavidade intraperitoneal dos camundongos, um dos primeiros obstáculos que as MSCs ou pericitos encontram são os macrófagos, células fagocíticas que fazem parte da linha de defesa da imunidade inata cujo objetivo principal é a defesa contra micro-organismos patogênicos ¹⁷. Além desta função contra bactérias, protozoários e vírus, a subpopulação M1 de macrófagos possui um perfil pró inflamatório e assim um papel importante na imunidade antitumoral ¹⁸. A fim de avaliar a capacidade dos macrófagos em fagocitar MSCs e pericitos humanos, realizou-se a co-cultura destes tipos celulares por 72 horas. Para tal, os macrófagos foram obtidos a partir da cavidade peritoneal de camundongos SOD1

Após este período de co-cultura, as células humanas foram seletivamente marcadas pelo anticorpo anti-lamina A/C, pela técnica de imunofluorescência. A quantificação de MSCs e pericitos co-cultivados com macrófagos não revelou qualquer diferença significativa em relação às MSCs e pericitos sem a co-cultura (figura 8). Em contrapartida, os macrófagos foram capazes de fagocitar o corante India Ink quando este foi adicionado por 2 horas no meio de cultura (controle positivo). Adicionalmente, não foi observada nenhuma formação típica de granuloma para nenhuma co-cultura de MSCs ou pericitos com macrófagos. Este resultado sugere que as MSCs e pericitos são capazes de adentrar a cavidade peritoneal dos camundongos SOD1 sem serem fagocitados pelos macrófagos.

Uma vez na cavidade peritoneal, a principal via de absorção de determinadas drogas é através dos vasos sanguíneos mesentéricos e posteriormente estas alcançam o fígado através da veia porta ¹⁹. Acredita-se que o mesmo ocorra com MSCs transplantadas nesta cavidade uma vez que após 2 horas pós transplante por esta via, estas já são encontradas no fígado de camundongos ²⁰. Passadas 24 horas após o transplante, estas células são também encontradas no pulmão, baço e até mesmo no cérebro de camundongos com isquemia cerebral, sem diferença significativa em relação ao transplante intravenoso das mesmas ²⁰. Isso sugere que as MSCs são capazes de atingir a circulação sistêmica após o transplante intraperitoneal.

MSCs obtidas de tuba uterina já foram detectadas no cérebro de camundongos EAE, modelo para esclerose múltipla, quando injetadas pela via

intraperitoneal ⁵. Acredita-se que MSCs sejam capazes de adentrar o sistema nervoso a partir de poros transientes formados na barreira hematoencefálica, uma barreira natural que é responsável por proteger e isolar o ambiente neuronal de componentes sanguíneos potencialmente tóxicos ²¹. Além disso, já foi visto nos camundongos SOD1 que a ruptura da barreira hematoencefálica tem um papel importante na aceleração da progressão da doença ²².

Adicionalmente à co-cultura com macrófagos, realizou-se a co-cultura de MSCs ou pericitos com linfócitos a fim de avaliar o potencial imunomodulatório das linhagens celulares, uma característica que poderia auxiliar a diminuir o quadro inflamatório existente no sistema nervoso de pacientes com ELA ²³.

Após o isolamento das células mononucleares periféricas (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) de sangue de camundongos SOD1 sintomáticos e a marcação destes com o corante vital CFDA, os linfócitos foram induzidos a se proliferar através da incubação com anticorpo anti CD3 ²⁶. Após 5 dias de co-cultura destas células com MSCs ou pericitos, a proliferação dos linfócitos foi avaliada pela análise de picos de fluorescência no citômetro: quanto mais intensa a fluorescência (revelada por uma maior quantidade de CFDA no citoplasma dos linfócitos), menos divisões celulares aconteceram na referida população de células. Tal ensaio revelou supressão tênue na proliferação de linfócitos a partir de uma concentração de 5.10^3 MSCs ou pericitos, no entanto, é possível notar um efeito mais significativo com a presença de 5.10^4 MSCs ou pericitos (concentração 5 vezes maior do que a de linfócitos na co-cultura), sugerindo que apesar de existente, o efeito imunossupressor de MSCs e de pericitos é limitado à quantidade de células presentes no microambiente inflamado (figura 8).

Figura 8: Ensaio de fagocitose de macrófagos. (A, C) Imunofluorescência específica para células humanas marcando respectivamente MSCs ou pericitos (verde) em co-cultura com macrófagos (não marcado). (B, D) Imunofluorescência específica para células humana marcando respectivamente MSCs ou pericitos (anti-lamina A/C humana, verde) sem co-cultura com macrófagos. (E) Macrófagos sem co-cultura marcados com DAPI. (F) Macrófagos sem co-cultura analisados no filtro verde demonstrando que não houve marcação inespecífica da imunofluorescência específica para humanos, aumento de 200X. (G) Macrófagos com grânulos internalizados de India Ink, aumento de 400X. (H) Quantificação de pericitos e MSCs com e sem co-cultura ($p=0,3024$ e $p=0,0906$, respectivamente).

Figura 9: Potencial imunossupressor dose-dependente de MSCs e pericitos. A partir da concentração de 5.10^3 , nota-se um efeito tênue de inibição de proliferação de linfócitos (deslocamento do menor pico de fluorescência presente no gráfico sem a co-cultura para o lado direito do gráfico). Não foram detectadas diferenças entre MSCs e pericitos.

Avaliação clínica e de sobrevida de camundongos SOD1 após transplante de MSCs e pericitos

Com início a partir da 8ª semana de vida, camundongos SOD1 receberam injeções semanais de MSCs, pericitos ou solução balanceada de Hank's (HBSS, veículo) e foram analisados quanto à sua habilidade motora (*motor score*, *rotarod* e *PaGE*), e peso para avaliação da progressão da doença. Adicionalmente, a sobrevida destes animais foi avaliada.

Análise da Sobrevida

A análise preliminar da sobrevivência dos camundongos SOD1, baseada nas estimativas de Kaplan-Meier é apresentada na figura 10. Camundongos machos apresentaram menor sobrevivência quando comparados às fêmeas (figura 10A). Este achado está em consonância com outros trabalhos¹⁻³ que mostram diferenças na progressão da doença em camundongos SOD1 de acordo com o sexo, tanto em relação a parâmetros eletrofisiológicos e motores como para a sobrevida. Considerando-se apenas os três tratamentos, sem levar em conta o sexo dos animais, não são evidenciadas diferenças significativas entre as curvas (figura 10B). Entretanto, existem indícios de que as curvas de sobrevivência dos tratamentos apresentam comportamentos distintos

para machos e para fêmeas. A figura 10 apresenta as estimativas de Kaplan-Meier para cada tratamento considerando camundongos fêmeas (figura 10C) e machos (figura 10D). O teste log-rank para fêmeas sugere que não há efeito de tratamento para esse grupo ($p=0,76$) enquanto que, para machos, a diferença entre as curvas de sobrevivência é estatisticamente significativa ($p=0,04$).

Figura 10: Estimativas Kaplan-Meier da função de sobrevivência e teste log-rank. (A) Sobrevivência estimada para cada sexo, unindo-se todos os tratamentos; (B) sobrevivência estimada para cada tratamento; (C) influência do tratamento na sobrevivência de fêmeas e (D) influência do tratamento na sobrevivência de machos.

A fim de avaliar a influência e magnitude das diferenças observadas na análise inicial, realizou-se uma análise estatística baseada no modelo de riscos proporcionais de Cox, considerando como fatores prognósticos sexo, tratamento e a interação entre os dois. O efeito de interação pode ser decomposto em dois, sendo o

primeiro relacionado a um possível efeito do tratamento de MSCs com relação ao HBSS para machos, que não se mostra estatisticamente significativa ($p=0,48$) e outro, associado ao efeito do tratamento de pericitos em relação ao HBSS, que se mostra estatisticamente significativa ($p=0,02$). Para melhor entender como se dá essa interação, um novo modelo foi ajustado considerando-se seis grupos formados pela combinação dos parâmetros de sexo (macho e fêmea) e tratamento (HBSS, MSCs e pericitos). O grupo de referência foi definido como o de camundongos fêmeas submetidas ao tratamento veículo. Através dessa modelagem, pode-se observar que não existem diferenças de tratamento para fêmeas ($p=0,82$). Para machos, observa-se que não há diferenças entre os tratamentos veículo e MSCs ($p=0,36$), porém quando o tratamento de pericitos é comparado com o de HBSS, nota-se que existe diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$). É possível ainda observar que, ao se considerar o grupo de fêmeas (combinando-se os três tratamentos), há diferença significativa com o grupo de machos que recebem HBSS ($p<0,01$) e machos que recebem MSCs ($p=0,01$); entretanto, machos que recebem pericitos mostram risco de morte semelhante às fêmeas ($p=0,50$).

