

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO**

Leticia Domingues Bertuzzi

**EFEITOS DE IMPLANTES DE
CÉLULAS-TRONCO SOBRE O
DESEMPENHO DE RATOS EM UM
MODELO DE DOENÇA DE
ALZHEIMER**

Porto Alegre

2013

Leticia Domingues Bertuzzi

Efeitos de Implantes de Células– Tronco sobre o Desempenho de Ratos em um Modelo de Doença de Alzheimer

UFCSPA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Orientador: Prof. Dr. Alcyr Alves de Oliveira Jr.

**Porto Alegre
2013**

Catálogo na Publicação

Bertuzzi, Leticia Domingues

Efeitos de implantes de células-tronco sobre o desempenho de ratos em um modelo de doença de Alzheimer / Leticia Domingues Bertuzzi. -- 2013.

110 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, 2013.

Orientador(a): Alcyr Aves de Oliveira Jr.

1. Modelo animal de doença de Alzheimer. 2. Implante de Células-Tronco. 3. Comportamento. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Alcyr Alves de Oliveira Jr., pelo incentivo, pela crença de que esse projeto poderia ser concluído, mas sobretudo, pela confiança depositada no meu trabalho.

Obrigada aos colegas dessa primeira turma do PPG-CR pelas risadas, pelos “ouvidos emprestados”, pelo apoio, pela paciência ao me ajudarem a compreender um pouco sobre a fisiologia voltada à fisioterapia. Obrigada pelo companherismo, pela união... pela amizade! Obrigada aos professores do PPG-CR pela competência nessa desafiadora arte de ensinar.

À Inês, um obrigada muito especial pela paciência, pelo carinho, pela disponibilidade, pelas gentis palavras. Ao Mário, pelas inúmeras vezes em que precisou me ajudar com a aquisição dos “sujeitos de pesquisa”, muito obrigada! Ao pessoal do Laboratório da Fisiologia, vocês são sensacionais!! Às “Anas”, minha amizade e admiração. Vocês são muito especiais!

Aos meus amigos, sou extremamente agradecida pela paciência, pela espera, pelas palavras motivadoras. Muito obrigada por estarem comigo, mas principalmente, por compreenderem a minha ausência! Aos bolsitas, voluntários, mestrandos do grupo de pesquisa, minha gratidão. Rafa, Anna, Paty, Leo, Élide, Arthur, Kamilla, Amanda e tantos outros, sem vocês esse trabalho não teria sido concluído!

Aos meus pais e minhas irmãs, muito obrigada pelo amor incondicional, pelo eterno apoio, pela confiança, pelos colos, pelas palavras, por terem tolerado tantas vezes as minhas frustrações e me ensinado a persistir, por me ensinarem a viver... feliz! Eu amo muito vocês! Aos meus sogros, muito obrigada pelo suporte, carinho e cuidado! Ao maior parceiro da minha vida, Rafa, muito obrigada por tudo!!!

RESUMO

Atualmente, a doença de Alzheimer é a mais prevalente enfermidade neurodegenerativa associada ao envelhecimento e à disfuncionalidade no sistema nervoso central. Caracteriza-se clinicamente pelo progressivo prejuízo das funções cognitivas, em especial, pela perda da memória. No entanto, outras funções como a atenção, orientação, capacidade de planejamento e organização de ideias também ficam comprometidas, levando à incapacidade de viver independente. Esses prejuízos resultam de alterações estruturais e funcionais de várias áreas do córtex cerebral. Evidências neuropatológicas da doença de Alzheimer incluem a presença de placas peptídicas de proteína β -Amilóide associadas a redes de neurofibrilamentos em corpos celulares no prosencéfalo basal e nas vias colinérgicas neocorticais. O tratamento farmacológico atual não é curativo, mas paliativo. Assim, pesquisas sobre implantes de células-tronco surgem como uma perspectiva promissora para o tratamento curativo de doenças do sistema nervoso central. Tendo isso em vista, o presente estudo propôs investigar o efeito de implantes de células-tronco oriundas da polpa dental de dente decíduo humano, de tecido adiposo humano e tecido renal de camundongos sobre o comportamento de ratos com lesões no núcleo basal magnocelular, em um modelo de doença de Alzheimer. Para o estudo, foram utilizados ratos *Wistar*, machos, adultos. À exceção do grupo controle, todos os animais receberam infusões unilaterais de AMPA para a lesão do núcleo basal magnocelular. Transcorridos 21 dias das cirurgias para a lesão, os animais receberam os implantes de células-tronco. Após a recuperação, os roedores foram avaliados nos testes do campo aberto, labirinto em T-Elevado e reconhecimento de objetos. Exames imunohistológicos foram realizados, a fim de comprovar a lesão e o comportamento das células-tronco implantadas. Os resultados evidenciaram que animais implantados com células-tronco de tecido adiposo humano e dentina humana obtiveram melhora no desempenho comportamental quando comparados ao grupo lesão.

Palavras-chave: Modelo de doença de Alzheimer; Implante de células-tronco; Comportamento.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most prevalent neurodegenerative disorder related to aging and central nervous system dysfunctions. It is characterized by the progressive loss of cognitive functions, specially, the memory. However, besides compromising the memory, AD is responsible for deficits in attention, orientation, organization, the capacity of planning and judging, among other cognitive functions leading to the inability of living independently. These deficits result from structural and functional changes of various cortical areas. Pathological hallmarks of Alzheimer's disease are dystrophic neuritis associated with plaques and neurofibrillary tangles within nerve cell bodies in the basal forebrain and neocortical cholinergic pathways. Pharmacological treatment is only palliative. Thus, researches on stem cells implants emerge as promising prospects for the cure of central nervous system's disorders. The aim of this study was to investigate the effects of stem cells implants from human dental pulp, human adipose tissue and mice renal tissue on the behavior of rats in a model for Alzheimer's disease. To this purpose, male adult rats of *Wistar* strain underwent stereotactic surgery for lesions of nucleus basalis magnocellularis with unilateral AMPA infusions. Twenty one days from surgery for lesions, animals received stem cells implants. After implants' recovery, rats were evaluated in the following behavioral tests: open field, elevated-T maze and object recognition. Immune histological exams pointed out the extent of caused injury and the performance of implanted stem cells. Results showed an improvement of implanted rats with human dental pulp and human adipose tissue over those with no implants.

Key words: Model for Alzheimer's disease; Stem Cells Implants; Behavior.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

- | | | |
|-----------------|---|----|
| Figure 1 | Open Field: number of crossings | 68 |
| Figure 2 | Elevated T-Maze: inhibitory avoidance from training and trial | 69 |

Apêndice A

- | | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Posição dos sítios de lesão e de implante das células | 83 |
| Figura 2 | Teste do Campo Aberto | 86 |
| Figura 3 | Teste do Labirinto em T-Elevado | 89 |
| Figura 4 | Teste de Reconhecimento de Objetos | 90 |

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Animal Models – Alzheimer’s disease	57
-----------------	-------------------------------------	----

ARTIGO 2

Tabela 1	Open Field: significant variables from first and second days	67
Tabela 2	Elevated T-Maze	69
Tabela 3	Object Recognition	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD	7-Amino-Actinomycin-D
Acetil-Coa	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
AMPA	Ácido α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazolepropionato
AP	Antero/Posterior
AsAP	Ácido ascórbico-2-fosfato
ChAT	Colina Acetiltransferase
CTAh	Células-Tronco de Tecido Adiposo humano
CTDh	Células-Tronco da Polpa Dental de Dentes Decíduos humanos
CTEDDs	Células-Tronco de Dentes Decíduos
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
CTMs-TA	Células-Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo
CTPDs	Células-Tronco de Polpa Dentária
CTRc	Células-Tronco de Tecido Renal de camundongos
CTRs	Células-Tronco Renais
CTs	Células-Tronco
dA	Doença de Alzheimer
dH	Doença de Huntington
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dP	Doença de Parkinson
FITC	Fluorocromo Fluoresceína
HUP-A	Huperzine-A
iPS	Pluripotência Induzida
L	Lateral
nbM	Núcleo Basal de Meynert
NBM	Núcleo Basal Magnocelular
NeuN	Núcleo Neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato

PBS	Tampão Fosfato-Salino
PE	Fluorocromo Ficoeritina
PPA	Proteína Precursora de Amilóide
SNC	Sistema Nervoso Central
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V	Ventral
β A	Peptídeo β -amilóide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA - CONTEXTUALIZAÇÃO	14
	2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER	14
	2.1.1 Sistema Colinérgico	15
	2.1.1.1 Prosencéfalo basal	15
	2.1.1.1.1 <i>Funções Cognitivas</i>	16
	2.1.1.1.1.1 <i>Farmacoterapia</i>	18
	2.1.1.1.1.1.1 <i>Modelos animais de doença de Alzheimer</i>	20
	2.1.1.1.1.1.1.1 <i>Implantes de tecidos neurais</i>	22
	2.1.1.1.1.1.1.1.1 <i>Células-tronco</i>	24
3	REFERÊNCIAS DA REVISÃO	29
4	ARTIGO 1: Stem Cell-Based Therapy for Alzheimer's Disease	39
5	ARTIGO 2: Stem cells behavioral effects in rats in a modelo of Alzheimer's disease	58
6	CONCLUSÃO GERAL	78
	Referências da Conclusão Geral	80
	ANEXOS	81
ANEXO A	Protocolo de Intervenção – Seção da Metodologia do Projeto de Pesquisa da Dissertação	81
	Referências do Anexo A	93
ANEXO B	Parecer do CEUA	96
ANEXO C	Protocolo para a obtenção das células-tronco	99
	Referências do Anexo C	102
ANEXO D	Normas de formatação do periódico <i>Avances en Psicología Latinoamericana</i>	103
ANEXO E	Normas de formatação do periódico <i>Advances in Stem Cells</i>	107

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a doença de Alzheimer (dA) é a mais prevalente enfermidade neurodegenerativa associada ao envelhecimento e à disfuncionalidade do sistema nervoso central (SNC) (Niedowicz, Nelson & Murphy, 2011). Caracteriza-se clinicamente pelo progressivo prejuízo das funções cognitivas, em especial, pela perda da memória, atenção, orientação, da capacidade de planejamento e organização de ideias. Esses prejuízos resultam de alterações estruturais e funcionais de várias áreas do córtex cerebral (Schaeffer, Figueiró & Gattaz, 2011).

Evidências neuropatológicas da dA incluem a presença de placas peptídicas de proteína β -amilóide (β A) associadas a redes de neurofibrilamentos em corpos celulares (Lee, Jin & Bae, 2009). A exata relação entre essas características incapacitantes permanece desconhecida. No entanto, sabe-se que as placas de β A precedem as redes de neurofibrilamentos na região neocortical (Vickers et al., 2000).

A hipótese colinérgica sugere que a perda da acetilcolina (ACh) no SNC contribui significativamente para o declínio da aprendizagem e memória (Wallace & Bertrand, 2013). Há mais de três décadas, foi descrita a importância da função colinérgica para o aprendizado e a memória, quando antagonistas colinérgicos (especialmente os muscarínicos) foram estudados em ratos (Adler et al, 2004).

Na dA, a destruição de neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert (nbM) traz efeitos em outras áreas como hipocampo, córtices parietal e frontal, e núcleo basolateral da amígdala (Adler et al., 2004). Essas associações estruturais sugerem importante envolvimento da modulação do comportamento, da atenção, do aprendizado, da memória, da emoção e do processamento de informações (Wallace & Bertrand, 2013). Sendo assim, o entendimento das alterações do sistema colinérgico se torna essencial para a compreensão das perdas cognitivas e funcionais na dA.

Embora a dA provoque déficits nos diversos sistemas de neurotransmissão, os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal parecem ser mais sensíveis e suscetíveis ao processo da doença (Wallace & Bertrand,

2013). Em virtude disso, as alternativas farmacológicas têm como foco a sinapse colinérgica. O objetivo geral desse tipo de tratamento é aumentar os níveis sinápticos da ACh, buscando atenuar os prejuízos associados à progressão da doença (Wallace & Bertrand, 2013).

Além da farmacologia, outras formas de tratamento que buscam reduzir a velocidade da progressão da doença ou a manutenção e recuperação das funções cognitivas, tais como terapias de treino cognitivo, reabilitação neurocognitiva e *neurofeedback* (Oliveira, 2003). Dessa forma, alguns procedimentos testam vacinas, fármacos antioxidantes capazes de impedir ou reduzir a velocidade da progressão da doença, implantes de células como a reposição colinérgica, além dos implantes de células-tronco (CTs) e sua multivariada capacidade de diferenciação (Oliveira, 2003).

A estrutura correspondente ao nbM, em ratos, é o núcleo basal magnocelular (NBM), que envia projeções colinérgicas para outras partes do cérebro como o neocórtex e a área septal medial com ligações para o hipocampo, bulbo olfatório e córtex visual medial (Pondiki, Stamatakis, Fragkouli, Philippidis & Stylianopoulou, 2006). Excitotoxinas como o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) são usadas para produzir lesões no NBM e gerar um modelo experimental de dA (Muir, Everitt & Robbins, 1994).

O AMPA atua em receptores glutamatérgicos, destruindo corpos celulares por um processo de excitotoxicidade que induz a maciça e sustentada despolarização de células pós-sinápticas, fazendo com que as membranas celulares e suas bombas de cálcio entrem em colapso e percam a capacidade de homeostase (Oliveira, Hodges & Rezaie, 2003). Assim, as células morrem por excesso de estimulação.

Nesse modelo de dA, a toxina causa a morte dos neurônios colinérgicos existentes no NBM sem disseminar a destruição colinérgica para outras estruturas ou outros tipos celulares (Waite, Chen, Wardlow & Thal, 1994). Como consequência, os animais que tiveram seu NBM lesionado por AMPA mostram dificuldades para eliciar memórias recentes, o que pode ser demonstrado no teste comportamental do labirinto aquático, labirinto radial e

outros que avaliam atributos funcionais de memória e aprendizagem como a esQUIVA INIBITÓRIA (Waite et al., 1994).

Os modelos animais de dA buscam reproduzir inúmeras condições patológicas, bioquímicas e clínicas, propiciando o estudo e a elucidação dos diversos mecanismos envolvidos na doença, além de possibilitarem a investigação de estratégias de tratamento (Oliveira & Hodges, 2005). Estudos demonstram que animais com lesões no NBM, implantados com células-tronco (CTs) embrionárias, apresentaram melhor rendimento em tarefas que exigiam habilidades mnemônicas (Oliveira & Hodges, 2005). Dessa forma, a pesquisa com CTs se mostra uma potencial fonte para o tratamento de doenças do SNC como a dA.

2. REVISÃO DA LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

A dA é uma demência neurodegenerativa e irreversível, que se caracteriza pela perda insidiosa e progressiva da memória, acometendo as áreas da fala, motricidade e funções executivas (Swarowsky, 2009). No estágio inicial da doença, há o comprometimento da formação hipocampal, porém, com sua evolução, as áreas corticais passam a ser envolvidas no processo. Além de prejudicar a memória, a dA também é responsável pela disfunção da linguagem, atenção, orientação e da capacidade de tomar decisões (Weintraube et al., 2009).

O paciente em processo inicial da doença confunde algumas informações e tende a evidenciar dificuldades para registrar novos *inputs*. Com o progresso da neurodegeneração, o enfermo passa a demonstrar significativa dificuldade para desenvolver atividades simples como se vestir, tomar banho ou se alimentar (Weintraub et al., 2009), evoluindo para a perda da independência.

As principais características histopatológicas da dA são a presença de placas extracelulares chamadas de placas senis, emaranhados neurofibrilares intracelulares e perda neuronal (Wszolek, 2008.). As placas senis consistem basicamente de fibrilas do peptídeo β A circundadas por neurites distróficas e células gliais reativas (Schaeffer et al., 2011). Esse peptídeo deriva da proteína precursora do peptídeo β A (PPA), sendo processado de duas formas distintas: amiloidogênica, que libera o peptídeo β A; e a não-amiloidogênica, que impede a liberação do peptídeo β A, gerando uma forma secretada de PPA (Swarowsky, 2009).

Estudos em humanos demonstraram significativas relações entre o déficit cognitivo, o nível de peptídeos solúveis de β A (Wang, Dickson & Trojanowski, 1999) e algumas formas de depósito β A (Parvathy et al. 2001). O acúmulo de proteínas β A causa prejuízo na membrana celular, redução da celularidade seguida por danos no DNA, geração de corpos nucleares apoptóticos e outras características clássicas de apoptose (Paradis, Douillard,

Koutroumanis, Goodyer & LeBlanc, 1996). Desse modo, a disfuncionalidade do metabolismo de PPA, a conseqüente acumulação dos peptídeos de β A e a formação de placas senis no parênquima cerebral de indivíduos com a dA têm sido consideradas pontos cruciais para a neuropatologia da dA (Schaeffer et al., 2011).

2.2 SISTEMA COLINÉRGICO

A destruição dos neurônios colinérgicos no nbM levou alguns pesquisadores a postular que a disfunção colinérgica é a primeira causa da perda da memória associada à dA (Bales et al., 2006). Em consonância a isso, estudos *postmortem* sobre o cérebro adulto senil com dA demonstraram a existência de anormalidades e danos nas vias colinérgicas, especialmente nas projeções do prosencéfalo basal (Terry & Buccafusco, 2003).

A ACh é sintetizada nos terminais nervosos através da ação da colina acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e da acetil coenzima A (Acetil-Coa). A enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela hidrólise da ACh, libera colina no líquido extracelular, favorecendo seu reaproveitamento nos processos de síntese neuronal (Squire & Kandel, 2000).

Uma importante perda seletiva da atividade da ChAT no córtex e hipocampo de pacientes com a dA foi reportada na década de 70 em três estudos independentes (Davies & Moloney, 1976; Bowen Smith, White & Davison, 1976; Perry, Perry, Blessed & Tomlinson, 1977). A partir desses estudos, foram identificados os prejuízos de inúmeros neurotransmissores e neuromoduladores na dA, sobretudo do sistema colinérgico, que ocorria previamente aos demais (Davies & Maloney, 1976; Stephan et al., 2012). O déficit nos neurotransmissores gera significativa diminuição da liberação de ACh na amígdala, no hipocampo e no neocórtex, além de alterar a modulação dos receptores muscarínicos sob as funções neuronais dessas estruturas (Brayda-Bruno et al., 2013).

2.3 Prosencéfalo Basal

O prosencéfalo basal corresponde a um conjunto de neurônios do telencéfalo que integra a área septal medial, a banda diagonal de Broca, o pálido ventral, a substância inominada e o nbM (Choi, 2007). Suas células se projetam para variadas regiões cerebrais, incluindo o hipocampo e o córtex. Desse modo, o prosencéfalo basal desempenha importante papel no funcionamento dessas regiões através da liberação de ACh e ativação dos receptores colinérgicos sobre os neurônios (Tomaz, 1993).

Na dA, os neurônios do prosencéfalo basal são caracterizados como os mais vulneráveis (Furey Ricciardi, Schapiro, Rapoport & Pietrini, 2008a), sendo a correlação entre a progressiva e irreversível perda da memória e dos neurônios colinérgicos no sistema de projeção do prosencéfalo basal a responsável pela elucubração da hipótese colinérgica do declínio cognitivo na dA (Bartus & Emerich, 1999).

A organização anatômica das aferências colinérgicas corticais sugerem uma inervação indiferenciada das áreas corticais pelos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal. Especificamente, os *inputs* colinérgicos corticais medeiam as habilidades do indivíduo para perceber e selecionar estímulos e associações, além de escolher os melhores recursos para o processamento dessas funções (Stephen et al., 2012). No entanto, o prosencéfalo basal não possui apenas neurônios colinérgicos. Compõe-se por células glutamatérgicas, gabaérgicas e peptidérgicas, recebendo projeções principalmente glutamatérgicas e gabaérgicas, além dos sistemas límbico e paralímbico, o que inclui a amígdala (Choi, 2007).

2.4 Funções cognitivas

Estudos sobre as projeções celulares piramidais no córtex frontal de ratos identificaram projeções para várias estruturas corticais e subcorticais (Hirai, Morishima, Karube & Kawaguchi, 2012). Dentre os alvos subcorticais, os neurônios do núcleo pontino, que fornecem informações ao cerebelo, estão envolvidos na supervisão de aprendizagem da memória de procedimento (Pennartz, Ito, Verschure, Battaglia & Robbins, 2011); os neurônios do estriado, no núcleo basal, estão envolvidos com o reforçamento da aprendizagem

(Glimcher, 2011), e as conexões entre o córtex frontal e o hipocampo participam da formação e recuperação da memória (Eichenbaum, 2006).

A memória procedural, também conhecida como memória implícita ou não declarativa, é um tipo de memória dificilmente acessível à mente consciente, isto é, sua evocação é inconsciente. Squire e Kandel (2000) caracterizam a memória não declarativa “como uma grande família de diferentes capacidades de memória que compartilham uma característica em particular” (p.36), refletindo as habilidades motoras, sensoriais, de sensibilização e os condicionamentos clássico e operante. Cabe ressaltar que a memória não declarativa apresenta natureza reflexa e se mantém intacta em pacientes que sofrem de amnésia, possivelmente por não ser armazenada no hipocampo (Squire & Kandel, 2000).

