

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

DANIEL MENDES FILHO

DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
RATOS WISTAR EM CÉLULAS *NEURON-LIKE* CATECOLAMINÉRGICAS

UBERABA

2017

DANIEL MENDES FILHO

DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
RATOS WISTAR EM CÉLULAS *NEURON-LIKE* CATECOLAMINÉRGICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área 1 (Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da
Silva

Coorientador: Dr. Lucas Felipe
Oliveira

UBERABA

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M491d Mendes Filho, Daniel
Diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais de ratos Wistar em células *neuron-like* catecolaminérgicas / Daniel Mendes Filho. -- 2017. 52 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Felipe Oliveira

1. Doença de Parkinson. 2. Doenças neurodegenerativas. 3. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. 4. Transplante de células-tronco mesenquimais. I. Silva, Valdo José Dias da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.858

DANIEL MENDES FILHO

DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
RATOS WISTAR EM CÉLULAS *NEURON-LIKE* CATECOLAMINÉRGICAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Ciências Fisiológicas, Área 1
(Bioquímica, Fisiologia e
Farmacologia) da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como
requisito parcial a obtenção do título
de Mestre em Ciências Fisiológicas.

_____ de _____ de _____

Banca Examinadora:

Prof.Dr. Valdo José Dias da Silva - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.Dr. Luciano Gonçalves
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^a.Dr^a. Celina Monteiro da Cruz Lotufo
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho à esperança de milhões de pessoas em obter alívio e/ou cura de seus males por meio da terapia com células-tronco; a todos os pesquisadores da área biomédica que, mesmo sem reconhecimento ou valorização, trabalham pelo progresso da ciência e da saúde; por fim dedico-o aos animais que tiveram as vidas ceifadas em nome da ciência, que seu sacrifício supremo não tenha sido em vão.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Alcenira de Fátima Mendes, à minha namorada Iolanda Silva Rafael e a todos meus amigos e familiares pelo apoio incondicional nesses anos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdo José Dias Silva pelas ideias.

Ao meu coorientador e colega biomédico Dr. Lucas Felipe Oliveira por toda ajuda concedida sem reservas, por sua amizade e exemplo de competência e trabalho ético.

À Dr^a Caroline Capitelli Santos pelas técnicas ensinadas.

Aos professores Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues e Dr^a Roseli Aparecida da Silva Gomes pela prestatividade e disposição em ajudar no que fosse preciso.

Ao Msc. Eduardo Henrique Tavares pelo acompanhamento atencioso nos primeiros experimentos de imunoistoquímica e imunofluorescência.

Aos colegas biomédicos: Msc. Patrícia de Carvalho Ribeiro, Msc. Thaís Soares Farnesi de Assunção, Msc. Diógenes Rodrigo Maronezzi de Paula, Dr^a Vanessa Capuano e Dr^a Angélica Cristina Alves da Cruz pela ajuda durante os experimentos.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP) do Instituto Sabin, à Simone Souza Lima e ao Dr. Henrique Borges Kappel, pela parceria para as dosagens de catecolaminas nas amostras de sobrenadantes de cultura celular.

Ao técnico laboratorial do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Alberto José de Borba pela ajuda valiosa no experimento de citoquímica.

Ao Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira pela amizade, pelo interesse em contribuir para meu trabalho e para melhorar/divulgar a Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFTM.

À bibliotecária e também secretária da Pós- Graduação em Ciências Fisiológicas, Elisabete Perez Caramori Ambrósio, pelos conselhos, paciência e por sua alegria contagiante sem a qual o mestrado em Ciências Fisiológicas teria sido mais sofrido ainda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

“Se não fosse por força da lei da transformação e se as coisas não se transformassem continuamente, a vida não só seria vazia de eventos, mas também não haveria vida alguma e, além do mais, nenhum interesse em viver.”

Harvey Spencer Lewis

RESUMO

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco adultas encontradas em diferentes tecidos e capazes de secretar moléculas bioativas, migrar para locais de injúria tecidual e se diferenciar em células de diversas linhagens. Tais características embasaram anos de pesquisa empregando MSCs em modelos experimentais de doença de Parkinson, uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal (entre a substância negra, parte compacta e o corpo estriado). Inúmeros trabalhos demonstraram o efeito neuroregenerador das MSCs sobre essas vias dopaminérgicas perdidas, levando à melhoria nos sintomas. Apesar de todo esse potencial terapêutico, há de se encontrar meios de tornar essas células mais eficientes para um tratamento curativo da doença. Nesse intuito, um passo importante é buscar um protocolo para aumentar a eficiência terapêutica de MSCs de rato por meio de diferenciação prévia, uma vez que esse animal é um dos principais modelos de experimentação e estudo da doença de Parkinson. Por isso, o presente trabalho testou um protocolo de diferenciação prévia de MSCs em células *neuron-like* dopaminérgicas usando CoCl_2 – que ativa o fator transcricional induzido por hipóxia -1 (HIF-1) - e Y-27632, o qual inibe a enzima Rho quinase (ROCK). Para tanto, foram utilizadas células-tronco mesenquimais de medula óssea (bmMSCs) de ratos Wistar cultivadas até entre a quarta passagem e a sétima passagem. As bmMSCs foram separadas em três grupos: G1, no qual elas foram mantidas em meio de cultura; G2, onde elas foram tratadas com CoCl_2 por 72 horas; e G3, no qual as bmMSCs foram incubadas com CoCl_2 e Y-27632 pelo mesmo tempo. Ao longo de três dias (72 horas) as células foram analisadas à microscopia de contraste de fase. Em seguida, as células foram submetidas à marcação por imunofluorescência para a enzima tirosina hidroxilase (TH) e para a proteína 2 associada à microtúbulo (MAP-2). Algumas células foram separadas para ensaio com ácido glioxílico a fim de detectar catecolamina intracitoplasmática. Na análise microscópica depois de 72 horas, as células do G1 se apresentaram inalteradas, G2 apresentaram aspecto de neuroblastos e as do G3 características *neuron-like*, com várias ramificações partindo do corpo celular. Na imunofluorescência, as células do G1 não apresentaram marcação, G2 expressou positividade para MAP-2 e G3 para TH e MAP-2. O ensaio com ácido glioxílico revelou que as células do G3 possuíam catecolamina em seu citoplasma. Os resultados indicam que bmMSCs de ratos também são suscetíveis a diferenciação *in vitro* em células *neuron-like* catecolaminérgicas após tratadas com CoCl_2 e Y-27632. Portanto, considerando esses resultados juntamente com o que é descrito pela

literatura é provável que a catecolamina presente no citoplasma das células *neuron – like* diferenciadas seja a dopamina.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Diferenciação neuronal. Doença de Parkinson. Terapia celular. Doenças neurodegenerativas.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells found in different tissues and capable of secreting bioactive molecules, migrate to sites of tissue injury and differentiate into cells of different lineages. These characteristics supported years of research using MSCs in experimental models of Parkinson's disease, a neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons from the nigro striatal pathway (between the substantia nigra pars compacta and in the striatum). Numerous studies have demonstrated the neuroregenerating effect of MSCs on these lost dopaminergic pathways, leading to improvement in symptoms. Despite all this therapeutic potential, is necessary to find ways of making these cells more efficient for a curative treatment of the disease. To this end, an important step is to seek a protocol to increase the therapeutic efficiency of rat's MSCs by prior differentiation, since this animal is one of the best models of experimentation and study of Parkinson's disease. Therefore, the present work tested a protocol of prior differentiation of MSCs in dopaminergic neuron-like cells using CoCl_2 – which activates the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) - and Y-27632, which inhibits the Rho kinase (ROCK) enzyme. For this purpose, we used bone marrow mesenchymal stem cells (bmMSCs) obtained from Wistar rats between the fourth and seventh passage. The bmMSCs were separated into three groups: G1, in which they were maintained in culture medium; G2, where they were treated with CoCl_2 for 72 hours; and G3, in which the MSCs were incubated with CoCl_2 and Y-27632 for 72 hours as well. Over the course of three days (72 hours) the cells were analyzed by light field microscopy. Then, these cells were labeled with immunocytofluorescence for the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) and microtubule-associated protein 2 (MAP-2). Some cells were separated for assay with glyoxylic acid in order to detect intracytoplasmic catecholamines. On the microscopic analyses after 72 hours, the G1 cells were unchanged; G2 presented neuroblast appearance and the G3 neuron-like characteristics, with several branches from the cell body. In immunocytofluorescence, G1 cells showed no labeling, G2 expressed positivity for MAP-2 and G3 for TH and MAP-2. The glyoxylic acid assay revealed that G3 cells had catecholamines in their cytoplasm. The results indicate that rat bmMSCs are also susceptible to *in vitro* differentiation in neuron-like cells after treated with CoCl_2 and Y-27632. In addition, considering these results together with what is described in the literature it is likely that the catecholamine present in the cytoplasm of neuron - like cells is dopamine.