Portanto, conclui-se que machos que recebem pericitos têm sobrevida comparável à fêmeas (cuja sobrevivência não difere para os três tratamentos), ao passo que machos que recebem HBSS ou MSCs apresentam mesma sobrevida, inferior à de fêmeas conjuntamente com o grupo de machos tratados com pericitos. Um modelo de regressão de Cox final foi então ajustado, considerando dois grupos: um formado por fêmeas (independente do tratamento recebido) e machos tratados com pericitos, e outro grupo formado por machos que recebem HBSS ou MSCs. Esses dois grupos têm risco de morte diferentes ($p < 0,01$). A ordem de magnitude dessa diferença foi dimensionada através do risco relativo, comparando o grupo de machos (sob tratamentos HBSS e MSCs) com o grupo formado pela combinação de fêmeas (qualquer tratamento) e machos tratados com pericitos, cujo valor estimado é igual a 3,28 [IC(95%)=(1,81; 5,92)]. Conclui-se que o risco de morte para camundongos SOD1 machos sob tratamento com MSCs ou HBSS é aproximadamente 3 vezes o risco de morte para fêmeas (qualquer tratamento) ou machos que recebem pericitos. Estimativas das curvas de sobrevivência para estes dois grupos, estimadas através do modelo de regressão de Cox, são apresentadas na figura 11.

Figura 11: Estimativas das funções de sobrevivência a partir do modelo de regressão de Cox final ajustado.

Análise dos testes físicos

Uma análise longitudinal detalhada referente ao desempenho dos animais nos testes durante o curso da doença foi realizada em colaboração com pesquisadores do Instituto de Matemática e Estatística da USP. Para cada variável (peso, PaGE, *rotarod* e *motor score*), após a identificação dos pontos de mudança de variação de desempenho e a comparação destes instantes entre os grupos, foi realizado o cálculo da taxa esperada de variação da resposta para cada grupo. Desta maneira, para cada variável, três fatores podem ser utilizados para avaliar o efeito do tratamento: o ponto estimado de mudança e as taxas de variação de desempenho antes e após deste ponto de mudança. Alterações no ponto de mudança e taxa esperada de variação anterior a este ponto podem ser entendidas como um efeito observado numa fase mais inicial da doença, já variações obtidas na taxa estimada após este ponto pode ser entendida como um efeito numa fase mais tardia da doença. Um modelo matemático foi ajustado a fim de estimar o perfil esperado do tratamento em nível populacional e não somente em nível amostral.

A descrição completa dos resultados obtidos após a análise estatística para os dados das variáveis peso, PaGE, *rotarod* e *motor score* está detalhada no apêndice 1. Nesta seção IV serão indicadas as inferências biológicas obtidas a partir destes dados.

De maneira semelhante à análise apresentada para a sobrevivência, os testes físicos foram avaliados separadamente entre os sexos.

Análise da variável peso

Para a variável peso, é possível dizer que não há diferenças ao longo do curso da doença entre os grupos de fêmeas tratadas com HBSS ou MSCs, sendo que numa fase mais final da doença a taxa estimada de perda de peso para estes grupos é de 0,82g/semana. Em contrapartida, fêmeas que recebem pericitos perdem peso mais rapidamente do que as demais, em uma fase mais tardia da doença. Para este grupo a taxa estimada de perda de peso é de 1,14 g/semana.

Machos tratados com MSCs começam a significativamente perder peso duas semanas antes daqueles tratados com HBSS, no entanto, essa perda de peso é comparativamente mais lenta no grupo que recebe MSCs, numa fase mais tardia da doença. Para machos que recebem pericitos o efeito é o oposto daquele observado para as fêmeas deste mesmo grupo: o tratamento faz com que os animais percam peso mais lentamente do que machos que recebem HBSS, em uma fase mais tardia da doença. A taxa estimada de perda de peso para machos que recebem pericitos e MSCs é de 0,82g/semana enquanto que para o grupo HBSS é de 1,14g/semana.

Análise da Variável PaGE

Em relação à variável PaGE, observa-se que machos tratados com células pioram mais rapidamente do que machos que recebem HBSS, numa fase mais inicial da doença (-4,3 segundos/semana para MSCs; -5,3 segundos por semana para pericitos e -3,4 segundos/semana para HBSS); entretanto, esse quadro muda após a 15ª semana, em que animais tratados com pericitos passam a apresentar uma taxa mais lenta de declínio de desempenho no teste em relação aos demais grupos. O grupo de machos tratados com MSCs apresenta padrão semelhante, mas com valor de magnitude inferior ao obtido para os machos tratados com pericitos (-12,2 segundos/semana para pericitos; -16,4 segundos/semana para MSCs e -26,0 segundos/semana para HBSS).

Para fêmeas, o quadro é o oposto. A piora no desempenho do PaGE para grupo tratado com HBSS é constante desde o início do tratamento (-8,0

segundos/semana para HBSS; -3,5 segundos/semana para MSCs e -2,8 segundos/semana para pericitos). Já as fêmeas tratadas com MSCs ou pericitos são capazes de manter o desempenho inicial no teste até um determinado momento e depois disso pioram rapidamente (-4,9 segundos/semana para HBSS; -15,6 segundos/semana para MSCs e -18,2 segundos/semana para pericitos). Assim como ocorre para machos, fêmeas tratadas com MSCs apresentam comportamento semelhante àquele de fêmeas tratadas com pericitos, com valores esperados de magnitude intermediária aos dois outros tratamentos (pericitos e HBSS).

Análise da variável *rotarod*

A análise da variável *rotarod* para fêmeas revela que, até a 15ª semana, os grupos tratados com células têm um declínio maior no desempenho do que o grupo tratado com HBSS (-0,3 segundos/semana para HBSS; -1,2 segundos/semana para MSCs e -1,8 segundos/semana para pericitos), indicando que em uma fase mais inicial da doença, as fêmeas que recebem células pioram mais rapidamente do que as fêmeas que recebem HBSS. Na fase mais tardia da doença, não são observadas diferenças no desempenho entre os grupos.

Machos tratados com MSCs começam a ter um declínio mais significativo no desempenho, três semanas antes daqueles tratados com HBSS ou pericitos, entretanto, numa fase mais tardia da doença, observa-se que machos tratados com MSCs tem uma taxa de declínio no desempenho do teste mais lenta do que a de machos tratados com HBSS ou pericitos (-26,6 segundos/semana para MSCs e -46,1 segundos/semana para pericitos ou HBSS). Adicionalmente, animais tratados com MSCs ou pericitos apresentam uma melhora no desempenho deste teste em uma fase mais inicial da doença, efeito ausente nos animais que recebem HBSS (-3,9 segundos/semana para HBSS; 1,8 segundos/semana para MSCs e 4,7 segundos/semana para pericitos).

Análise da variável *motor score*

O desempenho de machos e fêmeas para o teste do *motor score* é semelhante entre os sexos. A queda significativa do desempenho deste teste para o grupo tratado com MSCs, ocorre três semanas mais tarde em relação ao grupo tratado

com HBSS e para os animais tratados com pericitos o atraso foi de 4 semanas em relação ao grupo que recebe HBSS. Apesar deste efeito benéfico, o desempenho dos animais tratados com células decai mais rapidamente, numa fase mais final da doença, em relação ao grupo que recebe HBSS (-0,34 unidades/semana para fêmeas HBSS; -0,6 unidades/semana para fêmeas MSCs ou pericitos; -0,48 unidades/semana para machos HBSS e -0,71 unidades/semana para machos MSCs ou pericitos).

Análise da expressão gênica e busca de RNA humano por PCR em tempo real

O final da vida dos animais era marcado como a data em que o animal, quando tocado, não mais era capaz de se mexer e/ou levantar da posição deitada. Neste momento, realizava-se a eutanásia dos mesmos através da overdose de anestésicos, sendo assim possível coletar cérebro e medula espinhal para análise de expressão gênica e busca de RNA humano. Para tal, o RNA de dois machos e duas fêmeas com tempo de vida representativo da média do grupo do respectivo tratamento, foram utilizados.