O córtex frontal está ativamente envolvido na formação das memórias por meio de conexões existentes entre o hipocampo, a amígdala, o núcleo basal e o cerebelo (Miller & Cohen, 2001). Dessa forma, as patologias no lobo frontal podem desenvolver déficits no desempenho da memória como prejuízos para recordar, fazer julgamentos e predições sobre a própria memória, além de dificultar a evocação de habilidades já conhecidas (Bories, Husson, Guitton & De Koninck, 2013). A capacidade para adquirir novas memórias representa uma função cerebral distinta, que se localiza na porção medial do lobo temporal, sendo separável de outras funções cognitivas.

Assim, o lobo temporal medial e o hipocampo não representam sítios de armazenamento final para a memória de longa duração (Lamb, Masellis, Freedman, Stuss & Black, 2013), o que pode justificar a capacidade de os pacientes com a dA terem maior facilidade para recordar eventos remotos.

Além dos déficits na memória, atenção e fluência verbal, outras funções cognitivas deterioram, à medida que a dA progride. A capacidade de fazer cálculos, as habilidades viso-espaciais, a capacidade de usar objetos comuns ou ferramentas simples representam alguns exemplos (Lindeboom & Weinstein, 2004). Ainda, o grau de vigília e a lucidez do doente podem ser afetados em estágios mais avançados, assim como podem ocorrer alterações

motoras associadas à fraqueza do paciente (Sereniki & Vital, 2008). Normalmente, esses sintomas são acompanhados por distúrbios comportamentais, agressividade, alucinações, hiperatividade, irritabilidade e depressão (Sereniki & Vital, 2008).

Os transtornos do humor afetam uma parcela considerável de indivíduos que desenvolvem a dA, havendo a identificação de sintomas depressivos em muitos desses pacientes (Kessing, 2012). No entanto, outras características como apatia, lentificação, dificuldade de concentração, alteração de peso, insônia e agitação também podem ocorrer como parte da síndrome demencial (Gauthier, Juby, Dalziel, Réhel & Schechter, 2010), corroborando para a incapacitação do paciente.

Tendo isso em vista, inúmeras são as pesquisas realizadas com o intuito de desenvolver um tratamento curativo para as doenças neurodegenerativas, uma vez que o tratamento farmacológico não reverte o prejuízo neurológico acarretado pela dA (Sadowsky & Galvin, 2012).

2.5 Farmacoterapia

Em função da complexa neurobiologia da dA, intervenções medicamentosas simples (com um agente) tendem a ser insuficientes no impacto do curso da doença (Cummings, Gould & Zhong, 2012). Apesar do extensivo debate sobre a eficácia das drogas inibidoras da colinesterase, os fármacos, mesmo apresentando propriedades distintas, inibem a quebra da ACh através do bloqueio da AChE, o que faz aumentar o nível de ACh no cérebro (Birks, 2006). O uso de drogas como o donepezil, a galantamina e rivastigmina, utilizadas em pacientes com sintomas moderados e leves na dA, evidencia retardo na deterioração cognitiva e nos problemas comportamentais (Sadowsky & Galvin, 2012).

Apesar de o tratamento farmacológico atenuar o declínio cognitivo, não recupera as capacidades perdidas. Além disso, permanece nebulosa a identificação de quais pacientes responderão melhor a cada um dos fármacos, assim como não se tem como prever quais são os que desenvolverão, de forma mais intensa, reações adversas causadas pela

medicação (vômito, náusea e diarreia como as mais prevalentes) (Sadowsky & Galvin, 2012).

De acordo com Pfeil e colaboradores (2012), o tratamento combinado de um inibidor da AChE associado à memantina prolonga o tempo de independência do paciente com a dA. Contudo, o benefício só é percebido após um ano de tratamento combinado. Chu (2012) identificou que pacientes em tratamento simples com galantamina, donepezil e rivastigmina, por mais de quatro anos, evidenciaram menor declínio das funções cognitivas do que o esperado.

Novas estratégias terapêuticas para a dA estão sendo estudadas. Efeitos de substâncias que apresentam características neuroprotetoras demonstraram potenciais fontes para um possível tratamento de doenças neurodegenerativas. A epicatequina, um polifenol da família flavan-3-ol, que pode ser encontrada em alimentos e bebidas tais como chocolate *in natura*, vinho tinto, algumas frutas e chás, em especial no tradicional chá-verde - *Camellia sinensis* - pode exercer propriedades neuroprotetoras (Aktas, Waiczies & Zipp, 2007).

Frutas e vegetais ricos em flavonoides possuem papel importante na prevenção de declínios cognitivos e motores relacionados ao envelhecimento (Bickford, Shukitt-Hale, & Joseph, 1999). Adicionalmente, estudos *in vitro*, examinando os mecanismos potenciais de neuroproteção dos flavonoides, indicam que a epicatequina pode prevenir a morte celular pela redução do estresse oxidativo (Schroeter, Williams, Matin, Iversen, & Rice-Evans, 2000). Weinmann e colaboradores (2010) perceberam melhora considerável entre pacientes com dA que faziam uso de Gingko Biloba daqueles que faziam uso de placebo. No entanto, destacaram a necessidade de mais pesquisas comparando o efeito da Gingko Biloba e inibidores da AChE, uma vez que poucos estudos identificaram diferença estatística no uso da Gingko Biloba.

Outra potencial fonte neuroprotetora corresponde ao alcaloide isolado da erva *Huperzia serrata*, usado na medicina tradicional chinesa para tratamento de febres, inchaços, hipertensão e alterações de memória, também

está sendo estudado por evidenciar características que inibem a AChE (Zhang & Tang, 2006). Em estudo realizado com ratos, foi identificado um efeito protetivo das funções de células mitocondriais cerebrais após o uso de Huperzine-A (Hup-A), nome comercial da *Huperzia serrata*, sugerindo importante potencial da droga para ações inibidoras da AChE (Gao et al., 2009). Nos Estados Unidos, o Hup-A é vendido como suplemento alimentar capaz de melhorar o desempenho da memória. Entretanto, mais precisa ser estudado para corroborar essa hipótese.

Os tratamentos capazes de modificar o curso da dA são, além de necessários, extremamente importantes para aqueles que têm o diagnóstico e para os familiares. Assim, os modelos animais seguem representando um importante papel para o teste de hipóteses que possam servir como alternativas de tratamento para as doenças neurodegenerativas (Oliveira & Bizarro, 2006).

2.6 Modelos animais de doença de Alzheimer

Nenhum modelo animal representa fidedignamente as características humanas comportamentais, cognitivas, neuroquímicas e neurofisiológicas (Oliveira & Hodges, 2005). No entanto, o argumento básico para o uso de animais em pesquisas refere ao fato de que viabilizam a verificação de hipóteses classificadas como antiéticas ou impossíveis de serem aplicadas em seres humanos (Oliveira & Bizarro, 2006).

Uma das alternativas para se reproduzir controladamente doenças neurológicas em animais se dá por meio da destruição seletiva das células naturais ou de estruturas correlatas às patologias humanas. No modelo animal de dA, busca-se a depleção de células colinérgicas pela infusão de agentes capazes de destruir populações celulares ou estruturas cerebrais (Oliveira & Hodges, 2005). A infusão de excitotoxinas é um dos métodos mais comuns, sendo as mais conhecidas o N-metil-D-aspartato (NMDA) (Inglis & Semba, 1997), ácido caínico (Dunnett, Whishaw, Jones & Bunch, 1987), ácido ibotênico (Inglis & Semba, 1997), ácido quisquálico (Inglis & Semba, 1997) e

AMPA (Inglis & Semba, 1997), que infundidos no prosencéfalo basal do animal, simulam importantes aspectos da dA (Oliveira, et al., 2003).

Nesse tipo de infusão, as excitotoxinas agem nos receptores glutamatérgicos, destruindo corpos celulares neuronais através da despolarização maciça das células pós-sinápticas; o que torna o mecanismo de homeostase impossível e faz com que as células morram por excesso de estimulação (Barker & Dunnet, 1999). A comparação do efeito desses compostos sobre o comportamento, a bioquímica e histologia foi investigada por diversos autores, sendo variáveis a potencialidade e especificidade de cada uma das substâncias relacionadas aos subtipos de receptores glutamatérgicos (Inglis & Semba, 1997).

O modelo animal de lesão no NBM é considerado um dos principais modelos experimentais de dA porque, além de produzir um déficit colinérgico, podem ser utilizadas diferentes toxinas para lesionar o cérebro do animal, dependendo do efeito desejado. Quando se intenciona uma depleção colinérgica mais seletiva, sugere-se infusão de AMPA (receptor glutamatérgico ionotrópico, permeável ao sódio, que provoca a despolarização rápida dos neurônios) na área septal medial e no NBM (Inglis & Semba, 1997). Cabe ressaltar que lesões unilaterais do NBM produzem maior prejuízo cognitivo do que lesões bilaterais.

Conforme estudo de Calaminici e colaboradores (1997), a lesão unilateral do NBM com AMPA produz uma perda considerável de marcadores colinérgicos nos córtices ipsilaterais frontal e parietal sem acarretar a recuperação dessas regiões, transcorridos seis meses da lesão. Essa perda pode ser associada ao aumento compensatório da densidade das fibras ricas em AChE no córtex contralateral, nas regiões corticais ipsilaterais que não recebem inervação colinérgica do NBM, além de influenciar o tamanho dos neurônios colinérgicos magnocelulares no NBM contralateral (Calaminici, Abdulla, Sinden & Stephenson 1997).

Contudo, além da infusão de agentes excitotóxicos, outras formas também são utilizadas para modelar a dA. Os modelos transgênicos mostram uma importante alternativa para o estudo translacional da dA, pois possibilitam

a modificação genética do animal. Dependendo do objetivo desejado para o estudo, pode-se ter aumento das proteínas β A ou das proteínas Tau, por exemplo. O camundongo que expressa a proteína humana APP695, para citar um dos possíveis modelos, favorece o aparecimento de mutações da APP (Yu et al., 2012). No país, entretanto, o gasto despendido para a aquisição desses animais torna o método por vezes, impraticável.

O modelo de senescência permite a observação do declínio natural de inúmeros sistemas de neurotransmissores. Porém, essa alternativa é pouco difundida em função do longo tempo necessário para que os animais evidenciem os déficits, da dificuldade para manter a longevidade dos animais e a expressão do declínio em todos os sujeitos, além da despesa para a conservação adequada dos sujeitos nos biotérios (Oliveira & Hodges, 2005).

2.7 Implantes de tecidos neurais

A primeira publicação sobre o transplante de tecido neural foi feita por Walter Thomson, em 1890. O estudo constava de um implante de tecido cortical de um gato adulto em um cachorro adulto, reportando a sobrevivência de células numa análise *post-mortem* realizada semanas após o procedimento (Barker & Dunnet, 1999). Entretanto, o marco do neurotransplante ocorreu em 1917, com Elisabeth Dunn, em um estudo sobre transplante de tecidos corticais de camundongos neonatais em camundongos adultos (Barker & Dunnet, 1999).

Transplantar células corresponde ao ato de remover um tecido de um sítio específico e inseri-lo em outro local (Kelly et al, 2009). Os implantes ou transplantes autólogos são aqueles realizados por tecidos ou órgãos doados pelo próprio indivíduo (hospedeiro). Implantes ou transplantes alogênicos se referem ao tecido ou órgão removido de um indivíduo (doador), posicionado em outro indivíduo da mesma espécie. Por fim, os xenotransplantes representam os implantes ou transplantes realizados em sujeitos de espécies diferentes do tecido transplantado (Kelly et al., 2009). No que concerne aos sítios de implantes, classificam-se em duas categorias: homotópicos (tecidos ou células realocados no sítio originário); heterotópicos ou ectópicos (células ou tecidos

realocados em sítios distintos, por exemplo, implante de células da medula adrenal em sítios cerebrais) (Barker & Dunnet, 1999).

Em função de o SNC adulto apresentar baixa capacidade de reparação e reposicionamento celular endógeno, o que é imprescindível para a recuperação funcional, a terapia celular representa uma importante alternativa para o tratamento de patologias do SNC (Giusto, Donegà, Cossetti & Pluchino, 2013; Bonnamain, Neveu & Nayeilhan, 2012). Na prática clínica, o reposicionamento celular pode ser observado em pacientes com a doença de Parkinson (dP) - alotransplantes de células fetais mesencefálicas -, e em pacientes com a doença de Huntington (dH) - implantes de neuroblastos estriatais fetais humanos (Bonnamain et al., 2012). Resultados de implantes para a dP evidenciaram a melhora de alguns pacientes associada à sobrevivência das células implantadas e reinervação parcial do estriado (Björklund & Lindvall, 2000). Na dH, pesquisadores perceberam melhora funcional de pacientes implantados (Bachoud-Lévi et al., 2006).

Entretanto, apesar dos desfechos promissores, importantes questões como a viabilidade do tecido, preocupações logísticas e éticas envolvendo o uso de material humano, exequibilidade e pureza da célula, existência de efeitos colaterais deletérios, por exemplo, precisam ser avaliadas e entendidas para a chegada plena dos transplantes celulares à clínica (Barker, Barrett, Mason & Björklund, 2013).

De acordo com o estudo realizado por Dunnet e colaboradores (1982), apesar de os animais implantados com células colinergicamente ricas realizarem a tarefa solicitada no teste comportamental (no estudo, os ratos foram avaliados no teste do labirinto em T- elevado), o tempo necessário para sua execução foi muito maior do que o despendido pelos animais controle. Dessa forma, entende-se que a reinervação colinérgica se mostrou necessária, porém, insuficiente para a recuperação funcional.

Em estudo de Barker e Dunnet, anos mais tarde, ficou evidente que o implante ectópico de células do prosencéfalo ventral (colinergicamente ricas) atenuou *deficits* de aprendizagem associados a lesões do sistema colinérgico de ratos (lesão da fimbria-fórnix e principais deafferências colinérgicas do

hipocampo) quando implantadas nas deafferências do hipocampo (Barker & Dunnet, 1999).

Uma importante questão que envolve o transplante celular corresponde ao sistema imunológico. A inflamação corresponde ao primeiro sinal do sistema imunológico em defesa do organismo contra agentes patógenos intrusivos. A propriedade de discriminação faz com que seja possível ao organismo identificar o que é dele próprio do que é estranho ao mesmo, eliminando os agentes infecciosos (Bonnamain et al., 2012). Em função dessa resposta imunológica ocorrem os fenômenos de rejeição dos transplantes.

O SNC apresenta características imunológicas privilegiadas, ou seja, há baixos índices de inflamação após a inoculação de tecido alogênico (Medawar, 1948). Modo e colaboradores (2002) referem que essa característica pode ser atribuída a inúmeros fatores como a baixa imunogeneticidade dos tecidos neuronais, a proteção da barreira hematoencefálica, e/ou a ausência da drenagem linfática no cérebro. Contudo, a proteção imunológica do SNC é apenas parcial, uma vez que existindo diferença de espécies entre o doador e o hospedeiro pode haver rejeição (Modo et al., 2002). Dessa feita, o tratamento com imunossupressores se faz necessário em situações de transplantes alogênicos, por exemplo.

2.8 Células-tronco

As CTs são células indiferenciadas, capazes de autorrenovação prolongada, podendo dar origem a, pelo menos, um tipo celular (Meirelles, 2007). Quanto à potencialidade, classificam-se em toti, pluri ou multipotentes. As CTs totipotentes são aquelas capazes de gerar todos os tipos de células e tecidos que contribuem para a formação do organismo, por exemplo, o óvulo fecundado (zigoto) e as primeiras células provenientes do zigoto até a fase da mórula inicial (16 células), antes mesmo do estágio dos blastocistos (Schwindt, Barnabé & Mello, 2005). As pluripotentes podem originar muitas, mas não todas as células ou todos os tecidos do organismo. Correspondem às CTs que formam um embrião propriamente dito e provêm da massa interna do

blastocisto (Martin, 1981). As CTs multipotentes são as células que originam apenas um subgrupo especializado de linhagem celular, por exemplo, o estroma da medula óssea (Schwindt et al., 2005).

Evidências sugerem que indivíduos adultos possuem CTs, contudo, não totipotentes. Dentre os tecidos conhecidos, as CTs epiteliais, neurais e mesenquimais podem ser citadas (Meirelles, 2007). Em função de processos como *turnover* natural e lesões decorrentes de agressões, persiste no organismo adulto a necessidade de renovação celular. Essa renovação só pode ser realizada a partir de um pequeno número de células que permanece indiferenciado, as CTs do adulto (Sesterheim, 2010). Atualmente, um método para a aquisição de CTs adultas pluripotentes corresponde à reprogramação celular genética a partir de CTs de pluripotência induzida (iPS). Essas iPS se parecem com as CTs embrionárias e podem se diferenciar em células dos tecidos endodermal, mesodermal e ectodermal (Estrela, Alencar, Kitten, Vencio & Gaya, 2011).

As CTs mesenquimais (CTMs) são encontradas, principalmente, na medula óssea de indivíduos adultos, gerando ossos, tendões, cartilagens, tecido adiposo e muscular, estroma medular e algumas células com características neurais (Augello, Kurt & De Bari, 2010); e, em 1991, Caplan cunhou a nomenclatura CTMs para definir essas CTs capazes de dar origem a diferentes tecidos mesenquimais da medula óssea.

Inúmeras são as discussões acerca da terminologia das CTMs. Uma vez que se diferenciam em linhagens das três camadas germinativas, sendo originárias da mesoderme, caracterizam-se como pluripotentes, sugerindo inadequação na utilização do termo mesenquimal (especializadas e multipotentes) (Meirelles, Caplan & Nardi, 2008). Tendo isso em vista, a fim de evitar confusão, o termo CTMs utilizado nesse estudo refere à população de células presentes no organismo com capacidade de gerar outras CTs mesenquimais, além de formar tecidos mesenquimais.

As CTMs, quando submetidas a diferentes estímulos, são capazes de diferenciações em CTs osteogênicas (Kulterer et al., 2007), condrogênicas (Hashimoto, Kariya & Miyazaki, 2006), adipogênicas (De

Gemmis et al., 2006), neurogênicas (Anisimov, Christophersen, Correia & Brundin, 2007) e cardiogênicas (Amado et al., 2005). Podem ser encontradas nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo, fornecendo suporte estrutural, além da regulação da passagem celular através dos tecidos. Embora possuam capacidade de diferenciação mais limitada que as CTs embrionárias, apresentam importantes vantagens como facilidade de isolamento, capacidade de propagação em cultura e característica não imunogênica, o que permite seu emprego em transplantes alogênicos (Bydlowski, Debes, Maselli & Janz, 2009).

Além de encontradas na medula, as CTMs também podem ser identificadas em tecido adiposo (CTMs-TA), caracterizando-se pela secreção de múltiplos fatores do crescimento e reprodução de efeitos citoprotetivos em modelos animais (Im et al., 2013). Estudos investigaram os efeitos neuroprotetores das CTMs-TA em modelos de hemorragia intracerebral, sendo evidenciada redução na inflamação cerebral tanto aguda quanto crônica após o implante, o que favorece a recuperação funcional (Kim et al., 2007). Em um estudo sobre implante intravenoso de CTMs-TA em um modelo de dA, foi identificada a recuperação de déficits na memória dos animais, além da redução de placas amiloides no cérebro dos camundongos. Não houve a formação de tumores malignos nesse estudo (Kim et al., 2012). Entretanto, Gimble e colaboradores (2011) ressaltaram a formação de sarcomas, *in vivo*, após implante de CTMs-TA em camundongos imunodeficientes.

Tecidos dentais e periodontais constituem uma nova fonte de CTs neurais, apresentando como vantagem em relação a outras CTs, o fenótipo de cristas neurais (Ibarretxe et al., 2012). A formação dos dentes é determinada principalmente pelas células epiteliais da boca que formam o esmalte; as células mesenquimais que formam a papila dentária; e as células da crista neural. Essas células se originam no sistema nervoso e migram para o maxilar e a mandíbula, onde interagem com as células mesenquimais para formar o esmalte e a papila dentária (Chung, et al., 2009). Atualmente, inúmeros são os tipos de CTs adultas isoladas de dentes, o que inclui CTs da polpa dentária (CTPD), CTs do esfoliamento de dentes decíduos (CTEDD), CTs do ligamento

periodontal, CTs do folículo dentário progenitor e CTs da papila apical (Rodríguez-Lozano et al., 2012).

As CTPDs e as CTEDDs de tecido humano apresentam capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas (Janebodin et al, 2011). Quando comparadas às CTMs de medula óssea, observa-se que as CTPDs e CTEDDs apresentam mais células metabólicas ativas e desenvolvidas (Karaöz, Sağlam, Aksoy, Kaymaz & Duruksu, 2011). Tais características foram corroboradas no estudo de Wang e colaboradores (2010) sobre o processo de diferenciação de CTs provenientes da esfoliação de dentes decíduos humanos em neurônios que cumprissem a função dopaminérgica. Tendo isso em vista, estima-se que as CTPDs e CTEDDs possam vir a se tornar uma fonte humana alternativa de CTMs, uma vez que apresentam alta capacidade de proliferação e propriedade de diferenciação (Ibarretxe et al., 2012).

