

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA KOHN CORDEIRO

**RECUPERAÇÃO FUNCIONAL PÓS-TRANSPLANTE DE
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO UNILATERAL DE 6-
HIDROXIDOPAMINA DE DOENÇA DE PARKINSON.**

**CURITIBA
2008**

KARINA KOHN CORDEIRO

**RECUPERAÇÃO FUNCIONAL PÓS-TRANSPLANTE DE
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO UNILATERAL DE 6-
HIDROXIDOPAMINA DE DOENÇA DE PARKINSON.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do
Departamento de Cirurgia do Setor de
Ciências da Saúde como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Clínica
Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bernardo
Tenório

Co-orientador: Prof. Dr. Guido Nikkhah

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos
Campos

CURITIBA

2008

Para Joacir, meu sempre companheiro nesta jornada...por seu imenso amor,
compreensão e afeto.

Aos meus pais e irmãs, os quais sempre estiveram presentes me apoiando em todos
os momentos da minha vida...minha base.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório, anestesiolista do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), não somente por orientar a confecção desta tese, mas por ser o farol e exemplo em toda a minha formação.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do programa de pós graduação em cirurgia da UFPR, pelo apoio e pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

Ao Prof Dr. Guido Nikkhah, chefe do departamento de estereotaxia da Universidade Clínica de *Freiburg*, por possibilitar o desenvolvimento deste projeto e co-orientar esta obra.

À Dr. Anna Papazoglou, pós-doutoranda da Universidade Clínica de *Freiburg*, por ter criado toda a essência deste projeto e pela amizade com a qual me recebeu no grupo.

Ao Dr. PhD Máté Döbrössy, líder do grupo de pesquisa da estereotaxia da Universidade Clínica de Freiburg, pela dedicada orientação e trabalho conjunto na preparação deste projeto.

À Joanna Garcia, doutoranda da Universidade Clínica de *Freiburg*, pela amizade, pelo apoio e pela ajuda na habituação na nova vida no laboratório.

Ao Wei Jang, doutorando da Universidade Clinica de Freiburg, pela amizade, pelas valiosas dicas e pela ajuda técnica, principalmente no início do projeto.

A todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS: PERDA DA ATIVIDADE FUNCIONAL E DEGENERÇÃO TRÓFICA DO SIATEMA NERVOSO CENTRAL.....	14
1.2 DOENÇA DE PARKINSON	16
1.2.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO	16
1.2.2 PATOGÊNESE E CORRELATOS ANATÔMICOS	18
1.2.3 A ORGANIZAÇÃO DO MESENCÉFALO DURANTE A EMBRIOGÊNESE	19
1.2.4 DOENÇA DE PARKINSON VERSUS PARKINSONISMO	21
1.2.5 EPIDEMIOLOGIA	22
1.2.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS	22
1.3 MODELOS ANIMAIS DA PD	25
1.3.1 BENEFÍCIOS E FARDOS DOS MODELOS ANIMAIS.	25
1.3.2 O MODELO ANIMAL DE 6-OHDA PARA A DOENÇA DE PARKINSON	26
1.3.3 TERAPIA CELULAR RESTAURADORA NO MODELO ANIMAL DE 6-OHDA	30
2 OBJETIVOS	32
3 MÉTODO	33
3.1 POPULAÇÃO ANIMAL.....	33
3.2 SUBDIVISÃO EM GRUPOS.....	34
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	35
3.3.1 DISSECÇÃO DO MESENCÉFALO VENTRAL DE EMBRIÕES E PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR ÚNICA	35
3.3.2 ANESTESIA E PREPARAÇÃO DO ANIMAL.....	37
3.3.3 LESÃO DO FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL DIREITO	38
3.3.4 TRANSPLANTE DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS ORIGINÁRIAS DO MESENCÉFALO VENTRAL	39
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	40
3.4.1 ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.....	40
3.4.2 TESTE DA ESCADA OU <i>PAW REACHING TEST</i>	43
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3.6 CRONOGRAMA DO ESTUDO	47
4 RESULTADOS	47

4.1 DADOS REFERENTES À POPULAÇÃO	47
4.2 ANÁLISE DO TREINAMENTO NO TESTE DA ESCADA.....	48
4.3 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO POR DROGAS	52
4.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS NO TESTE DA ESCADA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO.....	55
5 DISCUSSÃO	61
5.1 TREINAMENTO NO TESTE DA ESCADA	63
5.2 ROTAÇÕES INDUZIDA POR DROGAS	65
5.3 RESULTADOS NO TESTE DA ESCADA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS.....	68
6 CONCLUSÕES	72
ANEXO 1	73
Referências bibliográficas	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema da dissecação do VM de embriões E14 e figura da suspensão celular única.....	36
Figura 2 Lesão do feixe prosencefálico medial direito pela injeção 6-OHDA	39
Figura 3 Caixa em formato côncavo para a realização do teste de rotação induzida por drogas.....	40
Figura 4 Animal colocado na caixa e conectado ao rotômetro	41
Figura 5 Base do rotômetro, demonstrando o sistema de rolamentos, o qual está conectado ao computador para análise dos dados.....	41
Figura 6 Animal colocado na caixa de <i>paw reaching</i> modificada utilizada neste experimento	44
Figura 7 Oito <i>pellets</i> por degrau colocadas bilateralmente durante a fase de treinamento	45
Figura 8: Representação esquemática do cronograma do estudo.	47

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Tabela 1 Coordenadas estereotáxicas da lesão e do transplante no modelo animal de 6-ODHA.	37
Gráfico 1 <i>Pellets</i> comidas em cada dia durante a fase de treinamento no lado ipsilateral aos futuros procedimentos.....	49
Gráfico 2 <i>Pellets</i> comidas em cada dia durante a fase de treinamento no lado contralateral aos futuros procedimentos.	50
Gráfico 3 <i>Pellets</i> comidas nos últimos cinco dias de treinamento, ipsi e contralateral aos futuros procedimentos.....	51
Gráfico 4 <i>Pellets</i> comidas nos últimos cinco dias de treinamento ipsilateral aos futuros procedimentos.....	51
Gráfico 5 <i>Pellets</i> comidas nos últimos cinco dias de treinamento contralateral aos futuros procedimentos.....	52
Gráfico 6 Comportamento rotacional induzido por apomorfina após a lesão e após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas.	53
Gráfico 7 Comportamento rotacional induzido por anfetamina após a lesão e após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas.	54
Gráfico 8 <i>Pellets</i> comidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado ipsilateral aos procedimentos.	56
Gráfico 9 <i>Pellets</i> comidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado contralateral aos procedimentos.....	57
Gráfico 10 <i>Pellets</i> movidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, ipsilateralmente aos procedimentos	58
Gráfico 11 <i>Pellets</i> movidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, contralateralmente aos procedimentos.	59
Gráfico 12 Taxa de sucesso nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado ipsilateral aos procedimentos.	60
Gráfico 13 Taxa de sucesso nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado contralateral aos procedimentos.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
ABP	- Associação Brasileira de Parkinson
AG	- após o transplante
AIDS	- síndrome da imunodeficiência adquirida
AL	- após a lesão
ANOVA	- <i>Analysis of Variance</i>
ATP	- adenosina trifosfato
AVCi	- acidente vascular cerebral isquêmico
BDS	- <i>deep brain stimulation</i>
BG	- gânglios da base
CNS	- sistema nervoso central
contralateral	- CONTRA
CPu	- <i>caudate-putamen-unit</i>
cx	- grupo controle
cx contra	- grupo controle, contralateral aos procedimentos
cx ipsi	- grupo controle, ipsilateral aos procedimentos
DNA	- ácido desoxiribonucleico
E10,5	- dia embrionário 10,5
E14	- dia embrionário 14
EP	- erro padrão da média
FGF-8	- fator de crescimento de fibroblastos 8
GFAP	- <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GP	- globo pálido
GPI	- globo pálido interno

HBSS	- <i>Hank`s balanced salt solution</i>
HD	- Doença de Huntington
Ho	- hipótese nula
ipsilateral	- IPSI
L-DOPA	- 1-3,4-dihidroxifenilalanina
Ix contra	- grupo lesão, contralateral aos procedimentos
Ix ipsi	- grupo lesão, ipsilateral aos procedimentos
m/hO	- organizador mesencéfalo-rombencéfalo
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
Nacc	- núcleo accubens
NIH	- <i>National Institut of Health</i>
NMDA	- N-metil-D-aspartato
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PD	- Doença de Parkinson
PET	- tomografia por emissão de pósitrons
PLSD	- <i>Protected Least Significant Difference</i>
Shh	- <i>Sonic hedgedog</i>
SN	- substância nigra
SNc	- substância nigra pars compacta
SNr	- substância nigra pars reticulada
STN	- núcleos subtalâmicos
TGF- β	- <i>transforming growth factor-β</i>
TH	- tirosina hidroxilase
tx contra	- grupo transplante, contralateral aos procedimentos
tx ipsi	- grupo transplante, ipsilateral aos procedimentos
UPDRS	- <i>Unified Parkinson Disease Rating Scale</i>

VM - mesencéfalo ventral
VTA - área tegmentar ventral

RESUMO

A Doença de Parkinson (PD) é uma doença de grande implicação em saúde pública, tanto por atingir uma parcela significativa da população quanto pelos gastos com a recuperação e o tratamento de pacientes enfermos. Atualmente, o tratamento medicamentoso se baseia na combinação de 1-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) com agonistas dos receptores dopaminérgicos. A principal desvantagem da terapia medicamentosa é o desenvolvimento de efeitos colaterais tardios, como discinesia e fenômeno *on-off*. Além disso, há uma parcela significativa de pacientes que se torna refratária à terapia. Outras modalidades terapêuticas foram desenvolvidas, a fim de se proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes portadores da doença. Entre elas, foram desenvolvidas bombas de apomorfina para uso subcutâneo, técnicas de ablação cerebral (talamotomia, palidotomia), estimulação cerebral profunda (*deep brain stimulation* – DBS) e o transplante de células tronco.

Este trabalho objetiva avaliar o papel do teste da escada na análise da recuperação funcional de ratos com PD induzida submetidos ao transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas.

Os animais foram submetidos ao treinamento extensivo no teste da escada durante 22 dias. Na fase de treinamento observou-se claramente uma curva de aprendizado em todos os grupos em ambas as patas. A seguir, os animais (excetuando-se o grupo controle) foram submetidos à lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-OHDA (6-hidroxidopamina) a fim de se induzir a PD. A eficácia da lesão foi controlada através do teste de rotação induzida por drogas (apomorfina e anfetamina) e então, cinco semanas após a lesão, os animais foram divididos em grupo lesionado (lx) e grupo lesionado e transplantado (tx). Para o transplante foi utilizada suspensão celular única com células provenientes do mesencéfalo ventral de embriões de ratos retirados no 14^o dia após a fecundação. Estas células foram transplantadas no *striatum* ipsilateral à lesão, utilizando-se a técnica de microtransplante com capilar de vidro. Após o transplante, o teste de rotação e o teste da escada foram repetidos.