No camundongo SOD1, assim como em pacientes de ELA, a vulnerabilidade seletiva de neurônios motores provavelmente resulta de uma combinação de vários mecanismos, incluindo resposta às proteínas mal dobradas, disfunção mitocondrial, danos ocasionados por estresse oxidativo, transporte axonal defeituoso, excitotoxicidade, e inflamação²⁹. A patologia intrínseca existente nos neurônios motores é reforçada por danos promovidos por células vizinhas não neuronais, através de uma resposta inflamatória que acelera a progressão da doença. A fase sintomática da ELA é caracterizada por uma ativação bastante intensa de astrócitos e microglias^{29,30}.

Os resultados obtidos com a técnica de análise da expressão gênica por PCR em tempo real estão representados na figura 12. Nota-se uma redução significativa na expressão do gene *CD11B* em cérebros de fêmeas tratadas com MSCs ou pericitos (sem diferença significativa entre estes dois grupos) em relação às fêmeas que receberam HBSS. Este gene está relacionado à quantidade de microglia reativa no tecido, fato intimamente ligado à inflamação progressiva que acomete este modelo animal³¹. A redução da expressão de *CD11B* nos cérebros das fêmeas na fase final da vida, sugere o estabelecimento de um microambiente neuronal menos agressivo nos grupos que

receberam células em relação ao grupo que recebeu HBSS. Apesar disso, conforme mencionado anteriormente, não foram detectadas diferenças significativas na sobrevivência das fêmeas.

No cérebro dos machos tratados com pericitos foi possível detectar um aumento significativo na expressão de genes codificadores das enzimas antioxidantes superóxido dismutase 1 (codificada pelo gene *SOD1*) e catalase (codificada pelo gene *CAT*). Levando em consideração o aumento da sobrevivência em decorrência do tratamento com pericitos em camundongos machos, estes achados de expressão gênica sugerem que o tratamento com pericitos é capaz de estimular o funcionamento da própria defesa antioxidante do animal, diminuindo assim o estresse oxidativo no cérebro dos camundongos tratados.

Não há relatos na literatura comparando o potencial antioxidante de pericitos com o de MSCs, no entanto, já foi observado que MSCs são capazes de estimular a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes em células obtidas de pacientes com ataxia de Friedreich, uma doença neurodegenerativa progressiva e atualmente incurável. Nestes relatos, foi possível observar que fatores solúveis derivados de MSCs obtidas de medula óssea aumentam a expressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase 1, a catalase e a glutatona peroxidase, e oferecem assim proteção contra o dano mediado pelo peróxido de hidrogênio ou pelo óxido nítrico induzido nos fibroblastos de pacientes^{32,33}.

Tal aumento na expressão em *SOD1* e *CAT* não foi encontrado no grupo de machos tratado com MSCs, reforçando mais uma vez os achados da análise da sobrevivência. Para o grupo de fêmeas, foi observado um aumento da expressão de *SOD1* no cérebro dos animais que receberam MSCs ou pericitos (sem diferenças significativas entre estes dois grupos), sugerindo mais uma vez que o ambiente neuronal das fêmeas que recebem células é menos agressivo do que aquele das fêmeas que recebem HBSS.

Além da análise da expressão gênica, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada para buscar vestígios de RNA humano no cérebro e na medula destes animais, a fim de verificar se houve a migração das células humanas (pericitos e MSCs) para estes órgãos. Tanto pericitos como MSCs são capazes de migrar para determinados tecidos^{5,14,34,35} em resposta a estímulos inflamatórios. No presente estudo não foi possível detectar a presença de RNA humano nos cérebros ou medula dos camundongos *SOD1* tratados. Não é possível, no entanto, excluir a possibilidade de poucas células

terem chegado à estes órgãos, uma vez que a técnica utilizada apresentou sensibilidade de detecção de 0,01% de cDNA humano em cDNA de camundongo (figura 13). Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa, pericitos obtidos de tecido adiposo, mas não de outras fontes teciduais, foram capazes de promover efeito benéfico na sobrevivência de camundongos duplo *knockout* para distrofina e utrofina, modelo para distrofia muscular de Duchenne ³⁶. De maneira semelhante, neste trabalho os pericitos não puderam ser identificados nos músculos do animal, tecidos predominantemente afetados na doença, sugerindo um efeito sistêmico e não local das células injetadas ³⁶.

Figura 12: Análise da expressão gênica de camundongos SOD1 no final da vida.
 $*p < 0,05$.

Figura 13: Curva de sensibilidade de detecção de cDNA humano em cDNA de camundongo.

Referências bibliográficas do capítulo

1. Alves, C. J. *et al.* Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res.* **1394**, 90–104 (2011).
2. Heiman-Patterson, T. D. *et al.* Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *J. Neurol. Sci.* **236**, 1–7 (2005).
3. Stephen R. Pfohl, Halicek, M. T. & Mitchell, C. S. Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *J. Neuromuscul. Dis.* **2**, 137–150 (2015).
4. Weydt, P., Hong, S. Y., Klot, M. & Möller, T. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* **14**, 1051–4 (2003).
5. Peron, J. P. S. *et al.* Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. *Stem Cell Rev.* **8**, 940–52 (2012).
6. Marconi, S. *et al.* Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model. *Neuroscience* **248C**, 333–343 (2013).
7. Doble, A. & Kennel, P. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* **1**, 301–312 (2000).
8. Kassa, R. M., Mariotti, R., Bonaconsa, M., Bertini, G. & Bentivoglio, M. Gene, cell, and axon changes in the familial amyotrophic lateral sclerosis mouse sensorimotor cortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 59–72 (2009).
9. Corselli, M., Chen, C.-W., Crisan, M., Lazzari, L. & Péault, B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1104–9 (2010).
10. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–13 (2008).
11. Morigi, M. *et al.* Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells* **28**, 513–22 (2010).
12. James, A. W. *et al.* Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 510–9 (2012).
13. Winkler, E. a, Bell, R. D. & Zlokovic, B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* **14**, 1398–405 (2011).
14. Dellavalle, A. *et al.* Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 255–67 (2007).
15. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7 (2006).
16. Birbrair, A. *et al.* Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem Cells Dev.* **22**, 2298–314 (2013).
17. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
18. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–37 (2011).
19. Lukas, G., Brindle, S. D. & Greengard, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **178**, 562–564 (1971).

20. Ohshima, M. *et al.* Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia. *Brain Dev.* 5–7 (2014). doi:10.1016/j.braindev.2014.06.010
21. Matsushita, T. *et al.* Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci. Lett.* **502**, 41–5 (2011).
22. Winkler, E. A. *et al.* Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E1035–42 (2014).
23. Winkler, E. a *et al.* Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **125**, 111–20 (2013).
24. Waterman, R. S., Henkle, S. L. & Betancourt, A. M. Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS One* **7**, e45590 (2012).
25. Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L. & Betancourt, A. M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* **5**, e10088 (2010).
26. Timón, M. *et al.* Selective impairment of T lymphocyte activation through the T cell receptor/CD3 complex after cytomegalovirus infection. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 38–42 (1993).
27. Morettin, P. A. & Toloi, C. M. C. *Análise de Séries Temporais.* (2006).
28. Sen, P. K., Singer, J. M. & Pedroso-de-Lima, A. C. *From Finite Sample to Asymptotic Methods in Statistics.* (Cambridge University Press, 2009).
29. Boillée, S., Vande Velde, C. & Cleveland, D. W. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* **52**, 39–59 (2006).
30. Weydt, P. & Moller, T. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* **16**, 527–531 (2005).
31. Vercelli, A. *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **31**, 395–405 (2008).
32. Kemp, K. *et al.* Mesenchymal stem cells restore frataxin expression and increase hydrogen peroxide scavenging enzymes in Friedreich ataxia fibroblasts. *PLoS One* **6**, e26098 (2011).
33. Dey, R. *et al.* Human Mesenchymal Stem Cells Increase Anti-oxidant Defences in Cells Derived from Patients with Friedreich's Ataxia. *The Cerebellum* 861–871 (2012). doi:10.1007/s12311-012-0406-2
34. Chen, C.-W. *et al.* Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* **31**, 305–16 (2013).
35. Vieira, N. M. *et al.* SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* **26**, 2391–8 (2008).
36. Valadares, M. C. *et al.* Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem Cell Rev.* (2014). doi:10.1007/s12015-014-9537-9

Capítulo V – Discussão Geral

O presente estudo teve como objetivo principal propor uma nova abordagem terapêutica para a Esclerose Lateral Amiotrófica, uma doença neurodegenerativa bastante agressiva. Atualmente, o único medicamento liberado pelo FDA para o uso em ELA é o Riluzol, que aumenta entre 2 a 4 meses a expectativa de vida dos pacientes¹⁻³. Neste cenário, a terapia celular vem sendo avaliada como uma possível alternativa.