Poucos são os estudos sobre CTs derivadas do rim. Porém, conforme Gupta e colaboradores (2006), as CTs derivadas do rim se encontram no mesênquima metanéfrico e podem originar todos os tipos celulares do rim adulto, à exceção das células uretrais (Ranghini et al., 2013). Estudos sobre o isolamento de células dessa região identificaram características consistentes a CTs renais (CTRs). Em umas das pesquisas, as células foram cultivadas para múltiplas duplicações da população sem que houvesse evidência de senescência ou de transformação em tumor maligno (Gupta, et al., 2006). Além disso, evidenciou-se que as CTMs isoladas do rim secretam fatores angiogênicos quando em cultura, sustentam o crescimento celular endotelial e são capazes de angiogênese (Chenet al., 2009). Ainda, Sallustio e colaboradores (2013) sugeriram que CTs/células progenitoras renais melhoraram a função renal a partir de efeitos parácrinos que promoveram reparação renal tubular.

À esteira disso, o presente estudo propôs investigar o efeito de implantes de CTs oriundas da polpa dental de dente decíduo humano, de tecido adiposo humano e tecido renal de camundongos sobre o comportamento de ratos com lesões no NBM em um modelo de dA. A principal hipótese foi de

que os animais que receberam implantes de CTs apresentariam melhor desempenho nos testes comportamentais quando comparados aos animais do grupo lesão, que não receberam os implantes. Dentre as hipóteses secundárias, o projeto buscou investigar a capacidade de diferenciação e migração celular após os implantes. Os resultados obtidos na pesquisa estão apresentados no Artigo 2, baseados na metodologia descrita no Anexo A.

3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO

Adler DG, Brassens S, Chwalek K, Dieter B & Teufe M. Prediction of treatment response to rivastigmine in Alzheimer's dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75:292–4.

Aktas O, Waiczies S & Zipp F. Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. *J Neuroimmunol*. 2007; 184(1-2):17-26.

Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW & Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(32):11474-9.

Anisimov SV, Christophersen NS, Correia AS, Li JY & Brundin P. "NeuroStem Chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *BMC Genomics*. 2007; 8(46).

Augello A, Kurth T & De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Cel Materials*. 2010; 20: 121-33.

Bachoud-Lévi AC, Gaura V, Brugières P, Lefaucheur JP, Boissé MF, Maison P, Baudic S, Ribeiro MJ, Bourdet C, Remy P, Cesaro P, Hantraye P & Peschanski M. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow up study. *Lancet Neurol*. 2006; 5: 303–09.

Barker RA & Dunnet SB. Neural repair, transplantation and rehabilitation. UK: Psychology Press, 1999.

Barker R, Barrett J, Mason SL & Björklund A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2013 Jan; 12(1): 84-91.

Bartus RT & Emerich DF. Cholinergic markers in Alzheimer disease. *J Am Med Associat*. 1999; 15(282): 2208-09.

Bickford PC, Shukitt-Hale B & Joseph J. Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions. *Mec Aging Dev.* 1999; 111(2-3): 141-54.

Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Sys Rev.* 2006 Jan; 25(1).

Björklund A & Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 537-44.

Bonnemain V, Neveu I & Naveilhan P. Neural stem/progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system. *Fron Cell Neurosci.* 2012; 6(17).

Bories C, Husson Z, Guitton MD & De Koninck Y. Differential balance of prefrontal synaptic activity in successful versus unsuccessful cognitive aging. *J Neurosci.* 2013; 33(4):1344-56.

Bowen DM, Smith CB, White P & Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain.* 1976; 99(459).

Brayda-Bruno L, Mons N, Yee BK, Micheau J, Abrous DN, Nogues X & Marighetto A. Partial loss in septo-hippocampal cholinergic neurons alters memory-dependent measures of brain connectivity without overt memory deficits. *Neurobiol Dis.* 2013; 54:372-81.

Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF & Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(supl.1): 25-35.

Calaminici M, Abdulla FA, Sinden JD & Stephenson JD. Plastic changes in the cholinergic innervation of the rat cerebral cortex after unilateral lesion of the nucleus basalis with alfa-amino-3-OH-4-isoxole propionoc acid (AMPA): Efectcts of basal forebrain transplants into neocortex. *Brain Res Bull.* 1997; 42(2): 79-93.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641-50.

Chen J, Park HC, Addabbo F, Ni J, Pelger E, Li H, Plotkin M & Goligorsky MS. Kidney-derived mesenchymal stem cells contribute to vasculogenesis, angiogenesis and endothelial repair. Author manuscript. Disponível em: PMC. 2009, Nov.

Choi YA. Caracterização dos efeitos da estimulação elétrica no núcleo *basalis* magnocelular no potencial de campo local e na frequência cardíaca no condicionamento comportamental de ratos Wistar. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina. USP. São Paulo. 2007; 77p.

Chu LW. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. Hong Kong Med J. 2012; 18:228-37.

Chung IH, Yamaza T, Zhao H, Choung PH, Shi S & Chai Y. Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. Stem Cells. 2009; 27: 866-77.

Corbett A, Pickett J, Burns A, Corcoran J, Dunnet SB, Edison P, Holmes C, Jones E, Katona C, Kearns I, Kehoe P, Mudher A, Passmore A, Shepherd N, Walsh F & Ballard C. Drug repositioning for Alzheimer's disease. Nat Rev Discov. 2012; 11(11): 833-46.

Cummings J, Gould H & Zhong K. Advances in designs for Alzheimer's disease clinical trials. Am J Neurodegener Dis. 2012; 1(3): 205-16.

Davies AP & Moloney AJF. Selective loss of cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet. 1976; ii: 1403.

De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, Pagano C, Pandolfo M & Fabbri A. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2006; 15(5): 719-28.

Dunnet SB, Low WC, Iversen SD, Stenevi U & Björklund A. Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions. Brain Res. 1982; 251: 335-48.

Dunnett SB, Whishaw IQ, Jones GH & Bunch ST. Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus *basalis magnocellularis* of rats. Neuroscience. 1987; 20(2): 653-69.

Eichenbaum H. Remembering: functional organization of the declarative memory system. *Curr Biol*. 2006; 16: R643–5.

Estrela C, Alencar AHG, Kitten GT, Vencio EF & Gava E. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*. 2011; 22(2): 91-8.

Furey ML, Ricciardi E, Schapiro MB, Rapoport SI & Pietrini P. Cholinergic enhancement eliminates modulation of neural activity by task difficulty in prefrontal cortex during working memory. *J Cog Neurosc*. 2008a; 20: 1-12.

Gao X, Zheng CY, Yang L, Tang XC & Zhang HY. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against beta-amyloid peptide. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 1454–62.

Gauthier S, Jubay A, Dalziel W, Réhel B & Schechter R. Effects of rivastigmine on common symptomatology of Alzheimer's Disease (EXPLORE). *Cur Med Opin*. 2010; 26(5): 1149-60.

Giusto E, Donegà M, Cossetti C & Pluchino S. Neuro-immune interactions of neural stem cell transplants: from animal's disease models to human trials. *Exp Neurol*. 2013 Mar; Pii: S0014-4886 (13).

Glimcher PW. Understanding dopamine and reinforcement learning: the dopamine reward prediction error hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(42): 17568-9.

Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A & Rosenberg ME. Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 3028–40.

Hashimoto J, Kariya Y & Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*. 2006; 24(11): 2346-54.

Hirai Y, Morishima M, Karube F & Kawaguchi Y. Specialized Cortical Subnetworks Differentially Connect Frontal Cortex to Parahippocampal Areas. *J Neurosci*. 2012 Feb; 32(5): 1898–913.

Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, Garcia-Murga V, Etxaniz J & Unda F. Neural Crest Stem Cells from Dental Tissues: A New Hope for Dental and Neural Regeneration. *Stem Cells*. 2012; 2012:12.

Im W, Ban J, Lim J, Lee M, Lee ST, Chu K & Kim M. Extracts of Adipose Derived Stem Cells Slows Progression in the R6/2 Model of Huntington's Disease. *PLoS One*. 2013 Apr; 8(4): e59438.

Inglis WL & Semba K. Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid, AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Res*. 1997; 755(1): 17-27.

Janebodin K, Horst OV, Ieronimakis N, Balasundaram G, Reesukumal K, Pratumvinit B & Reyes M. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One*. 2011; 6(11).

Karaöz EDP, Sağlam O, Aksoy A, Kaymaz F & Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*. 2011. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/0948-6143>. Acesso em Set, 2011.

Kelly CM, Precious SV, Scherf C, Penketh R, Amso NN, Battersby A, Allen ND, Dunnet SB & Rooser AE. Neonatal desensitization allows long-term survival of neural xenotransplants without immunosuppression. *Nat Methods*. 2009; 6(4): 271-3.

Kessing LV. Depression and the risk for dementia. *Curr Opin Psychiatry*. 2012; 25(6): 457-61.

Kim JM, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC., Kim SJ, Sinn DI, Kim JH, Park DK, Kang KM, Hyung Hong N, Park HK, Won CH, Kim KH, Kim M, Lee KS & Roh JK. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res*. 2007; 5(1183): 43-50.

Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH & Trajanoski Z. Gene expression

profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007; 8(70).

Lamb B, Masellis M, Freedman M, Stuss DT & Black SE. Clinical, imaging, and pathological heterogeneity of Alzheimer's disease syndrome. *Alzheimer's Res Ther*. 2013; 5(1).

Lee J, Jin H & Bae J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-B deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett*. 2009; 450: 136–41.

Lindeboom J & Weinstein H. Neuropsychology of cognitive aging, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *Eur J Pharmacol*. 2004; 490(1-3): 83-6.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(12): 7634-38.

Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*. 1948; 29(1): 58–69.

Meirelles LS, Caplan AI & Nardi NB. In search of the in vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Express*. 2008; 1122(28).

Meirelles LS. Biologia das células-tronco mesenquimais pós-natais. Tese de Doutorado. PPG-Genética e Biologia Celular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007; 177p.

Miller EK & Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 167–202.

Modo M, Rezaie P, Heuschling P, Patel S, Male DK & Hodges H. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res*. 2002 Dec; 958(1): 70-82.

Muir JL, Everitt BJ & Robbins TW. AMPA-induced excitotoxic lesions of the basal forebrain: a significant role for the cortical cholinergic system in attentional function. *J Neurosci.* 1994; 14(4): 2313-26.

Niedowicz DM, Nelson PT & Murphy PM. Alzheimer's Disease: Pathological Mechanisms and Recent Insights. *Curr Neuropharmacol.* 2011; 9: 674-84.

Oliveira AA & Hodges H. Alzheimer's Disease and Neural Transplantation as Prospective Cell Therapy. *Curr Alzheimer Res.* 2005; 2(1): 79-95.

Oliveira AA & Bizarro L. O uso de modelos animais e sua contribuição para o estudo do envelhecimento. In *Cognição e envelhecimento*. Pimenta MAMP. (Org). Porto Alegre: Artmed. 2006; 301-11.

Oliveira AA, Hodges H & Rezaie P. Excitotoxic lesions of the rat basal forebrain with S-AMPA: consequent mineralization and associated glial response. *Exp Neurol.* 2003; 179(2): 127-38.

Paradis E, Douillard H, Koutroumanis M, Goodyer C & LeBlanc A. Amyloid B Peptide of Alzheimer's Disease Downregulates Bcl-2 and Upregulates Bax Expression in Human Neurons. *J Neurosci.* 1996; 16(23): 7533-9.

Parvathy S, Davies P, Haroutunian V, Purohit DP, Davis KL, Mohs RC, Park H, Moran TM, Chan JY & Buxbaum JD. Correlation between A β x-40-, A β x-42-, and A β x-43-containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch. Neurol.* 2001; 58: 2025–32.

Pennartz CM, Ito R, Verschure PF, Battaglia FP & Robbins TW. The hippocampal-striatal axis in learning, prediction and goal-directed behavior. *Trends Neurosci.* 2011; 34(10): 548-59.

Perry EK, Perry RH, Blessed G & Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia: CAT and GAD activities in necropsy tissue. *J Neurol Sci.* 1977; 34(247).

Pfeil AM, Kressig RW, Thomas D & Szucs TD. Alzheimer's dementia: budget impact and cost-utility analysis of a combination treatment with a cholinesterase inhibitor and memantine in Switzerland. *Swiss Med Wkly.* 2012 Nov; 142: w13676.

Pondiki S, Stamatakis A, Fraçkoulis A, Philippidis H. & Stylianopoulou F. Effects of neonatal handling on the basal forebrain cholinergic system of adult male and female rats. *Neuroscience*. 2006; 142(2): 305-14.

Ranghini E, Mora CF, Edgar D, Kenny SE, Murray P & Wilm B. Stem cells derived from neonatal mouse kidney generate functional proximal tubule-like cells and integrate into developing nephrons *in vitro*. *PLoS One*. 2013; 8(5): e62953.

Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iñesta F, Blanquer M, Ramírez MC, Meseguer L, Meseguer-Henarejos AB, Marín N, Martínez S & Moraleda JM. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal Stem Cells in Dentistry*. Mar. 2012.

Sadowsky CH & Galvin JE. Guidelines for the Management of Cognitive and Behavioral Problems in Dementia. *Am Board Fam Med*. 2012 May-Jun; 25(3): 3350-66.

Sallustio F, Costantino V, Cox SN, Loverre A, Divella C, Rizzi M & Schena FP. Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin. *Kidney Int*. 2013; 83(3): 92–103.

Schaeffer E, Figueiró M & Gattaz WF. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinic*. 2011; 66(s1): 45-54.

Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L & Rice-Evans CA. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(12):1222-33.

Schwindt T, Barnabé G & Mello L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Rev Bra Neurocir*. 2005; 16(1): 13-9.

Sereniki A & Vital MABF. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev Psiquiatr Rio Gd Sul*. 2008; 30(s.1).

Sesterheim P. Avaliação de células-tronco mesenquimas murinas órgão-específicas quanto à capacidade de diferenciação *in vitro* em células produtoras de insulina. Tese de Doutorado. Universidade Pontifícia Católica do Rio Grande do Sul: Medicina e Ciências da Saúde /Nefrologia. Porto Alegre. 2010; 125p.

Squire LR & Kandel RE. *Memória: Da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed, 2003.

Stephan BC, Hunter S, Harris D, Llewellyn DJ, Siervo M, Matthews FE & Brayne C. The neuropathological profile of mild cognitive impairment (MCI): a systematic review. *Mol Psychiatry*. 2012; 17(11): 1056-76.

Swarowsky A. Alterações astrogliais hipocámpais no modelo de demência por lesão do núcleo basal magnocelular de ratos com ácido ibotênico. Tese de doutorado. PPG- Neurociências. UFRGS. Porto Alegre. 2009; 72p.

Terry AV & Buccafusco JJ. The Cholinergic Hypothesis, Challenges and Drug Development. *JPET*. 2003; 306(3): 821-7.

Tomaz C. *Psicobiologia da Memória*. *Psicologia USP*. 1993; 4(1-2): 49-59.

Vickers JC, Dickson TC, Adlard P, Saunders HL, King CE & McCormack G. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2000; 60(2): 139-65.

Waite J, Chen A, Wardlow M & Thal L. Behavioral and biochemical consequences of combined lesions of the medial septum/diagonal band and nucleus basalis in the rat when ibotenic acid, quisqualic acid and AMPA are used. *Exp Neurol*. 1994; 130(2): 214-29.

Wallace TL & Bertrand D. Importance of the nicotine acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. *Biochem Pharmacol*. 2013 Apr.

Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S & Wang S. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells*. 2010; 19(9): 1375–83.

Wang J, Dickson DW, Trojanowsk JQ & Lee VM. The levels of soluble versus insoluble brain β A distinguish Alzheimer's disease from normal to pathologic aging. *Exp Neurol*. 1999; 158: 328-37.

Weinmann S, Roll S, Schwarzbach C, Vauth C & Willich SN. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics*. 2010 Mar; 10(14):12p.

Weintraub S, Salmon D, Mercaldo N, Ferris S, Graff-Radford NR, Chui H, Cummings J, DeCarli C, Foster N, Galasko D, Peskind E, Dietrich W, Beekly D, Kukull WA & Morris JC. The Alzheimer's Disease Center's Uniform Data Set (UDS): The Neuropsychological test Battery. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2009; 23(2): 91-101.

Wszolek CWZK. Etiology and Pathophysiology of Frontotemporal Dementia, Parkinson Disease and Alzheimer Disease: Lessons from Genetic Studies. *Neurodegener Dis.* 2008; 5: 122-5.

Yu S, Zheng L, Li Y, Ma C, Li Y, Li X & Hao P. A cross-species analyses method to analyze animal models' similarity to humans' disease state. *BMC Systems Biol.* 2012; 6(suppl 3): S18.

Zhang HY & Tang XC. Neuroprotective effects of Hup-A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Pharmacol Sci.* 2006; 27(12): 619-25.

4. ARTIGO 1

STEM CELL-BASED THERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE

(Submetido ao periódico *Avances en Psicología Latinoamericana*. Artigo completo e formatado de acordo com as normas da revista)

Leticia Bertuzzi¹,
Patrícia Santos da Silva²,
Élida Fluck Pereira Neto²,
Rafael Nicolaidis¹,
Alcyr Alves de Oliveira^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

²Faculdade de Psicologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Departamento de Psicologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

Corresponding Author:

Alcyr Alves de Oliveira Jr., PhD

Departamento de Psicologia

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Rua Sarmento Leite, 245

90050-170 Porto Alegre, RS – Brazil

Phone: 55 – 51 –8125-7492

E-mail: alcyr.oliveirajr@gmail.com

Abstract: Alzheimer's disease is the most prevalent neurodegenerative disorder associated with aging, and its incidence is expected to grow intensively such that by 2050 more than 100 million people worldwide will have developed the dementia. Multiple complex sequential and interactive pathways are involved in the neurobiology of Alzheimer's disease, what may lead to the understanding that interventions with a single agent might be insufficient to impact the disease's course. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease is palliative and, although it may slow down the speed of the disease's progression, at the moment cannot offer cure. The combination of drugs and antioxidant substances has been investigated, nevertheless there are few studies demonstrating optimal and consistent results based on this combination. Thus, the purpose of this paper is to highlight cell-based therapies as promising prospects for the treatment of central nervous system disorders.

Key words: Alzheimer's disease. Pharmacological Treatment. Stem cells.

Resumen: La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más común asociada con el envejecimiento, y se espera que su incidencia vaya a crecer intensamente de tal manera que en 2050 más de 100 millones de personas en todo el mundo se han desarrollado la demencia. Múltiples vías complejas, secuenciales e interactivas están afectadas en la neurobiología de la patología de Alzheimer, lo que puede conducir a la comprensión de que las intervenciones con único agente podrían ser insuficientes para afectar el curso de la enfermedad. El tratamiento farmacológico para la afección de Alzheimer es paliativo y, apesar de que tiene la capacidad de reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, por el momento no puede ofrecer cura. Una combinación de fármacos y sustancias antioxidantes han sido estudiadas, pero hay poca comprobación científica de buenos resultados. Así, la terapia basada en células madre constituye perspectivas prometedoras para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer. Tratamiento Farmacológico. Células Madre.

Introduction

In acute cases of neurological damages such as stroke or spinal cord injury, different types of neurons and glial cells die within a restricted areas of the central nervous system (CNS) area over a short period of time (Lindvall & Kokaia, 2010). In chronic cases, there is either a selective loss of a specific cell population such as dopaminergic neurons in Parkinson's disease (Pd) or a widespread degeneration of many types of neurons over a period of several years such as in Alzheimer's disease (Ad) (Lindvall, Kokaia, 2010).

Alzheimer's disease is the most prevalent neurodegenerative disorder associated with aging (Niedowicz, Nelson & Murphy, 2011) and its incidence is expected to grow intensively such that by 2050 more than 100 million people worldwide will have developed this dementia (Prince, Bryce & Ferri, 2011). Ad is characterized by the progressive loss of cognitive functions, specially, the memory. However, besides compromising the memory, Ad is responsible for deficits in attention, orientation, organization, the capacity of planning and judging, among other cognitive functions (Weintraub et al., 2009) leading to the inability of living independently.

Pathological hallmarks of Ad are dystrophic neuritis associated with plaques and neurofibrillary tangles within nerve cell bodies in the basal forebrain and neocortical cholinergic pathways (Wszolek, 2008). The widespread loss of neurons and synaptic connectivity in Ad seem to be caused by the accumulation of toxic species of the β -amyloid ($A\beta$) peptide (Chen & Blurton-Jones, 2012).

It has been reported that the toxic deposit of $A\beta$ causes membrane blebbing and cell shrinkage followed by DNA damage, generation of nuclear apoptotic bodies, DNA ladder, and others classic hallmarks of apoptosis (Paradis, Douillard, Koutroumanis, Goodyer & LeBlanc., 1996). Preventing the apoptosis induced by $A\beta$ and reconstructing the cholinergic circuitry could be an optimal treatment for Ad, however, since the relationship among pathological features remains elusive, pharmacological therapies focus in the cholinesterase inhibitors (ChE-I) while stem cells (SC) researchers look for the best SC-based therapy for Ad's patients (Oliveira & Hodges, 2005).