Key words: Mesenchymal stem cells. Neuronal differentiation. Parkinson's disease. Cell therapy. Neurodegenerative diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição dos grupos por poço para imunofluorescência.....	22
Figura 2 -	Fotomicrografias de bmMSCs, osteoblastos e adipócitos	25
Figura 3 -	Fotomicrografias de microscopia de contraste de fase do processo de das células de G1,G2 e G3 ao longo das 72h de incubação de G2 e G3.....	27
Figura 4 -	Fotomicrografia de microscopia de contraste de fase do G2.....	28
Figura 5 -	Fotomicrografias de microscopia de contraste de fase do G3.....	29
Figura 6 -	Fotomicrografias de imunofluorescência de bmMSCs do rato R13 não submetidas a tratamento (grupo G1).....	30
Figura 7 -	Fotomicrografias de imunofluorescência de bmMSCs dos ratos R14 e R15 submetidas a tratamento com CoCl ₂ (grupo G2).....	31
Figura 8 -	Fotomicrografias de imunofluorescência de bmMSCs dos ratos R14 e R15 (grupo G2).....	32
Figura 9 -	Fotomicrografias de imunofluorescência de células <i>neuron-like</i> (grupo G3) dos ratos R14 e R15.....	33
Figura 10-	Fotomicrografia de imunofluorescência de células <i>neuron-like</i> (grupo G3) do rato R3.....	34
Figura 11-	Fotomicrografias de marcação por DAPI e GA de G1 e G2.....	36
Figura 12-	Fotomicrografias da marcação citoquímica por GA de células <i>neuron-like</i> (grupo G3) dos ratos R13 e R16.....	37
Gráfico 1-	Porcentagens médias de marcação dupla (DAPI e MAP-2).....	35
Gráfico 2-	Porcentagens médias de marcação tripla (DAPI, MAP-2 e TH).....	35
Gráfico 3-	Porcentagens médias de células marcadas com GA.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Abs** - (*Antibodys*) Anticorpos
- bmMSCs**- (*Bone marrow mesenchymal stem cells*) Células- tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
- DAPI** - (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) Marcador de núcleos celulares
- DMEM** - (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) Meio Dulbeco modificado por Eagle
- DP** - Doença de Parkinson
- GA** - (*Glyoxylic acid*) Ácido glioxílico
- G1** - Grupo 1 (controle, bmMSCs sem tratamento prévio)
- G2** - Grupo 2 (bmMSCs tratadas por 72h com CoCl₂)
- G3** - Grupo 3 (bmMSCs tratadas por 72h com CoCl₂ e Y-27632)
- HIF-1** - (*Hypoxia-inducible factor-1*) Fator de transcrição induzido por hipóxia-1
- iPSCs** - (*Induced pluripotent stem cells*) Células-tronco pluripotentes induzidas
- NF-L** - (*Neurofilament-light*) Neurofilamento leve
- MSC** (*Mesenchymal stem cell*) Células-tronco mesenquimais
- MAP-2** - (*Microtubule-Associated-Protein 2*) Proteína 2 associada a microtúbulo
- NeuN** - (*Neuron-specific nuclear protein*) Proteína nuclear específica de neurônio
- PBS** - (*Phosphate buffered saline*) Tampão fosfato-salino
- ROCK** - (*Rho kinase*) Rho quinase
- SC** - (*Stem cells*) Células-tronco
- TH** - Tirosina Hidroxilase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 METODOLOGIA	18
2.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA (bmMSCs).....	18
2.2 PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR OSTEOGÊNICA E ADIPOGÊNICA.....	19
2.2.1 Protocolo de diferenciação osteogênica.....	20
2.2.2 Protocolo de diferenciação adipogênica.....	20
2.3 DIFERENCIAÇÃO DAS bmMSCs EM CÉLULAS <i>NEURON-LIKE</i>	21
2.4 MARCAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	21
2.5 DETECÇÃO DE CATECOLAMINA NEURONAL POR ENSAIO COM ÁCIDO GLIOXÍLICO (GA).....	23
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	23
3 RESULTADOS	25
3.1 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E ADIPOGÊNICA.....	25
3.2 DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS <i>NEURON-LIKE</i>	26
3.3 MARCAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	30
3.4 DETECÇÃO DE CATECOLAMINA NEURONAL POR ENSAIO COM ÁCIDO GLIOXÍLICO (GA).....	36
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco (“stem cells” - SC) são células indiferenciadas com potencial de auto-renovação, baixa imunogenicidade e a capacidade de se converterem em células de variados tecidos, o que se deve ao papel fisiológico das SC: reparação tecidual e substituição de células perdidas (KOBOLAK et al, 2016). As SC são classificadas conforme seu potencial de diferenciação e capacidade proliferativa em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (BEHR et al, 2010).

As SC totipotentes são capazes de gerar um organismo completo incluindo os anexos embrionários – um exemplo de célula totipotente é o zigoto. SC pluripotentes, como as embrionárias (DOSS et al, 2004) e as iPSCs (células-tronco pluripotentes induzidas) (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006), são diferenciáveis em todos os tipos de tecido pertencente aos três folhetos embrionários. Já SC multipotentes, tem capacidade diferenciativa mais limitada e originam *in vivo* células-filhas apenas do tecido a que pertencem (ou seja, apenas de determinada linhagem). Existem vários tipos de SC multipotentes, como células-tronco hematopoéticas, cardíacas, neurais e as células-tronco mesenquimais ou estromais (BEHR et al, 2010; CAPLAN, 1991; VERFALLIE, 2002). Essas diversas SC trazem consigo crescentes expectativas de aplicações na pesquisa e na clínica. Tais expectativas envolvem principalmente possíveis aplicações clínicas (terapia celular) dentro da medicina regenerativa (NEREM, 2007).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são um subgrupo de células-tronco multipotentes originadas do mesoderma (WEI et al, 2013). Essas células fibroblastóides (MAJUNDAR et al, 1998) foram identificadas e descritas primeiramente por Friedenstein e colaboradores (1966). Anos mais tarde, Caplan (1991) analisou com mais profundidade sua fisiologia e seu nicho no organismo e cunhou o termo MSC. As MSCs são caracterizadas por expressarem em sua superfície CD73, CD90 e CD105, ao passo que são negativas para CD11b, CD14, CD19, CD79a, CD45, CD31, CD34 e HLA-DR (DOMINICI et al, 2006; PAUL e ANISIMOV, 2013). Variados tecidos podem ser fonte de MSCs (DA SILVA MEIRELLES et al, 2006; TUAN et al, 2003), dentre eles: sangue do cordão umbilical (ROMANOV et al, 2003), tecido adiposo (ZUK et al, 2002), placenta (FUKUSHI et al, 2004) e sangue periférico (NILSSON et al, 2001). Porém, a fonte primária e mais utilizada de MSCs é a medula óssea (FRIEDENSTEIN et al, 1970; HASS et al., 2011; OWEN, 1988).

Semelhantemente à diversidade de suas fontes, o poder de diferenciação das MSCs demonstrou abranger variados tipos celulares e tecidos, dentre os quais adipócitos, osteoblastos, condrócitos, mioblastos e células *neuron-like* (HORWITZ *et al*, 2002; KAWADA *et al*, 2004; LIECHTY *et al*, 2000; WEI *et al*, 2013).