Conforme mencionado no capítulo 2, células-tronco neurais (NSCs) já estão em fase de teste em pacientes com ELA, em ensaio liderado pela empresa Neuralstem (NCT01730716). Os resultados pré-clínicos em animais demonstram um efeito benéfico deste tratamento e que a ação destas células está mais ligada ao estabelecimento de um ambiente neuronal menos agressivo, através da liberação e ação de fatores neurotróficos, do que de fato à diferenciação direta destas em neurônios⁴. Apesar deste efeito benéfico, a obtenção destas células, a partir de fetos abortados, levanta diversas questões éticas, principalmente se considerarmos o uso comercial das mesmas. Em países onde o aborto é proibido, assim como no Brasil, este cenário se torna ainda mais complicado.

Como alternativa às NSCs, diversos grupos buscaram avaliar o potencial terapêutico de células mesenquimais (MSCs)⁵⁻⁸. Para este tipo celular, também não é esperada uma transdiferenciação em linhagem neuronal, mas o seu uso está baseado na capacidade que as MSCs possuem em secretar fatores solúveis com funções diversas, como ação anti-inflamatória e anti-proliferativa⁹, e que poderiam portanto melhorar o quadro clínico de pacientes com ELA. Testes clínicos liderados pela empresa Brainstorm (NCT01051882) já estão em andamento, com uso autólogo de MSCs manipuladas para produzirem grandes quantidades de fatores neurotróficos.

Apesar destes testes clínicos já estarem em andamento, alguns pontos ainda necessitam ser esclarecidos, como por exemplo, o uso de imunossupressores ou o local de injeção das células. MSCs e NSCs possuem baixa expressão de HLA e de moléculas co-estimulatórias e por isso são consideradas células “imuno privilegiadas”¹⁰. Tal característica possibilita o transplante heterólogo e até mesmo xenogênico destas, sem desencadear uma resposta imune no receptor¹¹⁻¹⁶. Entretanto, nos testes clínicos em pacientes com ELA há uso de um coquetel de imunossupressores semelhante àquele administrado a pacientes que recebem transplante de órgãos¹⁷. Além de serem

responsáveis por muitos dos efeitos adversos observados ¹⁷, há relatos que demonstram que o uso de imunossupressores esteroides pode abolir completamente o efeito terapêutico de MSCs¹⁸ e dessa forma, o ato de administrar um coquetel de imunossupressores após o transplante das células deve ser repensado e melhor estudado. Assim sendo, no presente estudo optou-se por não imunossuprimir os animais.

Nos estudos clínicos, a principal via de transplante é diretamente na medula espinhal, em nível torácico, lombar e até mesmo cervical ^{17,19,20}. Microplataformas de injeção estão sendo desenvolvidas a fim de tornar este processo mais seguro ¹⁷, no entanto, mesmo com o uso destas, a cirurgia é bastante invasiva e pode causar danos ao paciente ¹⁷. Desta forma, buscou-se avaliar neste estudo se as células em questão são capazes de promover um efeito benéfico nos camundongos SOD1 quando administradas por via sistêmica. Para compensar o direcionamento das células a outros órgãos e tecidos que não os predominantemente afetados na ELA, foram realizadas injeções semanais, até o final da vida dos animais.

Outro fator ponderado foi a origem das linhagens celulares utilizadas. Certamente o uso de pericitos e MSCs murinos seria útil para avaliar o potencial terapêutico das células transplantadas, sem a barreira imunológica que existe naturalmente no xenotransplante, no entanto, optamos por utilizar células humanas uma vez que estas podem nos fornecer respostas mais diretas e mais transponíveis aos pacientes. O cenário ideal para avaliar o efeito de uma terapia celular seria a realização de um estudo envolvendo diversos centros especializados, onde todas estas considerações fossem conjuntamente estudadas, tal como realizado para NSCs⁴.

Aqui propusemos o uso de pericitos, uma linhagem celular ainda não testada para tratamento pré-clínico em modelo murino de ELA. Pericitos são células perivasculares que circundam células endoteliais e que desempenham importantes funções celulares como por exemplo, promoção de estabilidade vascular e angio-arquitetura e auxílio no controle do fluxo sanguíneo. Ainda, quando no sistema nervoso central, os pericitos participam da formação e manutenção da barreira hematoencefálica, auxiliando na manutenção da homeostase vascular cerebral, importante para proteger o sistema nervoso central de danos em doenças neurodegenerativas ²¹. Por sua capacidade de migração, diferenciação, bem como por sua localização estratégica, alguns grupos defendem a hipótese de que os pericitos são os progenitores das MSCs^{22,23}.

A fim de avaliar o efeito do tratamento proposto no desempenho motor de camundongos SOD1, testes físicos foram semanalmente aplicados. Cada teste avalia funções diferentes do animal. As variações do peso por exemplo, se relacionam inicialmente com o crescimento e posteriormente com a atrofia dos músculos, um processo natural da doença. Como observado na fase de padronização, os camundongos SOD1 ganham peso até momento por volta da 13ª semana e depois desse período há um declínio nesta variável. O teste do *motor score* avalia o comprometimento visível das patas traseiras dos animais que tende a ser estável no início da vida dos animais (onde não há tremor visível) e diminui progressivamente até atingir o nível mínimo, quando o animal encontra-se totalmente paralisado. O teste do PaGE avalia a força nos quatro membros, responsáveis por manterem o animal preso à grade. O teste do *rotarod* avalia a agilidade nos membros, capacidade respiratória, bem como coordenação dos movimentos e equilíbrio para se manterem no cilindro rotativo até o término do teste. Assim sendo, ao avaliarmos o efeito de um potencial tratamento no desempenho físico dos animais é possível obter diferentes respostas entre os testes.

A análise conjunta dos dados clínicos para fêmeas mostra que o tratamento com pericitos ou MSCs não é capaz de promover efeitos terapêuticos significantes, para este sexo. Não são observadas diferenças na sobrevida entre os grupos de tratamento. A análise longitudinal da variável peso demonstra que fêmeas que recebem pericitos perdem peso mais rapidamente que as demais, numa fase mais final da doença. O efeito no teste do *rotarod* também não é favorável, uma vez que o tratamento com células (pericitos ou MSCs) faz com que as fêmeas piorem mais rapidamente em uma fase inicial da doença.

Traduzindo os efeitos da análise longitudinal aos pacientes com ELA, pode-se dizer que melhoras no desempenho físico que ocorrem em uma fase mais inicial da doença seriam equivalentes à um prolongamento de uma fase de vida onde o paciente ainda possui um quadro clínico mais favorável e não tão comprometido. Assim sendo, no presente estudo, considera-se que estes resultados são mais positivos em relação à melhorias em uma fase tardia que são acompanhadas de uma piora inicial do desempenho, por exemplo.

Resultados benéficos do tratamento das fêmeas são observados no teste do PaGE e do *motor score*, em uma fase mais inicial da doença. No primeiro, a piora no desempenho do grupo HBSS ocorre desde o início da vida destes animais e é constante

enquanto que as fêmeas que recebem MSCs ou pericitos, são capazes de manter o desempenho inicial no teste, até por volta da 15ª semana mas depois disso pioram rapidamente. Ambos efeitos são mais proeminentes para o grupo que é tratado com pericitos. No teste do *motor score*, há um atraso no aparecimento dos sintomas motores do grupo tratado com MSCs de 3 semanas em relação ao grupo que recebe HBSS. O atraso para o grupo tratado com pericitos é de 4 semanas em relação ao grupo que recebe HBSS. Apesar deste efeito benéfico, o desempenho dos animais tratados com células nesses dois últimos testes destes decai mais rapidamente, em uma fase final da doença, em relação a desempenho do grupo que recebe HBSS.

Com a finalidade de identificar a extensão do efeito do tratamento com pericitos ou MSCs no final da vida dos animais, a análise de expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real identificou uma redução na expressão do gene *CD11B* (relacionado à quantidade e ativação da microglia) e simultaneamente um aumento na expressão do gene *SOD1* (que codifica a enzima antioxidante superóxido dismutase 1), no cérebro de fêmeas que receberam MSCs e pericitos, em relação às fêmeas que receberam HBSS. Este resultado sugere que o ambiente neuronal de fêmeas que receberam células é menos agressivo do que aquele das fêmeas que receberam HBSS entretanto, esse efeito não resulta em melhora no quadro clínico das fêmeas na fase final da doença. A análise conjunta dos resultados obtidos para as fêmeas sugere que as células tiveram um efeito benéfico em determinadas funções motoras dos animais, em uma fase mais inicial da doença (com um efeito levemente mais eficaz para o tratamento com pericitos), sugerindo que as células perdem o efeito após um determinado período de tratamento.