No teste de rotação com apomorfina pós-transplante, observou-se uma diminuição significativa da rotação para o lado contralateral, o que pode ser atribuído à redução da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos no lado lesionado.

No teste com anfetamina, observou-se o fenômeno de supercompensação rotacional, que é uma inversão do sentido da rotação, de ipsilateral para contralateral ao transplante, o que é atribuído à produção de dopamina pelas células transplantadas, associado à hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos estriatais. Os achados da rotação induzida por drogas sinalizam a presença de recuperação funcional após o transplante.

Em contrapartida, no teste da escada observou-se claramente o efeito da lesão, mas não o efeito do transplante. Explicações para este fato podem ser: (1) o número de *pellets* utilizadas, (2) a localização das células transplantadas no *striatum* (3) o volume do transplante e a densidade e distribuição das fibras e (4) a possibilidade dos animais apresentarem uma preferência no uso das patas, a qual não foi testada anteriormente aos procedimentos. Concluindo, neste estudo não se pôde observar recuperação funcional no teste da escada após o transplante de células dopaminérgicas. Outros estudos são necessários para uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na integração funcional das células transplantadas.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, células tronco, modelo animal de 6-OHDA, transplante.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a condition with great implication in public health not only because it affects a significant part of the population over 60 years old but also because of the economic impact it causes with the recuperation and treatment of these patients. Actually, the drug therapy is based on the combination of L-DOPA with dopaminergic agonists. The main pitfall of this treatment, mainly the therapy with L-DOPA, is the development of severe late side effects, such as dyskinesias and on-off phenomenon. Furthermore, with the chronic use of the drug there's a reduction of its beneficial effects. Because of these adverse effects, other therapeutic modalities were created in order to ensure the patients suffering from the disease a better quality of life. Among them, were developed the subcutaneous apomorphine pump, cerebral ablative techniques (pallidotomy, thalamotomy), deep brain stimulation (DBS), and approaches using neural transplantation of embryonic dopaminergic stem cells.

The objective of this study is to evaluate the role of the staircase test on the analysis of the functional recovery of rats submitted to a model of PD and transplanted with neural dopaminergic stem cells.

All the animals were submitted to extensive training on the staircase test for 22 days. In this phase a clear learning curve was observed in all groups and in both paws. Afterwards, the rats, except the control group, received a unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion on the middle forebrain bundle in order to induce PD. The efficacy of the lesion was controlled by means of drug-induced rotations. The drugs used were amphetamine and apomorphine, and five weeks after the lesion the animals were randomly divided in lesioned group and lesioned and transplanted group. For the transplant, a ventral mesencephalon single cell suspension was used from rats on the embryonic day 14. These cells were transplanted on the striatum ipsilateral to the lesion using the microtransplantation approach with a glass capillary. After the transplantation, the drug-induced rotation test and the staircase test were repeated.

On the apomorphine induced rotation test after the transplantation, a clear reduction on the rotation amplitude contralateral to the lesion was observed, which may be a consequence of a reduction of the dopaminergic receptors hypersensitivity on the lesioned side.

On the amphetamine test, the overcompensation phenomenon was observed, in which the rotation direction inverts from ipsilateral to contralateral to the transplant side. This phenomenon is explained by dopamine production by the transplanted cells associated to the striatal dopaminergic receptor hypersensitivity. These findings on the drug-induced rotation after the transplant support the presence of a functional recovery after the graft.

On the other hand, on the staircase test a clear lesion effect was seen, but no transplant effect. Explanations for these facts might be: (1) the number of pellets used, (2) the location where the cells were transplanted inside the striatum, (3) the graft volume and the fiber density and distribution and, (4) the possibility that the animals have a preference on the paws use, which was not tested before the procedures. To conclude, in this study we could not observe a functional recovery on the staircase test after the transplantation of dopaminergic cells. Other studies are necessary to a better comprehension of the phenomenon involved on the functional integration of the transplanted cells.

Key-words: Parkinson's disease, stem cells, 6-OHDA animal model, graft.

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho enfoca a análise do comportamento motor e recuperação funcional em um modelo animal de Doença de Parkinson (PD) antes e após o transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas. Como ainda não há terapias restaurativas eficazes para esta enfermidade, e a terapia medicamentosa clássica produz efeitos colaterais graves cronicamente, existe a necessidade da extensão da terapia convencional para outros modelos terapêuticos, como o neurotransplante.

Primeiramente, serão revisados os mecanismos fisiopatológicos da PD incluindo o processo neuropatológico e formas terapêuticas. A seguir, uma descrição do modelo animal da PD, a análise de comportamentos motores no rato e uma revisão dos dados existentes na literatura sobre neurotransplante experimental.

1.1 DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS: PERDA DE ATIVIDADE FUNCIONAL E DEGENERAÇÃO TRÓFICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.

Distúrbios neurodegenerativos podem ser explicados por uma perda neuronal progressiva. Diferentemente de dano neuronal agudo como trauma mecânico, hemorragia ou infecção aguda, distúrbios neurodegenerativos são processos crônicos e progressivos. A base molecular da morte neuronal pode ser explicada por três mecanismos: (1) comprometimento metabólico, (2) citotoxicidade externa e (3) *stress* oxidativo. Estes mecanismos podem agir tanto isoladamente quanto interativamente iniciando o processo de necrose e apoptose (Alexi et al., 2000). Necrose define morte celular desregulada após exposição a uma injúria a qual supera a capacidade de recuperação da célula ocasionando edema e destruição

celular (Raff, 1998). Causas possíveis são injúria direta, infecção, câncer, hipóxia, intoxicação, entre outras. Em contrapartida, apoptose define morte celular programada e controlada induzida por desencadeantes extra ou intracelulares que resulta finalmente em redução volumétrica e fagocitose dos restos celulares (Raff, 1998).

O comprometimento metabólico celular é causado por dano mitocondrial e restrição da produção mitocondrial de adenosina trifosfato (ATP). Como este é o principal fornecedor de energia à célula, privação de ATP induz apoptose e necrose. O comprometimento metabólico é relevante em doenças neurodegenerativas como PD, Doença de Huntington (HD) e Doença de Wilson.

A toxicidade externa, primeiramente descrita por Olney et al., em 1972, é relacionada a uma transmissão modificada e patológica de aminoácidos excitatórios os quais ativam excessivamente receptores pós-sinápticos N-metil-D-aspartato (NMDA) e glutamatérgicos finalmente induzindo morte celular. Toxicidade externa é reportada como paradigma patológico na hipoglicemia, PD e HD, assim como em vários distúrbios neurológicos agudos como crises convulsivas, acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) e trauma mecânico (Ikonomidou e Turski, 1995; Rao e Balachandran, 2002; Olney, 2003).

O *stress* oxidativo resulta de um desbalanço entre radicais livres, os quais são espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, e antioxidantes que podem ser enzimas intracelulares como a superóxido desmutase, moléculas endógenas como o *glutathione* ou nutrientes como as vitaminas C e E. Ocorre um dano às membranas celulares lipídicas, proteínas celulares e moléculas de ácido desoxirribonucléico (DNA) levando à morte celular induzida pelo *stress* oxidativo (Barnham et al., 2004 e Bergamini et al., 2004). O *stress* oxidativo foi reportado na Doença de Alzheimer, PD, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, demência relacionada a

síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a muitos outros distúrbios neurodegenerativos.

Todos os três mecanismos de morte neuronal são encontrados no sistema nigro-estriatal de pacientes com PD. Exames *post-mortem* de espécimes cerebrais comprovaram que há comprometimento metabólico, especialmente do metabolismo mitocondrial (Mizuno et al., 1998; Schapira et al., 1998). Além disto, a toxina mitocondrial 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produz parkinsonismo por lesão seletiva da substância nigra (SN) em primatas e camundongos (Langston, 1987; Sporeen et al., 1998). Outros estudos demonstraram haver toxicidade externa na SN e no globo pálido interno (GPi) via *input* excitatório glutamatérgico dos núcleos subtalâmicos (STN) e do neocórtex, assim como interações entre estes mecanismos citotóxicos e prejuízo do metabolismo mitocondrial (Rodriguez et al., 1998). Está estabelecido que o *stress* oxidativo, o aumento de radicais livres e a falta de antioxidantes influenciam a patogênese da PD. Estudos *post-mortem* em tecidos cerebrais nigrais de pacientes com PD apresentaram um aumento de lipídios de membrana oxidados e moléculas de DNA oxidadas (Alam et al., 1997). A interação de comprometimento metabólico mitocondrial, toxicidade externa e *stress* oxidativo na gênese PD já foi discutida anteriormente (Beal, 2003; Alexi et al., 2000).

1.2 DOENÇA DE PARKINSON

1.2.1 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO

Relatos históricos de possíveis sintomas parkinsonianos datam de 2.500 A.C na Índia (Stern, 1989). Sintomas como tremor e marcha propulsiva também foram mencionados por autores famosos como Claudius Galenus (129-199 AC) e

Franciscus Sylvius de la Boë (1680). Em 1817, James Parkinson escreveu seu livro “*Essay on the Shaking Palsy*” definindo *paralysis agitans*. Em 1886, Jean-Martin Charcot batizou esta enfermidade de Doença de Parkinson após refinar o relatório do seu antecessor (Alexi et al., 2000).

A PD apresenta-se classicamente pela tríade: rigidez muscular (hipertonia), acinesia/hipocinesia e tremor. Como quarto sintoma principal, instabilidade postural pode ser observada. O tremor, observado em 70% dos casos como o primeiro sintoma indicador da doença, tem frequência entre 4-7 *Hertz* e é um tremor de repouso, desaparecendo quando o paciente executa algum movimento. O tremor pode ser uni ou bilateral e afeta principalmente os membros, mas em alguns casos pode também acometer a cabeça, o pescoço e a mandíbula. A acinesia/hipocinesia manifesta-se através de “*freezing*”, cessação repentina de todos os movimentos e hesitação ao iniciar movimentos. A instabilidade postural inclui ataxia e festinação, significando aumento repentino e involuntário da velocidade da marcha durante a caminhada (Gleixner et al., 2004). Pacientes portadores de PD também podem apresentar sintomas vegetativos (seborréia, aumento da salivação e da sudorese, constipação, distúrbios de bexiga urinária, mudanças na pressão arterial, hipersexualidade e disfunção erétil), distúrbios sensitivos (hiposmia, habilidade reduzida para diferenciar cores), sintomas psiquiátricos (bradifrenia, ansiedade, distúrbios afetivos, distúrbios do sono, fadiga, depressão, pensamentos suicidas) além de sintomas tardios parcialmente causados pela medicação como distonia, discinesia, fenômeno *on-off*, o qual pode ser explicado como hipercinesia seguida de acinesia súbita (Gleixner et al., 2004). Embora existam inúmeras escalas para classificação da PD três delas são as mais comumente usadas: *Hoehn and Yahr Staging of Parkinson`s Disease* (Hoehn and Yahr, 1967), *Schwab and England Activities of Daily Living* (Gilligham FJ, 1969) e *Unified Parkinson Disease Rating*

Scale (UPDRS) (Fahn S e Elton RL, 2003). No Anexo 1, está detalhada a classificação de *Hoehn e Yahr* para PD. Nesta escala, a doença é classificada em cinco estágios, onde o estágio V é alcançado em média dez anos após o início da doença. A escala de *Schwab e England* gradua a independência do paciente em 100% (independência completa, o paciente é capaz de realizar todas as tarefas sem lentificação, dificuldade ou comprometimento motor) a 0% (paciente totalmente dependente, acamado, com disfunção vegetativa). A UPDRS é mais acurada e portanto a mais complexa descrevendo o desenvolvimento longitudinal dos sintomas parkinsonianos, os quais são divididos entre: (1) inteligência, comportamento e humor, (2) atividades da vida diária, (3) exame motor. O escore total de 199 pontos pode ser atingido, o que significa comprometimento total e zero significando nenhuma deficiência.