Por outro lado, devido à limitação de se usar as SC embrionárias e as iPSCs – graças a dilemas bioéticos, no caso das embrionárias, e ao risco de formação de teratomas em ambos os tipos (BAHAT-STROOMZA *et al*, 2009; KIM *et al*, 2009) – é crescente o interesse nas MSCs. Sendo assim, a cada ano aumenta o número de ensaios clínicos e trabalhos científicos visando a um melhor entendimento da fisiologia das MSCs, seu papel no organismo e suas possíveis aplicações terapêuticas em diversas condições patológicas, tais como doenças cardiovasculares, autoimunes, musculoesqueléticas e neurodegenerativas (KAJIYAMA *et al*, 2010; KIM, M. *et al* 2006; KOBOLAK *et al*, 2016; NURI e HAFEEZ, 2011; WANG, S *et al*, 2012).

De todas as desordens neurológicas, uma das que se destaca entre as passíveis de tratamento e cura via terapia celular é a doença de Parkinson (DP) (LEVY *et al*, 2008; OH *et al*, 2016). A DP é uma doença neurodegenerativa causada por uma perda progressiva e extensiva dos neurônios dopaminérgicos do tegmento mesopontino, especialmente da via nigro-estriatal (entre a substância negra parte compacta e o corpo estriado). Isso gera distúrbios motores como instabilidade postural, bradicinesia e tremor de repouso (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; HORNYKIEWICZ, 1973). Os tratamentos empregados atualmente para DP se baseiam principalmente no alívio desses sintomas - não sendo tais tratamentos capazes de frear a progressão da doença ou atuarem eficazmente sobre os sintomas não motores, como a depressão e a perda do controle urinário e intestinal (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; OH *et al*, 2016). Além disso, esses tratamentos apresentam efeitos colaterais importantes, como discinesia e comportamentos impulsivo-compulsivos (KURAMOTO *et al*, 2013; NÓBREGA *et al*, 2014; YAMADA *et al*, 2007).

Por isso, novas terapias para DP estão em estudo/desenvolvimento. Entre elas tem-se: uso de antiinflamatórios, antioxidantes e fatores neurotróficos (ANUSHA *et al*, 2017; HEGARTY *et al*, 2017; MASAKI *et al*, 2017; PATEL *et al*, 2013). Contudo, a mais promissora é a terapia celular - a qual tem potencial para remissão sintomática e neuroregeneração das vias dopaminérgicas (GLAVASKI-JOKSIMOVIC e BOHN, 2013; PETIT *et al*, 2014; TAKAHASHI *et al*, 2017).

Nesse sentido, as células-tronco mesenquimais (MSCs) se destacam tanto pela sua multipotencialidade – capaz de promover neuroregeneração - quanto pelas propriedades imunomodulatórias de seu secretoma (KERKIS et al., 2015; PAUL e ANISIMOV, 2013). Apesar da existência de controvérsias, vários trabalhos descrevem a capacidade das MSCs de se diferenciarem em células específicas de determinado tecido, incluindo neurônios e células da glia (HERMAN et al., 2006). Além disso, dentro de sua multipotencialidade, as MSC diferenciadas seriam capazes de se conectar com os neurônios circunjacentes criando novas sinapses (GLAVASKI-JOKSIMOVIC e BOHN, 2013).

Esse potencial de diferenciação em múltiplas linhagens aliado a outras características benéficas das MSCs, tem permitido sua aplicação em diversos modelos experimentais de doenças neurodegenerativas ou cerebrovasculares. Como exemplos pode-se citar: Doença de Alzheimer (CUI et al, 2017; WEN et al, 2011), Coreia de Huntington (DEY et al, 2010; FINK et al, 2015) e acidentes vasculares cerebrais (HU, B et al, 2016; YE, X et al., 2016).

Fora seu potencial de diferenciação, o secretoma produzido pelas MSCs é outra característica com alcance terapêutico notável (BARRY e MURPHY, 2004). Esse secretoma é um conjunto de fatores parácrinos formado por um amplo repertório de moléculas imunomodulatórias - dentre as quais interleucina-6 (IL-6), fator beta de transformação de crescimento (TGF β) e prostaglandina E2 (PGE2) - e fatores tróficos, dentre os quais neurogênicos (como o fator neurotrófico derivado de célula glial, GDNF), angiogênicos (como o fator de crescimento vascular endotelial, VEGF), neuroprotetores (como o fator neurotrófico derivado de cérebro, BDNF) e sinaptogênicos (como o fator de crescimento neural, NGF) (CAPLAN e CORREA, 2011; CHEN e CHOPP, 2006; LATTANZI et al., 2011; MEZEY et al., 2010; SINGLER e CAPLAN, 2011). As moléculas imunomodulatórias do secretoma regulam a intensidade da resposta imune ao inibir a proliferação de linfócitos T citotóxicos e estimular a proliferação de linfócitos T reguladores (DI NICOLA et al., 2002) – o que limita processos inflamatórios. Os fatores tróficos do secretoma, por sua vez, têm efeito antiapoptótico, estimulam a síntese de proteínas da matriz extracelular, reduzem o estresse oxidativo e desencadeiam mecanismos intrínsecos de regeneração tecidual (AIZMAN et al., 2009; GLAVASKI-JOKSIMOVIC e BOHN, 2013; LU et al., 2011; PAUL e ANISIMOV, 2013; WANG, F et al., 2010). Sendo assim, o secretoma das MSCs tem potencial para limitar o processo neuroinflamatório, reverter os danos

causados por ele na DP e proteger os neurônios saudáveis restantes (DÍEZ-TEJEDOR et al, 2014; JEON et al., 2014; PAUL e ANISIMOV, 2013).

Uma vez isoladas de sua fonte e cultivadas, as MSCs podem ser mantidas em estado indiferenciado ou serem previamente diferenciadas antes de administradas a um modelo animal de DP (YE et al, 2007). Apesar de em ambos os casos as MSCs promoverem melhora (FU et al, 2006), as previamente diferenciadas demonstram efeito terapêutico mais pronunciado, levando a neuroregeneração e a alívio dos distúrbios motores mais intensos (ALIAGHAEI et al, 2016; GLAVASKI-JOKSIMOVIC e BOHN, 2013; KIM et al, 2008; LOCATELLI et al, 2009).

Sejam indiferenciadas, sejam pré-diferenciadas, as MSCs têm outra característica – além da multipotencialidade e do secretoma - que complementa seu poder terapêutico: sua capacidade migratória que alguns autores chamam de “homing” (KANG et al., 2012; KARP e LENG-TEO, 2009). “Homing” é a capacidade das MSCs de migrarem para locais de injúria tecidual graças à atração gerada por fatores liberados durante a lesão tecidual ou apoptose (CHUDICKOVA et al, 2017; DENG et al., 2011; JI et al., 2004; KANG et al., 2012; ROSOVA et al, 2008). Essa capacidade migratória, portanto, permite o transplante de MSCs nos modelos animais de DP por diversas vias, dentre elas intracerebral, endovenosa e intranasal (BLANDINI et al., 2010; DANIELYAN et al., 2011; PAVON-FUENTES et al., 2004; WANG, F et al., 2010).

Tendo em conta que a diferenciação prévia das MSCs incrementa o “homing”, bem como seu poder neuroregenerador (GLAVASKI-JOKSIMOVIC e BOHN, 2013; LEVY et al, 2008) e a importância experimental do modelo parkinsoniano de rato (BJORKLUND e LINDVALL, 2000; TIEU, 2011), o presente trabalho se propôs a diferenciar *in vitro* MSCs isoladas da medula óssea de ratos Wistar (bmMSCs) em células *neuron-like* produtoras de catecolamina por meio de um protocolo de diferenciação usando CoCl_2 , o qual ativa o fator de transcrição induzido por hipóxia-1 (HIF-1), e Y-27632, que inibe a enzima Rho quinase (ROCK) importante inibidora da diferenciação neuronal (PACARY et al, 2006). Essa investigação foi realizada por meio de análise morfológica em microscopia de contraste de fase, de imunofluorescência e de citoquímica. Tais células *neuron-like* descendentes das bmMSCs são aplicáveis em uma terapia celular experimental em modelos de ratos parkinsonianos como os apresentados por Capitelli et al (2014) , Aliaghaei et al (2016) e Kumar et al (2016).