Apesar de observarmos um aparente efeito benéfico do tratamento com MSCs nos machos em uma fase mais tardia da doença (observado na variável do peso, no teste PaGE e no *rotarod*) e também em uma fase mais inicial da doença (observado no teste do *motor score* e também no teste do *rotarod*), não é possível observar efeito benéfico na sobrevivência destes animais e nem no desempenho final (16ª semana) nos testes físicos. Um ponto a ser levado em consideração, que surge nas análises do peso e do *rotarod*, é a antecipação do início de perda significativa de peso ou da queda de desempenho estimado para o teste do *rotarod* dos machos que recebem MSCs em relação aos demais.

Diversos estudos investigaram o potencial terapêutico de MSCs obtidas de diferentes fontes neste mesmo modelo animal ⁵⁻⁸. No geral, há uma melhora no quadro clínico dos animais com o tratamento e esta tem sido atribuída à ação de fatores solúveis. No entanto, esses resultados não são diretamente comparáveis, uma vez que há diversas variações nos protocolos experimentais utilizados como por exemplo, diferenças nas fontes de obtenção das MSCs, nos protocolos de injeção e nos locais de injeção.

No presente estudo, o efeito do tratamento com pericitos mostra-se comparativamente mais efetivo do que o tratamento com MSCs. Machos tratados com pericitos têm uma sobrevida semelhante à de fêmeas (cuja sobrevida não difere para nos três grupos experimentais e é naturalmente maior do que a de machos) e esse grupo tem um risco de morte cerca de 3 vezes menor do que o de machos que recebem MSCs ou HBSS. A partir da análise longitudinal das variáveis é possível notar que, em uma fase mais tardia da doença, machos que recebem pericitos perdem peso mais lentamente em relação ao grupo que recebe HBSS. No teste do PaGE, o efeito do tratamento com pericitos também aparece numa fase mais tardia da doença, uma vez que estes animais apresentam uma deterioração mais lenta no desempenho em relação aos grupos que recebem MSCs ou HBSS. Apesar disso, até a semana 15ª semana, os animais tratados com pericitos apresentam uma taxa de deterioração maior no desempenho da variável do PaGE, em relação ao grupo que recebe HBSS.

Adicionalmente, é possível observar um efeito benéfico do tratamento de machos com pericitos em uma fase mais inicial da doença, para os testes do *rotarod* e *motor score*. A análise do teste do *rotarod* mostra uma melhora no desempenho dos grupos tratados com células, efeito ausente nos animais que recebem HBSS. Este efeito é ainda mais proeminente no grupo tratado com pericitos em relação ao grupo tratado com MSCs. O teste do *motor score* por sua vez, mostra um padrão semelhante ao obtido para fêmeas, com um atraso no início do aparecimento dos sintomas motores estimado para os grupos que recebem células, efeito novamente mais proeminente para o grupo tratado com pericitos em relação ao grupo que recebe MSCs. Diferentemente do que ocorre no teste do *rotarod*, na variável do *motor score* o grupo de machos tratados com pericitos tem uma queda mais acelerada no desempenho em relação ao grupo que recebe HBSS, em uma fase mais final da doença.

A influência do sexo em ELA é um assunto amplamente estudado e é observada também nos pacientes. Resultados promovidos por uma meta análise de dados previamente publicados indicam que a incidência e a prevalência de ELA são maiores em homens do que em mulheres, sendo que homens são a maioria entre pacientes mais jovens com a doença. O estudo mostrou ainda que a ELA esporádica tem diferentes características clínicas em homens e mulheres. Nos homens há maior probabilidade de aparecimento dos sintomas nas regiões da medula espinhal e as mulheres tendem a ter início dos sintomas na região bulbar. Entretanto, em humanos o gênero aparenta não ter um efeito claro na sobrevivência²⁴.

Diversas hipóteses já foram propostas para justificar esta diferença inerente entre os sexos, tais como: influência hormonal, exposições distintas a toxinas ambientais entre homens e mulheres, diferentes respostas biológicas a toxinas exógenas, diferenças entre o sistema nervoso masculino e feminino e/ou habilidades distintas entre os sexos de reparo dos danos nestes tecidos²⁴. Diversos estudos relatam que há diferenças em parâmetros eletrofisiológicos, motores e também na sobrevida entre os sexos, na linhagem de camundongos SOD1 G93A com background B6SJL, a linhagem utilizada no presente estudo²⁵⁻²⁷. Nos machos, a doença é mais agressiva e desta forma é possível que o efeito do tratamento com pericitos tenha resultado em benefícios capazes de tornar a doença mais branda, fazendo com que resultasse em melhora significativa para estes animais. Entretanto, as fêmeas apresentam uma forma comparativamente mais leve da doença e possivelmente o efeito terapêutico das células necessitaria ser maior para resultar em uma alteração impactante no quadro clínico destes animais.

A análise da expressão gênica identificou um aumento significativo de expressão de *SOD1* e *CAT*, apenas no cérebro de machos tratados com pericitos, sugerindo que o tratamento com este tipo celular foi capaz de estimular o sistema antioxidante do animal.

Vários relatos evidenciam o envolvimento de espécies reativas de oxigênio na patogênese da ELA²⁸⁻³⁰. De fato, marcadores relacionados ao dano provocado pelo estresse oxidativo a lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos já foram detectados em tecido *post-mortem* de pacientes^{29,30}, fazendo com que enzimas antioxidantes ou subprodutos do estresse oxidativo venham sendo considerados como biomarcadores para esta doença³¹.

Babu e colaboradores³² relataram uma redução da atividade das enzimas catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, e glutathione redutase em eritrócitos de pacientes de ELA, e que esta redução se correlacionava com a duração da doença. De maneira semelhante, Cova e colaboradores em 2010³³ encontraram diminuição da atividade da glutathione peroxidase e da superóxido dismutase 1 em eritrócitos de pacientes com ELA sendo que o nível de redução desta última enzima estava correlacionada com o estado funcional dos pacientes³³. Esses resultados contradizem os obtidos por Tuncel e colaboradores em 2006, que relatam aumento da atividade da superóxido dismutase 1 em eritrócitos de pacientes, sem relação com o estado da doença³⁴.

O potencial terapêutico da catalase já foi avaliado em camundongos SOD1. A hipótese central era que o tratamento sistêmico (através de mini bombas osmóticas) com catalase seria capaz de aumentar a expressão desta enzima no cérebro e medula dos camundongos, a fim de reduzir o nível de estresse oxidativo nestes órgãos. O tratamento foi capaz de retardar o início dos sintomas e uma leve tendência de aumento da sobrevida também pôde ser observada³⁵.

Além da catalase, outros antioxidantes como a vitamina E, vitamina C, vitamina B12, ácido fólico, coenzima Q10 e glutathione peroxidase já foram avaliados para tratamento em ELA, com alguns resultados animadores³⁶. Além destes, a administração de vitamina D (em quantidade 10 vezes maior do que a indicada) foi capaz de promover uma melhora no desempenho dos camundongos SOD1 no teste PaGE e no teste de performance motora, com efeito mais proeminente em machos³⁷.

O presente estudo demonstra portanto que, com exceção dos benefícios observados nos testes do PaGE e do *motor score* em uma fase mais inicial da doença, o tratamento com MSCs ou pericitos não resulta em efeitos significativos no quadro clínico de camundongos SOD1 do sexo feminino. Para os machos, o tratamento com pericitos se destaca em relação aos tratamentos com MSCs ou HBSS, resultando em efeitos benéficos na sobrevida e em determinadas funções motoras dos animais, com destaque para os testes do *motor score* e do *rotarod*, onde há uma melhora na fase inicial da doença.