1.2.2 PATOGÊNESE E CORRELATOS ANATÔMICOS

Na célula, a PD é caracterizada por uma degeneração progressiva da circuitaria dos gânglios da base (BG) levando a uma progressiva depleção dopaminérgica nas vias que conectam a substância nigra pars compacta (SNc) ao *striatum*. Exames *post-mortem* de tecidos cerebrais e estudos *in vivo* através de tomografia por emissão de pósitrons (PET) sugerem que os primeiros déficits motores na PD ocorrem quando há uma depleção de 50-60% das células nigrais dopaminérgicas e uma perda de 60-80% de dopamina no *striatum* (Langston, 1990; Leenders et al., 1990). Depleção progressiva de dopamina é relacionada ao aumento da sintomatologia clínica (Riederer e Wuketich, 1976; Fearnley e Lees, 1991; Foley e Riederer, 1999). Os BG são compostos por núcleos subcorticais e basicamente contém quatro unidades funcionais: o *striatum*, o globo pálido (GP), a

SN e os STN. O *striatum* representa o principal *input* do sistema dos gânglios da base e pode ser subdividido em núcleo caudado, putâmen e *striatum* ventral, o qual inclui o núcleo *accumbens* (Nacc). O *striatum* recebe aferências tanto da SNc quanto de virtualmente todas as áreas do córtex cerebral. Como principais eferências são definidas a substância nigra pars reticulada (SNr) e o GPi, os quais conduzem seus sinais via tálamo e tronco cerebral para o córtex motor e medula espinhal (Kandel ER et al., 2000). Funcionalmente, esta circuitaria pode ser dividida em duas alças: a alça dorsal a qual exerce influência sobre a função motora e a alça ventral que pertence ao sistema límbico (Alexander et al., 1986; Albin et al., 1989). A alça dorsal funcionalmente conecta as aferências corticais através do *striatum* dorsal, do GP, da SNc e da SNr com eferências ao tálamo e ao córtex. A alça ventral recebe aferências do córtex pré-frontal e as conecta via Nacc, área tegmentar ventral (VTA) e GP com o tálamo e como *feedback* com o córtex pré-frontal e outras estruturas límbicas incluindo a amígdala e o hipocampo. Na PD, a degeneração inicial dos neurônios dopaminérgicos ocorre principalmente na alça dorsal dos gânglios da base.

1.2.3 A ORGANIZAÇÃO DO MESENCÉFALO DURANTE A EMBRIOGÊNESE

A formação do sistema nervoso central (CNS) é um processo complexo e requer uma interação acurada entre os fatores que definem a segmentação territorial entre prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, fatores que induzem a neurogênese, fatores que influenciam progenitores neuronais a desenvolverem determinado fenótipo dentro dos limites apropriados e finalmente fatores que garantem a sobrevivência e manutenção neuronal, crescimento de fibras, e formação de conexões sinápticas com a área correta. Neurônios dopaminérgicos

que formam a SN derivam de células progenitoras provenientes do mesencéfalo ventral (VM). Uma particularidade destes progenitores é sua geração a partir da linha média do VM, o assoalho da placa neural, o qual inicialmente é ocupado por células gliais que expressam a proteína *Sonic hedgehog* (Shh) (Andersson et al., 2005; Placzek et al., 1993; Placzek e Briscoe 2005). A teoria supõe que durante o início da embriogênese há uma conversão única de células gliais em neurônios, mais especificamente conversão de células basais da placa neural em neurônios dopaminérgicos (Anderson et al., 2005). Este processo ocorre na junção do mesencéfalo com o metencéfalo, onde o organizador mesencéfalo-rombencéfalo (m/hO) está situado. A indução de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos é dependente tanto da expressão de Shh quanto da expressão de FGF-8 (fator de crescimento de fibroblastos 8). Shh e FGF-8 são necessários para a proliferação destes progenitores neuronais antes da sua migração e diferenciação em direção a uma célula com neurotransmissores específicos e também atuam na posterior especialização neuronal nos subgrupos da SN e da VTA. Adicionalmente, TGF- β (*transforming growth factor- β*) é necessário para a indução do destino dopaminérgico nas células mesencefálicas e para sua sobrevivência (Farkas et al., 2003; Prakash e Wurst, 2006). Outros fatores transcripcionais necessários para a sobrevivência, diferenciação e manutenção dos neurônios dopaminérgicos atualmente identificados são membros da família Wnt, Nurr1, LMX1b, Ptx3 e En1/En2. Wnt-1 aumenta o número de neurônios TH (tirosina hidroxilase) positivos através da regulação do ciclo celular e pelo reforço da proliferação dos precursores Nurr1. Wnt-5a aumenta o número de neurônios TH positivos pela promoção da diferenciação de precursores Nurr1 em neurônios dopaminérgicos (Castelo-Branco et al., 2003). Nurr1, também conhecido como Nr4a2, é necessário para a aquisição do fenótipo dopaminérgico nas células precursoras mesencefálicas (Castelo-Branco et al., 2003 e Zetterstrom et

al., 1997). Lmx1b age como um ativador transcripcional do gene Ptx3, definindo portanto uma via alternativa na especificação do destino celular dopaminérgico no mesencéfalo independente da via Nurr1 (Prakash e Wurst, 2006). A proteína Ptx3 parece ser necessária na especialização destes progenitores dopaminérgicos os quais formam a SNc (Simeone et al. 2005; Nunes et al., 2003; Prakash e Wurst, 2006). As proteínas En1 e En2, as quais durante a embriogênese são expressas através do m/hO e no animal adulto são expressas na SN e na VTA, são necessárias para a sobrevivência e a manutenção, mas não para a indução da diferenciação inicial das células mesencefálicas dopaminérgicas.

As primeiras células que posteriormente se tornarão células dopaminérgicas são encontradas no VM de ratos no seu E10,5 (dia embrionário 10,5) (Prakash e Wurst, 2006). A posterior migração para a sua posição final e a inervação das estruturas alvo corretas continua até a terceira semana *post-partum* (Voorn et al., 1988). Além da neurogênese e da diferenciação, morte celular por apoptose também é importante para o desenvolvimento fisiológico do sistema dopaminérgico mesencefálico. Um primeiro pico de morte celular ocorre após o nascimento e um segundo pico durante a segunda semana pós natal (Burke, 2004; Jackson-Lewis et al., 2000).

1.2.4 DOENÇA DE PARKINSON VERSUS PARKINSONISMO

O termo PD inclui tanto uma minoria de 5% dos pacientes, os quais apresentam defeitos autossômicos dominantes e autossômicos recessivos nos cromossomos 2, 4 e 6 e também a vasta maioria, 80% os quais apresentam a doença idiopática, resultado provavelmente na combinação de diversos fatores patogênicos, como previamente mencionado. Cerca de dez à 15% dos pacientes

que apresentam sintomas parkinsonianos podem ser definidos como casos de parkinsonismo, o qual é definido como uma síndrome *parkinson-like* com etiologia conhecida. Síndrome *parkinson-like* pode ser secundária à doenças infecciosas (doença de Lyme, encefalite), intoxicações (monóxido de carbono, dissulfeto de carbono, cianeto, metanol, manganês), após consumo de drogas (heroína, neurolépticos e outras), devido a doenças metabólicas (doença de Wilson, hipoparatiroidismo) ou por destruição direta do CNS por meio de trauma, tumor, ou processos hipóxicos vasculares (Scholz e Oertel, 2003; Gleixner et al., 2004).

1.2.5 EPIDEMIOLOGIA

A idade média do início dos sintomas da PD é entre 50 e 60 anos, porém há descrição de casos de início mais precoce (Langston, 1998, Tanner e Goldman, 1996). A prevalência da doença na faixa etária entre 50 e 60 anos é de 0,1%. No entanto, a prevalência da PD em pacientes acima de 65 anos aumenta para 0,5 - 1%. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 4 milhões de pessoas em todo mundo sofrem com a PD. No Brasil, estimativas da Associação Brasileira de Parkinson (ABP), mostram que atualmente cerca de 200 mil pessoas tem a doença e que, ano a ano, vinte novos casos são diagnosticados para cada 100.000 pessoas, sem distinção de sexo.

1.2.6 OPÇÕES TERAPÊUTICAS

Entre as opções terapêuticas para a PD cita-se a terapia medicamentosa, a terapia física e a cirurgia. A terapia medicamentosa modula a sintomatologia da PD por reforçar a neurotransmissão dopaminérgica na circuitaria dos BG de forma a

rebalancear os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos por meio de agonistas dopaminérgicos pós-sinápticos, pela redução da degradação intraneuronal de dopamina e por meio de drogas anti-colinérgicas. A terapia farmacológica para a PD foi estabelecida em 1961 com a introdução da terapia de substituição dopaminérgica com L-DOPA, molécula precursora de dopamina. Esta é a estratégia clínica padrão desde 1967 (Birkmayer e Hornykiewicz, 2001; Cotzias, 1968). Atualmente, agonistas dopaminérgicos são usados para o tratamento dos estágios iniciais da PD, para prevenção ou retardo do aparecimento dos efeitos colaterais conhecidos da L-DOPA, como o fenômeno *on-off* e as discinesias. Além destes efeitos colaterais, há ainda a diminuição dos efeitos benéficos da L-DOPA com o uso crônico (Gleixner et al., 2004). A L-DOPA pode ser prescrita em combinação com inibidores da sua degradação periférica e intracelular (Feuerstein, 2001). Drogas bloqueadoras dos receptores NMDA exercem uma influência funcionalmente sinérgica com a L-DOPA. A influência positiva contra a citotoxicidade externa desempenha um papel relevante no tratamento da PD, porém os mecanismos moleculares exatos ainda permanecem obscuros.

O tratamento da PD inclui terapia física para treinamento da função motora, estabilidade motora e compensação de déficits motores assim como psicoterapia (Gleixner et al., 2004).