Pharmacotherapy

Multiple complex sequential and interactive pathways are involved in the neurobiology of Ad and interventions with a single agent could be insufficient to impact the disease's course (Cummings, Gould & Zhong, 2012). Pharmacological treatments for Ad are palliative, having the property of slowing down the speed of the disease's progression, not reconstructing compromised areas in the brain. Several studies have shown the combination treatment of acetylcholinesterase inhibitor (AChE-I) and memantine prolongs the time an Ad's patient is able to live more independently (Pfeil, Kressig & Szucs, 2012). However, according to Pfeil and colleagues (2012) these benefits only start after a year of combined therapy.

Cholinesterase inhibitors increase cholinergic synaptic transmission by holding back acetylcholinesterase in the synaptic cleft, thereby decreasing the hydrolysis of acetylcholine released from the presynaptic neurons (Chu, 2012). Despite the extensive discussion on the effectiveness of AChE-I donepezil, galantamine and rivastigmine are the drugs currently approved for treating Ad's patients in moderate and mild stages (Mini Mental State Examination scores between 10 and 24), showing a delay in the cognitive impairment and some of the behavioral problems (Sadowsky & Galvin, 2012).

In general, AChE-I drugs are well tolerated; nevertheless, dose-related adverse effects may occur. It is not possible yet to identify which Ad's patients will respond best to each one of these drugs, nor predict who will develop more intense adverse reactions such as vomiting, nausea and diarrhea as the most prevalent (Sadowsky & Galvin, 2012). Meanwhile, studies of Ad's patients treated by rivastigmine, donepezil and galantamine for up to 4 years demonstrated fewer declines in cognitive functions than expected (Chu, 2012).

Some studies have investigated the role of antioxidant treatment in Ad. Epicatechin, a polyphenol flavan-3-ol that can be found in food and beverages such as chocolate *in natura*, red wine, some fruit and teas, especially the traditional green tea *Camellia sinensis*, can exert neuroprotective properties (Aktas, Waiczies & Zipp, 2007). Fruit and vegetables rich in flavonoid played an important role in the prevention of motor and cognitive declines related to aging

(Bickford, Shukitt-Hale & Joseph, 1999). In an *in vitro* experiment, epichatechin's antioxidant property could be responsible for the prevention of cells deaths by reducing the oxidative stress (Schroeter, Williams, Matin, Iversen, & Rice-Evans, 2000).

Limited data are available considering antioxidant treatment in dementia. According to Weinmann and colleagues (2010), the extract of Ginkgo Biloba, an herb considered to have potent antioxidant property due to the presence of flavonoids and terpenoids, is not truly recommended for Ad's treatment. Even though in the subgroup of patients with Ad there was a significant advantage of Ginkgo Biloba compared to placebo in the conducted study, there was no relevant benefit of the herb in the treatment of neuropsychiatric symptoms, for example. More studies comparing the relative effectiveness of Ginkgo Biloba and AChE-I should be conducted (Weinmann et al., 2010).

Huperzine-A (Hup-A), an alkaloid isolated from *Huperzia serrata*, an herb used in the traditional Chinese medicine for treating fevers, swellings, hypertension and memory impairment is considered to be a potent AChE-I proven to effectively improve the learning, memory performance and behavioral dysfunction in chinese with Ad (Gao et al., 2009; Xi, Tang, 2006). In a study with rats, an isolation of brain mitochondria demonstrated the protective effects of Hup-A on mitochondrial function and on mitochondria's extended noncholinergic functions as well, providing a significant potential for the design of anti-Ad drugs (Gao et al., 2009)

Animal models for Alzheimer's disease

Animal models have been very important to understand the complex pathogenic mechanism underlying neurodegenerative diseases. The use of neurotoxins characterizes an alternative to reproduce an Ad model. The cytotoxin infusion of agents capable of destroying cell populations or brain structures is a common method for this (see Table 1). Even though the neurotoxins' actions destroy neuronal cells by a massive postsynaptic depolarization (Barker & Dunnett, 1999), they have their own specificities and limitations.

Transgenic models have also been developed, providing considerable information about the neuropathology. According to Granic et al. (2010) transgenic models of Ad rely on inherited forms of the disease and present indistinguishable clinical and histopathological features. It is important to highlight that, even though there is a great quantity of transgenic Ad models, there is no perfect model that incorporates all aspects of Ad and some effective results in the animals fail on clinical trials.

Neuro pathway mechanical lesions in the electrolytic model by direct target destruction or the fimbria-fornix transaction by pathway axotomy can also be an option; nevertheless there are chances of unspecific results (Oliveira & Hodges, 2005).

In addition to the models presented, others can be pointed such as aging animals characterized by an overall age related deficit of neurotransmitter systems. The senescence model favors the natural decline of neurotransmitter systems, however it is not a widespread model due to its long time period keeping and maintaining the animals and the animal's inconsistency cognitive decline (Oliveira & Hodges 2005).

Stem Cell therapy

In the 80's, researchers believed that neurodegenerative diseases like Ad and Parkinson's disease (Pd) could benefit from SCs once there would be an increase of the cells in the brain (Gash, Collier & Sladeck, 1985). Almost 30 years later, stem cell-based therapies have aimed to replace missing or defective cells in many disorders, but a lot is to be known about the mechanism of the SCs inside the organism. Shortly, SCs are classically defined as cells that have the ability to renew themselves continuously and possess totipotent, pluripotent or multipotent ability to differentiate into various cell types (Wislet-Gendebien et al., 2011). Studies indicate that different lineages of SCs promote a series of changes throughout the recipient's CNS not restricted only to the specific area (Giusto, Donegá, Cossetti & Pluchino, 2013; Bonnamain et al. 2012).

According to Dunnett and colleagues (1982), implanted animals with cholinergically rich cells were able to perform a requested task as the control animals; however, the time required for its execution was much higher than that expended by the control animals. A cholinergic reinnervation is known to be needed; nevertheless in the study it was insufficient to a successful functional recovery (Dunnett, Low, Iversen, Stenevi & Bjorkland, 1982). Some years later, ectopic implantation of forebrain ventral cells (cholinergically rich) attenuated learning deficits in rats with cholinergic lesions in a study proposed by Barker and Dunnett (1999).

Modo and colleagues (2002) reported that the privileged immune characteristics of CNS can be attributed to numerous factors such as the low immunogenicity of neuronal tissues, the protection of the blood-brain barrier and the absence of lymphatic drainage in the brain. However, CNS immune's protection is only partial once occurring differences in species between the donor and the host, rejection occurs (Modo et al. 2002). Thus, the treatment with immunosuppressive drugs is necessary in cases of allogeneic transplants.

MSCs may be defined as progenitor cells capable of giving rise to a number of unique, differentiated cells from all three germ layers (Caplan, 1991). First described as fibroblast precursors from bone marrow (BM) by Friedenstein et al. (1970), MSCs may be also referred to as a fibroblast colony-forming units or marrow stromal cells (Phinney, 2002). Even though these SCs have more limited ability of differentiation than the embryonic SCs, MSCs have important advantages such as the facility for isolation, the capacity to propagate in culture, besides the non-immunogenic characteristics (Bydlowski, Debes, Maselli & Janz, 2009).

Cova, et al (2010) found that human MSCs promoted an effective neuronal survival and supported the development of immature cells in a Pd animal model. According to them, neuronal proliferation and maturation were found after the implants in animals that had the striatum injured by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The same was not found in sham animals implanted with the same cell line. The results suggest the existence of a mutual influence between the grafted cells and endogenous neural precursors,

becoming important to determine the effect on survival neuronal cells in other brain regions.

Naive human MSCs consistently synthesize a variety of trophic factors that play an important role on the improvement observed in implanted animals (Cova, et al., 2010). However, despite the promising outcomes, important issues such as the tissue's viability, the logistic and ethical concerns surrounding the use of human material, the cell's purity and viability, the deleterious side effects, to site some, need to be better evaluated and understood until this practice becomes commonly used (Barker, Barrett, Mason, & Björklund, 2013).

Bone marrow mesenchymal SCs (BM-MSC) show a great potential of proliferating and differentiating into several types of cells, and present two major advantages over other cell sources: accessibility and immunological features (Oliveira, 2008). Besides this, the use of BM-MSC's for grafts circumvents the ethical concerns attached to the use of embryonic cells. It also brings technical and practical solutions, such as simpler cell collection since it has been practiced in bone marrow transplants.

Recent studies show that BM-MSCs are satisfactory used in intracerebral procedures for neurodegenerative diseases in animal models. According to Lee, Jin and Bae (2009), BM-MSCs promoted microglial activation and reduced significantly the A β deposit in a mouse model. Hence, BM-MSCs can increase the number of activated microglia, which supports the hypothesis that BM-MSCs might be an effective therapeutic vehicle to reduce A β deposits in AD patients (Lee et al., 2009).

Adipose-derived MSCs (AMSC) isolated from adipose tissue can be differentiated into neuronal SCs, and so improving the feasibility for neurodegenerative diseases' treatment. Besides this, AMSCs secrete anti-apoptotic growth factors, reproducing cytoprotective effects in animal models (Imet al., 2013). Studies have investigated the neuroprotective effects of the AMSC in animal models of intracerebral hemorrhage and found out evidences of a reduction in the acute cerebral inflammation and in the chronic brain's

degeneration after implantation, which corroborated to improve functional recovery (Kim et al., 2007).

Therapeutic potential of intracerebral injection of human AMSCs in neurodegenerative diseases was previously reported in Huntington's disease, Pd and ischemia mouse models, but not in Ad (Kim et al., 2012). In a carefully designed study on therapeutic effects of intravenous human adipose-derived SCs in an Ad model, Kim et al. (2012) observed that intravenous or intracerebral human AMSC transplantation rescued memory impairments, besides reducing the number of amyloid plaques in the mice's brain. There was no notification sign of tumorigenesis in this study; nevertheless Gimble et al. (2011) identified the formation of sarcomas *in vivo* after the implantation of AMSCs in immunodeficient mice.

Dental and periodontal tissues constitute a recent source of neural SCs, presenting a substantial advantage among other SCs: their neural crest phenotype (Ibarretxe et al., 2012). Dental pulp SCs (DPSC) and human exfoliated teeth SCs (ETSC) have been shown to differentiate into the three germ layers, also displaying a potency that was widely thought to be exclusive from embryonic SCs (Janebodin et al., 2011; Miura et al., 2006). When compared to BM-MSCs, ETSCs present more active and developed metabolic cells (Karaoz, Sağlam, Aksoy, Kaymaz & Duruksu, 2011).

These characteristics were corroborated in a study on the differentiation process of human exfoliated deciduous teeth SCs into neurons that performed a dopaminergic function (Wang et al., 2010). As a result, it is estimated that the dental pulp SCs become an alternative source of human MSCs, once they offer promising differentiation properties, high proliferative capacity, and don't raise ethical concerns as embryonic SCs (Ibarretxe et al., 2012).

Few studies have identified kidney-derived SCs (KSCs), especially considering neurodegenerative diseases. Studies about the isolation of kidney-derived cells showed consistent characteristics of renal SCs, without evidences of cell senescence or transformation into malignant tumors (Gupta et al, 2006). According to Ranghini and colleagues (2013), studies have shown that some

kidney stem/progenitor cells (KSPCs) can differentiate into a variety of renal cell types (Lee et al., 2010).

However, in most cases, differentiation was defined solely on the basis of marker analysis, remaining unknown whether these stem/progenitor cell-derived renal cell types display any functionality. Nevertheless, another study suggested that human KSPCs cells improve renal function by secreting paracrine factors that promote tubular repair (Ranghini et al., 2013; Sallustio et al., 2013).

Conclusions

A substantial segment of the aging population constitutes the primary risk factor for Ad and other neurodegenerative disorders. Intensive efforts have been dedicated to improve old people's life style habits such as exercise and dietary supplements in combination with symptomatic treatment drugs to improve age-related cognitive decline and to attenuate motor and neurological dysfunction in neurodegenerative diseases (Mandel & Youdim, 2012). However, the adult brain has limited regenerative capacity, and no effective treatment options are available (Andresa, Meyerb, Ducraya & Widmera, 2008).

Stem cells-derived therapy constitute promising prospects for the treatment of CNS disorders, once it is known that SCs have a great potential to develop into many types and subtypes of cells, besides being able of *in vitro* long-term survival and self-renewal (Ibarretxe et al., 2012). Studies on SCs for the cure of CNS's diseases have been one of the hallmarks of this first decade, but more research towards compelling novel strategies for Ad therapy, as an example, is needed.

Several experiments have demonstrated that SCs' grafts ameliorate a variety of CNS conditions. However, crucial issues such as functional connectivity, *in vivo* differentiation and survival, potential for migration to areas of lesion, host's immune reactions or mechanisms regulating these functions, are still to be addressed (Oliveira, Haeser & Pranke, 2008). Existing clinical data suggest that transplantation is technically feasible and can be carried out safely. Nevertheless, data on functional outcome and long-term efficiency remains preliminary (Andresa, Meyerb, Ducraya & Widmera, 2008). A greater

understanding of the neurobiological and molecular factors that determine the progress of the brain disorder will probably lead to safer treatments (Oliveira, Haeser & Pranke, 2008).

The rehabilitation of tissues after SCs implants may occur due to innate mechanisms of SCs' migration to the lesion site, in particular, inflammations, apoptosis or hypoxia, releasing trophic factors that accelerate the endogen repair (Joyce et al., 2010). This migration to injured tissues in animal models is not yet clearly understood but it is likely involved in the production of paracrine, anti-inflammatory and anti-apoptotic factors (Roux et al., 2011).

In a study of acute cerebral injury Joyce and colleagues (2010) identified the SCs' intense migration to injured sites promoting endogen neuronal growth and a decrease of the apoptosis or inflammation. Aside from the observation that SCs release a multitude of growth factors and cytokines to induce the reparative process, SCs are known to release microvesicles and exosomes that may produce paracrine factors required for tissue repair (Anthony & Shiels, 2013).

According to this, SCs based therapies represent an emerging therapeutic approach by which incurable diseases may be treated (Marchetti, Krohne, Friedlander & Friedlander, 2010). Although more should be known to clarify all the mechanisms of cellular paracrine effects in the host's tissues, there is a good perspective cell therapies may soon be used to treat neurodegenerative diseases.

REFERENCES

- Aktas, O., Waiczies, S. & Zipp, F. (2007). Neurodegeneration in autoimmune demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. *J Neuroimmunol*, 184(1-2), 17-26.
- Andresa, R.H., Meyerb, M., Ducraya, A.D. & Widmera, H.R. (2008). Restorative neuroscience: concepts and perspectives. *Swiss Med Wkly*, 138(11-12), 155-172.
- Anthony, D.F. & Shiels, P.G. (2013). Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs. *Transplant Res*, 2(10).
- Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S.L. & Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 12(1), 84-91.
- Barker, R.A. & Dunnet, S.B. (1999). Neural repair, transplantation and rehabilitation. UK: Psychology Press.
- Bickford, P.C., Shukitt-Hale, B. & Joseph, J. (1999). Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional interventions. *Mec Aging Dev*, 111(2-3), 141-154.
- Bonnamain, V., Neveu, I. & Naveilhan, P. (2012). Neural stem/progenitor cells as promising candidates for regenerative therapy of the central nervous system. *Fron Cell Neurosci*, 6(17).
- Bydlowski, S.P., Debes, A.A., Maselli, L.M.F. & Janz, F.L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 31(supl.1), 25-35.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9,641-650.
- Chen, W.W. & Blurton-Jones, M. (2012). Concise Review: Can Stem Cells Be Used to Treat or Model Alzheimer's Disease? *Stem Cells*, 30, 2612–2618.
- Chu, L.W. (2012). Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*, 18, 228-237.

Cova, L., Armentero, M-T., Zennaro, E., Calzarossa, C., Bossolasco, P., Busca, G. Deliliers, G.L., Polli, E., Nappi, G., Silani, V. & Blandini, F. (2010). Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res*, 1311, 12 – 27.

Cummings, J., Gould, H. & Zhong, K. (2012). Advances in designs for Alzheimer's disease clinical trials. *Am J Neurodegener Dis*, 1(3), 205-216.

Dunnet, S.B., Low, W.C., Iversen, S.D., Stenevi, U. & Björklund, A. (1982). Septal transplants restore maze learning in rats with fornix-fimbria lesions. *Brain Res*, 251, 335-348.

Dunnett, S.B., Whishaw, I.Q., Jones, G.H. & Bunch, S.T. (1987). Behavioural, biochemical and histochemical effects of different neurotoxic amino acids injected into nucleus basalis magnocellularis of rats. *Neuroscience*, 20(2), 653-669.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. & Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3, 393-403.

Gao, X., Zheng, C.Y., Yang, L., Tang, X.C. & Zhang, H.Y. (2009). Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against beta-amyloid peptide. *Free Radic Biol Med*, 46, 1454– 1462.

Gash, D.M., Collier, T.J. & Sladek, J.R. (1985). Neural transplantation: A review of recent developments and potential applications to the aged brain. *Neurobiol Aging*, 6, 131-150.

Gimble, J., Bunnell, B., Chiu, E. & Guilak, F. (2011). Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Stem Cells: Let's Not Get Lost in Translation. *Stem Cells*, 29,749-754.

Giusto, E., Donegà, M., Cossetti, C. & Pluchino, S. (2013). Neuro-immune interactions of neural stem cell transplants: from animals' disease models to human trials. *Exp Neurol*, 13, 92-97.

Gordon, M.N., King, D.L., Diamond, D.M., Jantzen, P.T., Boyett, K.V. & Hope, C.E. (2001). Correlation between cognitive deficits and A(beta) deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol Aging*, 22(3), 377-385.

Granic, I., Masman, M.F., Luiten, P.G.M & Eisel, U.L.M. (2010). Braak Staging in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol*, 177(4),1603-1605.

Ibarretxe, G., Crende, O., Aurrekoetxea, M., Garcia-Murga, V., Etxaniz, J. & Unda, F. (2012). Neural Crest Stem Cells from Dental Tissues: A New Hope for Dental and Neural Regeneration. *Stem Cells Int*, 2012, 12 p.

Im, W., Ban, J., Lim, J., Lee, M., Lee, S.T., Chu, K. & Kim, M. (2013). Extracts of Adipose Derived Stem Cells Slows Progression in the R6/2 Model of Huntington's Disease. *PLoS One*, 8(4), e59438.

Inglis, W.L. & Semba, K. (1997). Discriminable excitotoxic effects of ibotenic acid AMPA, NMDA and quinolinic acid in the rat laterodorsal tegmental nucleus. *Brain Res*, 755(1),17-27.

Janebodin, K., Horst, O.V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B. & Reyes, M. (2011). Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One*, 6(11).

Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G. & Nolte, J.A. (2010). Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med.*, 5(6), 933-946.

Karaöz, E.D.P., Sağlam, O., Aksoy, A., Kaymaz, F. & Duruksu, G. (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*. Available at <http://www.springerlink.com/content/0948-6143>. Access Sep, 2011.

Kim, J.M., Lee, S.T., Chu, K., Jung, K.H., Song, E.C., Kim, S.J., Sinn, D.I., Kim, J.H., Park, D.K., Kang, K.M., Hyung Hong, N., Park, H.K., Won, C.H., Kim, K.H., Kim, M., Lee, K.S. & Roh, J.K. (2007). Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res*, 5(1183), 43-50.

Kim, S., Chang, K.A., Kim, J., Park, H.G., Ra, J.C., Kim, H.S. & Suh, Y.H. (2012). The Preventive and Therapeutic Effects of Intravenous Human Adipose-Derived Stem Cells in Alzheimer's Disease Mice. *PLoS One*, 7(9).

Krugel, U., Bigl, V., Eschrich, K. & Bigl, M. (2001). Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*, 3, 263-277.

Kulnane, L.S. & Lamb, B.T. (2001). Neuropathological characterization of mutant amyloid precursor protein yeast artificial chromosome transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 8(6), 982-992.

Lee, J., Jin, H. & Bae, J. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-B deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett*, 450, 136–141.

Lee, P.T., Lin, H.H., Jiang, S.T., Lu, P.J., Chou, K.J., Fang, H.-C., Chiou, Y.-Y. & Tang, M.-J. (2010). Mouse kidney progenitor cells accelerate renal regeneration and prolong survival after ischemic injury. *Stem Cells*, 28, 573–584.

Lee, H.J., Lee, J.K., Lee, H., Carter, J.E., Chang, J.W., O, W., Yang, Y.S., Suh, J.-G., Lee, B.-H., Jin, H.K. & Bae, J.-S. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol Aging*, 33, 588-602.

Lindvall, O. & Kokaia, Z. (2010). Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation? *J Clin Invest*, 120(1), 29–40.

Mandel, S.A. & Youdim, M.B. (2012). In the rush for green gold: Can green tea delay age-progressive brain neurodegeneration? *Recent Pat CNS Drug Discov*, 7(3), 205-217.