2 METODOLOGIA

A metodologia empregada se baseou em três pontos principais, sendo eles: o isolamento de MSCs a partir da medula óssea de ratos e diferenciação dessas células; marcações imunofluorescentes para a proteína 2 associada a microtúbulo (MAP-2) e para a enzima tirosina hidroxilase (TH); ensaio com ácido glioxílico (GA) para detecção de catecolamina intracitoplasmática.

2.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA (bmMSCs)

Todos os procedimentos experimentais empregados neste trabalho estão de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publicado pelo the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996). Os protocolos experimentais de manuseio dos animais e coleta dos ossos longos para extração de medula foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFTM), protocolo número 366 (Anexo-A). As bmMSCs foram obtidas a partir de 16 ratos Wistar (4 machos e 12 fêmeas, nomeados de R1 a R16) fornecidos pelo biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). A seleção do sexo dos animais se deu conforme a disponibilidade de cada gênero, como havia uma quantidade maior de fêmeas elas foram usadas em maior número. Os animais foram mantidos em condições controladas e estáveis em biotério (temperatura de aproximadamente 22° C, umidade de 40-70% e ciclo claro-escuro de 12/12horas) com livre acesso à água e ração.

Para extração dos ossos, esses animais foram eutanasiados por meio de uma dose supra-anestésica de tiopental sódico (100 mg/kg i.p.) que provoca uma parada respiratória nos animais. Confirmada a eutanásia, houve extração de fêmur e tíbia; eluição da medula óssea e processamento celular. Os ossos retirados dos animais foram embebidos em PBS-EDTA (pH = 7,2) e resfriados até seu posterior processamento. Utilizando-se uma capela de fluxo laminar tipo 2-A, removeram-se as epífises ósseas, sendo as metáfises colocadas dentro de um tubo hematológico plástico apresentando um orifício na extremidade inferior, introduziram-se este conjunto em um tubo falcon de 15mL, e centrifugou-se por 5 minutos a 400 g. A medula óssea obtida foi então ressuspendida em PBS-EDTA (pH = 7,2) e filtrada em filtros plásticos de 70 µm

(Milipore[®]). O filtrado foi colocado sobre uma camada de Ficoll (Ficoll-Paque Plus, Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) e submetido a 40 minutos de centrifugação a 400 G, de modo a obter-se uma fração isolada de células mononucleares de medula óssea, a qual foi submetida a lavagens com PBS-EDTA seguidas de centrifugação a 200 G por 10 minutos, ressuspensa em Meio de Dulbecco Modificado (DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium com baixa concentração de glicose - SIGMA cat. n° D5523) acrescido de 10% em volume de soro bovino fetal (FBS –Gibco-BRL cat. n° 12657) e 1% em volume de penicilina/estreptomicina (Gibco-BRL cat. n° 15140-122), e plaqueadas em frascos de cultura de 75 cm² na densidade aproximada de 400.000 células/cm². Os frascos de cultura foram então colocados em uma estufa a 37°C contendo 5% de CO₂.

Cerca de 72 horas após o plaqueamento, foi realizado a troca do meio de cultura, desprezando-se as células que não aderiram à superfície plástica das garrafas de cultura. As células aderentes foram submetidas ao replaqueamento, que consistiu de remoção do meio de cultura, lavagem da superfície celular do frasco 2 vezes com PBS-EDTA (pH = 7.2), aplicação de tripsina 0,25% em EDTA 1mM (Gibco-BRL cat. n° 25200), na proporção de 0,02mL/cm², por 3 minutos, neutralização com 3 vezes o volume de tripsina-EDTA com meio de cultura (DMEM acrescido de 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina). A seguir, as células obtidas foram centrifugadas a 200 G por 10 minutos; ressuspensas em meio de cultura e novamente centrifugadas a 200 G por 10 minutos. Por fim, as células foram novamente replaqueadas na densidade aproximada de 20.000 células/cm², e os frascos de cultura foram colocados na estufa.

As células obtidas a partir do isolamento e plaqueadas foram consideradas P0, e a cada replaqueamento as células avançavam uma passagem, prosseguindo para P1, depois para P2 e assim sucessivamente. Todos os procedimentos realizados neste trabalho utilizaram MSCs entre a 4^a e a 7^a passagens.

2.2 PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR OSTEOGÊNICA E ADIPOGÊNICA

As MSCs em cultura foram estimuladas, mediante protocolo específico, a se diferenciar em osteoblastos e adipócitos – no intuito de se confirmar a pureza das

células-tronco mesenquimais utilizadas. O protocolo de diferenciação celular baseou-se em Neuhuber et al (2008).

2.2.1 Protocolo de diferenciação osteogênica

Para a indução de diferenciação osteogênica, as MSCs em P6 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 6 poços numa densidade de 3000 células/cm². Dois dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênico, constituído por DMEM acrescido de 15% em volume de FBS, 1% em volume de penicilina/estreptomicina, 100 nM dexametasona, 50 µM ascorbato-2-fosfato e 10 mM de glicerol-fosfato. O meio de indução osteogênica foi substituído a cada 3-4 dias e, no 18º dia, foi feita a análise da diferenciação.

A análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de indução osteogênica, fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído 4% (20 min), aplicação do corante Alizarin-Red (Solução de 2% p/v), o qual cora matriz óssea em vermelho, por 5-10 minutos e análise ao microscópio.

2.2.2 Protocolo de diferenciação adipogênica

Para a indução de diferenciação adipogênica, as MSCs em P6 foram plaqueadas em placas de cultura contendo 6 poços numa densidade de 20 000 células/cm², e cultivadas até próximo da confluência de 100%, quando o meio de cultura foi substituído por meio de indução adipogênica, constituído por DMEM acrescido de 15% em volume de FBS, 1% em volume de penicilina/estreptomicina, 1 µM dexametasona, 0,5 mM isobutil-metil-xantina, 10 µg/mL insulina e 100 µM indometacina. Após 3 dias, o meio de indução adipogênica foi substituído por meio de manutenção adipogênica, constituído por DMEM acrescido de 15% em volume de FBS, 1% em volume de penicilina/estreptomicina e 10 µg/mL insulina. Após 24 horas, o meio de manutenção adipogênica foi novamente substituído por meio de indução adipogênica por 3 dias, quando foi substituído por meio de manutenção adipogênica por novas 24 horas. Completando-se 3 ciclos de troca de meios de indução e manutenção, as células permaneceram por 5 dias com o meio de manutenção, quando foi realizada a análise da diferenciação.

A análise da diferenciação consistiu de remoção do meio de manutenção adipogênica, fixação das células na placa através da utilização de paraformaldeído 4% (60 min), aplicação do corante Oil-Red (Solução 0,5% p/v), o qual cora lipídios em vermelho, por 5-10 minutos e análise microscópica.

2.3 DIFERENCIAÇÃO DAS bmMSCs EM CÉLULAS *NEURON-LIKE*

Após serem isoladas como descrito, as bmMSCs foram suspendidas em meio de Dulbecco Modificado (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 1% penicilina e streptomina, e então, plaqueadas em 3 garrafas de cultura celular distintas numa densidade de 4×10^5 células/cm².

Para a diferenciação *in vitro* foi seguido o protocolo apresentado por Pacary et al. (2006). A uma das garrafas foi adicionado, na fase subconflente, 100 µM de CoCl₂ (Sigma[®]) diluído em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – sendo esse grupo de células denominado G2; em outra garrafa foi acrescentado 100 µM de CoCl₂ e 30 µM de Y-27632 (Sigma[®]) ambos diluídos em DMEM – esse grupo foi denominado G3. Por fim, em uma das garrafas as células foram mantidas indiferenciadas havendo apenas a troca do meio – grupo G1 conforme a tabela 1.