O tratamento neurocirúrgico para PD foi primeiramente desenvolvido em 1930 sendo baseado na ablação do córtex motor ou de parte do sistema dos BG, entretanto, taxas significativas de eficácia não foram alcançadas. Poucas décadas depois, baseado na experiência adquirida com a cirurgia, nos experimentos animais utilizando o modelo de MPTP e nos resultados obtidos através do tratamento com L-DOPA, foram desenvolvidos procedimentos ablativos (como a talamotomia e a palidotomia) e não-ablativos (como a estimulação cerebral profunda). Ambas as

técnicas foram desenvolvidas primariamente a fim de controlar as disfunções motoras em pacientes selecionados com PD idiopática (Walter e Vitek, 2004).

Outra modalidade cirúrgica inclui terapia celular restaurativa através de transplante intraestriatal de células embrionárias provenientes do VM. Ensaios clínicos estão sendo feitos desde 1987. Ensaios clínicos nos quais um pequeno grupo de pacientes recebem o tratamento com o transplante de células, porém sem o uso de nenhum grupo controle ou de nenhum processo de cegamento, foram realizados em centros norte-americanos e europeus. Estes ensaios clínicos iniciais forneceram dados convincentes de que neurônios embrionários nigrais humanos retirados quando há o início da expressão do fenótipo dopaminérgico, são capazes de sobreviver, integrar-se e funcionar por um longo período de tempo no cérebro humano. Análise detalhada em pacientes transplantados forneceu evidências de que as células transplantadas reinervaram o *striatum* receptor, liberaram dopamina e promoveram melhora significativa na função motora. Em alguns pacientes a melhora foi mantida por mais de dez anos. No entanto, a interpretação dos resultados obtidos nestes estudos foi questionada pois o efeito placebo pode ser proeminente na PD. Como consequência, em 1993 dois estudos placebo controlados e duplo cegos foram iniciados pela NIH (*National Institute of Health*). Nestes estudos havia um grupo controle, o qual era submetido a cirurgia, mas não recebia o transplante de células dopaminérgicas e o protocolo era duplo cego. O resultado destes estudos foi desapontador, mas importante, ao fornecer as primeiras observações de alguma melhora promovida pelo transplante, claramente distingüível do efeito placebo. No ensaio clínico de Denver-Columbia, a recuperação funcional no grupo transplantado não atingiu nível de significância estatística na parte motora da escala UPDRS avaliado 12 meses após a cirurgia. Interessantemente, o grupo de pacientes mais jovens, com idade inferior a 60 anos, apresentou melhora significativa. No ensaio

clínico de Tampa-Mount Sinai, também não foi encontrado diferença no desempenho motor avaliado pela escala UPDRS, 24 meses após a cirurgia (Winkler et al., 2005). Com base nestes dados conclui-se que a terapia de restituição neuronal através do transplante de células embrionárias dopaminérgicas ainda permanece amplamente heterogênea, e por este motivo, existe a necessidade de pesquisa adicional para padronização da técnica de transplante e seleção adequada dos pacientes que se beneficiarão com a técnica. Apesar destes resultados desanimadores, a substituição celular permanece uma técnica promissora para o tratamento futuro da PD. Estudos em cultura celular e em modelos animais podem auxiliar na melhor compreensão das interações existentes entre as células transplantadas e o hospedeiro e também da integração funcional das células dopaminérgicas no *striatum* doente antes que maior aplicação clínica possa ser realizada.

1.3 MODELOS ANIMAIS DA PD

1.3.1 BENEFÍCIOS E FARDOS DOS MODELOS ANIMAIS.

Conhecida como a “teoria geral dos modelos” e publicada por Stachowiak em 1973, um modelo precisa preencher três critérios principais: (1) representação de uma imagem da realidade, (2) redução da realidade aos pontos relevantes e (3) pragmatismo para uso experimental. Quanto maior a redução aos pontos relevantes que um modelo tolera, menor a acurácia com que imita a realidade, mas maior o pragmatismo para uso experimental. Deste modo, modelos animais para doenças neurodegenerativas fornecem uma opção importante para a investigação de certos aspectos definidos de uma patologia específica utilizando um *setting* pragmático e

padrão. Através da aquisição de conhecimentos mais profundos a respeito de processos patogênicos moleculares, influência do fator genético, rede anatômica envolvida na patogênese da doença e correlação existente entre melhora clínica em humanos e em modelos animais, estes modelos podem evoluir (por exemplo, uso de modelos em primatas não humanos após resultados em animais menores) ou podem ser transferidos para modelos “*back to reality*” e avaliados em ensaios clínicos controlados em pacientes.

Existem diferentes modelos animais da PD. A depleção de dopamina nos BG pode ser alcançada por axonotomia de aferências provenientes da SN (modelo tradicional). Outras opções são a aplicação sistêmica de MTPT e a aplicação intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Cenci et al., 2002b). Modelos utilizando animais modificados geneticamente, como o modelo de camundongos os quais expressam excesso de α -sinucleína, mostram resultados inconsistentes e problemas quando da comparação com a doença em humanos (Shimohama et al., 2003).

1.3.2 O MODELO ANIMAL DE 6-OHDA PARA A DOENÇA DE PARKINSON

A toxicidade seletiva da 6-OHDA sobre neurônios monoaminérgicos centrais foi primeiramente descrita por Urgerstedt em 1986. Esta substância precisa ser injetada topicamente dentro do sistema dos BG por meio de cirurgia estereotáxica, uma vez que a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (Cenci et al., 2002b). Sendo ativamente absorvida pelos axônios de neurônios dopaminérgicos e após transporte ao corpo celular, a 6-OHDA age por meio de comprometimento metabólico mitocondrial, toxicidade enzimática e *stress oxidativo* (Blum et al., 2001; Olanow, 1993). Por fim, através do uso localizado de 6-OHDA obtêm-se

degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais.

Neste modelo, a 6-OHDA pode ser injetada bilateralmente ou unilateralmente no feixe prosencefálico medial ou diretamente no *striatum*, conduzindo a diferentes modelos de 6-OHDA para PD. A injeção unilateral ou bilateral intra-estriatal de 6-OHDA resulta em uma lesão parcial do sistema dopaminérgico nigro-estriatal. Este modelo, conhecido como “lesão terminal” é análogo a estágios iniciais e/ou intermediários da PD em humanos (Rodter et al., 2000; Roedter et al., 2001). Lesão bilateral do feixe prosencefálico medial resulta em acinesia e déficits sensório-motores graves, incluindo afagia e adipsia. Animais tratados com lesão bilateral do feixe prosencefálico medial necessitam de terapia cuidadosa, incluindo nutrição parenteral total (Ungerstedt, 1971; Dunnett et al., 1983b). O modelo utilizado neste estudo se baseia na injeção unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial direito (lesão completa). Este modelo de hemi-parkinsonismo não é somente mais pragmático do que o modelo bilateral, mas também permite comparação direta dos efeitos da lesão e resultados terapêuticos em cada animal pela comparação dos dois hemisférios. Este é o modelo mais freqüentemente usado e mimetiza vários dos sintomas clínicos apresentados pelos pacientes com PD (Cenci et al., 2002b). Após quatro a seis semanas da injeção de 6-OHDA, a lesão do feixe prosencefálico medial resulta em uma depleção grave das células dopaminérgicas na SNc (Schmidt et al., 1982), levando a uma depleção de dopamina no striatum ipsilateral superior à 97% (Schmidt et al., 1983; Kirik et al., 1998). Esta intensa depleção dopaminérgica não pode ser espontaneamente recuperada nem parcialmente compensada pelo lado contralateral à lesão (Nikkhah e Brandis, 1995). Após esta depleção dopaminérgica, o sistema nigroestriatal afetado exibe várias alterações funcionais e estruturais. Há uma hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos remanescentes por um aumento reativo dos receptores dopaminérgicos pós-

sinápticos estriatais (receptores D2) (Creese et al., 1997), e mudanças adicionais nas vias colinérgicas, gabaérgicas e glutamatérgicas, além de alterações no metabolismo de neuropeptídeos e na atividade elétrica cerebral (Schwartzing e Huston, 1996). Como resultado do desbalanço do sistema nigro-estriatal, os animais apresentam déficits sensorio-motores unilaterais, os quais podem ser avaliados por testes comportamentais.

Após a lesão com 6-OHDA os animais exibem uma tendência à rodar em sentido ao hemisfério lesionado ao caminhar (Ungerstedt e Arbuthnott, 1970). Este comportamento pode ser reforçado pelo *stress* e, em particular, durante as rotações induzidas por anfetamina. Com a injeção intra-peritoneal de anfetamina, ocorre liberação de dopamina e inibição da sua recaptação no hemisfério intacto, resultando em rotação na sentido ipsilateral à lesão (Ungerstedt e Arbuthnott, 1970). A duração deste efeito é superior à 90 minutos e tem uma intensidade entre seis e 25 rotações completas por minuto. Em contrapartida, a hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no *striatum* depletado pode ser avaliada pela aplicação de doses baixas de agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina (agonista dos receptores D1/D2). Dada em dosagem na qual não causa nenhum efeito clínico no *striatum* saudável, mas age no receptores dopaminérgicos pós-sinápticos hipersensibilizados induzindo rotação em sentido contra-lateral à lesão (Creese et al., 1997; Marshall Ungerstedt, 1977; Dunnett e Robbins, 1992). Este efeito tem duração de cerca de 40 minutos com intensidade de mais de quatro rotações completas por minuto. Publicado por Hudson em 1993, o grau de depleção dopaminérgica se correlaciona com este comportamento rotacional. Rotação contra-lateral significativa após injeção de apomorfina somente é percebida após depleção dopaminérgica estriatal superior à 90%. Lesões parciais (75-90%) resultam em rotações moderadas com anfetamina, mas não há rotação com apomorfina. Uma

lesão superior à 90% pode ser comprovada funcionalmente por uma rotação significativa com apomorfina combinada com uma rotação com anfetamina superior à seis rotações completas por minuto (Hudson et al., 1993). O comportamento rotacional pode ser utilizado como método de avaliação, *in vivo*, de lesão completa por 6-OHDA, utilizando rotômetros. (Ungerstedt e Arbuthnott, 1970). Adicionalmente, a redução das rotações pode ser observada após o transplante de células liberadoras de dopamina. Isto é consequência da produção de dopamina pelas células transplantadas e da diminuição da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos no *striatum* lesionado (Savasta et al., 1992).