Marchetti, V., Krohne, T.U., Friedlander D.F. & Friedlander M. (2010). Stemming vision loss with stem cells. *J Clin Invest.*, 120(9), 3012–3021.

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G. & Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(10), 5807–5812.

Modo, M., Rezaie, P., Heuschling, P., Patel, S., Male, D.K. & Hodges, H. (2002). Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res*, 958(1), 70-82.

Niedowicz, D.M., Nelson, P.T. & Murphy, P.M. (2011). Alzheimer's Disease: Pathological Mechanisms and Recent Insights. *Curr Neuropharmacol*, 9, 674-684.

Oliveira, A.A., Haeser, A. & Pranke, P. (2008). Stem cell grafts as therapeutic tools for central nervous system disorders. *Psychol Neurosci*, 1(1), 47–54.

Oliveira, A.A. & Hodges, H. (2005). Alzheimer's Disease and Neural Transplantation as Prospective Cell Therapy. *Curr Alzheimer Res*, 2(1), 79-95.

Paradis, E., Douillard, H., Koutroumanis, M., Goodyer, C. & LeBlanc, A. (1996). Amyloid B Peptide of Alzheimer's Disease Downregulates Bcl-2 and Upregulates Bax Expression in Human Neurons. *J Neurosci*, 16(23), 7533-7559.

Pennanen, L., Welzl, H., D'Adamo, P., Nitsch, R.M. & Gotz, J. (2004). Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 15(3), 500-509.

Pfeil, A.M., Kressig, R.W., Thomas, D. & Szucs, T.D. (2012). Alzheimer's dementia: budget impact and cost-utility analysis of a combination treatment with a cholinesterase inhibitor and memantine in Switzerland. *Swiss Med Wkly*, 142, w13676.

Phinney, D.G. (2002). Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 38, 7-12.

Prince, M., Bryce, R. & Ferri, C. (2011). World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention. Available at: <http://www.alz.co.uk>. Access Nov, 2012.

Ranghini, E., Mora, C.F., Edgar, D., Kenny, S.E., Murray, P. & Wilm, B. (2013). Stem cells derived from neonatal mouse kidney generate functional proximal tubule-like cells and integrate into developing nephrons *in vitro*. PLoS One, 8(5), e62953.

Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P. & Rouard, H. (2011). Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects. Transfus Clin Biol., 18(1), 1-12.

Sadowsky, C.H. & Galvin, J.E. (2012). Guidelines for the Management of Cognitive and Behavioral Problems in Dementia. Am Board Fam Med, 25(3), 3350-3366.

Sallustio, F., Costantino, V., Cox, S.N., Loverre, A., Divella, C., Rizzi, M. & Schena, F.P. (2013). Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin. Kidney Int, 83(3), 92–103.

Schroeter, H., Williams, R.J., Matin, R., Iversen, L. & Rice-Evans, C.A. (2000). Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. Free Radic Biol Med, 29(12), 1222-1233.

Vale-Martinez, A., Guillazo-Blanch, G., Marti-Nicolovius, M., Nadal, R., Arevalo-Garcia, R. & Morgado-Bernal, I. (2002). Electrolytic and ibotenic acid lesions of the nucleus basalis magnocellularis interrupt long-term retention, but not acquisition of two-way active avoidance, in rats. Exp Brain Res, 142(1), 52-66.

Waite, J.J. & Thal, L.J. (1996). Lesions of the cholinergic nuclei in the rat basal forebrain: excitotoxins vs. an immunotoxin. Life Sci, 58(22), 1947-1953.

Waite, J.J., Chen, A.D., Wardlow, M.L. & Thal, L.J. (1994). Behavioral and biochemical consequences of combined lesions of the medial septum/diagonal band and nucleus basalis in the rat when ibotenic acid, quisqualic acid, and AMPA are used. Exp Neurol, 130(2), 214-229.

Wang, J., Wang, X., Sun, Z., Wang, X., Yang, H., Shi, S. & Wang, S. (2010). Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. Stem Cells Dev, 19(9), 1375–1383.

Wang, R., Yan, H. & Tang, X.C. (2006). Progress in studies of Huperzine-A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta Pharmacol Sin*, 27, 11–26.

Weinmann, S., Roll S., Schwarzbach, C., Vauth, C. & Willich, S.N. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis. (2012). *BMC Geriatrics*, 10(14), 12 p.

Weintraub, S., Salmon, D., Mercaldo, N., Ferris, S., Graff-Radford, N.R., Chui, H., Cummings, J., DeCarli, C., Foster, N., Galasko, D., Peskind, E., Dietrich, W., Beekly, D., Kukull, W.A. & Morris, J.C. (2009). The Alzheimer's Disease Center's Uniform Data Set (UDS): The Neuropsychological test Battery. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 23(2), 91-101.

Wislet-Gendebien, S., Laudet, E., Neirinckx, V. & Rogister, B. (2011). Adult Bone Marrow: Which Stem Cells for Cellular Therapy Protocols in Neurodegenerative Disorders? *J Biomed Biotechnol*, 2012, 10 p.

Wszolek, C.W.Z.K. (2008). Etiology and Pathophysiology of Frontotemporal Dementia, Parkinson Disease and Alzheimer Disease: Lessons from Genetic Studies. *Neurodegener Dis*, 5, 122-125.

Xuan, A.G., Luo, M., Ji, W.D. & Long, D.H. (2009). Effects of engrafted neural stem cells in Alzheimer's disease rats. *Neurosci Lett*, 450, 167-171.

Yamada, K. & Nabeshima, T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*, 88, 93-113.

APPENDIX 1

Table and Figures

Table 1: Animal Models – Alzheimer's disease

Model	Mechanism	Anatomic Target	References
Cytotoxin Infusion			
Quisqualic acid, Ibotenic acid, Kainic acid, AMPA	Glutamate overexcitation	Basal forebrain	Dunnett, Whishaw, Waite, Chen, Wardlow & Thal (1994); Waite & Thal (1996); Inglis & Semba (1997); Yamada & Nabeshima (2000).
Trangenics			
Amyloid Precursor Protein (APP)	A β deposition	Hippocampus, cortex, thalamus	Yamada & Nabeshima (2000); Kulnane & Lamb (2001); Gordon, King, Diamond, Jantzen, Boyett & Hope (2001); Pennanen, Welzl, D'Adamo, Nitsch & Gotz (2004); Lee, et al. (2012).
Tau Protein	Neurofibrillary tangles, filamentous tau aggregate	Amygdala, basal forebrain	
Mechanical Destruction			
	Fimbria-Fornix transection	Fimbria-Fornix	Yamada & Nabeshima (2000); Krugel, Bigl, Eschrich & Bigl, (2001); Vale-Martinez, Guillazo-Blanch, Marti-Nicolovius, Nadal, Arevalo-Garcia, & Morgado-Bernal (2002); Xuan, Luo, Ji & Long (2009).
	Electrolytic	NBM, amygdala	

5. ARTIGO 2

STEM CELL'S BEHAVIORAL EFFECTS IN RATS IN A MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Leticia Bertuzzi (lebertuzzi@yahoo.com.br)¹, Annelise Ribeiro da Rosa (annelise.ribeirodarosa@hotmail.com)², Anna Ourique (aourique@hotmail.com)¹, Leonardo Wendt (leonardowendt@gmail.com)³, Rafael Nicolaidis (rafael.nicolaidis@gmail.com)¹, Kamilla Torquato (kamillat@ufcspa.edu.br)³, Amanda Staphenhorst (amandasa@ufcspa.edu.br)³, Patrícia Santos da Silva (pss.2501@gmail.com)³, Éliada Fluck (elida.fluck@hotmail.com)³, Pedro Chagas Telles (pedro_chagastelles@yahoo.com)², Patrícia Pranke (patriciapranke@hotmail.com)⁴, Alcyr Alves de Oliveira (alcyr.oliveirajr@gmail.com)⁵.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre – RS/Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

³Undergraduate student, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Hematologia e Células-Tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Address: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 2752 sala 304 G. Bairro Santana. CEP: 90610-000. Porto Alegre - RS, Brazil

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, Faculdade de Psicologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre – RS, Brazil

Corresponding Author:

Alcyr Alves de Oliveira Jr., PhD

Departamento de Psicologia

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245 CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS – Brazil

Phone: +55 051 81257592

E-mail: alcyr.oliveirajr@gmail.com

Abstract

Alzheimer's disease (Ad) is the most prevalent neurodegenerative disorder related to aging and central nervous system dysfunctions. Besides compromising the memory, Ad is responsible for deficits in attention, orientation, organization, the capacity of planning and judging, among other cognitive functions, leading to the inability of living independently. The pharmacological treatment is only palliative. Thus, researches on stem cells implants emerge as promising prospects for the cure of central nervous system's disorders. The aim of this study was to investigate the effects of stem cells implants from human dental pulp, human adipose tissue and mice renal tissue on the behavior of rats in a model for Ad. To this purpose, male adult rats of Wistar strain underwent stereotactic surgery for lesions of the nucleus basalis magnocellularis with unilateral AMPA infusions. Twenty one days from surgery for lesions, animals received the stem cells implants. Subjects were, then, evaluated in the following behavioral tests: open field, elevated-T maze and object recognition. Immune histological exams pointed out the success of the AMPA infusions. Results showed an improvement in the behavioral performance of implanted rats with stem cells over the non-implanted group in the number of crossings in the open field ($p= 0.001$), time spent in the periphery, center area and latency ($p= 0.012$). In the elevated T-maze, the significant mean was identified in the inhibitory avoidance ($p= 0.028$). Implants of stem cells demonstrated an improvement in the performance of implanted animals compared to the non-implanted group.

Key words: Model of Alzheimer's disease; Stem Cells Implants; Behavior.

Literature Review

Alzheimer's disease (Ad) is the most prevalent neurodegenerative disorder associated with aging (Niedowicz, Nelson and Murphy, 2011) and its incidence is expected to grow intensively such that by 2050 over 100 million people worldwide will have developed the dementia (Prince, Bryce and Ferri, 2011). Ad is characterized by the progressive loss of cognitive functions, specially, the memory. However, besides compromising the memory, this pathology is responsible for deficits in attention, orientation, organization, in the capacity of planning and judging, among other cognitive functions (Weintraub et al., 2009), leading to the inability of living independently.

Pathological hallmarks of Ad are dystrophic neuritis associated with plaques and neurofibrillary tangles within nerve cell bodies in the basal forebrain and neocortical cholinergic pathways (Wszolek, 2008). The widespread neurons loss and synaptic connectivity in Ad seem to be caused by the accumulation of toxic species of the β -amyloid (A β) peptide (Chen, & Blurton-Jones, 2012). Pharmacological treatments for this disorder are palliative, having the property of slowing down the speed of the disease's progression. Thus, stem cells-based therapy constitute promising prospects for the treatment of central nervous system (CNS) disorders, once it is known that stem cells (SCs) have a great potential to develop into many types and subtypes of cells, besides being able of *in vitro* long term survival and self-renewal (Ibarretxe et al., 2012).

Mesenchymal stem cells (MSCs) have important advantages over embryonic SCs, such as the facility for isolation, the capacity to propagate in culture and the property of non-immunogenic characteristics (Bydlowski, Debes, Maselli and Janz, 2009) besides expressing some common antigens in rats and humans (Foudah et al., 2012). Animal models represent a suitable model for *in vivo* and *in vitro* studies since there are physiological characteristics similar to those of human (Bugos, Bhide and Zilka, 2009).

SCs-based therapies may effectively support activation of neurogenesis, as well as migration, maturation and integration of newly generated neurons in a functional network through the production of diffusible trophic factors (Okano, Sakaguchi, Ohki, Suzuki and Sawamoto, 2007), enlightening the possibility of SCs to treat neurodegenerative diseases.

Research Question

According to the potential therapeutic application of MSCs for neurodegenerative diseases, the aim of this study was to investigate the effects of SCs grafts on the behavior of rats in an Ad model. Our working hypothesis was that engrafted animals would improve their behavior when compared to the non-engrafted group. For the study we used SCs from human Dental Pulp of Deciduous Teeth (DPDTh-SCs), human Adipose Tissue (ATh-SCs) and mice Renal Tissue (RTm-SCs).

Research Design and Methodology

1. Animals

Experiments were performed in 60 male Wistar rats (300-350 grams in the beginning of the study) from the Animal Breeding Unit of *Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre* (UFCSPA). They were housed in groups of three per cage, receiving water and food *ad libitum*, maintained in a room with a controlled temperature at 24°C and a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7 am). Rats were manipulated according to international laws for ethical care and use of laboratory animals (Guide for Care and Use of Experimental Animals, by the National Institutes of Health, 1996) and experiments were approved by the local Ethics and Research Committee (UFCSPA, protocol no.079-11, project no. 051-11).

Rats were distributed into 5 different groups (12 animals per group): control, AMPA, DPDTh-SCs, ATh-SCs and RTm-SCs. The goal of the first surgery was to lesion the nucleus basalis magnocellular (NBM), an analogous

structure to the nucleus basalis of Meynert in humans (nbM). Except for the control group that received saline infusions, all of the others received infusions of AMPA. In the second surgery, except for the control and the AMPA groups which received saline infusions, SCs were implanted. The groups were distributed according to the following:

Group 1: saline + saline

Group 2: AMPA + saline

Group 3: AMPA + DPDTh-SCs

Group 4: AMPA + ATh-SCs

Group 5: AMPA + RTm-SCs

2. Experimental Procedures

All lesion and graft surgeries followed the same anesthetic and post operative care procedures. For sham surgery, animals underwent the same procedure for lesioning and grafting and received the respect vehicle injection at the same coordinates.

2.1 Anesthesia: rats were weighed and intraperitoneal (ip) anesthetized with xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg).

2.2 Surgery for lesions and grafts:

Animals were mounted on a stereotactic frame (Insight, Brazil) and a midline incision was made with a scalpel. Bregma was located and the coordinates calculated. Appropriate holes were made through the skull using a dental drill, exposing the dura mater but not touching it. For lesioning, a cannula attached to a 5 μ L Hamilton syringe was used. Unilateral injections of 0.4 μ L of AMPA (S-AMPA: Tocris Neuramin, UK) in a 0.05mM sterilized phosphate buffered saline (PH 7.4) were infused at a flow rate of 0.2 μ L/minute. Anterior/posterior (AP) coordinates taken from bregma, lateral (L) midline and ventral (V) depth from dura mater, used the following coordinates: rostral AP: +1.0; L: +2.6; V: -7.5 and caudal AP: +0.2; L: +3.2; V: -7.0.

For grafting, an interval of 21 days was used as a standard after lesion surgeries; 50.000 μ L cells suspended in PBS were infused through a 10 μ L Hamilton syringe with a flap tip, removable needle, fixed on the measurement arm of the stereotactic apparatus and lowered under stereotactic control. Each injection took 2.5 minutes (speed rate of 1 μ L/minute), using the following coordinates from frontal and parietal cortex, respectively: AP: +3,2; L: +3,5; V:-3,0 and AP: -1,0; L: +5,0; V: -2,2.

2.3 Post-operative care procedure:

After surgeries, animals were caged individually and given wet mashed food until normal drinking and feeding was returned. The cage's floor was covered with white *crepe* paper to facilitate checking food intake, defecation and urine conditions. Wet and dry pellets were placed in the cages to monitor food consumption. Besides this, twisting, rolling over, shaking and convulsive fits were observed as effects of the lesion. Animals were considered recovered when the pre-surgery weight was re-gained, there was no blood in the urine and normal movement was re-established. They were then group-housed and daily monitored.

2.4 Behavioral Tests

After 21 days of the surgical procedures, experiments were carried out using the following sequence of testing: open field, elevated T-maze and object recognition. At the end of each test, animals were given a three-day interval. Tests run in the order listed, from least invasive to most invasive.

Open Field (OF) was used to investigate the influence of lesions and grafts on motor activity and exploratory behavior of the subjects. Animals were exposed to the OF for 2 minutes, 4 days in a row. The whole procedure was recorded. The number of crossings and the avoidance of the central area were taken under consideration. According to Bogdanov (2013), a decrease in the ambulation may be used to investigate anxiety and fear, and the avoidance of the central area may indicate a restraint of dangerous environments.

The OF consisted of a circular wooden arena (80cm in diameter with walls 40cm high). The floor was divided into 12 segments of approximately the same area (Open Field – Rats. Insight, Brazil). Animals were taken to a pre-test waiting room for 30 minutes before the experiment started. The test sessions were carried out in the presence of a researcher and they were recorded by a video camera placed 1,5m above the apparatus. Rats were carefully handled and placed individually at the centre of the apparatus, and after 2 minutes of testing they were placed back in the group cage.

Elevated T - Maze (ETM) was used in the study to evaluate two types of fear responses: learned and innate. Repeatedly placing the rat inside the enclosed arm to explore the maze allows the animal to learn not to enter open arms (inhibitory avoidance learning). Re-exposing the animal to the situation after a time interval assesses memory of emotional related behavior, whereas placing the animal in an open arm produces unlearned escape responses into the enclosed arms (Conde et al., 2000).

The apparatus consisted of an enclosed perpendicularly positioned arm at a right angle to two open arms elevated 50cm from the ground (Elevated T-Maze – Rats. Insight, Brazil). Placing the animals repeatedly into the enclosed arm allows them to explore the maze and learn inhibitory avoidance of the open arms. Placing them at the end of one open arm produces an escape response generally to the enclosed arm (Zangrossi and Graeff, 1997). Re-exposing the animals to the same situation after a time interval assesses memory of these emotionally related behaviors (Conde et al., 2000).

Conde and colleagues (2000) demonstrated that a multi-trial training-to-criterion (criterion of 5 minutes not evading to the open arms) increased avoidance and escape performance on later trials. The following behaviors were scored in the ETM: number of trials before reaching the criterion of 300 seconds in the enclosed arm (acquisition), latency to return to the enclosed arm after the

criterion was obtained (escape 1), and latency to go to the enclosed arm (escape 2).

Object Recognition (OR) was carried out in the same arena used in the OF (Insight, Brazil). All animals were habituated to the environment 30 minutes before the sessions. The two objects were made out of metal and plastic and were fixed to the arena's floor with adhesive ribbon. The training session was held 24 hours before the trial, and the animals were placed in the arena containing one object, being left to freely explore it for 15 minutes. The test was repeated 24 hours later to evaluate long-term memory, following the protocol described by Ferreira (2009). In the trial, a novel object was put along with the familiar and the animal was left to explore both objects freely. Exploration was recorded. Time spent to explore the objects was analyzed by a blind observer.

2.5 Perfusion and Fixation

At the end of the behavioral testing, animals were anesthetized with xylazine (10 mg/kg ip) and ketamine (100 mg/kg ip) and transcardially perfused with 300mL of heparanized saline followed by 4% paraformaldehyde (PARA) in a 0.1M sodium phosphate buffer saline (pH 7.4). The heparanized saline was cooled and PARA was at room temperature. After pre-wash and fixation perfusions, brains were removed from the skull, post fixed for 24 hours at 4°C in PARA and transferred to 30% sucrose in PBS solution cryoprotection. Brains were kept in sucrose for at least 10 days before cutting in a criotome.

2.6 Immunostaining

Immunostochemical methods were used to identify lesion sites, phenotypes of grafted cells, migration and reaction of the host tissue to the implanted material. Frozen sections were washed in PBS 3 times for 5 minutes. Primary antibodies were diluted in anti-NeuN, anti-hNuclei and anti-ChAt and put in the shaker for 24 hours. Frozen sections were then washed in PBS 3 times for 5 minutes and the secondary staining used were goat anti-mouse, goat anti-rabbit and donkey anti-goat (depending on the primary used) Alexa

488 and 568 (Molecular Probes, UK), green and red, respectively, at concentrations of 1:400. Hoechst 33342 (Molecular Probes) counterstaining was used in all studies. Hoechst is a cell-permeable nuclear dye that emits blue fluorescence at UV light when bound to DNA (double-stranded deoxyribonucleic acid). The images taken from treated sections were analyzed in a fluorescent microscope (Olympus, BX 51).

2.7 Statistical Analyses

Data from OF and OR were expressed as mean \pm SD and standard error (SE). The intergroup data were analyzed using one way ANOVA, followed by the Bonferroni *post hoc* test. Data from ETM were analyzed using Kruskal-Wallis. Nonparametric *post hoc* comparisons were analyzed by U Mann-Whitney test followed by Bonferroni's correction. A 'p' \leq 0.05 was considered statistically significant for all tests and data analyses were held in the SPSS 17 package for Windows.

Results

Open Field. In the first day of the OF, there was statistically significant difference among groups on the crossing variable ($p=0,001$), as shown in Table 1. The Bonferroni *post hoc* test showed significant difference between the control group and ATh-SC group; the AMPA group and RTm-SCs group; and the RTm-SCs and ATh-SCs implanted groups. In the second day of testing it was possible to verify statistical difference among 3 variables: time spent in the periphery area ($p= 0,012$), time spent in the center area ($p= 0,012$) and latency ($p= 0,012$). Bonferroni's *post hoc* test demonstrated powerful differences between the AMPA group and control group; the AMPA group and DPDTh-SCs group; and the AMPA group and ATh-SCs group (see Table 1). There was no other significant statistical value in the testing days 3 and 4.