Tabela 1- Divisão das MSCs por grupos de tratamento

Grupos	Tratamento das bmMSCs
G1	Ausente
G2	CoCl ₂
G3	CoCl ₂ + Y-27632

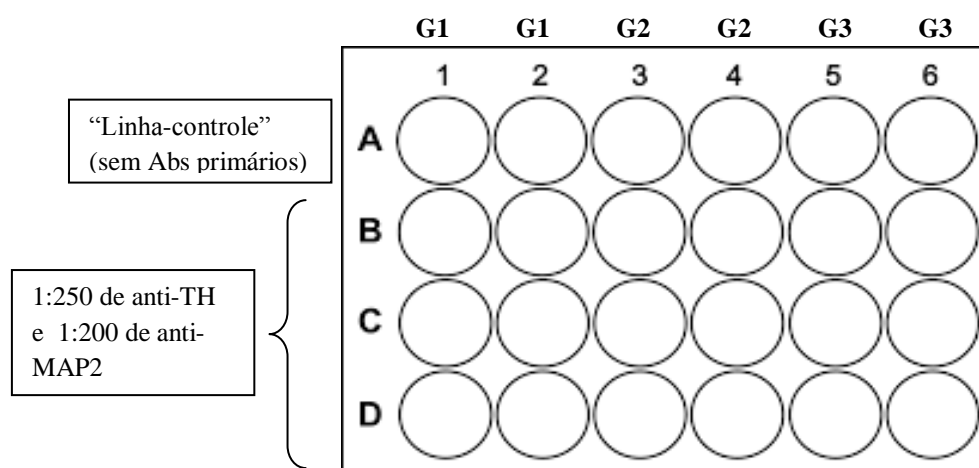
Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Após três dias (72h), as células aderidas foram despregadas por meio de tripsina 0,25%, suspendidas em PBS-EDTA 1 mM e então plaqueadas em uma placa de 24 poços.

2.4 MARCAÇÕES POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As bmMSCs , pós diferenciadas ou não conforme descrito acima, foram depositadas em uma placa de 24 poços na concentração de cerca de 5×10^4 células por poço (ou $2,5 \times 10^4$ células por cm^2). Após 24 h, elas foram lavadas delicadamente com tampão fosfato salino (PBS) por duas vezes, elas foram fixadas com 1 ml por poço de solução fixadora (PLP + paraformaldeído 1%) por 60 min e novamente procederam-se outras lavagens. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBS-0,1% Tween 20 por 5 min, lavadas e tratadas por 30 min com a solução de bloqueio - soro de cabra baixo (a 5%) contendo 5% de PBS - 0,1% Tween 20. Posteriormente ao bloqueio, iniciaram-se os procedimentos de tripla marcação: as células foram incubadas overnight em câmara úmida a 4°C , sendo que cada um dos poços das “linhas-teste” recebeu 100 μl dos anticorpos (Abs) primários anti-tirosina hidroxilase (anti-TH) (monoclonal antibody mouse anti rat, Milipore[®]) 1:250 e anti MAP-2 (policlonal antibody rabbit anti rat, Milipore[®]) 1:200, ao passo que os poços da “linha-controle” foram incubados overnight com 100 μl por poço da solução de bloqueio (conforme figura 1).

Figura 1 - Distribuição dos grupos por poço para imunofluorescência



Fonte: Do autor, 2017.

No dia seguinte, após lavagens em PBS, as células foram incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes goat anti-mouse 568 (revela a marcação de TH) (1:100) e goat anti-rabbit 488 (revela a de MAP-2) (1:100) (ambos da Milipore[®]) por 90 min ao abrigo da luz. A seguir, as bmMSCs foram lavadas e incubadas com 4,6 – diamidino – 2- fenilindol, (DAPI) (Sigma[®]) por 10 min. Após o DAPI, elas foram lavadas novamente com PBS e a placa envolta em plástico negro (para proteção contra a

luz) foi guardada em geladeira até a visualização em microscópio de epifluorescência (modelo Axio Observer Z1, Carl Zeiss[®]) e captura das imagens (câmera AxioCam HRC Carl Zeiss MicroImaging GmbH[®]) com aumento na lente objetiva de 10 X .

Após a captura, essas imagens foram analisadas por meio do software Image J[®], sendo que o número de células positivamente marcadas foi baseado na contagem de células DAPI, MAP-2 e TH positivas em 5 campos visuais aleatórios de cada um dos 24 poços na placa de cultura. Como o DAPI é um marcador nuclear, sua contagem indicou o número total de células em cada campo.

2.5 DETECÇÃO DE CATECOLAMINA NEURONAL POR ENSAIO COM ÁCIDO GLIOXÍLICO (GA)

A marcação citoquímica com GA foi empregada para detectar catecolaminas no citoplasma das células. A técnica se baseou no método da sacarose-ácido glioxílico (KÖNIG, 1979; TORRE e SURGEON, 1976). Inicialmente foi feita uma solução de GA 1%. Para tanto, foram dissolvidos 10,2 g de sacarose, 4,8 g de KH_2PO_4 e 1,5 g de ácido glioxílico em 100 ml de água destilada usando agitador magnético. Em seguida, essa solução foi titulada até o pH de 7,4 usando NaOH 1 N (ou 2 M) e o volume completado para 150 ml.

Para o ensaio foi usada placa de 24 poços contendo células na sétima passagem (P7) dos ratos R13, R14, R15 e R16 (pré-diferenciadas ou não, conforme descrito acima). A distribuição das células na placa foi a mesma da imunofluorescência (figura 1). Removido o meio de cultura desses poços, as células foram lavadas duas vezes delicadamente com PBS. Terminada a lavagem, elas foram incubadas por 30 segundos com 1 ml por poço da solução de GA 1%. Após, a solução foi retirada e as células foram expostas ao ar seco frio de um secador de cabelo por 10 minutos. Depois a placa foi levada a uma estufa e mantida a 80 °C por 15 minutos. Terminado esse tempo, as células foram incubadas com DAPI (100 μL /poço) por 10 min, após os quais se procedeu duas lavagens com PBS (5 min cada). As células foram visualizadas a microscopia de fluorescência.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas por meio do software SigmaStat 4.0. Todos os parâmetros numéricos foram expressos como média +/- erro padrão médio e comparados entre si empregando-se teste t-Student ou teste Mann-Whitney para os grupos G2 e G3, quando apropriado. O valor de probabilidade menor que 0,05 foi usado para expressar significância nas comparações.

4 DISCUSSÃO

Na microscopia de contraste de fase, observamos que as bmMSCs de rato submetidas a tratamento com CoCl_2 (grupo G2) ou CoCl_2 e Y-27632 (grupo G3) apresentaram mudanças morfológicas. As células do G2 apresentaram bipolaridade com estruturas semelhantes às já descritas em bmMSCs de camundongos (PACARY *et al*, 2007; TROPEL *et al*, 2006). Essas estruturas se assemelham, também, aos neuritos relatados por Jeon *et al* (2014) após submeter bmMSCs humanas a tratamento com CoCl_2 . No G3, observamos que as células apresentaram morfologia neuronal com várias ramificações semelhantes a dendritos e axônios partindo do corpo celular, em consoante com outros trabalhos os quais também diferenciaram MSCs em *neuron-like* (KHANABDALI *et al*, 2015; SINGH e SHERPA, 2017).

As proteínas associadas à microtúbulo (MAP-1, -2 e -3) têm uma expressão variável ao longo do desenvolvimento das células neuronais, sendo a expressão de MAP-2 associada a dendritos de neurônios maduros (RIEDERER e MATUS, 1985). A MAP-2, além disso, desempenha um papel essencial no desenvolvimento, diferenciação e formato dos neurônios, estando presente de forma abundante no citoesqueleto neuronal e, portanto, é considerada um marcador neuronal (HERZOG e WEBER, 1978; JINFENG *et al*, 2016; YAN *et al*, 2011). Ao contrário do encontrado por Sanchez-Ramos *et al* (2000), neste trabalho as bmMSCs de ratos diferenciadas apresentaram marcação significativa para MAP-2. Quase todas as células do G2 e do G3 apresentaram positividade para MAP-2, resultado semelhante ao de outros trabalhos que diferenciaram MSCs em células *neuron-like* (AZEDI *et al*, 2017; CHUDICKOVA *et al*, 2015; JEONG e CHO, 2017). Curiosamente, a porcentagem de células positivas para MAP-2 foi expressiva tanto no grupo G2 quanto no G3 apesar das células do G2 assemelharem-se a neuroblastos à microscopia de contraste de fase - o que teoricamente não condiz com a positividade para um marcador de neurônios maduros. Porém, é possível que tais células com morfologia de neuroblasto tenham iniciado o processo de diferenciação em células *neuron-like* e assim iniciado a expressão de MAP-2.