Após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial utilizando 6-OHDA, os animais apresentam um significativo déficit unilateral na coordenação e na motricidade fina das duas patas anteriores (Dunnett et al., 1983^a; Dunnett e Iversen, 1982; Whishaw et al., 1986). Em 1990, o teste da escada foi publicado como um método para avaliar, em ratos, a habilidade de agarrar *pellets* (pequenas esferas de ração) com ambos os membros anteriores separadamente (Montoya et al., 1990; Montoya et al., 1991). Neste teste, os animais são colocados individualmente em caixas de acrílico para avaliar sua capacidade de alcançar, agarrar e comer *pellets* com ambos os membros anteriores individualmente. Seguindo-se à lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-OHDA, um prejuízo significativo da habilidade de agarrar e comer as *pellets* pode ser observada na pata anterior contralateral ao hemisfério lesionado (Whishaw et al., 1997). Os movimentos finos da pata dianteira em ratos são correlacionados à coordenação dos movimentos da extremidade superior em pacientes com PD (Whishaw et al., 1992).

1.3.3 TERAPIA CELULAR RESTAURADORA NO MODELO ANIMAL DE 6-OHDA

Métodos iniciais e promissores em direção a uma restauração do sistema nigro-estriatal no modelo animal de 6-OHDA foram publicados em 1979 por Björklund e Stenevi: tecido embrionário proveniente do mesencéfalo ventral transplantado no neocórtex ou no ventrículo de ratos lesionados com 6-OHDA mostraram tanto um crescimento de neurônios dopaminérgicos como integração funcional, avaliada pela redução da rotação induzida por drogas (Bjorklund e Stenevi, 1979; Perlow et al., 1979). Ambos os parâmetros se correlacionaram com a proximidade das células transplantadas com o *striatum* depletado de dopamina. Quanto maior o número de fibras que desenvolveram conexões com o *striatum*, maior o número de células sobreviventes e maior a redução das rotações induzidas por drogas (Bjorklund, 1980). Em 1980, a técnica de neurotransplante experimental de células embrionárias foi padronizada, sendo o mesencéfalo ventral embrionário mecanicamente e enzimaticamente triturado até a obtenção de uma suspensão celular. Esta era então injetada, através de procedimento estereotáxico, no *striatum* depletado de dopamina (Bjorklund, et al. 1983a). Os embriões doadores eram dissecados no dia embrionário 14 (E14). Neste estágio, os neurônios do mesencéfalo ventral completam o seu último ciclo mitótico e expressam marcadores dopaminérgicos, mas ainda não há crescimento de dendritos ou axônios. Se dissecados em estágios anteriores, a diferenciação em direção a um fenótipo dopaminérgico estaria diminuído. Em estágios mais avançados, a trituração iria retirar os axônios das células e diminuir sua viabilidade (Voorn et al., 1988; Bjorklund e Stenevi, 1984). Células originárias de tecido doador as quais foram primariamente desenvolvidas para inervar o *striatum* mostraram uma taxa de integração e sobrevivência após transplante estriatal significativamente maior do que tecidos

doadores provenientes de regiões cerebrais que normalmente não apresentam conexões com o esta região cerebral (Abrous et al., 1988).

A eficácia da reconstrução funcional nigroestriatal provou ser dependente: (1) da sobrevivência e crescimento celulares, (2) dos tipos celulares e estágios evolutivos dos tecidos doadores (3) da implantação do transplante no cérebro receptor (4) do estabelecimento de conexões intra-celulares após o transplante e (5) do grau dos déficits motores e comportamentais anteriores ao transplante (Winkler et al., 2000). Apesar de todos os esforços, em estudos anteriores utilizando esta técnica de transplante, a taxa de sobrevivência das células transplantadas não excedeu 5% (Brundin e Bjorklund, 1987), o nível de dopamina no hemisfério transplantado atingiu somente 10-30% se comparado ao lado contralateral saudável (Schmidt et al., 1983; Rioux et al., 1991), o crescimento das fibras das células dopaminérgicas transplantadas foi limitada à 1-2 mm de distância (Bjorklund et al., 1983a; Doucet et al., 1990) e a densidade média das fibras dos neurônios transplantados não excedeu 40% quando comparado ao hemisfério saudável (Doucet et al., 1990).

Em 1994, uma técnica de transplante celular modificada melhorou significativamente a sobrevivência e a integração funcional das células do tecido doador, reduziu o trauma mecânico da cirurgia estereotáxica e transformou o transplante neuronal com o uso de suspensão celular proveniente do mesencéfalo ventral embrionário uma técnica *standard*, reproduzível, e sem as vastas variações que existiam anteriormente (Nikkhah et al., 1994b; Nikkhah et al., 1994a). A cânula para transplante (0,5mm) foi conectada a um capilar de vidro com diâmetro de 50µm resultando em um trauma mecânico mínimo durante a injeção das células.

Para conseguir esta redução no diâmetro do tracto a ser injetado, o protocolo de dissecação e trituração das células foi otimizado na direção da preparação de uma suspensão celular homogênea, pois agrupamentos celulares grudariam no capilar de

vidro. Esta técnica, conhecida como microtransplante, alcançou uma sobrevivência de 2,5 a 20,7 vezes maior de células TH positivas, um volume do transplante duas vezes maior e uma densidade de fibras TH positivas nas células transplantadas duas a três vezes maior. O trauma mecânico, o qual pode ser avaliado através da formação de cicatrizes astro-gliais por imunohistoquímica contra *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) provou ser reversível e significativamente menor no grupo microtransplante do que no grupo transplantado com a cânula metálica convencional (Nikkhah et al., 1994b). Adicionalmente, transplante em pequenas regiões cerebrais, como a SN ou em cérebros embrionários ou de ratos neonatais tornou-se possível (Nikkhah et al., 1995^a; Nikkhak et al., 1995b). Os transplantes deste projeto foram realizados segundo o protocolo de microtransplante.

2 OBJETIVOS

A. Avaliar a recuperação funcional após transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas no modelo animal de 6-OHDA utilizando o teste de rotação induzida por apomorfina e anfetamina.

B. Avaliar a recuperação funcional após transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas no modelo animal de 6-OHDA através do teste da escada com duas *pellets* por degrau.

3 MÉTODO

3.1 POPULAÇÃO ANIMAL

Foram utilizadas 33 ratas Sprague-Dawley (do laboratório *Charles River, Sulzfeld*, Alemanha) adultas jovens (2 meses) não gestantes com peso entre 250 e 300 gramas no início do experimento. A utilização destas foi aprovada pelo comitê de ética e estatuto para modelos experimentais em animais da *Uni-Klinik Freiburg*. As ratas foram alojadas em condições padrão da universidade em grupos de cinco ou seis em gaiolas transparentes. O acesso à comida foi limitado à 12 gramas de ração padrão do laboratório (*Altromin, Lage*, Alemanha) por rata durante os períodos do estudo nos quais foram realizados testes com alimentos. Nos outros períodos, o acesso à alimentação foi *ad libitum*. O acesso à água não foi restrito em nenhum momento, sendo este *ad libitum* durante todo o período do experimento. As ratas foram pesadas semanalmente para assegurar a manutenção de um mínimo de 90% do seu peso inicial e foram submetidas à um ciclo circadiano alternando doze horas com luz (diurno) e doze horas sem luz (noturno). Todos os experimentos foram realizados em mesmo horário e durante o ciclo diurno. Optou-se por este número de animais a fim de se validar os resultados obtidos considerando as possíveis diferenças de resposta inerentes a cada indivíduo e levando-se em conta que habitualmente existe uma parcela de animais que não completa o processo. Este número permite comparações estatísticas com nível de significância adequado ($p < 0,05$).

Critérios de inclusão:

- Ratas Sprague-Dawley fêmeas adultas jovens não gestantes
- Peso entre 250e 300 gramos no início do experimento.
- Lesão adequada comprovada pelo teste de rotação induzida por apomorfina e por anfetamina realizados duas semanas e quatro semanas após a lesão com 6-OHDA.

Critérios de exclusão:

- Perda ponderal superior a 10% do peso inicial.
- Ausência de lesão adequada comprovada pelos testes de rotação induzida por apomorfina e por anfetamina realizados duas semanas e quatro semanas após a lesão com 6-OHDA.

3.2 SUBDIVISÃO EM GRUPOS

Do total de 33 ratas existentes no início do estudo, cinco animais foram randomicamente selecionados para comporem o grupo controle (cx). As 28 ratas restantes foram lesionadas no feixe prosencefálico medial direito, e seis foram excluídas do estudo por serem consideradas mal lesionadas pelo critério de rotação induzida por drogas. Metade das ratas lesionadas foram submetidas ao transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas. Portanto, no final do estudo, 11 ratas haviam sido lesionadas e compunham o grupo lesão (lx) e 11 ratas foram lesionadas e transplantadas compondo o grupo transplante (tx).

Duas semanas após a lesão, todas as ratas foram submetidas ao teste de rotação induzida por apomorfina e dois dias após, ao teste de rotação induzida por anfetamina. As ratas que não foram consideradas como adequadamente lesionadas

pelos critérios do estudo (mais do que quatro rotações por minuto contralaterais à lesão após injeção subcutânea de apomorfina e mais do que seis rotações por minuto ipsilateralmente à lesão após injeção intraperitoneal de anfetamina) foram novamente lesionadas. Quatro semanas após a primeira lesão o teste de rotação induzido por drogas foi novamente realizado. Nesta ocasião, as ratas consideradas bem lesionadas, utilizando-se os critérios acima mencionados, foram selecionadas para permanecerem no experimento e os animais que não obtiveram a performance desejada foram excluídos do estudo.

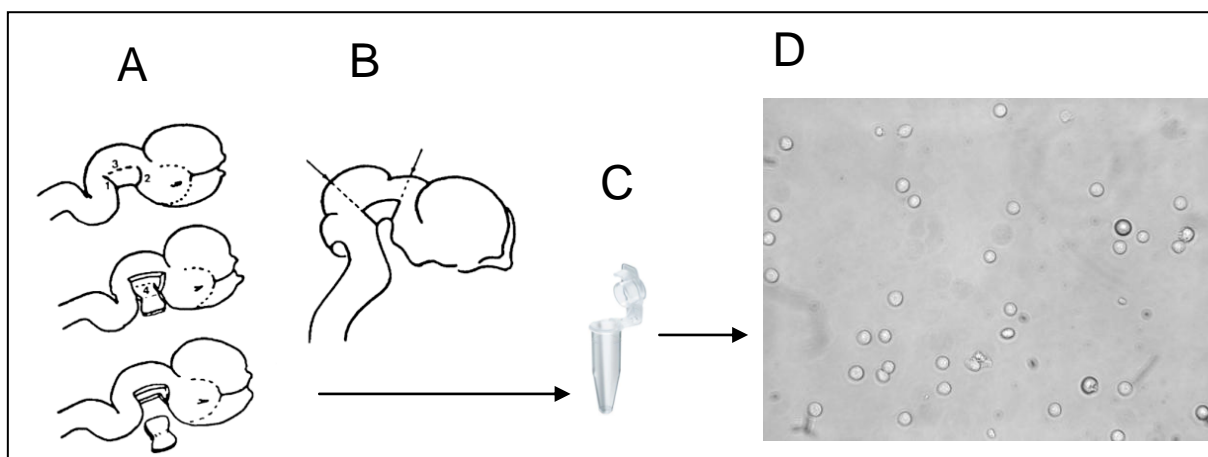
Sete semanas após a primeira lesão metade dos animais bem lesionados foi randomicamente selecionado para receber o transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas provenientes do VM no *striatum* direito.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.3.1 DISSECÇÃO DO MESENCÉFALO VENTRAL DE EMBRIÕES E PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR ÚNICA

Embriões no E14, isto é 14 dias após a fecundação, medindo entre 10,5 e 11,5 mm foram retirados de ratas *Sprague Dawley* grávidas obtidas do Laboratório *Charles River, Suchfeld*, Alemanha, e o VM do embrião foi dissecado. Neste estágio evolutivo os embriões atingiram o estágio 16 de *Carnegie*. Na figura 1 observa-se um desenho esquemático da dissecção e preparação do VM embrionário até a obtenção da suspensão celular única.