O fato de não termos detectado as células injetadas no cérebro ou medula dos animais tratados, indica um possível efeito parácrino através de fatores solúveis, potencialmente capaz de melhorar o ambiente neuronal, uma vez que as alterações da

expressão gênica foram detectadas no cérebro e medula dos camundongos. Em estudo recente do nosso grupo, pericitos de tecido adiposo injetados pela via intraperitoneal resultaram no aumento da sobrevivência de camundongos duplo *knockout* para distrofina e utrofina (modelo para distrofia muscular de Duchenne)³⁸. De maneira semelhante, neste trabalho os pericitos não foram encontrados nos músculos dos animais, tecido predominantemente afetado pela doença. Levando em consideração este resultado, é possível propor dois novos delineamentos experimentais que poderiam aumentar o efeito terapêutico de pericitos aqui observados: (1) a combinação de injeções sistêmicas com uma injeção intraespinhal de células, ou até mesmo (2) o tratamento dos animais apenas com fatores solúveis derivados de pericitos.

Referências bibliográficas do capítulo

1. Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. *A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. N. Engl. J. Med.* **330**, (1994).
2. Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M. & Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* (2007). doi:10.1002/14651858.CD001447.pub2
3. Mitchell, J. D. & Borasio, G. D. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **369**, 2031–2041 (2007).
4. Teng, Y. D. *et al.* Multimodal actions of neural stem cells in a mouse model of ALS: a meta-analysis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 165ra164 (2012).
5. Vercelli, A. *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **31**, 395–405 (2008).
6. Marconi, S. *et al.* Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model. *Neuroscience* **248C**, 333–343 (2013).
7. Kim, K. S. *et al.* Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model. *Cell Transplant.* 1–38 (2013). doi:10.3727/096368913X673450
8. Zhao, C.-P. *et al.* Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy* **9**, 414–26 (2007).
9. Li, J., Ezzelarab, M. B. & Cooper, D. K. C. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* **19**, 273–85
10. Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O. & Grinyó, J. M. in *Front. Immunol.* **3**, (2012).
11. Secco, M. *et al.* Systemic delivery of human mesenchymal stromal cells combined with IGF-1 enhances muscle functional recovery in LAMA2 dy/2j dystrophic mice. *Stem Cell Rev.* **9**, 93–109 (2013).
12. Vieira, N. M. *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant.* **21**, 1407–17 (2012).
13. Vieira, N. M. *et al.* SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human

- adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* **26**, 2391–8 (2008).
14. Peron, J. P. S. *et al.* Human endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress inflammation in the central nervous system of EAE mice. *Stem Cell Rev.* **8**, 940–52 (2012).
 15. Xu, L. *et al.* Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats. *Transplantation* **82**, 865–75 (2006).
 16. Nizzardo, M. *et al.* Minimally invasive transplantation of iPSC-derived ALDHhiSSCloVLA4+ neural stem cells effectively improves the phenotype of an amyotrophic lateral sclerosis model. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 342–54 (2014).
 17. Riley, J. *et al.* Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I trial, cervical microinjection, and final surgical safety outcomes. *Neurosurgery* **74**, 77–87 (2014).
 18. Chen, X. *et al.* The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation. *Cell Death Dis.* **5**, e1009 (2014).
 19. Glass, J. D. *et al.* Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* **30**, 1144–51 (2012).
 20. Karussis, D. *et al.* Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch. Neurol.* **67**, 1187–1194 (2010).
 21. Winkler, E. a, Bell, R. D. & Zlokovic, B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* **14**, 1398–405 (2011).
 22. Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–13 (2008).
 23. Corselli, M., Chen, C.-W., Crisan, M., Lazzari, L. & Péault, B. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1104–9 (2010).
 24. McCombe, P. A. & Henderson, R. D. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend. Med.* **7**, 557–70 (2010).
 25. Alves, C. J. *et al.* Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res.* **1394**, 90–104 (2011).
 26. Heiman-Patterson, T. D. *et al.* Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS. *J. Neurol. Sci.* **236**, 1–7 (2005).
 27. Stephen R. Pfohl, Halicek, M. T. & Mitchell, C. S. Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1

- G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *J. Neuromuscul. Dis.* **2**, 137–150 (2015).
28. Shibata, N. *et al.* Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res.* **917**, 97–104 (2001).
 29. Shaw, P. J., Ince, P. G., Falkous, G. & Mantle, D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann. Neurol.* **38**, 691–695 (1995).
 30. Ferrante, R. J. *et al.* Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* (1997).
 31. Robelin, L. & Gonzalez De Aguilar, J. L. Blood biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis: Myth or reality? *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
 32. Babu, G. N. *et al.* Oxidant-antioxidant imbalance in the erythrocytes of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients correlates with the progression of disease. *Neurochem. Int.* **52**, 1284–9 (2008).
 33. Cova, E. *et al.* Time course of oxidant markers and antioxidant defenses in subgroups of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurochem. Int.* **56**, 687–93 (2010).
 34. Tuncel, D., Aydin, N., Aribal Kocatürk, P., Ozelçi Kavas, G. & Sarikaya, S. Red cell superoxide dismutase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Neurosci.* **13**, 991–4 (2006).
 35. Reinholz, M. M., Merkle, C. M. & Poduslo, J. F. Therapeutic benefits of putrescine-modified catalase in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **159**, 204–16 (1999).
 36. Patel, B. P. & Hamadeh, M. J. Nutritional and exercise-based interventions in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Nutr.* **28**, 604–17 (2009).
 37. Gianforcaro, A. & Hamadeh, M. J. Dietary vitamin D3 supplementation at 10× the adequate intake improves functional capacity in the G93A transgenic mouse model of ALS, a pilot study. *CNS Neurosci. Ther.* **18**, 547–57 (2012).
 38. Valadares, M. C. *et al.* Human Adipose Tissue Derived Pericytes Increase Life Span in Utrn (tm1Ked) Dmd (mdx) /J Mice. *Stem Cell Rev.* (2014). doi:10.1007/s12015-014-9537-9
-

Apêndice I – Detalhamento da análise longitudinal

Análise longitudinal da variável peso

A análise longitudinal dos testes físicos foi realizada em colaboração com pesquisadores do Instituto de Matemática e Estatística da USP. Para cada variável (peso, PaGE, *rotarod* e *motor score*), após a identificação dos instantes em que há mudança na taxa esperada de variação do teste (ponto de mudança) e a comparação destes instantes entre os grupos, foi realizado o cálculo da taxa esperada de variação da resposta para cada grupo. Desta maneira, para cada variável, três fatores podem ser utilizados para avaliar o efeito do tratamento: o ponto estimado de mudança e as taxas de decréscimo de desempenho antes e após deste ponto de mudança.

Os gráficos de perfis individuais de cada animal com perfil médio da população suavizado por meio da técnica LOESS¹ apresentados na figura 14 sugerem que a partir de um certo instante há uma tendência de diminuição do peso esperado dos animais. Estimativas dos instantes de mudança de comportamento do peso esperado e respectivos erros padrões para cada grupo estão dispostos na tabela 1.

Figura 14: Perfis individuais com perfil médio suavizado por meio de LOESS para Peso.

Tabela 1: Estimativas e erros padrões do instante (em semanas) em que ocorre mudança no comportamento do peso esperado com limites inferior (LI) e superior (LS) para os respectivos intervalos de confiança (95%)

Tratamento	Gênero	n	Estimativa	Erro Padrão	LI	LS
HBSS	F	14	16.6	0.52	15.5	17.6
MSC	F	14	15.3	1.04	13.3	17.4
Pericito	F	15	14.3	1.05	12.2	16.3
HBSS	M	11	14.5	0.24	14.1	15.0
MSC	M	13	12.2	0.71	10.8	13.6
Pericito	M	12	15.2	0.82	13.6	16.8

Utilizando técnicas de comparações múltiplas, concluímos que os instantes em que se inicia a perda esperada de peso para fêmeas submetidas a quaisquer dos tratamentos podem ser considerados iguais a 16.0 semanas (erro padrão = 0,4 semanas). Para machos que receberam tratamento pericitos ou HBSS, a perda esperada de peso começa na 15ª semana (erro padrão = 0,2 semanas) e para machos que receberam tratamento MSC, a perda esperada de peso começa na semana 12.0 (erro padrão = 0,7 semanas). Esses resultados estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2: Estimativas dos pontos de mudança na taxa esperada de variação de peso e correspondentes erros padrões para agrupamentos de tratamentos e gêneros

Agrupamentos identificados	Estimativa	E.P.
HBSS, MSC, Pericito (fêmeas)	16,0	0,4
HBSS, Pericito (machos)	15,0	0,2
MSC (machos)	12,0	0,7

Os pontos de mudança estimados na tabela 2 foram então utilizados para o cálculo da taxa esperada de variação de peso, a partir de modelos mistos de regressão segmentada.