Sendo a enzima da etapa limitante da síntese de catecolaminas, a tirosina hidroxilase (TH) é amplamente usada como um marcador de células dopaminérgicas (O'BYRNE *et al*, 2000; JIN *et al.*, 2008). Quando submetidas à marcação com TH, as células do G1 foram todas negativas, bem como a maioria do G2. Porém, as células do

G3 apresentaram positividade significativamente maior para marcação de TH. Esse resultado concorda com o de pesquisas envolvendo diferenciação de MSCs em células *neuron-like* dopaminérgicas (ALIAGHAEI et al , 2016; BORKOWSKA et al, 2014; PACARY et al , 2006) e sugere que as células do G3 têm a maquinaria bioquímica necessária para produção de dopamina.

Portanto, depreende-se que bmMSCs de ratos também são passíveis de diferenciação *in vitro* em células *neuron-like* por meio do protocolo de Pacary et al (2006). Os resultados da avaliação morfológica, da imunofluorescência e da citoquímica indicam que parte dessas células *neuron-like* derivadas de bmMSCs de ratos são catecolaminérgicas e talvez apresentem características neurofisiológicas à semelhança das bmMSCs de camundongo diferenciadas com CoCl₂ e Y-27632 (PACARY et al., 2006, 2007, 2008). Tais resultados reafirmam a capacidade diferenciadora das MSCs demonstrada por diversos trabalhos usando bmMSCs de camundongos, humanas e/ou de ratos (FOX et al. 2010; PETIT et al, 2014; e BERNAUDIN .2008; WOODBURY et al, 2000). No entanto, deve se comparar, sob diversos aspectos, a eficiência desse protocolo aplicado a bmMSCs de rato com outros existentes, como o fez Borkowska et al (2014) com alguns dos métodos disponíveis na época. Essa análise comparativa é um passo importante nos estudos visando a uma terapia celular contra doenças neurodegenerativas, como a DP, pois as células empregadas devem preencher determinados requisitos - sendo alguns deles liberar dopamina de forma regular, além de exibir as características morfológicas e eletrofisiológicas dos neurônios da substância negra (LEVY et al 2008; LINDVALL e KOKAIA, 2009).

Quando se pensa em terapia celular com SCs, é importante que elas preencham esses requisitos e apresentem uma taxa de sobrevivência mínima depois de transplantadas. Em geral, a sobrevivência das SCs transplantadas é curta e sua taxa de enxertia tecidual varia de 1 a 3% - o que se explica pelo fato de elas estarem fora do seu nicho natural, além do problema da rejeição imune (QI et al., 2010). Esses obstáculos à terapia celular validam a opção pelas MSCs, por apresentarem elas baixa imunogenicidade e serem passíveis de diferenciação prévia ou *in situ* (FOX et al., 2010; GLAVASKI-JOKSIMOVIC et al., 2013; KANG et al, 2012; YE. et al, 2002). Entretanto, apesar da capacidade de transdiferenciação *in vitro* das MSCs em células da glia, neurônios ou células *neuron-like* (KIM et al, 2006; KOBUNE et al., 2003; PROCKOP et al. , 1997), em geral não se observam porcentagens significativas de

diferenciação *in vivo* e as células resultantes não apresentam muitas características morfológicas e bioquímicas de células neuronais (GAO et al, 2006; JIANG et al., 2002; QI et al., 2010; SANCHEZ-RAMOS et al., 2000).

Por isso, a despeito de ser provável que a catecolamina presente no citoplasma de parte das células do G3 seja a dopamina (considerando em conjunto nossos resultados e o que a literatura descreve), é necessário saber se essas células *neuron-like* são capazes de liberar dopamina regularmente no local onde forem enxertadas e se apresentam determinados componentes da maquinaria neuronal como, por exemplo, os usados na condução dos potenciais de ação e na resposta a neurotransmissores (FOX et al. 2010; LINDVALL e KOKAIA, 2009). Por outro lado, nossos resultados sugerem que as células *neuron-like* oriundas de bmMSCs de ratos atingiram o mesmo grau de diferenciação observado em bmMSCs de camundongo submetidas ao tratamento com CoCl₂/Y-27632 e, portanto, possuem esses componentes da maquinaria neuronal já demonstrados (PACARY et al., 2006). Logo, a confirmação dessas características neuronais morfofisiológicas – incluindo a expressão celular de Proteína nuclear específica de neurônio (*Neuron-specific nuclear protein* - NeuN), β -tubulina classe 3, e Neurofilamento leve (*Neurofilament-light* - NF-L) (MOHAMMAD et al, 2016; SANCHEZ-RAMOS et. al 2000; TROPEL et al 2006) - respaldará pesquisas empregando essas células *neuron-like* em um modelo experimental de Doença de Parkinson em ratos.

5 CONCLUSÃO

O protocolo de diferenciação por meio de tratamento com CoCl_2 e Y-27632 estabelecido por Pacary et al (2006) é capaz de converter bmMSCs de rato em células *neuron-like* catecolaminérgicas.

REFERÊNCIAS

- ALIAGHAEI, A. et al. Dopaminergic induction of umbilical cord mesenchymal stem cells by conditioned medium of choroid plexus epithelial cells reduces apomorphine-induced rotation in parkinsonian rats. **Arch Iran Med.**, Tehran, v. 19, n. 8, p. 561-70, Aug. 2016. doi: 0161908/AIM.008.
- ANUSHA, C.; SUMATHI, T.; JOSEPH, L.D. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of parkinson's disease: suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis. **Chem Biol Interact.** ,2017 May 1; 269:67-79. doi: 10.1016/j.cbi.2017.03.016. Epub 2017 Apr 4.
- AIZMAN, I. et al. Extracellular matrix produced by bone marrow stromal cells and by their derivative, SB623 cells, supports neural cell growth. **J Neurosci Res**, New York, v.87, n.14, p. 3198-3206, Nov 2009.
- AXELSSON, S. et al. Glyoxylic acid condensation: a new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines. **Acta Physiol Scand.** 1973 Jan; 87(1):57-62.
- AZEDI, F. et al. Comparative capability of menstrual blood versus bone marrow derived stem cells in neural differentiation. **Mol Biol Rep.** 2017 Feb; 44(1):169-182. doi: 10.1007/s11033-016-4095-7. Epub 2016 Dec 15.
- BAHAT-STROOMZA, M. et al. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. **J Mol Neurosci.** 2009 Sep; 39(1-2):199-210. doi: 10.1007/s12031-008-9166-3. Epub 2009 Jan 6
- BARRY, F.P.; MURPHY, J.M.. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol** 36:568–584. 2004
- BEHR, B. et al. Stem cells. **Plast Reconstr Surg.** 2010 Oct; 126(4):1163-71. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181ea42bb.
- BLANDINI, F. et al. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. **Cell Transplant**, Elmsford, v.19, n.2, p.203-217, 2010.
- BJÖRKLUND, A.; LINDVALL, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. **Nat Neurosci.** 2000 Jun;3(6):537-44.
- BORKOWSKA, P. et al. Differentiation of adult rat mesenchymal stem cells to GABAergic, dopaminergic and cholinergic neurons. **Pharmacol Rep.** 2015 Apr;67(2):179-86. doi: 10.1016/j.pharep.2014.08.022. Epub 2014 Sep 9.
- CAPLAN, A.L. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, New York, v.9, n.5, p.641-650, Sep 1991.