Figura 1 Esquema da dissecação do VM de embriões E14 e figura da suspensão celular única.



A) CNS embrionário, B) esquema de dissecação do mesencéfalo ventral, C) digestão enzimática e trituração mecânica, D) suspensão celular única. Fonte: Dados do estudo.

As ratas grávidas foram anestesiadas através de injeção intraperitoneal de Ketamina 10% (0,1 ml/kg; *Essex, München, Alemanha*) e Xilazina (*Rompum®*, 2%, 0,01ml/kg; *Bayer, Leverkusen, Alemanha*) e após incisão do abdômen, o útero foi retirado e lavado com PBS (*phosphate buffered saline*) estéril. Subseqüentemente, os embriões foram retirados do útero e mantidos em HBSS (*Hank's balanced salt solution*) (*Gibco, Invitrogen, Alemanha*). Os mesencéfalos ventrais dos embriões foram microscopicamente dissecados e preservados em tubos *Eppendorf* de 0,5 ml contendo 0,1% DNase diluída em HBSS. O agrupamento de mesencéfalos ventrais foi então incubado em 0,1% tripsina e 0,05% DNase por 20 minutos à 37°C. Na seqüência, a suspensão foi lavada quatro vezes em 0,05% DNase diluída em HBSS. Após remoção do sobrenadante, o tecido foi mecanicamente triturado utilizando-se pontas de pipeta de 1000µl e 200µl polidas à fogo. A suspensão celular única resultante foi ajustada para uma concentração entre 110.000 e 120.000 células/µl e uma viabilidade entre 96 à 98%.

3.3.2 ANESTESIA E PREPARAÇÃO DO ANIMAL

A anestesia das ratas foi realizada através da injeção intraperitoneal de Ketamina 10% (0,1 ml/kg; *Essex, München, Alemanha*) e Xilazina (*Rompum®*, 2%, 0,01ml/kg; *Bayer, Leverkusen, Alemanha*). O sítio cirúrgico foi tricotomizado (aparelho de barbear da empresa *Braun, Alemanha*) e lavado com iodo alcoólico (*Mundipharma, Alemanha*). A córnea foi protegida pela aplicação de pomada ocular (*Bepanthen eye ointment*, da empresa *Roche, Alemanha*). Subseqüentemente, os animais foram fixados no *frame* estereotáxico (*Stoelting, frame estereotáxico número 51600, Stoelting, Estados Unidos da América*) e foi realizada a incisão longitudinal de 2 cm para exposição do crânio, e do bregma como marco anatômico. Nas coordenadas apropriadas (tabela 1) foram realizados orifícios de 1-2 mm utilizando *Microdrill (Proxxon Micromot 40, da empresa Proxxon, Alemanha)* sem lesar a dura-máter. Após o procedimento a pele foi suturada com cliques cirúrgicos e novamente lavada com iodo.

Tabela 1 Coordenadas estereotáxicas da lesão e do transplante no modelo animal de 6-ODHA.

Procedimento cirúrgico	Barra de dentes	de Antero-posterior	Lateral	Dorso-ventral
Lesão	+3,4 // -2,3	-4 // -4,4	-0,8 // -1,2	-8 // -7,8
Transplante	0 // 0	+1 // +1	-2,5 // -3,3	-5 // -4

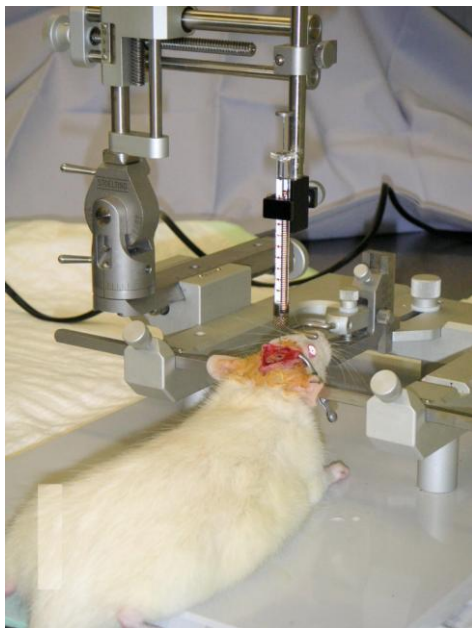
Fonte: Dados do estudo.

3.3.3 LESÃO DO FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL DIREITO

Todas as ratas, excetuando-se o grupo controle, receberam lesão unilateral completa da via dopaminérgica nigroestriatal através da injeção de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial direito em dois tractos (Figura 2). Os tractos utilizados seguem as coordenadas estereotáxicas mencionadas na tabela 1. O primeiro tracto foi realizado ajustando-se as coordenadas do *frame* estereotáxico para +3,4 na barra de dentes, -4 no sentido antero-posterior, -0,8 na barra lateral e -8 no sentido dorso-ventral. O segundo tracto foi lesionado de acordo com os mesmos princípios.

Para o procedimento foram utilizadas seringas de *Hamilton (Hamilton microliter syringes, Hamilton Europe, Suíça)* de 10 µl acopladas a agulhas de aço de 26 *Gauge*. No total, os animais receberam a quantidade de 5.5 µl da solução à 0,36% de 6-OHDA (preparo da solução: 3,6 mg de 6-hidroxidopamina-hidroclorido e 0,1 µg de ácido ascórbico dissolvidos em 1 ml de solução salina isotônica estéril) (ácido ascórbico da empresa *Merk*, Alemanha e 6-hidroxidopamina-hidroclorido da empresa *Sigma*, Estados Unidos da América). A velocidade de injeção empregada foi de 2 µl/min. Antes de ser retirada, a cânula foi mantida em posição por três minutos. Para prevenir oxidação, a solução de 6-OHDA foi mantida em gelo e protegida da luz e foi repostada a cada segundo animal.

Figura 2 Lesão do feixe prosencefálico medial direito pela injeção 6-OHDA



Fonte: Dados do estudo.

3.3.4 TRANSPLANTE DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS ORIGINÁRIAS DO MESENCÉFALO VENTRAL

Para reduzir o trauma mecânico foi utilizado um capilar de vidro (Universidade de *Freiburg*, Alemanha) com diâmetro de 50 μ m. Este foi conectado à cânula de uma seringa de Hamilton (*Hamilton Europe*, Suíça) de 2 μ l. Após lavar o capilar de vidro com solução acelular foi realizado o transplante de células tronco embrionárias no *striatum* carente de dopamina utilizando-se dois tractos e dois depósitos em cada tracto (vide tabela 1). Cada depósito recebeu 1 μ l da suspensão celular única, a qual tinha a concentração de 110.000 à 120.000 células/ μ l, resultando num total de 440.000 à 480.000 células transplantadas por *striatum*. A viabilidade das células na suspensão celular era entre 96-98%. Após injeção da suspensão celular, o capilar foi mantido em posição por 3 minutos antes de sua lenta retirada. Este processo foi repetido para cada tracto. Após retirada, a seringa foi novamente lavada com

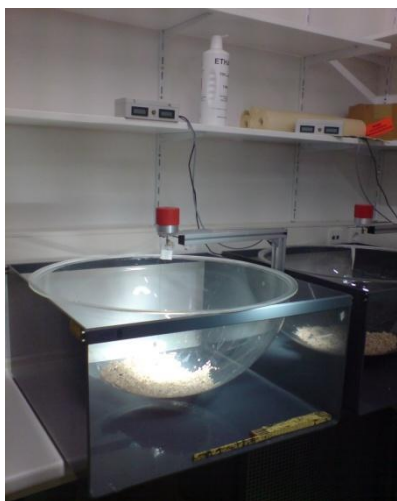
solução acelular.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.

Os efeitos da lesão e do transplante foram avaliados por meio de rotação induzida por drogas duas e quatro semanas após a lesão e duas e quatro semanas após o transplante. Os animais foram individualmente colocados em caixas de superfície côncava (figura 3) de acordo com o trabalho de Ungerstedt e Arbuthnott, 1970.

Figura 3 Caixa em formato côncavo para a realização do teste de rotação induzida por drogas.



Fonte: Dados do estudo.

Um arreio consistindo de um elástico foi ajustado sobre o tórax imediatamente posterior à pata dianteira do animal. O elástico foi ajustado de modo confortável a fim de não restringir os movimentos ou perturbar o rato (figura 4).

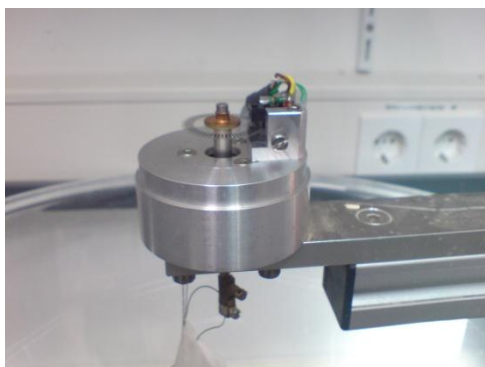
Figura 4 Animal colocado na caixa e conectado ao rotômetro



Fonte: Dados do estudo.

Um fio de aço de 0,4mm de diâmetro é preso tanto ao elástico que envolve o animal quanto a base, conectando ambos. Na base há um sistema composto de rolamentos o qual reage a cada rotação completa do animal. O sistema de rolamentos está posicionado no centro geométrico da esfera (figura 5).

Figura 5 Base do rotômetro, demonstrando o sistema de rolamentos, o qual está conectado ao computador para análise dos dados.



Fonte: Dados do estudo.

Este desenho não restringe os movimentos do animal e previne que o fio que o conecta à base seja demasiadamente esticado. Oito animais realizam o teste

simultaneamente em caixas diferentes. A base composta pelos rolamentos é chamada de rotômetro (Universidade de *Hannover*, Alemanha). Os dados obtidos pelo rotômetro são enviados ao sistema de análise, *Rotation behavior analysis software* (Universidade de *Hannover*, Alemanha), no qual as rotações completas por minuto (eixo y) são plotadas contra tempo (eixo x). As rotações completas para a esquerda foram plotadas como valores negativos no eixo y e as rotações completas para a direita como valores positivos no eixo y.