Table1. Open Field: significant variables from first and second days

Variables	Control		AMPA		AMPA + DPDTh		AMPA + ATh		AMPA + RTm		p*
	M	SE	M	SE	M	SE	M	SE	M	SE	
Crossings 1	8 ^a	1.6	15 ^b	1.9	16	2.3	18 ^{a,c}	2.9	7.4 ^{b,c}	1.5	.001
Periphery 2	118 ^a	.25	115 ^{a,b,c}	1.2	118 ^b	.14	118 ^c	.22	118	.78	.012
Center 2	1.25 ^a	.25	4.25 ^{a,b,c}	1.2	1.2 ^b	.15	1.4 ^c	.22	2.2	.77	.012
Latency 2	1.25 ^a	.25	4.25 ^{a,b,c}	1.2	1.2 ^b	.14	1.4 ^c	.22	2.2	.77	.012

M = media. SE = standard error. Periphery 2 = time spent in the periphery area in the second day. Center 2 = time spent in the center area in the second day. Latency 2 = time spent to leave the center area in the second day. Control = Saline + Saline (n=8), AMPA = AMPA + Saline (n= 8), AMPA + DPDTh = AMPA + SCs implant from human dental pulp from deciduous teeth (n= 9), AMPA + ATh = AMPA + SCs implant from human adipose tissue (n= 10), AMPA + RTm = AMPA+ SCs implant from mice renal tissue (n= 9). p* value = value used p < 0,05. *One way ANOVA, Bonferroni post hoc* test: significance expressed with identical letters.

Crossings (see Figure 1) decreased along the testing days in two of the groups: AMPA and ATh-SCs group. The other groups increased their crossings, but no statistical values were shown.

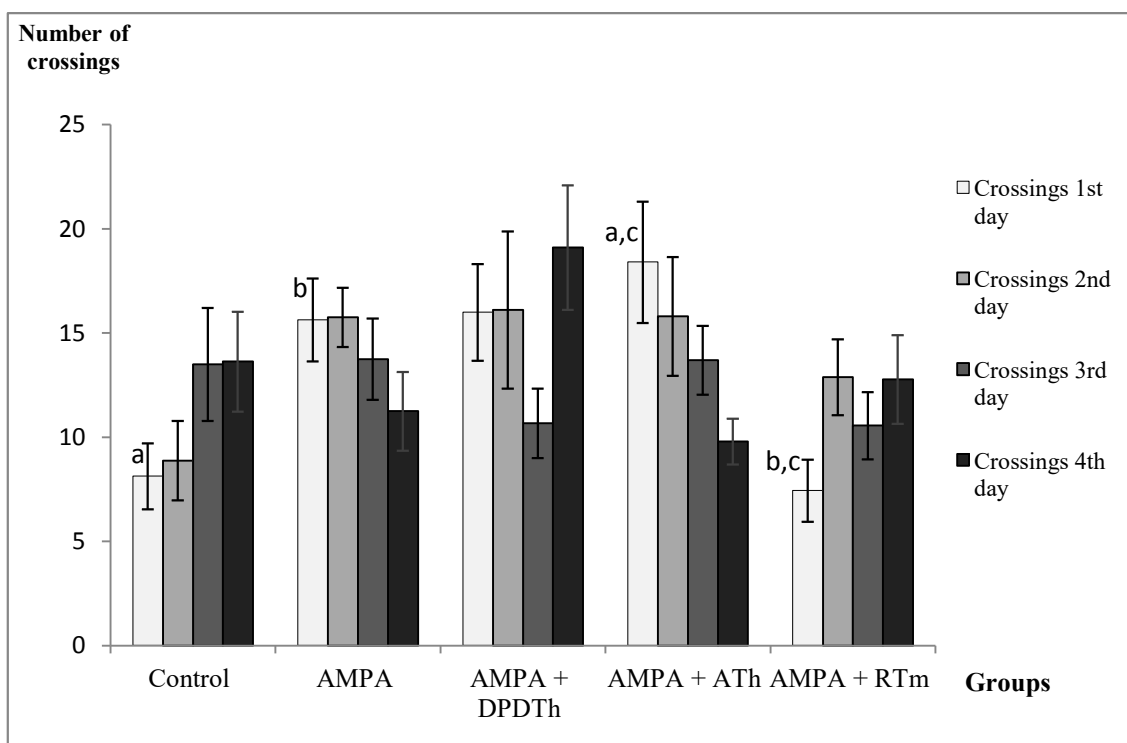


Figure 1. Open Field: number of crossings

Elevated T - Maze. Kruskal-Wallis' test showed statistical difference in the 'latency' variable from the second testing day ($p=0,028$). The U Mann-Whitney's test followed by the Bonferroni's correction demonstrated differences between the AMPA group and the ATh-SCs group ($p = 0,005$); and between the control group and ATh-SCs group ($p=0,005$) (see Figure 2). No other statistical difference was pointed out in this behavioral test (see Table 2).

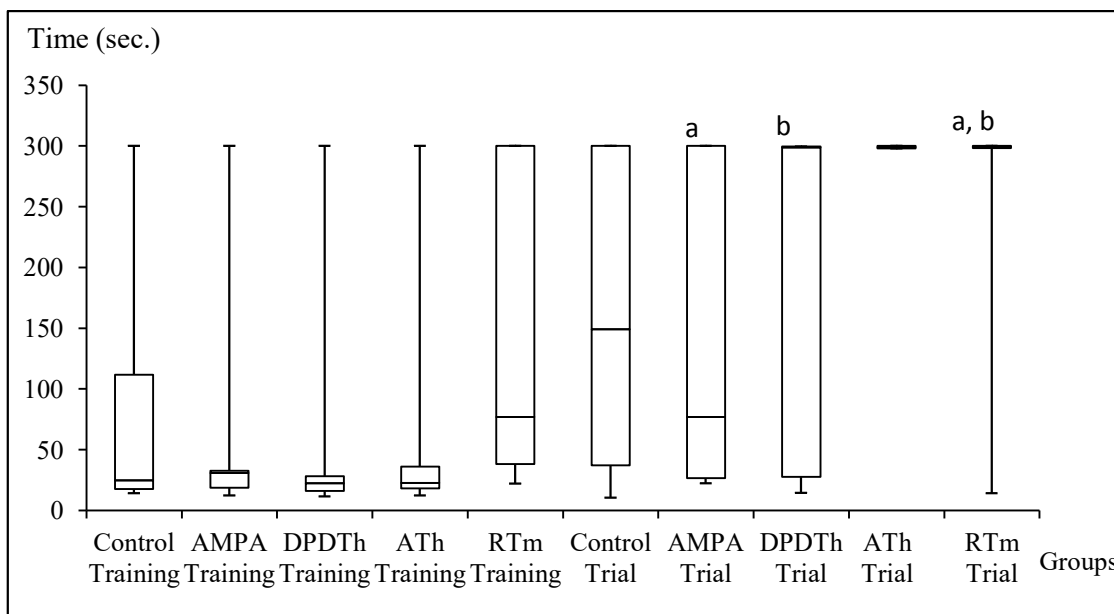


Figure 2. Elevated T- Maze: Inhibitory avoidance from training and trial.

Table 2. Elevated T-Maze

Variables	Control		AMPA		AMPA + DPDTh		AMPA+ ATh		AMPA + RTm		p*
	M	IIQ	M	IIQ	M	IIQ	M	IIQ	M	IIQ	
IA 1	37	47	31	7	22	6	23	9	77	131	.121
IA 2	149 ^a	131	77 ^b	137	300	6	300 ^{a, b}	0	300	0	.028
Escape 1	41	13	48	18	24	17	46	12	34	6	.152
Escape 2	52	17	46	14	17	12	28	26	28	4	.087

M = median, IIQ = interquartil interval, IA= inhibitory avoidance, Control = Saline + Saline (n= 8), AMPA = AMPA + Saline (n= 8), AMPA + DPDTh = AMPA + SCs implant from human dental pulp from deciduous teeth (n= 9), AMPA + ATh = AMPA + SCs implant from human adipose tissue (n= 10), AMPA + RTm = AMPA+ SCs implant from mice renal tissue (n= 9). p* value = value used for a 'p' < 0,05. Kruskal-Wallis' and Mann-Whitney's Tests: significant differences shown by the same letters.

Object Recognition. There was no statistical significance in the intergroup comparison between the variables 'time spent exploring the novel object' and

'time spent exploring the familiar object' (Table 3). Nevertheless, there was statistical significance among the intergroup medias in the analyses of the 'difference between exploration of the novel object and the familiar object' ($p = 0,03$). Bonferroni's *post hoc* test identified a powerful difference between the control group and ATh-SCs group ($p = 0,03$).

Table 3. Object Recognition

Variables	Control		AMPA		AMPA + DPDTh		AMPA+ ATh		AMPA + RTm		p
	M	SE	M	SE	M	SE	M	SE	M	SE	
Time NO	34.25	4.88	19.5	3.98	25.6	6.64	15.5	6.1	15.56	4.6	.11
Time FO	16.88	2.86	18.6	4.62	20.7	3.91	15.1	4.1	8.44	3.4	.22
Difference											
NO - FO	17.4 ^a	2.02	.85	.64	4.80	2.73	0.4 ^a	2.0	7.10	1.1	.03

M = media, SE = standard error, NO = novel object, FO = familiar object, Control = Saline + Saline (n=8), AMPA = AMPA + Saline (n= 8), AMPA + DPDTh = AMPA + SCs implant from human dental pulp from deciduous teeth (n= 9), AMPA + ATh = AMPA + SCs implant from human adipose tissue (n= 10), AMPA + RTm = AMPA+ SCs implant from mice renal tissue (n= 9). p^* value = value used $p < 0,05$. *One way ANOVA*, Bonferroni *post hoc* test: significance expressed with identical letters.

Histology

It was possible to identify, in the AMPA group, more cholinergic cells in one side of the cortex and less of these cells in its contralateral side, implying the success of the lesions. Although there were statistical differences among some of the animals behavioral testing, it wasn't possible to identify the SCs in the histology process.

Discussion

In the OF, according to Harsha and Anilakumar (2013), an increase in crossings along the testing days could be explained by the animal's acquaintance to the environment, suggesting the idea of safeness to exploring the apparatus. From graphs analyses, animals from the control group, DPDTh-

SCs and RTm-SCs groups demonstrated similar behaviors, exploring more the apparatus along the testing days.

There was a significant difference in the first day of crossings between RTm-SCs group and the AMPA group, suggesting the implants made a difference in the behavior of these implanted rats. The AMPA group, during the testing days, spent more time exploring the center area of the apparatus, reflecting a riskier behavior (Harsha and Anilakumar, 2013).

In the ETM, apparently the three implanted groups showed a better performance than the AMPA group, but only one of them exhibited statistical meaning. In the trial, it was identified a statistical significance between ATh-SCs group and the AMPA group in the 'acquisition of inhibitory avoidance'. Perhaps it only happened in the ATh-SCs group because the test was not specific to evaluate the ability of learning new tasks or because of the small number of animals in the groups.

It was not possible to identify statistical differences between the control group and the AMPA group in the OR test. Nevertheless it was interesting to notice a better performance of the ATh-SCs group than the control group. More studies should be done to understand the reason of this finding. The lack of significant differences in this behavioral test may also be explained by the low specificity of the test to evaluate long-term memory, as well as the small number of animals per group.

Study Limitations

Even though there were better performances, the histology wasn't complete once it wasn't possible to trace the SCs. More needs to be done to identify immune activation markers for CD11b, CD4 and CD40, as well as markers for mice cells. Besides this, more specific behavioral test should be done, such as the water maze or passive avoidance tests.

Conclusions

Implants from SCs demonstrated an improvement in the performance of groups in a model for Ad in some of the behavioral tests. The existence of behavioral improvement is not only associated exclusively to implants survival. Rehabilitation of tissues may occur due to innate mechanisms of the SCs to migrate to the lesion site, in particular, inflammations, apoptosis or hypoxia, releasing trophic factors that accelerate the endogen repair (Joyce et al., 2010).

The migration of the SCs to injured tissues in animal models is associated to a mechanism not yet clearly understood and it is likely involved in the production of paracrine, anti-inflammatory and anti-apoptotic factors (Roux et al., 2011). Paracrine effect is defined as a form of communication between two different cells. One releases chemical mediators to its immediate environment, resulting in a change in the behavior of a cell in its adjacent environment (Anthony and Shiels, 2013).

In a study of organ bio-distributions of transplanted MSCs in mice with acute kidney injury, Cheng and colleagues (2013) found out that after intravenous administration, MSCs were largely localized in pulmonary capillaries but cells survived only transiently. Transplanted MSCs did not migrate to kidneys from peritoneal cavity nor renal subcapsular space, but it was identified the presence of over forty regulatory cytokines protecting renal tubular cells from cisplatin-induced cytotoxicity.

Joyce and colleagues (2010), in a study of acute cerebral injury, demonstrated that a very limited number of grafted SCs characterized a stable implant; and SCs revealed an intense migration to injured sites, promoting endogen neuronal growth, decreasing the apoptosis or inflammation. Nevertheless, in a transient way, once they had disappeared in time (Joyce et al., 2010).

Aside from the observation that SCs release a multitude of growth factors and cytokines to induce the reparative process, SCs release microvesicles and exosomes that may produce paracrine factors required for tissue repair (Anthony and Shiels, 2013). Paracrine factors released by transplanted cells accounted for improvements, and it appears that the route of cell transplantation is not critical for realizing benefits of cell therapy (Cheng et al., 2013).

Paracrine-mediated tissue repair is to be exploited via genetic engineering of stem, progenitor or other cells to deliver various beneficial mediators to stimulate regenerative processes in damaged tissues (Anthony and Shiels, 2013). Stem cell-based therapy represents an emerging therapeutic approach by which incurable diseases may be treated (Marchetti, Krohne, Friedlander and Friedlander, 2010). Although more should be known to clarify all the mechanisms of cellular paracrine effects in the host's tissues, there is a good perspective that cell therapy may be used to treat neurodegenerative diseases.

Acknowledgement:

Grants from Brazilian Agencies: *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*.

References

- Anthony, D. F. and Shiels, P. G. (2013) "Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs," *Transplant Res*, 2 (10).
- Bogdanov, V. B., Bogdanova, O. V., Koulchitsky, S. V., Chauvel, V., Multon, S., Makarchuk, M. Y., Brennan, K. C., Renshaw, P. F. and Schoenen, J. (2013) "Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats," *Behav Brain Res*, 236 (1), 90-93.
- Bugos, O., Bhide, M. and Zilka, N. (2009) "Beyond the rat models of human neurodegenerative disorders," *Cell Mol Neurobiol*, 29 (6-7), 859–869.
- Bydlowski, S. P., Debes, A. A., Maselli, L. M. F. and Janz, F. L. (2009) "Características biológicas das células-tronco mesenquimais," *Rev. Bras. Hematol Hemoter*, 31 (supl.1), 25-35.
- Chen, W. W. and Blurton-Jones, M. (2012) "Concise review: can stem cells be used to treat or model alzheimer's disease?" *Stem Cells*, 30, 2612–2618.
- Cheng, K., Rai, P., Plagov, A., Lan, X., Kumar, D., Salhan, D., Rehman, S., Malhotra, A., Bhargava, K., Palestro, C. J., Gupta, S. and Singhal, P. C. (2013) "Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms," *Expl Mol Pathol*, 94 (3), 466-473.
- Conde, C., Costa, V., and Tomaz. C. (2000) "Effects of emotional reactivity on inhibitory avoidance in the elevated T-maze," *Braz J Med Biol Res*, 33 (2), 233-236.
- Ferreira, G. F. S. (2012) "Análise da estrutura fatorial do comportamento exploratório de ratos em modelos de ansiedade, depressão e reconhecimento," Unpublished doctoral dissertation. University of Brasília, Brasil. pp106.
- Foudah, D., Redondo, J., Caldara, C., Carini, F., Tredici, G. and Miloso M. (2012) "Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells," *J Biomed Biotechnol*, 2012, pp13.

Harsha, S. N. and Anilakumar, K. R. (2013) "Anxiolytic property of hydro-alcohol extract of *Lactuca sativa* and its effect on behavioral activities of mice," *J Biomed Res*, 27 (1), 37-42.

Ibarretxe, G., Crende, O., Aurrekoetxea, M., Garcia-Murga, V., Etxaniz, J. and Unda, F. (2012) "Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration," *Stem Cells Int*, 2012, pp12.

Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G. and Nolte, J. A. (2010) "Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease," *Regen Med*, 5 (6), 933-946.

Marchetti, V., Krohne, T. U., Friedlander D. F. and Friedlander M. (2010) "Stemming vision loss with stem cells," *J Clin Invest*, 120 (9), 3012–3021.

Niedowicz, D. M., Nelson, P. T. and Murphy, P. M. (2011). Alzheimer's Disease: pathological mechanisms and recent insights. *Curr Neuropharmacol*, 9, 674-684.

Okano, H., Sakaguchi, M., Ohki, K., Suzuki, N. and Sawamoto, K. (2007) "Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms," *J Neurochem*, 102 (5), 1459–1465.

Prince, M., Bryce, R. and Ferri, C. (2011) "World Alzheimer Report 2011: The benefits of early diagnosis and intervention," <http://www.alz.co.uk>. Accessed 10 December 2012.

Roux, S., Leotot, J., Chevallier, N., Bierling, P. and Rouard, H. (2011) "Mesenchymal stromal cells: biological properties and clinical prospects," *Transfus Clin Biol*, 18 (1), 1-12.

Weintraub, S., Salmon, D., Mercaldo, N., Ferris, S., Graff-Radford, N. R., Chui, H., Cummings, J., DeCarli, C., Foster, N., Galasko, D., Peskind, E., Dietrich, W., Beekly, D., Kukull, W. A. and Morris, J. C. (2009) "The Alzheimer's Disease Center's Uniform Data Set (UDS): the neuropsychological test battery," *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 23 (2), 91-101.

Wszolek, C. W. Z. K. (2008) "Etiology and pathophysiology of frontotemporal dementia, Parkinson disease and Alzheimer disease: lessons from genetic studies," *Neurodegener Dis*, 5,122-125.

Zangrossi, H. and Graeff, F. G. (1997) "Behavioral validation of the elevated T-maze: a new animal model of anxiety," *Brain Res Bull*, 44 (1), 1-5.

6. CONCLUSÃO GERAL

A partir da análise dos dados, foi evidenciada melhora no comportamento dos animais no teste do campo aberto e labirinto em T-elevado. Apesar de os animais demonstrarem melhor desempenho no comportamento, a histologia realizada no estudo não foi acurada, uma vez que não foi possível rastrear as CTs.

A existência da melhora comportamental não é garantida apenas pela sobrevivência de implantes de CTs. A recuperação ou reparação de tecidos por CTs adultas pode ocorrer através de um mecanismo referente às funções inatas das CTs de se deslocarem até o sítio da lesão, em particular áreas de hipóxia, apoptose ou inflamação, liberando fatores tróficos que aceleram o reparo endógeno (Joyce et al., 2010). De acordo com os autores, o produto bioativo secretado pelas células pode suprimir o sistema imunológico local, fazendo com que haja intensificação da angiogênese, redução do nível de radicais livres e inibição da fibrose e apoptose, estimulando, assim, o recrutamento, a retenção, proliferação e diferenciação do tecido hospedeiro das CTs.

Em casos de lesões agudas ou inflamações, as CTs evidenciaram comportamento intenso no sítio lesionado, promovendo crescimento neuronal endógeno, diminuição da apoptose e regulação da inflamação; contudo, forma transitória, desaparecendo com o tempo (Joyce et al., 2010). A migração das CTs aos tecidos lesionados nos modelos animais ainda não é clara, mas parece estar envolvida com a produção de fatores parácrinos, antiinflamatórios e antiapoptóticos (Roux et al., 2011).

Efeitos parácrinos são definidos como uma forma de comunicação celular (Anthony & Shiels, 2013). Em estudos sobre camundongos transplantados com CTMs, em um modelo de doença renal aguda, Cheng e colaboradores (2013) descobriram que após a administração intravenosa das CTs, as células foram localizadas em capilares pulmonares, porém, com sobrevivência transitória. É importante ressaltar que as CTMs transplantadas não migraram dos rins pela cavidade peritoneal nem pelo espaço renal subcapsular. Entretanto, foi identificada a presença de mais de 40 reguladores

de citocinas nessas regiões, agindo como protetores das células renais tubulares contra a citotoxicidade induzida pelo cisplatino.

Além do fato de as CTs liberarem inúmeros fatores de crescimento e citocinas no processo de reabilitação celular, as CTs também liberam microvesículas e exossomos capazes de produzir os fatores parácrinos requeridos para a reparação tecidual (Anthony & Shiels, 2013). Assim, a terapia celular representa uma abordagem terapêutica emergente para um possível tratamento de doenças incuráveis. Apesar da necessidade de se compreender mais sobre os mecanismos celulares que produzem o efeito parácrino no tecido hospedeiro, há uma boa perspectiva de que futuramente a terapia celular possa ser usada para tratar doenças neurodegenerativas.