- CAPLAN, A.L.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v.9, n.1, p.11-15, Jul 2011.
- CAPITELLI, C. S. et al. Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in MPTP-rat model of Parkinson's disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. **Int J Med Sci**, London, v.11, n.10, p.1049-1064, Ago 2014.
- CHEN, J.; CHOPP, M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. **NeuroRx**. 2006 Oct;3(4):466-73.
- CHUDICKOVA, M. et al. Targeted neural differentiation of murine mesenchymal stem cells by a protocol simulating the inflammatory site of neural injury. **J Tissue Eng Regen Med**. 2017 May; 11(5):1588-1597. doi: 10.1002/term.2059. Epub 2015 Jun 29.
- CUI, Y. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. **Behav Brain Res**. 2017 Mar 1;320:291-301. doi: 10.1016/j.bbr.2016.12.021. Epub 2016 Dec 19.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J. Cell Sci.** (2006) 119 (Part 11): 2204 -2213.
- DANIELYAN, L. et al. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. **Rejuvenation Res**, Larchmont, v.14, n.1, p.3-16, Feb 2011.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, New York, v.39, p.889-909, Sep. 2003.
- DENG, J. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. **Neurol Sci**, Milano, v.32, n.4, p. 641-651, Aug 2011.
- DEY, N.D. et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells reduce behavioral deficits in the YAC 128 mouse model of Huntington's disease. **Behav Brain Res**. 2010 Dec 25; 214(2):193-200. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.023. Epub 2010 May 21.
- DÍEZ-TEJEDOR, E. et al. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. **J Stroke Cerebrovasc Dis**. 2014 Nov-Dec; 23(10):2694-700.
- DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**. 2002 May 15;99(10):3838-43.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**. 2006; 8(4):315-7.

DOSS, M.X. et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. **J Cell Mol Med**, Oxford, v.8, n.4, p. 465-473, Nov 2004.

FINK, K.D. et al. Developing stem cell therapies for juvenile and adult-onset Huntington's disease. **Regen Med**. 2015;10(5):623-46. doi: 10.2217/rme.15.25.

FOX, L.E. et al. Membrane properties of *neuron-like* cells generated from adult human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev**, Larchmont, v.19, n.12, p. 1831-1841, Dec 2010.

FU, Y.S. et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for parkinsonism. **Stem Cells**, 24, p.115–124, 2006,.

FUKUCHI, Y. et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells** (2004) 22 (5): 649 -658.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morphol**. 1966 Dec; 16(3):381-90.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**. 1970 Oct; 3(4):393-403.

GAO, Y.J. et al. Differentiation potential of bone marrow stromal cells to enteric neurons in vitro. **Chin J Dig Dis**, Carlton South, v.07, n.03, p.156-163, 2006.

GLAVASKI-JOKSIMOVIC, A.; BOHN, M.C. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, New York, v.247, n.1, p.25-38, Sep 2013.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Commun Signal**, London, v.9, n.1, p.12, May 2011.

HEGARTY, S.V. et al. Effects of intracerebral neurotrophic factor application on motor symptoms in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism Relat Disord**. 2017 May;38:19-25. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.02.011. Epub 2017 Feb 10.

HERZOG, W.; WEBER, K. Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. **Eur J Biochem**. 1978 Dec 1;92(1):1-8.

HORNYKIEWICZ, O. Parkinson's disease: from brain homogenate to treatment. **Fed Proc**, Washington, v.32, n.2, p.183-190, Feb. 1973.

- HU, B. et al. Effect of extracellular vesicles on neural functional recovery and immunologic suppression after rat cerebral apoplexy. **Cell Physiol Biochem**. 2016; 40(1-2):155-162. Epub 2016 Nov 18.
- HU, C.; LI, L. In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. **Protein Cell**, Berlin, v.6, n.8, p.562-574, Aug 2015.
- JEON, E.S. et al. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124^a. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v.444, p. 581-587, Jan 2014.
- JEONG, S.G.; CHO, G.W. The tubulin deacetylase sirtuin-2 regulates neuronal differentiation through the ERK/CREB signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun**. 2017 Jan 1;482(1):182-187. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.031. Epub 2016 Nov 9
- JI, J.F. et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. **Stem Cells**, Basel, v.22, n.3, p.415-427, 2004.
- JIANG, Y. et al Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, London, v.418, n.01, p.41-49, 2002.
- JIN, G.Z. et al. Rat mesenchymal stem cells increase tyrosine hydroxylase expression and dopamine content in ventral mesencephalic cells in vitro. **Cell Biol Int**. 2008 Nov; 32(11):1433-8. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.08.014. Epub 2008 Aug 20.
- JINFENG, L. et al. Therapeutic effects of CUR-activated human umbilical cord mesenchymal stem cells on 1-methyl-4-phenylpyridine-induced parkinson's disease cell model. **Biomed Res Int.**, 2016; 2016: 9140541. Published online 2016 May 31. doi: 10.1155/2016/9140541
- KAJIYAMA, H. et al. Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. **Int J Dev Biol**. 2010;54(4):699-705. doi: 10.1387/ijdb.092953hk.
- KANG, S.K. et al. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. **Stem Cells Int**, London, v.2012, ID: 342968, Apr 2012.
- KARP, J.M.; LENG-TEO, G.S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v.4, n.3, p.206-216, Mar 2009.
- KERKIS ,I. et al. Neural and mesenchymal stem cells in animal models of Huntington's disease: past experiences and future challenges. **Stem Cell Res Ther**. 2015 Dec 14; 6:232. doi: 10.1186/s13287-015-0248-1.

- KHANABDALI, R. et al. Promoting effect of small molecules in cardiomyogenic and neurogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Drug Des Devel Ther.**, 2015 Dec 24;10:81-91. doi: 10.2147/DDDT.S89658. eCollection 2016
- KIM, M. et al. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006 Sep 22;348(2):386-92. Epub 2006 Jul 24.
- KIM, S. et al. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bonemarrow-derived precursor cells. **Brain Res.** 2006 December 6; 1123(1): 27–33. doi:10.1016/j.brainres.2006.09.044.
- KIM, S.S. et al. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. **Stem Cells** , 2008 Jul 10
- KIM, Y.J. et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. **Glia.** 2009 Jan 1; 57(1):13-23. doi: 10.1002/glia.20731.
- KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods.** 2016 Apr 15;99:62-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.016. Epub 2015 Sep 15.
- KÖNIG, R. Consecutive demonstration of catecholamines and dopamine- β -hydroxylase within the same specimen. **Histochemistry** , January 1979, Volume 61, Issue 3, pp 301–305
- KURAMOTO, L. et al. The nature of progression in Parkinson's disease: an application of non-linear, multivariate, longitudinal random effects modelling. **PLoS One.** 2013 Oct 18;8(10):e76595. doi: 10.1371/journal.pone.0076595. eCollection 2013
- LATTANZI, W. et al. Neurotrophic Features of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: In Vitro and In Vivo Studies. **J Biomed Biotechnol.**, Volume 2011 (2011). <http://dx.doi.org/10.1155/2011/468705>
- LEVY, Y.S. et al. Regenerative effect of neural-induced human mesenchymal stromal cells in rat models of Parkinson's disease. **Cytotherapy.** 2008; 10(4):340-52. doi: 10.1080/14653240802021330.
- LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci**, London, v.30, n.5, p.260-267, May 2009.
- LOCATELLI, F. et al. Stem cell therapy in stroke. **Cell Mol Life Sci.** 2009 Mar;66(5):757-72. doi: 10.1007/s00018-008-8346-1.

LU, S. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. **Toxicology**, Amsterdam, v.279, n.1-3, p. 189-195, Jan 2011.

MAJUMDAR, M.K. et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **J. Cell. Physiol**, 1998;176:57–66. [PubMed: 9618145].

MASAKI, Y. et al. Protective effect of Nrf2-ARE activator isolated from green perilla leaves on dopaminergic neuronal loss in a Parkinson's disease model. **Eur J Pharmacol.** 2017 Mar 5; 798:26-34. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.005. Epub 2017 Feb 4.

MEZEY, E. et al. Unexpected roles for bone marrow stromal cells (or MSCs): a real promise for cellular, but not replacement, therapy. **Oral Dis.** 2010 Mar;16(2):129-35. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01605.x. Epub 2009 Jul 27.