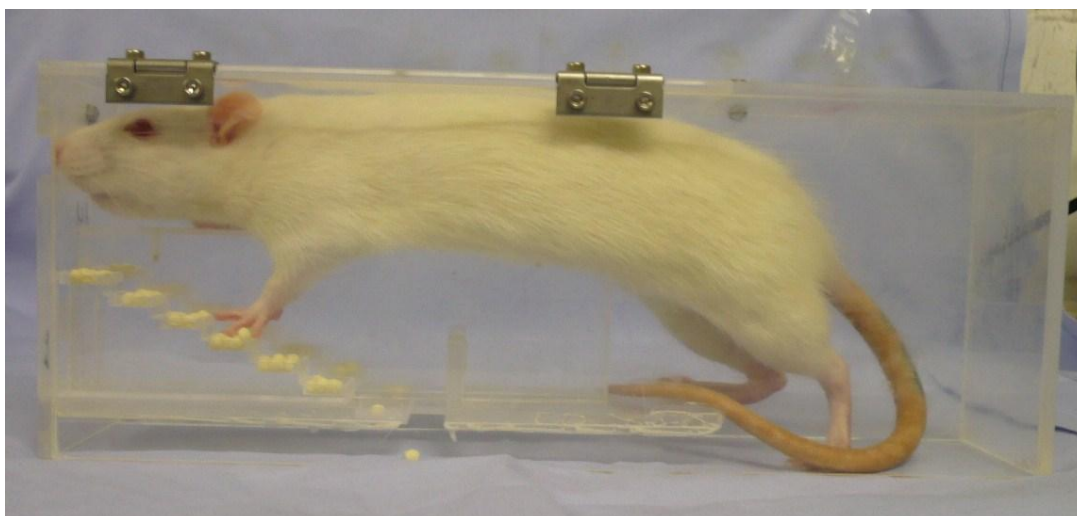
A solução de apomorfina (*Sigma*, Estados Unidos da América) à 0,05% foi preparada da seguinte maneira: 0,5 mg de hidrocloreto de apomorfina e 2 mg de ácido ascórbico foram dissolvidos para cada ml de solução salina isotônica estéril. A solução foi mantida à 4°C no escuro até completa utilização para evitar oxidação. Após conexão do animal ao sistema de análise, a solução foi injetada subcutaneamente na região dorsal do pescoço do animal na dose de 0,05 mg/kg. O comportamento rotacional após a injeção foi documentado por 40 minutos. O valor de corte para considerar o animal como adequadamente lesionado foi de quatro rotações completas para a esquerda por minuto. Somente os animais que apresentaram quatro ou mais rotações para a esquerda por minuto foram transplantados. Após dois dias de recuperação, foi realizado o teste de rotação induzida por anfetamina à 0,25%. A solução de anfetamina foi preparada do seguinte modo: cada 2,5 mg de sulfato de D-anfetamina (da empresa *Sigma*, Estados Unidos da América) foi dissolvido em 1ml de solução salina isotônica. Após conexão do animal ao sistema de análise, a solução foi injetada intraperitonealmente na dose de 2,5 mg/kg e o padrão rotacional foi gravado por 90 minutos. O valor de corte para lesão completa foi de 6 rotações completas para a direita por minuto. Animais que apresentaram menos rotações não foram transplantados e foram excluídos do estudo.

3.4.2 TESTE DA ESCADA OU *PAW REACHING TEST*

Atividade motora fina da pata dianteira foi investigada através de uma versão modificada do teste da escada originalmente descrito por *Montoya et al.* em 1990. Este teste foi desenvolvido para avaliar cada membro anterior independentemente nas atividades motoras finas de alcançar e agarrar e comer *pellets* (*Campdem Instruments*, Reino Unido). As *pellets* utilizadas são esferas ração de 45mg cada, insípidas.

O aparato para realização do teste foi produzido na Universidade de *Hannover*, Alemanha e consiste de uma caixa de acrílico de 290mm de comprimento, 60mm de largura e 110mm de altura com uma plataforma central de 160mm de comprimento, 20mm de largura e 50mm de altura na sua parte frontal (figura 6). Uma escada dupla removível com seis degraus em cada lado os quais aumentam de distância progressivamente em relação à parte superior da plataforma pode ser inserida no espaço de 20mm de cada lado entre a plataforma e a parede da caixa. A profundidade de cada degrau é de 3mm e foi desenhada a fim de poder acomodar 10 *pellets* de 45mg cada em cada degrau. Para impedir que os animais arrastem as *pellets* pela parede da plataforma e as alcancem com a língua, um ressalto de 35mm de largura foi montado no topo da plataforma ultrapassando-a em 7,5mm em cada lado.

Figura 6 Animal colocado na caixa de *paw reaching* modificada utilizada neste experimento



Fonte: Dados do estudo.

Este aparato é diferente do usado por *Montoya et al.* em 1990, o qual consistia de uma caixa de acrílico com 285mm de comprimento, 90mm de altura e 60mm de largura. Uma plataforma de 21mm de largura foi colocada na parte central da caixa ocupando dois terços do seu comprimento. A superfície superior da plataforma é coberta por uma tampa de 27mm de comprimento, a qual ultrapassa os limites superiores da plataforma. Uma escada dupla removível com seis degraus pode ser colocada no espaço entre a plataforma e a parede da caixa. Cada degrau contém uma concavidade de 3mm de profundidade a fim de colocar uma ou mais *pellets*.

Todos os animais foram treinados diariamente por 22 dias nas caixas de *paw reaching* (Universidade de *Hannover*, Alemanha) antes de serem lesionados. Para o treinamento, todos os degraus da escada foram banhados com oito *pellets* por degrau, bilateralmente (*Campdem Instruments*, Reino Unido) (figura 7). Os animais permaneciam na caixa por 15 minutos.

Figura 7 Oito *pellets* por degrau colocadas bilateralmente durante a fase de treinamento



Fonte: Dados do estudo.

O teste da escada também foi utilizado para a avaliação da recuperação da motricidade fina do animal entre cinco a dez semanas após o transplante. Para tal, todos os degraus da escada foram banhados com duas *pellets* bilateralmente. Neste período, todos os animais foram mantidos em dieta de 12 gramas de ração padrão do laboratório por dia e foram submetidos ao teste diariamente sempre no período da manhã. Os animais foram colocados individualmente nas caixas de acrílico e tinham um tempo de 15 minutos para realizar a tarefa, após o qual eram retirados da caixa. Importante salientar que o desenho da caixa permite que o animal agarre as *pellets* do lado direito exclusivamente com a pata dianteira direita, o mesmo acontecendo com o lado esquerdo. Este teste permite, portanto a avaliação da motricidade fina de ambas as patas dianteiras independentemente. Após retirados da caixa, as *pellets* restantes em cada degrau foram contadas e os dados obtidos anotados em tabela apropriada. Posteriormente, foram calculadas as *pellets* comidas, movidas e a taxa de sucesso. O número de *pellets* comidas representa o número de *pellets* que o animal alcançou, agarrou, levou até a boca e comeu. O número de *pellets* movidas representa o número de *pellets* que o rato comeu somadas ao número de *pellets* que o animal alcançou e moveu de degrau. A taxa de sucesso é definida como a razão entre as *pellets* movidas e as *pellets* comidas.

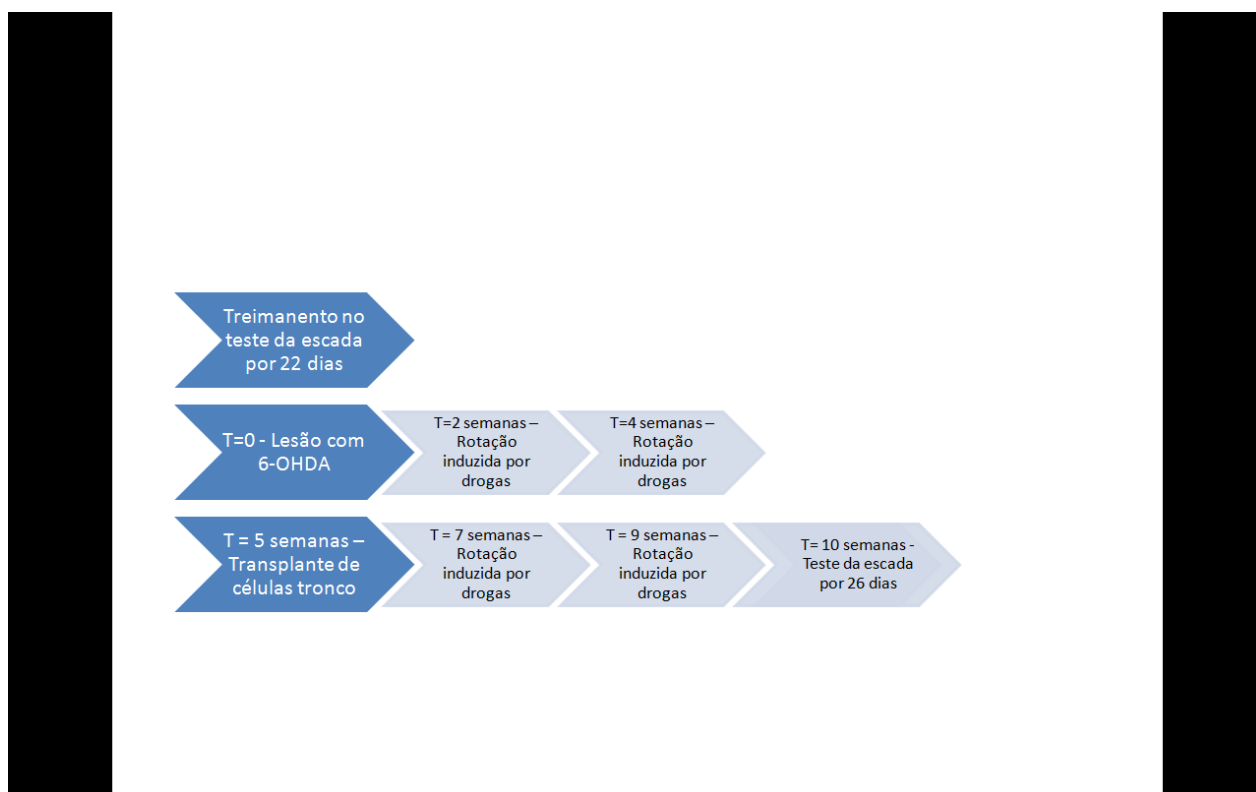
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do *software Statview (StatView data analysis and representation system, Abacus, Estados Unidos da América)* usando o *one-way ANOVA (Analysis of Variance)*. Como teste *post-hoc* foi utilizado o teste o teste de *Fisher PLSD (Protected Least Significant Difference)*. A hipótese nula (H_0), isto é, as médias de todos os grupos são as mesmas, foi testada por meio do *one-way ANOVA*. Se a hipótese H_0 pudesse ser rejeitada, o teste de *Fisher PLSD* foi aplicado para definir quais médias diferiam estatisticamente. O teste de *Fisher PLSD* foi usado visto que este é um teste mais liberal, e portanto, mais suscetível ao erro tipo 1, isto é, rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira. Este teste deve ser usado quando o objetivo é analisar se algum dos grupos teve uma melhora com o tratamento, visto que, neste cenário, é melhor não perder um possível efeito benéfico. O nível de significância considerado foi de 0,05. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EP). Para confecção dos gráficos foi utilizado o programa *OriginLab* (da empresa *OriginLab Corporation, Northampton, Estados Unidos da América*).