Tabela 3: Estimativas das taxas esperadas de variação de peso antes e depois dos instantes de mudança de comportamento.

Gênero	Tratamento	Mudança ocorrendo na semana	Antes da mudança		Depois da mudança	
			Taxa esperada de aumento de peso	Erro padrão	Taxa esperada de aumento de peso	Erro padrão.
F	HBSS	16,0	0,16	0,03	-0,82	0,04
	MSC	16,0	0,15	0,03	-0,82	0,04
	Pericito	16,0	0,13	0,03	-1,14	0,07
M	HBSS	14,6	0,31	0,05	-1,14	0,07
	MSC	12,2	0,35	0,08	-0,82	0,04
	Pericito	14,6	0,04	0,04	-0,82	0,04

Utilizando técnicas de comparações múltiplas, concluímos que as taxas esperadas de perda de peso após o ponto de mudança são iguais para as fêmeas submetidas aos tratamentos HBSS e MSCs e iguais àquelas dos machos submetidos aos tratamentos MSCs e pericitos ($p=0,584$). Após o instante de mudança a taxa esperada de perda de peso para esses grupos é de 0,82 g /semana (erro padrão = 0,04). As taxas esperadas de perda de peso após o ponto de mudança para fêmeas submetidas ao tratamento com pericitos e para machos tratados com HBSS são iguais ($p=0,853$). Após o instante de mudança, a taxa esperada de perda de peso para esses grupos é de 1,14 g /semana (erro padrão = 0,07). Um resumo desses resultados está apresentado na tabela 3.

Não há evidência de que os pesos esperados na oitava semana sejam diferentes para fêmeas ($p = 0,509$) e também para machos ($p = 0,215$). O peso esperado das fêmeas na oitava semana é de 18,3g (erro padrão = 0,2) e o peso esperado dos machos é de 22,4g (erro padrão = 0,3).

Com estes resultados é possível dizer que não são detectadas diferenças nas taxas estimadas para a variável peso entre o grupo de fêmeas tratadas com MSCs e HBSS. Fêmeas que recebem pericitos têm uma maior taxa esperada de perda de peso após o ponto estimado de mudança (16 semanas), indicando que os animais deste grupo perdem peso mais rapidamente do que as demais fêmeas, em uma fase mais tardia da doença.

Machos tratados com MSCs começam a perder peso antes daqueles tratados com HBSS ou pericitos, no entanto, após este ponto de mudança, observa-se

que machos tratados com MSCs ou pericitos perdem peso mais lentamente do que os machos tratados com HBSS.

Análise longitudinal da Variável PaGE

Gráficos de perfis individuais de cada animal com perfil médio da população suavizado por meio da técnica LOESS¹ apresentados na figura 15 sugerem que a partir de um certo instante há uma tendência de mudança na taxa esperada de decréscimo do PaGE. Utilizando técnicas estatísticas similares àquelas consideradas na análise do peso, estimamos os pontos de mudança na taxa esperada de decréscimo do PaGE para cada grupo. As estimativas e erros padrões correspondentes além dos limites inferior e superior de intervalos de confiança (95%) estão dispostos na tabela 4.

Figura 15: Perfis individuais com perfil médio suavizado por meio de LOESS para PaGE.

Tabela 4: Estimativas e erros padrões do instante (em semanas) em que ocorre mudança na taxa esperada de decréscimo do PaGE com limites inferior (LI) e superior (LS) para os respectivos intervalos de confiança (95%)

Tratamento	Gênero	n	Estimativa	Erro Padrão	LI	LS
HBSS	F	14	17,0	1,3	14,5	19,5
MSC	F	14	13,5	0,8	11,9	15,1
Pericito	F	15	14,7	0,2	14,4	15,0
HBSS	M	11	14,6	0,5	13,7	15,5
MSC	M	13	12,5	1,5	9,6	15,4
Pericito	M	13	14,2	0,9	12,5	16,0

Testes de Wald ² de comparações múltiplas sugerem que não há diferenças entre os instantes de mudança na taxa esperada de decréscimo do PaGE para os seis grupos ($p = 0,130$). O ajuste de um modelo reduzido sugere que, para todos os tratamentos e ambos os gêneros, o instante de mudança na taxa esperada de decréscimo do PaGE ocorre na 15ª semana (erro padrão = 0,1).

Ajustamos modelos mistos de regressão segmentada com mudança de comportamento da taxa esperada de decréscimo de PaGE ocorrendo na semana 15. Os resultados estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Estimativas das taxas esperadas de decréscimo de PaGE antes e depois dos instantes de mudança de comportamento

Gênero	Tratamento	Antes da 15ª semana		Depois da 15ª semana	
		Taxa esperada de decréscimo	Erro padrão	Taxa esperada de decréscimo	Erro padrão
F	HBSS	-8,0	0,7	-4,9	1,3
	MSC	-3,5	0,7	-15,6	1,4
	Pericito	-2,8	0,7	-18,2	1,44
M	HBSS	-3,4	1,0	-26,0	2,8
	MSC	-4,3	0,9	-16,4	2,6
	Pericito	-5,3	0,8	-12,2	2,1

Estes resultados indicam que para machos, até a 15ª semana, a taxa esperada de piora no teste do PaGE é maior nos animais tratados com pericitos (-5,3 segundos/semana) relativamente àquela de animais submetidos aos demais tratamentos (-3,4 segundos/semana para HBSS ou -4,3 segundos/semana para MSC);

no entanto, esse quadro muda após a 15ª semana em que animais tratados com pericitos apresentam uma taxa esperada de piora menor do que aquelas esperadas para animais tratados com MSCs ou HBSS ou seja, os machos tratados com pericitos pioram mais lentamente que os demais. O grupo de machos tratados com MSCs apresenta comportamento semelhante àquele de animais tratado com pericitos; as taxas esperadas de decréscimo do PaGE posicionam-se entre aquelas obtidas para animais sob este tratamento e os valores obtidos para aqueles tratados com HBSS.

Para fêmeas, o quadro é o oposto. Como observado na figura 2, a piora das fêmeas tratadas com HBSS é constante desde o início do tratamento; já as fêmeas tratadas com MSCs ou pericitos são capazes de manter o desempenho no teste até um determinado ponto e depois disso pioram rapidamente. Isso pode ser evidenciado com a análise das taxas esperadas de decréscimo antes e após o ponto estimado de mudança. No início do tratamento, a taxa de piora de animais tratados com HBSS é aproximadamente 2,9 vezes maior do que a taxa esperada para animais tratados com pericitos. Depois do ponto de mudança, a taxa esperada de decréscimo do teste PaGE é menor para fêmeas tratadas com HBSS, relativamente às demais. Assim como ocorre para machos, fêmeas tratadas com MSCs apresentam comportamento semelhante àquele de fêmeas tratadas com pericitos, com valores esperados de magnitude intermediária aos dois outros tratamentos (pericitos e HBSS).

Análise longitudinal da variável *rotarod*

Gráficos de perfis individuais de cada animal com perfil médio da população suavizado por meio da técnica LOESS apresentados na figura 16 sugerem uma mudança de comportamento no tempo durante o qual o animal permaneceu no cilindro rotativo de um aparelho *rotarod*. Utilizando técnicas estatísticas similares àquelas consideradas nas análises anteriores, estimamos os pontos de mudança na taxa esperada de decréscimo do *rotarod* para animais submetidos aos três tratamentos. As estimativas e erros padrões correspondentes além dos limites inferior e superior de intervalos de confiança (95%) estão dispostos na tabela 6.

Figura 16: Perfis individuais com LOESS do tempo em que o animal permaneceu no cilindro rotativo de um aparelho *rotarod*.

Tabela 6: Estimativas e erros padrões do instante (em semanas) em que ocorre mudança na taxa esperada de decréscimo do Rotarod com limites inferior (LI) e superior (LS) para os respectivos intervalos de confiança (95%)

Tratamento	Gênero	Estimativa	Erro padrão	LI	LS
HBSS	F	14,6	0,5	13,6	15,7
MSC	F	15,5	0,6	14,4	16,7
Pericito	F	15,7	0,7	14,4	17,0
HBSS	M	14,4	0,3	13,8	15,1
MSC	M	12,0	1,7	8,7	15,4
Pericito	M	15,2	0,3	14,7	15,8

Testes de Wald ² de comparações múltiplas sugerem que não há diferenças entre os instantes de mudança na taxa esperada de decréscimo do *rotarod* para fêmeas tratadas com HBSS, MSCs ou pericitos e machos tratados com HBSS ou pericitos ($p=0,200$). Há evidência de diferença entre os instantes de mudança na taxa esperada de decréscimo do *rotarod* de machos tratados com MSCs em relação

àquelas para machos tratados com HBSS ou pericitos ou fêmeas submetidas a quaisquer dos tratamentos ($p < 0,001$). Esses resultados estão resumidos na tabela 7.