MOHAMMAD, M.H. et al. Characterization of neural stemness status through the neurogenesis process for bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells Cloning.**, 2016 Apr 18; 9:1-15. doi: 10.2147/SCCAA.S94545. eCollection 2016.

NEREM, R.M. Cell-based therapies: from basic biology to replacement, repair, and regeneration. **Biomaterials**, Amsterdam, v.28, n.34, p.5074-5077, Dec 2007.

NEUHUBER, B. et al. Stem cell delivery by lumbar puncture as a therapeutic alternative to direct injection into injured spinal cord. **J Neurosurg Spine.** 2008 Oct; 9(4):390-9. doi: 10.3171/SPI.2008.9.10.390.

NILSSON, S.K.; JOHNSTON, H.M.; COVERDALE, J.A. Spatial localization of transplanted hematopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood**, v.97, n.8, p.2293-9, 2001.

NÓBREGA, A.C. et al Levodopa treatment in Parkinson's disease: how does it affect dysphagia management? **Parkinsonism Relat Disord.** 2014 Mar; 20(3):340-1. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.09.013. Epub 2013 Sep 20.

NURI, M.M.; HAFEEZ, S. Intracoronary administration of autologous bone marrow stem cell transplant in myocardial infarction. **J Pak Med Assoc.** 2011 Jan;61(1):3-5

OH, S.H. et al. Mesenchymal stem cells inhibit transmission of α -synuclein by modulating clathrin-mediated endocytosis in a parkinsonian model. **Cell Rep.**, 2016 Feb 2;14(4):835-49. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.075. Epub 2016 Jan 14.

O'BYRNE, M.B. et al. Tyrosine-hydroxylase immunoreactive cells in the rat striatum following treatment with MPP₊. **Adv Exp Med Biol**, 2000;483:369e74.

OWEN, M. Marrow stromal stem cells. **J Cell Sci Suppl.** 1988;10:63-76.

PACARY, E. et al. Synergistic effects of CoCl₂ and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into *neuron-like* cells. **J Cell Sci.**, London, v. 119, .13, p.2667-2678, Mar 2006.

PACARY, E. et al. Crosstalk between HIF-1 and ROCK pathways in neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, neurospheres and in PC12 neurite outgrowth. **Mol Cell Neurosci**. 2007 Jul;35(3):409-23. Epub 2007 Apr 10.

PACARY, E.; PETIT, E.; BERNAUDIN, M. Concomitant inhibition of prolyl hydroxylases and ROCK initiates differentiation of mesenchymal stem cells and PC12 towards the neuronal lineage. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 377, n.02, p. 400-406, Dec 2008.

PAVON-FUENTES, N. et al. Stromal cell transplant in the 6-OHDA lesion model. **Rev Neurol**, Barcelona, v.39, n.4, p.326-334, Aug 2004.

PATEL, N.K. et al. Benefits of putaminal GDNF infusion in Parkinson disease are maintained after GDNF cessation. **Neurology**, Hagerstown, v.81, n.13, p.1176-1178, Sep 2013.

PAUL, G.; ANISIMOV, S.V. The secretome of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**, Paris, v.95, n.12, p.2246-2256, Dec 2013.

PETIT, G.H.; OLSSON, T.T.; BRUNDIN, P. The future of cell therapies and brain repair: Parkinson's disease leads the way. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Oxford, v.40, n.1, p.60-70, Feb 2014 .

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, 1997;276:71-74. [PubMed: 9082988]

QI, X. et al. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into neurons and glial cells and differential protein expression in a two compartment bone marrow stromal cell/neuron co-culture system. **J Clin Neurosci**, Melbourne, v.17, n.07, p.908-913, Jul 2010.

RAMÍREZ-ORDÓÑEZ, R.; GARCÍA-ARRARÁS, J.E. Peptidergic, catecholaminergic and morphological properties of avian chromaffin cells are modulated distinctively by growth factors. **Brain Res Dev Brain Res**, 1995 Jul 14;87(2):160-71.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**. 2003;21(1):105-10.

ROSOVA, I. et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. 2008 Aug;26(8):2173-82. doi: 10.1634/stemcells.2007-1104. Epub 2008 May 29.

SANCHEZ-RAMOS, J. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp Neurol**, New York, v.164, n.02, p.247-256, Aug 2000.

SINGH, V.; SHERPA, M. Neuronal-Like Differentiation of Murine Mesenchymal Stem Cell Line: Stimulation by *Juglans regia* L. Oil. **Appl Biochem Biotechnol**. 2017 Mar 13. doi: 10.1007/s12010-017-2452-1.

SINGER, N.G.; CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annu Rev Pathol**. 2011;6:457-78. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230.
TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, Cambridge, v.126, n.4, p.663-676, Aug 2006.

TAKAHASHI, H.; ISHIKAWA, H.; TANAKA, A. Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. **Hum Cell**. 2017 Apr; 30(2):60-71. doi: 10.1007/s13577-017-0160-3. Epub 2017 Feb 16.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2011 Sep;1(1):a009316. doi: 10.1101/cshperspect.a009316.

TUAN, R.S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. **Arthritis Res Ther**. 2003; 5(1):32-45. Epub 2002 Dec 11.
TROPEL, P. et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Durham, v.24, n.12, p.2868-76, Dec 2006.

TORRE, J.C.; SURGEON, J.W. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. **Histochemistry**. 1976 Oct 22; 49(2):81-93.

VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol**, Cambridge, v.12, n.12, p. 502-508, Nov 2002.

WANG, F. et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells exerts therapeutic effects on parkinsonian model of rats: focusing on neuroprotective effects of stromal cell-derived factor-1alpha. **BMC Neurosci**, London, v.11, n.1, p. 52, Apr 2010.

WANG, S.; QU, X.; ZHAO, R.C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **J Hematol Oncol**, 2012; 5: 19. Published online 2012 Apr 30. doi: 10.1186/1756-8722-5-19

WEI, X. et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacol Sin**, Beijing, v.34, n. 06, p.747-754, Jun 2013.

WEN, S.R. et al. Expression of δ Np73 in hippocampus of APP/PS1 transgenic mice following GFP-BMSCs transplantation. **Neurol Res**, 2011 Dec; 33(10):1109-14. doi: 10.1179/1743132811Y.0000000051.

WOODBURY, D. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J. Neurosci. Res**, 2000; 61:364–370. [PubMed: 10931522].

XUE, Z.G.; SMITH, J.; LE DOUARIN, N.M. Differentiation of catecholaminergic cells in cultures of embryonic avian sensory ganglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1985 Dec; 82(24): 8800–8804.

YAMADA, K. et al. Stereotactic surgery for subthalamic nucleus stimulation under general anesthesia: a retrospective evaluation of Japanese patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 2007 Mar; 13(2):101-7. Epub 2006 Oct 19.
YE, M. et al. Therapeutic effects of differentiated bone marrow stromal cell transplantation on rat models of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, Kidlington, v.13, n.1, p. 44-49, Feb 2007.

YE, X.; HU, J.; CUI, G. Therapy effects of bone marrow stromal cells on ischemic stroke. **Oxid Med Cell Longev**. 2016;2016:7682960. doi: 10.1155/2016/7682960. Epub 2016 Mar 16.

ZUK, P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, 2002 Dec; 13(12):4279-95.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



Ministério da Educação

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia

CEP: 38025-100 – Uberaba - MG - Telefone: (034) 3700 6764 - E-mail: ceaa@pesqgg.uftm.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais pré-tratadas com neurotrofinas no modelo experimental de doença de Parkinson em ratos.”, protocolo nº 366, sob a responsabilidade de Valdo José Dias da Silva – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de 18/03/2016.

Vigência do projeto	18/03/2016 à 18/01/2018
Espécie/Linhagem	Ratos isogênicos Wistar e Kyoto
Nº de animais	45
Peso/idade	280-300 gramas /3-4 meses
Gênero	Machos
Origem	Biotério Setorial da Disciplina de Fisiologia - UFTM


 Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira
 Coordenador da CEUA/UFTM