Referências da Conclusão Geral

Anthony DF & Shiels PG. Exploiting paracrine mechanisms of tissue regeneration to repair damaged organs. *Transplant Res.* 2013, 2(10).

Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G & Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med.* 2010; 5(6): 933-946.

Roux S, Leotot J, Chevallier N, Bierling P & Rouard H. Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects. *Transfus Clin Biol.* 2011, 18(1): 1-12.

ANEXO A

Protocolo de Intervenção – Seção da Metodologia do Projeto de Pesquisa da Dissertação

Intervenção

Para o estudo, foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos, adultos, com pesos variando entre 300-350g no início do experimento. À exceção do grupo controle, todos os animais receberam infusões unilaterais de AMPA para lesão do NBM, sendo distribuídos conforme os seguintes grupos:

Grupo 1: Controle (Salina + Salina);

Grupo 2: Lesão (Lesão + Salina);

Grupo 3: Tratamento com implante de Células-Tronco da Polpa Dental de Dentes Decíduos humanos (Lesão + CTDh);

Grupo 4: Tratamento com implante de Células-Tronco de Tecido Adiposo humano (Lesão + CTAh);

Grupo 5: Tratamento com implante de Células-Tronco de Tecido Renal de camundongos (Lesão + CTRc).

Tamanho Amostral

A determinação do tamanho amostral é sempre um passo importante no planejamento de qualquer estudo quantitativo. Estudos contribuem com os valores do nível e intervalo de confiança, que devem ser incluídos no cálculo amostral, além disso, demonstram o número de animais sugerido (Hodges et al., 2000; Oliveira et al., 2008). Pesquisas na área da ciência básica, que apresentam resultados confiáveis, evidenciam a necessidade de 08-10 animais por grupo.

Oliveira (2003), em uma pesquisa com cinco grupos experimentais e três instrumentos de medida, usou 10 animais em cada um dos grupos. No presente estudo também houve a utilização de três instrumentos, assim, para um poder de análise de 80%, estimativa de erro do Tipo I igual a 0,05 (*unpaired T-test*) em estudos com 5 grupos de uma população infinita e uma diferença máxima esperada entre grupos de 5 pontos percentuais, a formação de cada grupo contou com o total de 12 sujeitos.

Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas-alojamento padrão com três sujeitos em cada, em uma sala com temperatura controlada a 25°C e ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes ligadas a partir das 7h). Antes do início do projeto, os animais foram examinados para problemas que pudessem interferir no estudo, como por exemplo, alterações de locomoção e deficiência visual. Durante todo o experimento, os roedores receberam comida e água *ad libitum*.

Cirurgia Estereotáxica

O modelo utilizado para a dA envolveu cirurgia estereotáxica para a lesão do NBM dos roedores. Os animais foram anestesiados (via intraperitoneal) com uma associação de Xilazina (10mg/kg) e Quetamina (100mg/kg). Uma vez sedados, realizava-se a tricotomia e posterior fixação do roedor no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil). Para a lesão, foram feitas duas infusões excitotóxicas unilaterais de AMPA (Tocris, Neuramin) na concentração de 0.8 mM e volume de 0.4 µL diluídos em uma concentração de 0,05mM em *buffer* salino (pH 7.4) em taxa de 0,2 µL/minuto.

Para alcançar o NBM, foram utilizadas as seguintes coordenadas: a partir do bregma, anterior/posterior (AP), lateral (L) e ventral (V): crânio posicionado a 5° acima do plano interaural, rostral AP: +1,0; L: +2,6; V: -7,5 e caudal AP: +0,2; L: +3,2; V: -7,0 (Figura 1).

Transcorrida a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas individuais por sete dias. É importante referir que no modelo em questão, os animais apresentam convulsões e comportamento agressivo nos primeiros dias seguintes à cirurgia para a lesão, em virtude da ação do AMPA no cérebro. Por essa razão, houve a necessidade da manutenção das caixas individuais.

Nas primeiras 48 horas, os sujeitos não foram colocados diretamente na maravalha. As gaiolas-alojamento foram forradas com papel toalha para proporcionar um ambiente pós-operatório higienizado, auxiliando a recuperação. Durante as primeiras 24-48 horas após a cirurgia, os animais receberam comida úmida e triturada para facilitar a mastigação e evitar a redução de peso característica desse tipo de tratamento (Oliveira, 2003).

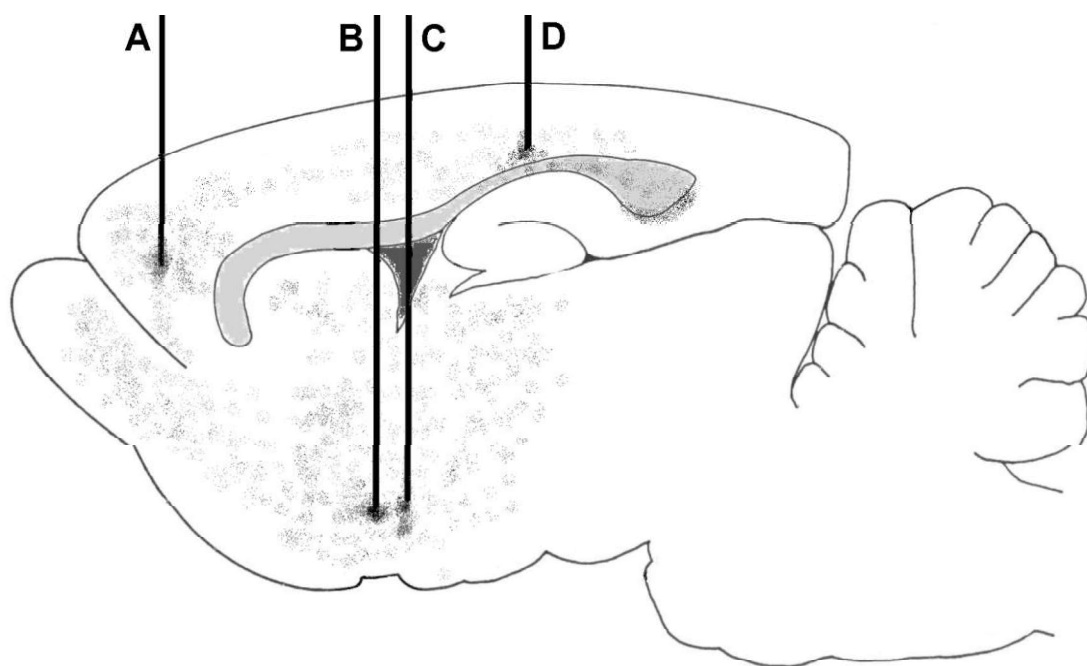


FIGURA1 – Posição dos sítios de lesão e implante das células. **A** indica o local onde é feito o implante no córtex frontal; **B** e **C** são os locais de lesão do NBM rostral e caudal, respectivamente; **D** mostra o local de implante no córtex parietal. Imagem original de Oliveira (2003) (gentilmente cedida).

Cirurgia para o Implante de Células-Tronco

Os implantes de CTs também foram realizados a partir de cirurgias estereotáxicas. Estudos indicam que os animais se recuperam de um procedimento cirúrgico em, aproximadamente, 14 dias (Grigoryan, et al., 2000). Entretanto, para alguns sujeitos esse tempo pode ser insuficiente, sendo isso observado, dentre outras formas, pelo baixo ganho de peso. Assim, foi utilizado um intervalo de 21 dias como padrão entre a cirurgia para a lesão e os transplantes celulares. Os animais foram preparados para a cirurgia de implantes das CTs de forma semelhante ao preparo para a cirurgia de lesão do NBM.

Grigoryan e colaboradores (2000) demonstraram que o melhor sítio para a implantação celular nesse tipo de lesão se encontra nos córtices frontal e parietal. Tendo isso em vista, cada animal recebeu infusões de 2,5 μ L de 50 mil células/ μ L suspensas em PBS através de uma seringa Hamilton (séries 700, 10 μ L agulha removível, ponta plana) posicionada nas seguintes

coordenadas para os córtices frontal e parietal, respectivamente: AP: +3,2; L: +3,5; V: -3,0 e AP: -1,0; L: +5,0; V: -2,2. Cada infusão durou, em média, 2 minutos.

Todas as células usadas nos implantes desse estudo foram provenientes do laboratório de hematologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a coordenação da professora Dr^a Patrícia Pranke. As CTs foram selecionadas e entregues 30 minutos antes do procedimento de implantação, suspensas em PBS.

Em relação às CTDh, foram utilizados dentes anteriores, esfoliados naturalmente, de 10 crianças entre 5 e 7 anos inseridas no Programa de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para serem incluídos no estudo, os dentes precisavam apresentar 1/3 de raiz residual e ser provenientes de crianças com estado geral de saúde normal, além da assinatura do termo de Consentimento Informado pelos responsáveis, doando os dentes extraídos para a realização do experimento.

O protocolo de Luisi & Barbachan (2007) foi usado para a coleta, isolamento e caracterização das CTDs da polpa de dente decíduo e padronizados pelo grupo conforme Bernardi e colaboradores (2011). As células da polpa dental de dentes decíduos humanos e do tecido adiposo humano foram selecionadas em processo próprio, tendo em vista a origem em espécie diferente daquela onde foram implantadas as células. A viabilidade da contagem total das CTs, quando entregues pelo grupo de pesquisa acima citado foi superior a 90% no método de Neubauer.

As CTM-TAs de tecido humano foram isoladas através de protocolo estabelecido pelo Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da UFRGS. Cerca de 100 ml de tecido adiposo foram obtidos de pacientes submetidos à lipoaspiração no Hospital Santa Clara, pertencente ao Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O produto do lipoaspirado foi transportado até o laboratório sobre refrigeração (2°C a 8°C), sendo processado até 24h após a coleta. A viabilidade da contagem total das CTs, quando entregues pelo grupo de pesquisa acima citado, através do

método de Neubauer foi de 91%, enquanto que pelo contador automático foi de 88%.

Para as CTRc, o isolamento das células do rim foi realizado de camundongos adultos da linhagem C57/B16N. Os animais foram anestesiados, sacrificados e tiveram os rins extraídos, cortados e lavados com solução tampão de fosfato para o preparo em cultura (descrição do protocolo em anexo). A viabilidade da contagem total das CTs, quando entregues pelo grupo de pesquisa acima citado, através do método de Neubauer foi de 83,3%, enquanto que pelo contador automático foi de 77%.

Testes Comportamentais

Após a recuperação do procedimento cirúrgico para o implante das CTs (21 dias, assim como no protocolo para a lesão), foram realizados os experimentos comportamentais. A fim de que os resultados não fossem prejudicados, o tempo de intervalo entre os testes comportamentais foi de três dias sempre que a modalidade do teste fosse trocada (Hodges, 1995). Além disso, a avaliação comportamental acompanhou a seguinte ordem: teste do Campo Aberto, Labirinto em T-Elevado e Reconhecimento de Objetos, respectivamente.

Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi desenvolvido na década de 30 pelo psicólogo Calvin Hall para avaliar o comportamento emocional e os distúrbios das atividades motoras de roedores (Oliveira, 2003). Atualmente, variações de modelos desse teste proporcionam a interpretação do comportamento dos animais dentro do paradigma inicialmente proposto por Hall. Inúmeros estudos afirmam a importância do teste do campo aberto para a investigação de respostas associadas ao estresse (Katz, Roth & Carroll, 1981); ansiedade (Enkel, Thomas & Bartsch, 2013) e memória espacial (Lipatova & Toufexis, 2013).

A interpretação proposta por Hall é de que respostas de ansiedade e medo de um animal exposto a um ambiente novo e potencialmente perigoso são caracterizadas por uma alta taxa de defecação

(ativação do sistema autonômico) (Joffe, 1965). Contudo, estudos mais recentes inferem que a ambulação diminuída também possa ser usada para determinar ansiedade e medo (Bogdanov et al., 2013).

Roedores tendem a evitar espaços abertos (potencialmente perigosos), o que os leva a concentrar o movimento próximo às paredes, isto é, às áreas mais periféricas do aparato (Bogdanov, 2013). O principal objetivo para o uso do campo aberto nesse projeto foi investigar a influência das lesões e dos implantes na atividade motora e no comportamento exploratório dos ratos. O modelo seguiu o protocolo proposto por Joffe (1965), em que os animais são expostos ao campo aberto durante dois minutos por quatro dias consecutivos.

O aparato consiste de uma arena de madeira circular com 80 cm de diâmetro e paredes de 40 cm de altura. A base é dividida em 12 segmentos com, aproximadamente, a mesma área.

Os animais foram colocados na sala de avaliação de comportamentos sempre 30 minutos antes do início dos testes, para habituação. Todo o percurso dos sujeitos durante o procedimento foi filmado e posteriormente analisado por dois avaliadores treinados e cegos para os grupos.

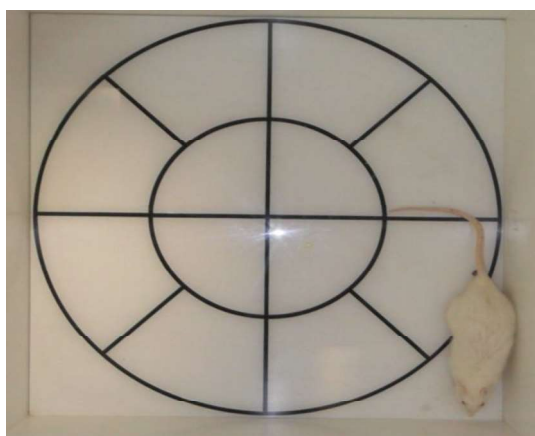


Figura 2. Teste Campo Aberto

Teste do Labirinto em T-Elevado

O labirinto em T-elevado é um teste inicialmente desenvolvido para investigar os efeitos de drogas ansiolíticas; a relação existente entre os

subsistemas neurais e o transtorno de pânico (Moreira et al., 2013); memória emocional (Thakur & Mengi, 2005). Esse é um instrumento que deriva do labirinto em cruz-elevado, usado para investigar o efeito de drogas ansiolíticas e a caracterização da ansiedade nos animais (Pellow, Chopin, File & Briley, 1985). É baseado no comportamento naturalmente aversivo que a altura e os espaços abertos têm sobre os roedores (Moreira et al., 2013). De acordo com Roncon (2013), a impossibilidade de o animal permanecer com o corpo próximo ou em contato com superfícies verticais serviria como estímulo aversivo associado aos braços abertos do labirinto.

A lógica desse teste é baseada no conflito de duas forças motivacionais: a avaliação exploratória de novos ambientes e a inibição do comportamento defensivo em ambientes perigosos ou aversivos (Viana, Tomaz & Graeff, 1994). A exploração de ambientes abertos pode ser considerada aversiva porque os animais se colocam em situação de vulnerabilidade frente a possíveis predadores (Harsha & Anilakumar, 2013). Sendo assim, a redução da atividade ou o ato de se esconder no braço fechado podem ser vistos como uma resposta defensiva, enquanto a exploração dos braços abertos pode ser considerada um comportamento de risco (Blanchard, Blanchard, Rodgers & Weiss, 2001).

Colocar o sujeito repetidamente dentro do braço fechado permite que o animal aprenda a não entrar no braço aberto (aprendizagem da esQUIVA inibitória) (Viana, Tomaz & Graeff, 1994). Expô-lo novamente ao aparato, após um intervalo de tempo, avalia a memória emocional (Moreira et al., 2013). O labirinto em cruz-elevado e o labirinto em T-elevado são testes significativamente usados porque medem os estados emocionais do animal sem usar estímulos externos como a dor (choque elétrico) ou a privação (alimentos, água) (Conde, Costa & Tomaz, 1999).

O aparato consiste de três braços com iguais dimensões (50 cm de comprimento e 12 cm de largura) posicionados em ângulos retos com dois braços abertos, formando um “T”. É elevado do chão em 50 cm. A borda do “T” é protegida por uma parede de 2 cm de altura.

A fim de adaptar os animais ao ambiente, os sujeitos foram colocados na sala de comportamento 30 minutos antes do início do experimento. Todas as sessões foram filmadas e o teste consistiu das seguintes fases:

- 1) Aquisição da esquiva inibitória: os ratos foram colocados individualmente no braço fechado, de frente para a parede do braço. O tempo para a saída do braço, com as quatro patas (latência/treino), foi gravado. Sempre que o animal saísse do braço fechado, era colocado de volta em sua gaiola-alojamento por 1 minuto, e então recolocado no braço fechado. Esse procedimento foi repetido até que o rato permanecesse no braço fechado por 5 minutos (treinado a critério).
- 2) Fuga 1: após a aquisição do comportamento da esquiva inibitória, o animal foi colocado em sua gaiola-alojamento por 1 minuto, sendo então posicionado ao final do braço aberto direito. O tempo decorrido para o sujeito entrar no braço fechado (fuga 1/treino) foi gravado. Um limite de 5 minutos (teto) para essa tarefa foi dado a todos os ratos, a fim de certificar que todos entrariam no braço fechado.
- 3) Esquiva: transcorridos 3 dias do treinamento (aquisição da esquiva inibitória e fuga 1), a avaliação foi iniciada (teste). Os animais foram colocados individualmente no braço fechado do labirinto em T-elevado, virados para a parede. O tempo de latência para a saída do braço fechado (exploração dos braços abertos) foi gravado. O tempo limite (teto) dos animais no braço fechado era de 5 minutos (critério de retenção), quando eram retirados do aparato e posicionados na gaiola-alojamento.
- 4) Fuga 2: transcorrido 1 minuto na gaiola-alojamento, o animal era colocado no final de braço aberto direito e o tempo para que entrasse no braço fechado era gravado (teste).



FIGURA 3. Labirinto em T-Elevado

Teste de Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos consiste na exploração espontânea de objetos familiares e novos (Mogensen et al., 2003). A memória de reconhecimento pode ser evidenciada porque os animais expostos a objetos novos e familiares tendem a preferir a exploração dos objetos novos frente aos já conhecidos (Winters, Saksida & Bussey, 2008).

A memória declarativa é adquirida com poucas exposições ao objeto novo, o que passa a ser a base para o teste de reconhecimento de objetos (Abreu, 2009). Dessa feita, o treino para a pré-exposição do objeto (familiarização) e o teste em si são fundamentais para a emergência do comportamento exploratório do animal sobre o objeto novo. Roedores tendem a explorar mais o objeto novo na fase de teste, evidenciando o instinto inato de exploração dos ambientes/objetos desconhecidos (Costa et al., 2008a).

O teste é normalmente realizado em uma arena aberta, e consiste de uma fase de treino e uma fase de teste, separadas por um tempo de retenção variável (Abreu, 2009). O modelo utilizado nesse estudo foi uma adaptação do experimento clássico de Ennaceur e Delacour (1988), caracterizando-se pela exposição individual do animal a dois objetos, um familiar e outro desconhecido, em uma arena circular de 80 cm de diâmetro e paredes com 40 cm de altura (a mesma utilizada no campo aberto).

Na fase de treino, o roedor foi introduzido no centro da arena, virado para uma das paredes. Em uma zona intermediária à parede e o centro, colocou-se um objeto até então desconhecido (o objeto tinha peso suficiente para que o animal não o movesse). Permitiu-se que o sujeito explorasse o ambiente por 15 minutos (familiarização), sendo então retirado da arena e colocado em sua gaiola-alojamento. Transcorridas 24 horas, o animal era reintroduzido à arena (centro do aparato, virado para a parede), que agora continha dois objetos: o familiar e um objeto desconhecido. Os objetos foram colocados em uma zona intermediária ao centro e à parede.

O comportamento de exploração foi filmado por 15 minutos, sendo avaliados os tempos de exploração de todo o ambiente, do objeto familiar e do objeto novo. Cabe ressaltar que todos os animais foram habituados ao ambiente por 30 minutos antes do início do experimento.

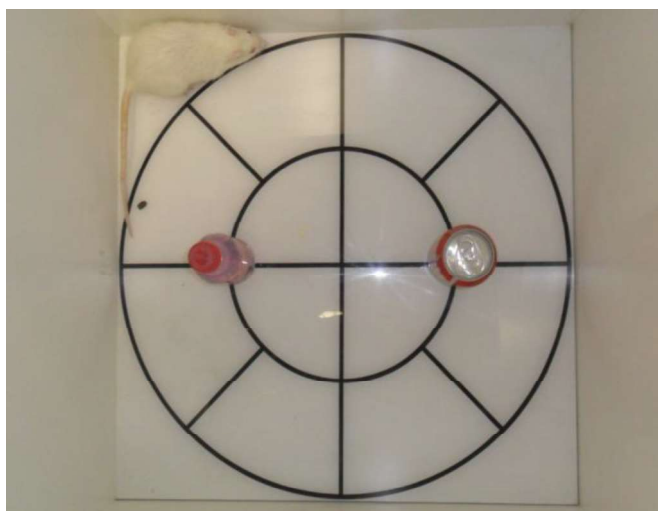


Figura 4. Teste de Reconhecimento de Objetos.