Tabela 7: Estimativas e erros padrões do instante (em semanas) em que ocorre mudança na taxa esperada de decréscimo do Rotarod com limites inferior (LI) e superior (LS) para os respectivos intervalos de confiança (95%)

Tratamento	Gênero	Estimativa	Erro padrão
HBSS	F	15,0	0,2
MSC	F	15,0	0,2
Pericitos	F	15,0	0,2
HBSS	M	15,0	0,2
MSC	M	12,0	1,7
Pericitos	M	15,0	0,18

Ajustamos modelos mistos de regressão segmentada com mudança de comportamento da taxa esperada de variação de peso nos instantes identificados na tabela 8.

Utilizando técnicas de comparações múltiplas, concluímos que as taxas esperadas de decréscimo do *rotarod* após o ponto de mudança são iguais para as fêmeas submetidas aos tratamentos HBSS, MSCs ou pericitos e iguais àquelas dos machos submetidos ao tratamento com MSCs ($p=0,339$). Não há evidência de que as taxas esperadas de decréscimo do *rotarod* após o ponto de mudança sejam diferentes para machos tratados com HBSS ou pericitos ($p=0,215$).

Após o instante de mudança, a taxa esperada de decréscimo do *rotarod* para machos tratados com HBSS e pericitos é de 46,1 segundos por semana (erro padrão = 3,2 segundos) e para machos tratados com MSCs ou fêmeas sob quaisquer dos três tratamentos, a taxa esperada de decréscimo do *rotarod* é de 26,6 segundos por semana (erro padrão = 1,2 segundos). Um resumo desses resultados está apresentado na tabela 8 abaixo.

Tabela 8: Estimativas das taxas esperadas de decréscimo do *rotarod* antes e depois dos instantes de mudança de comportamento.

Gênero	Tratamento	Mudança ocorrendo na semana	Antes da mudança		Depois da mudança	
			Taxa esperada de decréscimo no <i>rotarod</i>	Erro padrão	Taxa esperada de decréscimo no <i>rotarod</i>	Erro padrão
F	HBSS	15	-0,3	1,1	-26,6	1,2
	MSC	15	-1,2	1,1	-26,6	1,2
	Pericito	15	-1,8	1,2	-26,6	1,2
M	HBSS	15	-3,9	1,7	-46,1	3,2
	MSC	12	4,7	2,8	-26,6	1,2
	Pericito	15	1,8	1,5	-46,1	3,2

A análise da variável *rotarod* para fêmeas revelou que o perfil de desempenho foi semelhante entre os tratamentos com relação ao ponto de mudança estimado e à taxa esperada de decréscimo após o ponto de mudança. Há uma piora na taxa esperada de decréscimo anterior ao ponto de mudança para animais tratados com MSCs e pericitos em relação às taxas esperadas de decréscimo para animais tratados com HBSS, indicando que em uma fase mais inicial da doença, as fêmeas que recebem células pioram mais rapidamente do que as fêmeas que recebem HBSS.

Para os machos tratados com MSCs, há uma antecipação no ponto de mudança em relação àqueles esperados para machos ou fêmeas submetidos aos demais tratamentos; no entanto este efeito é contrabalanceado por taxas menores de decréscimo de desempenho esperado após este ponto relativamente àquelas esperadas para animais tratados com HBSS ou pericitos. Em outras palavras, machos tratados com MSCs começam a perder peso antes daqueles tratados com HBSS ou pericitos, no entanto, após este ponto de mudança, observa-se que machos tratados com MSCs perdem peso mais lentamente do que os machos tratados com HBSS ou pericitos. Adicionalmente, para animais tratados com MSCs ou pericitos espera-se uma melhora neste teste no período anterior ao ponto de mudança, efeito ausente em animais tratados com HBSS.

Análise longitudinal da variável *motor score*

Gráficos de perfis individuais de cada animal com perfil médio da população suavizado por meio da técnica LOESS apresentados na figura 17 sugerem que a partir de um certo instante há uma tendência de mudança na taxa esperada de decréscimo no sinal de déficit motor. Estimativas dos instantes de mudança da taxa esperada de decréscimo do déficit motor e erros padrões correspondentes além dos limites inferior e superior de intervalos de confiança (95%) estão dispostos na tabela 9.

Figura 17: Perfis individuais com LOESS para o sinal de déficit motor no teste do *motor score*.

Tabela 9: Estimativas e erros padrões do instante (em semanas) em que ocorre mudança na taxa esperada de decréscimo do déficit motor com limites inferior (LI) e superior (LS) para os respectivos intervalos de confiança (95%)

Tratamento	Gênero	Estimativa	Erro padrão	LI	LS
HBSS	F	11,0	0,3	10,4	11,6
MSC	F	13,8	0,4	13,0	14,6
GP	F	13,0	2,1	8,9	17,1
HBSS	M	12,0	0,5	11,0	13,0
MSC	M	11,5	1,3	9,0	14,0
GP	M	14,7	0,2	14,3	15,1

Testes de Wald de comparações múltiplas sugerem que não há diferenças entre os instantes de mudança na taxa esperada de decréscimo do sinal do déficit motor para machos e fêmeas ($p=0,865$). No entanto, há sugestão de diferenças entre os instantes de mudança na taxa esperada de decréscimo do déficit motor para animais tratados com HBSS, MSC e Pericitos ($p<0,001$). Esses resultados estão resumidos na tabela 10.

Tabela 10: Estimativas dos pontos de mudança na taxa esperada de variação sinal do déficit motor e correspondentes erros padrões para agrupamentos de tratamentos e gêneros

Agrupamentos identificados	Estimativa	Erro padrão
HBSS (Machos e Fêmeas)	11	0,3
MSC (Machos e Fêmeas)	14	0,4
Pericitos (Machos e Fêmeas)	15	0,2

Ajustamos modelos mistos de regressão segmentada com mudança de comportamento da taxa esperada de variação de sinal do déficit motor nos instantes identificados na tabela 10.

Utilizando técnicas de comparações múltiplas, concluímos que não há evidência de que as taxas esperadas de decréscimo no sinal de déficit motor sejam diferentes para animais tratados com MSCs ou pericitos tanto para fêmeas ($p=0,318$), quanto para machos ($p=0,239$). Há evidência de que a taxa esperada de decréscimo no sinal de déficit motor para animais tratados com MSCs ou pericitos é diferente da

taxa correspondente para animais tratados com HBSS, tanto para fêmeas ($p < 0,001$) quanto para machos ($p < 0,001$). Um resumo desses resultados está apresentado na tabela 11.

Tabela 11: Estimativas das taxas esperadas de decréscimo do sinal do déficit motor antes e depois dos instantes de mudança de comportamento.

Gênero	Tratamento	Mudança ocorrendo na semana	Antes da mudança		Depois da mudança	
			Taxa esperada de decréscimo	Erro padrão	Taxa esperada de decréscimo	Erro padrão
F	HBSS	11	-0,15	0,06	-0,34	0,02
	MSC	14	0,05	0,03	-0,60	0,03
	Pericito	15	-0,06	0,03	-0,60	0,03
M	HBSS	11	0,11	0,08	-0,48	0,04
	MSC	14	-0,13	0,04	-0,71	0,04
	Pericito	15	-0,04	0,03	-0,71	0,04

O desempenho de machos e fêmeas na avaliação do *motor score* é semelhante entre os grupos de tratamento. A taxa de piora após o ponto de mudança é maior para estes dois grupos em relação ao grupo que recebe HBSS no entanto, há atraso no ponto de mudança, sugerindo que os animais tratados com células começam a apresentar sintomas de déficit motor mais tardiamente que os animais que recebem HBSS, sendo que os tratados com pericitos ainda apresentam estes sintomas uma semana após o início esperado para animais que recebem MSCs.

Referências bibliográficas do apêndice

- Morettin, P. A. & Toloi, C. M. C. *Análise de Séries Temporais*. (2006). *Finite Sample to Asymptotic Methods in Statistics*. (Cambridge University Press, 2009).
- Sen, P. K., Singer, J. M. & Pedroso-de-Lima, A. C. *From*