Perfusões Transcardíacas

Passados seis meses dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com quetamina e xilasina (dosagem vide cirurgias para lesão e implante de CTs), e sacrificados através do método da perfusão transcardíaca com 300mL de solução salina heparinizada (solução de pré-lavagem, 0,9% NaCl em dH₂O contendo 5.000 unidades por litro de heparina), seguida de paraformaldeído a 4% para a fixação do cérebro. Após as

perfusões, o cérebro dos animais foi removido e pós-fixado por 24h a 4°C em solução de paraformaldeído a 4%, sendo então transferidos para uma solução de PBS com sacarose a 30% para a crioproteção por, pelo menos, 05 dias (Oliveira et al., 2003).

Métodos imunohistológicos foram empregados para identificar as lesões, a localização das células implantadas, assim como a reação do hospedeiro aos implantes. Após o congelamento, os cérebros foram seccionados em um criotomo e analisados para os seguintes anticorpos primários: anti-ChAt para identificação de células colinérgicas, sendo o mais significativo dos anticorpos porque favorece a identificação das lesões; NeuN para identificação de células neuronais; HNuclei para a identificação de células neuronais humanas. Como anticorpos secundários, foram usados Alexas de comprimentos de onda entre verde e vermelho, os mais comuns para marcação dupla a fim de identificar as CTs. Todas as lâminas foram observadas através da emissão de luz UV para a marcação do Hoechst impregnado nas células implantadas, em microscópio fluorescente (Olympo, BX 51).

Análise estatística

A análise estatística foi conduzida no pacote do SPSS versão 16 para Windows. A fim de investigar a distribuição foi utilizado o teste de Shapiro-Will uma vez que o 'n' não acrescia de 50.

Na análise dos dados dos testes do campo aberto e do reconhecimento de objetos foi identificada distribuição normal, sendo assim, as variáveis foram examinadas pela ANOVA de uma via. Identificada significância estatística ($p \leq 0,05$), fez-se uso do *post hoc* de Bonferroni.

Na avaliação de desempenho dos animais no instrumento do labirinto em T-elevado, além da não identificação de distribuição normal e em função da existência de um tempo limite no teste para a avaliação da latência e fuga nas sessões de treino e teste ("teto" de 300 segundos), os dados foram classificados como não paramétricos, sendo expressos em mediana e intervalos interquartis. Para a investigação da latência e fuga dos grupos, usou-se a análise de variância de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Com a identificação de

relevância estatística, usou-se o teste U de Mann-Whitney com a correção do teste de Bonferroni.

Referências do Anexo A

Abreu RV. Efeito proamnésico e antioxidante do café no sistema nervoso central de ratos. Tese de Doutorado. PPG-Ciências de Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009; 115p.

Bernardi L, Luisi SB, Fernandes RF, Valentim L, Bogo JCs, Fossati ACM & Pranke P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod.* 2011; 37:973-9.

Blanchard R J, Blanchard DC, Rodgers J & Weiss SM. The characterization and modeling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990; 14(4):463-72.

Bogdanov VB, Bogdanova OV, Koulchitsky SV, Chauvel V, Multon S, Makarchuk MY, Brennan KC, Renshaw PF & Schoenen J. Behavior in the open field predicts the number of KCl-induced cortical spreading depressions in rats. *Behav Brain Res.* 2013; 236(1):90-93.

Conde CA, Costa V & Tomaz C. Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 63(1):63-69.

Costa MS, Botton PH, Mioranza S, Ardis AN, Moreira JD, Souza DO & Porciúncula LO. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunoccontent in the hippocampus. *Neurochem Int.* 2008a; 53:89-94.

Enkel T, Thomas M & Bartsch D. Differential effects of subchronic phencyclidine on anxiety in the light-enhanced startle, light/dark exploration and open field tests. *Behav Brain Res.* 2013.

Ennaceur A & Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav. Brain Res.* 1988; 31:47-59.

Grigoryan GA, Gray JA, Rashid T, Chadwick A & Hodges H. Conditionally immortal neuroepithelial stem cell grafts restore spatial learning in rats with lesions at the source of cholinergic forebrain projections. *Restor Neurol Neurosci.* 2000; 17(4).

Harsha SN & Anilakumar KR. Anxiolytic property of hydro-alcohol extract of *Lactuca sativa* and its effect on behavioral activities of mice. J. Biomed Res. 2013 Jan; 27(1):37-42.

Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. Brain Res. 1995; 3(3-4):167-81.

Hodges H, Sowinski P, Virley D, Nelson A, Kershaw TR, Watson WP et al. Functional reconstruction of the hippocampus: fetal versus conditionally immortal neuroepithelial stem cell grafts. Novartis Found Symp. 2000; 231:53-65.

Joffe JM. The effect of prenatal maternal stress on emotionality and learning ability in rats selected for emotional reactivity. Unpublished PhD, University of London. 1965.

Katz RJ, Roth KA & Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neurosci Biobehav Rev. 1981; 5(2): 247-51.

Lipatova O & Toufexis DJ. Estrogen enhances the retention of spatial reference memory in the open field tower test, but disrupts the expression of spatial memory following a novel start position. Neurobiol Learn Mem. 2013; 99:50-8.

Luisi SB & Barbachan JJ. Behavior of Human Dental Pulp Cells Exposed to Transforming Growth Factor-Beta1 and Acidic Fibroblast Growth Factor in Culture. J Endod. 2007; 33(7):833-5.

Mogensen J, Wörtwein G, Plenge P & Møllerup ET. Serotonin, locomotion, exploration, and place recall in the rat. Pharmacol Biochem Behav. 2003; 75: 381–95.

Moreira FA, Gobra PH, Viana TG, Vicente MA, Zangrossi H & Graeff FG. Modeling panic disorder in rodents. Cell Tissue Res. Apr. 2013.

Oliveira AA, Haeser A & Pranke P. Stem cell grafts as therapeutic tools for central nervous system disorders. Psychol Neurosci. 2008; 1(1):1-9.

Oliveira AA. Stem cell graft effects following unilateral cholinergic depletion. Tese de Doutorado. Universidade de Londres. King's College: Instituto de Psiquiatria. 2003; 322p.

Pellow S, Chopin P, File SE & Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; 14(3):149-67.

Roncon CM, Biesdorf C, Coimbra NC, Audi EA, Zangrossi H & Graeff F.G. Cooperative regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors in the t periaqueductal grey matter by 5-HT_{1A} and μ -receptors. *J Psychopharmacol*. 2013; Apr.

Thakur VD & Mengi SA. Neuropharmacological profile of *Eclipta Alba* (Linn.) Hassk. *J Ethnopharmacol*. 2005; 102:23–31.

Viana MB, Tomaz C & Graeff FG. The elevated T-Maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 49:549-54.

Winters BD, Saksida LM & Bussey TJ. Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32: 1055-70.

ANEXO B

**Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre**



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 051/2011

2) DATA DO PARECER: 10.10.2011

3) TÍTULO DO PROJETO:

Efeitos de implante de células-tronco sobre o desempenho de ratos em um modelo de doença de Alzheimer

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Prof. Dr. Alcyr de Oliveira

5) SUMÁRIO DO PROJETO:

Consta resumo no projeto

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Investigar os efeitos de implantes de células-tronco de cordão umbilical humano, no tecido adiposo e da medula óssea de ratos, em animais com lesões do NBM em um modelo de doença de Alzheimer.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral:

Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

Adequada Inadequada



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgésia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico

substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico

substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico

substituto:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Laboratório de Fisiologia da UFCSPA.

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
dez/2011 a jun/2012	Ratus wistar	Masculino	60

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

ANEXO C

Protocolo para a obtenção das células-tronco

Obtenção de CTs mesenquimais de dentes decíduos humanos

Foram utilizados, para obtenção das células pulpares, dentes anteriores esfoliados naturalmente de 10 crianças entre 5 a 7 anos de idade, inseridas no Programa de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para serem incluídos no estudo, os dentes deveriam apresentar 1/3 de raiz residual e ser provenientes de crianças com estado geral de saúde normal, após os pais assinarem o termo de Consentimento Informado, doando os dentes extraídos para a realização do experimento. O protocolo de Luisi foi usado para a coleta, isolamento e caracterização das CTs mesenquimais (CTMs) da polpa de dente decíduo humano (Luisi & Barbachan, 2007) e padronizados pelo grupo conforme Bernardi e colaboradores (Bernardi et al., 2011).

Cultura de CTMs obtidas de diferentes fontes:

Foram utilizadas CTMs, isoladas e cultivadas conforme procedimento padronizado e descrito a seguir:

Para a proliferação de células aderentes, as células foram suspensas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (catalogue no. D5523; Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/ estreptomicina (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

Para iniciar o cultivo, as células foram cultivadas em placas de garrafas de cultura e a cultura foi mantida em incubadora umidificada a 5% CO₂ e 37°C por 72h, quando as células não aderentes foram removidas por troca de meio. As trocas subsequentes foram realizadas a cada 3-4 dias.

Após a confluência, a cultura primária foi lavada uma vez com solução Hank's livre de Ca²⁺ Mg²⁺ (Sigma). Uma solução de 0,25% de tripsina em solução de Hank's (Sigma) foi utilizada e as células foram incubadas por 10 min a 37°C. As células foram ressuspensas em meio de cultura e

plaqueadas para novas garrafas de cultivo celular. Passagens subsequentes foram realizadas de forma semelhante. As passagens (subculturas) foram realizadas quando a cultura atingia uma confluência de, pelo menos, 90%.

Caracterização das CTMs:

A caracterização das CTMs foi realizada conforme protocolos padrões internacionais (Dominici et al., 2006) e constituiu-se em (1) avaliação morfológica e análise de adesão celular, (2) perfil imunofenotípico, avaliado por citometria de fluxo e (3) ensaios de diferenciação em adipócitos, condroblastos e osteoblastos. As CTMs foram isoladas e cultivadas conforme protocolo já padronizados no laboratório de Hematologia e Células-tronco da UFRGS.

Análise morfológica das culturas celulares:

A presença das células aderentes e a sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Olympus, durante as culturas de células-tronco.

Análise imunofenotípica das células cultivadas:

As CTMs foram caracterizadas imunofenotipicamente através da presença de marcadores de células mesenquimais e ausência de células hematopóéticas, através de citometria de fluxo, usando-se o equipamento FACSCalibur. As CTMs foram analisadas na quinta passagem da cultura celular, conforme segue:

Para as células humanas, os anticorpos utilizados foram os específicos para identificar os marcadores de CTMs: CD29, CD44 e CD90, bem como a confirmação da ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas: CD34, CD45 e HLA-DR. Para as células de camundongos, o anticorpousados foi o *anti-mouse*: Sca-1, CD44, CD45, CD49e CD49e. Todos os anticorpos foram marcados com fluorocromos FITC ou PE. Também foram utilizados controles isotípicos para FITC e PE. Todos os anticorpos eram da marca Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA.

A presença das moléculas foi avaliada utilizando-se 5 μ L de cada anticorpo monoclonal utilizado. O 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) foi utilizado para permitir a avaliação apenas de células vivas, por exclusão das células positivas para 7AAD.

Após a incubação das células com os anticorpos por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. O 7AAD foi utilizado a uma concentração final de 1 μ g/mL em PBS e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro.

A aquisição de dados foi realizada usando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), para 3 cores, equipado com laser de argônio para 488-nm e a análise foi feita através do *software* CELLQuest (BD Biosciences).

Diferenciação celular *in vitro*:

A diferenciação em tipos celulares necessária para confirmação da identidade da população obtida foi testada a partir da quinta passagem, através de ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, seguindo protocolos já padronizados e descritos a seguir.

Diferenciação adipogênica:

Para a diferenciação das células de camundongo, as células foram cultivadas por 3 a 4 semanas em meio contendo 10% de soro fetal bovino, dexametasona (10^{-8} M), e insulina (5 μ g/ml). Os adipócitos puderam ser discernidos por observação ao microscópio com contraste de fase e/ou por coloração com o corante Oil Red O.

Referências do Anexo C:

Bernardi L, Luisi SB, Fernandes RF, Valentim L, Bogo JCs, Fossati ACM, Pranke P. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod.* 2011; 37: 973-979.

Luisi SB, Barbachan JJ. Behavior of Human Dental Pulp Cells Exposed to Transforming Growth Factor-Beta1 and Acidic Fibroblast Growth Factor in Culture. *J Endod.* 2007; 33(7): 833-835.

ANEXO D

Normas de formatação do periódico “Avances en Psicología Latinoamericana”

Normas para autores

Los artículos sometidos a la revista deben seguir las normas del Manual de Estilo de Publicaciones de la American Psychological Association (quinta edición, 2001) en lo que respecta a su presentación formal. El autor principal debe dirigir una carta al director de la revista en la que se afirme que el artículo es original, que no está siendo sometido a otra revista y que todos los autores están de acuerdo en someterlo a la revista.

El comité editorial evalúa la pertinencia de los manuscritos remitidos y verifica el cumplimiento de los requisitos solicitados en la sección Instrucciones a los autores. Si este primer examen tiene un resultado positivo, a continuación se da inicio al proceso de revisión por pares, en el que son evaluados por dos especialistas en la materia. Este proceso de tipo doble ciego se realiza de forma anónima y la única persona que conoce las identidades tanto del autor como del revisor es el editor de la revista, quien se encarga de enviar la correspondencia.

Forma y presentación de manuscritos: instrucciones a los autores

- **Contenido.** Se aceptan trabajos originales empíricos, teóricos o de revisión en profundidad, que contribuyan al avance de la psicología como ciencia o como profesión. Los artículos enviados se someterán a evaluación “doble ciego” por dos árbitros.
- **Aspectos éticos.** Los artículos basados en investigaciones con seres humanos deben incluir una declaración en la sección de métodos en la que se certifique que los experimentos se hicieron con el conocimiento y el consentimiento escrito de cada uno de los sujetos participantes. Cuando se usen animales experimentales, se debe hacer referencia explícita en la sección de métodos al uso de medidas apropiadas para minimizar el dolor. En uno y otro caso, los autores deben seguir las normas éticas de la APA.

- **Idiomas.** Se publican artículos en español, portugués, inglés e italiano, con resumen y palabras clave (obtenidas del Thesaurus de la American Psychological Association) en español e inglés.
- **Forma.** Los autores deben enviar sus artículos siguiendo el estilo internacional en psicología (normas de la American Psychological Association, quinta edición, 2001). Los trabajos que no sigan estas normas de presentación serán devueltos a sus autores para ser revisados. En el texto debe citarse por autor y año. Así: Estes (2000), Gutiérrez (1999), Ruiz, Pellón y García (2006) y Wolfgang (1997). En la lista de referencias, al final del artículo, se deben citar todos los trabajos (artículos, libros, capítulos de libros, materiales tomados de Internet, presentaciones a congresos, etc.), en orden alfabético del primer autor. Por ejemplo:
 1. Estes, W. K. (2000). Basic methods of psychological science. En K. Pawlik & M. R. Rosenzweig (Eds.), *International handbook of psychology* (pp. 20-39). London: SAGE.
 2. Gutiérrez, G. (1999). Hormonas y reproducción en aves: la influencia de factores ambientales y sociales. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 31, 151-174.
 3. Ruiz, G., Pellón, R. y García, A. (2006). Análisis experimental de la conducta en España. *Avances en Psicología Latinoamericana*, 24, 71-103.
 4. Wolfgang, A. (1997). *Nonverbal behavior. Perspectives, application, intercultural insights*. Seattle, WA: Hogrefe y Huber.
- **Figuras y tablas.** Enviar cada una en página aparte. Las figuras deben estar listas para entrar en prensa, lo mismo que las fotografías, si las hubiere. Se recomienda el envío de los archivos originales de cada una de las figuras.
- **Lenguaje.** Usar un lenguaje “estándar”, que sea lo más general y sencillo posible. Evitar el uso de regionalismos o de anglicismos que tengan un claro equivalente en el idioma original (en castellano, por ejemplo: usar “prueba” en vez de “test”).

- **Abreviaturas.** Pueden utilizarse, siempre que la primera vez se presente la frase completa. Por ejemplo: Eysenck Personality Inventory (EPI); después en el texto se utilizará únicamente EPI.
- **Separatas.** El autor recibirá copia electrónica de su artículo en formato PDF, para su distribución únicamente con fines académicos.

Envío de manuscritos

El material debe enviarse en formato electrónico a través de la plataforma Open Journal System de la revista, disponible en la dirección electrónica: <http://revistas.urosario.edu.co/index.php/apl/index>

En el sistema debe crearse una cuenta de usuario con el perfil de autor, y hacerse el envío del artículo a someterse.

Lista de comprobación de preparación de envíos

Como parte del proceso de envío, se les requiere a los autores que indiquen que su envío cumpla con todos los siguientes elementos, y que acepten que envíos que no cumplan con estas indicaciones pueden ser devueltos al autor.

1. El envío no ha sido publicado previamente ni se ha enviado previamente a otra revista (o se ha proporcionado una explicación en Comentarios al / a la editor/a).
2. El fichero enviado está en formato Microsoft Word.
3. Se han añadido direcciones web para las referencias donde ha sido posible.
4. El texto cumple con las normas de estilo de la American Psychological Association - APA
5. Si esta enviando a una sección de la revista que se revisa por pares, tiene que asegurarse que se han tomado las medidas necesarias para asegurarse una revisión a ciegas

Declaración de privacidad

Los nombres y direcciones de correo-e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.

ANEXO E

Normas de formatação do periódico “JMED Research”

Author Guidelines

Manuscript Submission

Manuscript submission should be submitted to the link above “Submit a Manuscript.” Indicate the journal to which you want to submit the manuscript. Use a major word processing software such as Microsoft word, open office word,...etc. to write and submit your manuscript. PDF submission are also allowed.

Manuscript Title

Manuscript title should be clear and provide an overall idea of the research.

Author(s) information

The manuscript should include on the first page:

- Full author(s) names
- Complete affiliation names and addresses
- E-mail addresses for all authors
- Contact author (if available)

Author(s) information should not be available anywhere else in the paper. Do not include author information in the header/footer of the paper.

Abstract

Use the word “Abstract” as the title for the abstract section. The abstract should be no more than 250 words. It should capture research motivation, research design/methodology, and main findings and implications. The abstract should provide an excellent summary of the paper.

Keywords: 3-4 keywords that highlight the topic in the paper.

Introduction

This section should follow keywords. This section should provide background of the study and highlight research motivation.

The main body of the paper

Two categories of heading are defined: 'Heading' (Bold, Left, 12 pt) with 10 point space before paragraph for the first level headings and 'Subheading' (Italic, Left) for the subsidiary level.

The main body of the paper can include titles and subtitles followed by discussion to address: literature review, research question, research design and methodology, result, discussion, study limitations and conclusion.

Body text is set in 'Text' style (Justified). Paragraphs are separated by a separate line.

Figures and Tables

Include figures and tables within the body of your paper. DO NOT design your figures using Microsoft word in bits and pieces. This will cause the figure to be distorted during formatting and production. You have to use a drawing tool and import the figure to word.

Figures titles should be under the figure. Table title should be above the table.

Make sure you have permission of any previously published figure or table from publishers and/or authors. This is the sole responsibility of the author(s).

Acknowledgment

Include any acknowledgement right before the references section (if applicable).

Referencing published research within text

References to previously published research studies must in Harvard style. Author(s) should make every effort to ensure completeness, accuracy and consistency of each reference.

Examples:

- In a research study by ackoff (1961)
- Gibberd et al (1991) mentioned.....
- In the book by Dunlop and Williams (1989)

References

References section should be at the end of the manuscript. References to previously published research studies must in Harvard style. References should be arranged alphabetically without numbers. Keep one black line between each two references. Please follow the examples below.

Journal Articles

Last name, initials. (year) 'Article title with only first letter upper case,' *Journal name*, vol (issue no.), pages.

Example: Articles with one author

Goodwin, G. M. (2009) "Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: revised second edition-recommendations from the British association for psychopharmacology," *Journal of Psychopharmacology*, 23 (4) 346–388.

Example: Articles with two authors

Y. Q. Liang, Y. Q. and Tang, X. C. (2006) "Comparative studies of huperzine A, donepezil, and rivastigmine on brain acetylcholine, dopamine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine levels in freely-moving rats," *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (9) 1127–1136.

Example: Articles with more than two authors

Kountouras, J, Billing, B. H. and Scheuer, P. J. (1984) "Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat," *British Journal of Experimental Pathology*, 65 (3) 305–311.

Books

Paxinos, G. and Franklin, K. B. J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, Calif, USA.

Conference Paper

Zhou, M. Ciobanu, Pavon-Djavid, G., Gueguen, V., and Migonney, V. (2007) "Morphology and adhesion of human fibroblast cells cultured on bioactive polymer grafted ligament prosthesis," *Conference Proceedings of IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, (2007), 5115–5118.

Copyright Notice

Authors who publish in any IBIMA Publishing open access journal retain the copyright of their work under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, which allows the unrestricted use, distribution, and reproduction of an article in any medium, provided that the original work is properly cited. No permission is required from the authors or the publishers. While authors retain copyright of their work with first publication rights granted to IBIMA Publishing, authors are required to transfer copyrights associated with commercial use to this Publisher. Revenues produced from commercial sales and distribution of published articles are used to maintain reduced publication fees and charges.