3.6 CRONOGRAMA DO ESTUDO

Abaixo, (figura 8), uma representação esquemática do cronograma do estudo.

Figura 8: Representação esquemática do cronograma do estudo.



Fonte: Dados do estudo.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS REFERENTES À POPULAÇÃO

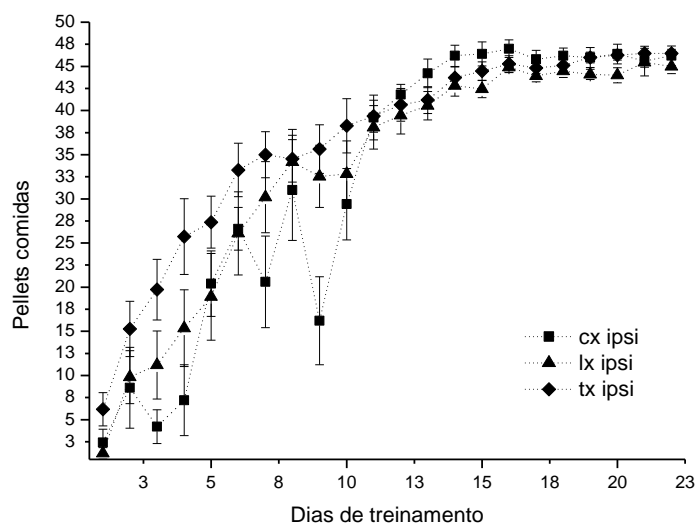
Foram avaliados 33 ratos Sprague-Dawley adultos jovens do sexo feminino. O peso médio das ratas no momento da lesão foi de 261,31 gramas com EP de 2,82. Cinco ratas foram randomicamente selecionadas para comporem o grupo cx. Um total de 28 ratas foram lesionadas e seis delas foram excluídas do estudo por serem

considerados mal lesionadas pelo critério da rotação induzida por drogas. Metade das ratas bem lesionadas (n=11) receberam transplante de células embrionárias dopaminérgicas (n=11). Na ocasião do transplante as ratas tinham um peso médio de 277 gramas com EP de 4,21. Nenhum dos animais foi excluído por perder peso com a dieta e os mesmos tinham dois meses de idade quando submetidos à primeira cirurgia.

4.2 ANÁLISE DO TREINAMENTO NO TESTE DA ESCADA

Anteriormente à lesão, todos os animais receberam treinamento no teste da escada, o qual teve a duração de 22 dias. O objetivo do treinamento é habituar o animal na tarefa a ser realizada para que a aprenda e para que obtenha desempenho máximo antes de ser submetido à cirurgia de lesão do feixe prosencefálico medial direito. No gráfico 1 estão plotados a média por grupo das *pellets* comidas em cada dia durante esta etapa do experimento no lado ipsilateral aos futuros procedimentos. Nesta fase do estudo, ambos os lados da escada foram banhados com oito *pellets* por degrau e todos os degraus foram utilizados, compondo um total de 48 *pellets* em cada lado da escada dupla.

Gráfico 1 Pellets comidas em cada dia durante a fase de treinamento no lado ipsilateral aos futuros procedimentos.

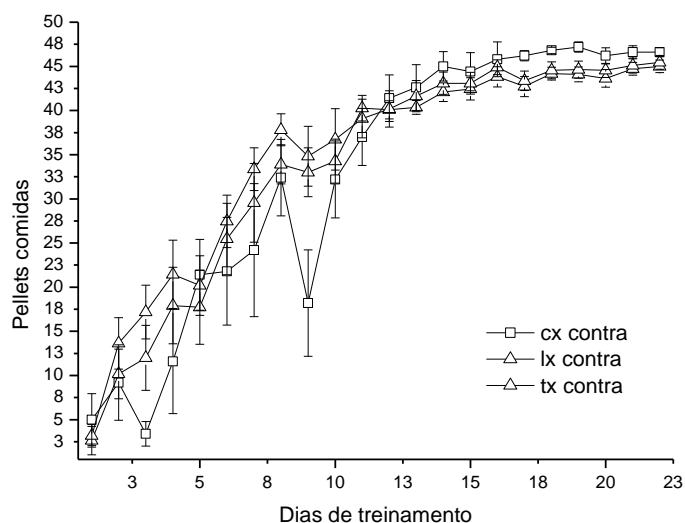


Dados expressos por média e EP

Neste gráfico, observa-se a curva de aprendizado dos animais com relação à pata ipsilateral aos futuros procedimentos. Nota-se que estes adquirem desempenho máximo em média 15 dias após o início do treinamento e atingem um platô nos últimos sete dias indicando que os animais haviam aprendido a tarefa e atingiram seu desempenho máximo.

No gráfico 2 observa-se a média das *pellets* comidas em cada grupo durante todos os dias do treinamento contralateralmente aos futuros procedimentos. Neste gráfico, nota-se a curva de aprendizado dos animais contralateralmente aos futuros procedimentos. Nos últimos sete dias de treinamento os animais atingiram um platô nos qual os dados estavam estáveis.

Gráfico 2 Pellets comidas em cada dia durante a fase de treinamento no lado contralateral aos futuros procedimentos.

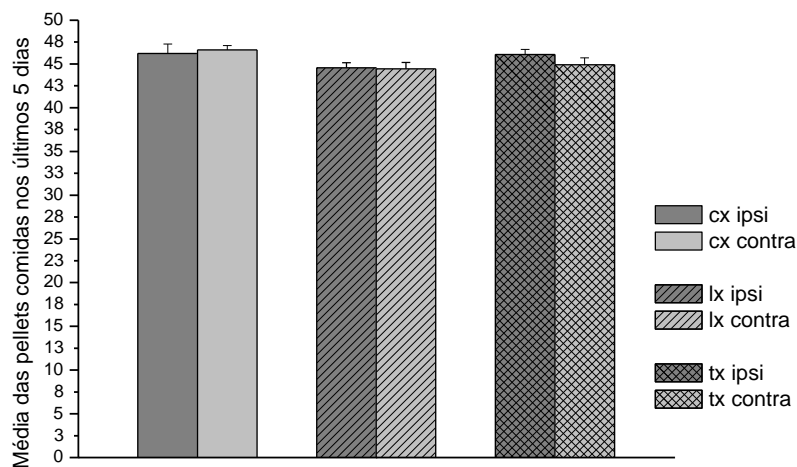


Dados expressos por média e EP

A fim de tornar possível comparações futuras entre os grupos com relação ao déficit motor após a lesão e à recuperação motora após o transplante, há a necessidade da obtenção de grupos homogêneos no desempenho no teste da escada anteriormente à lesão e ao transplante. Para tal, foram analisados os últimos cinco dias do treinamento, pois nesta fase os dados estavam estáveis e os animais haviam adquirido desempenho máximo.

No gráfico 3 observa-se a média das *pellets* comidas nos últimos cinco dias de treinamento, ipsilateral e contralateralmente aos futuros procedimentos. Na análise dos dados, não houve diferença estatística na comparação dos lados ipsi e contralateral aos futuros procedimentos.

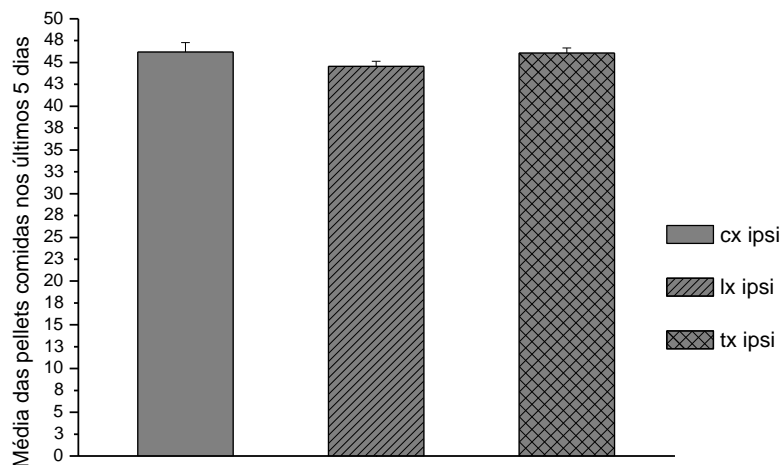
Gráfico 3 *Pellets* comidas nos últimos cinco dias de treinamento, ipsi e contralateral aos futuros procedimentos



Dados expressos por média e EP

No gráfico 4 observa-se a média das *pellets* comidas nos últimos cinco dias de treinamento, ipsilateralmente à futura lesão. Na análise estatística dos dados não houve diferença entre os grupos na comparação das *pellets* comidas nos últimos cinco dias da fase de treinamento ipsilateralmente à futura lesão.

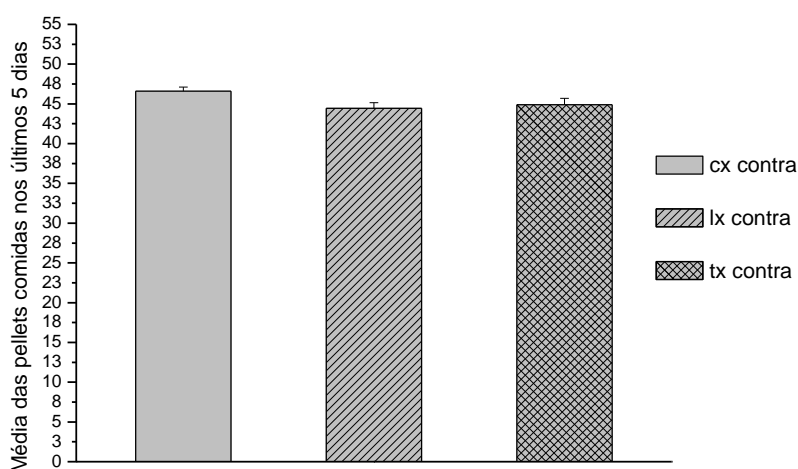
Gráfico 4 *Pellets* comidas nos últimos cinco dias de treinamento ipsilateral aos futuros procedimentos.



Dados expressos por média e EP

No gráfico 5 representa-se a média das *pellets* comidas po grupo nos últimos cinco dias da fase de treinamento no lado contralateral aos futuros procedimentos. A análise estatística dos dados demonstrou que não há diferença significativa entre estes grupos.

Gráfico 5 *Pellets* comidas nos últimos cinco dias de treinamento contralateral aos futuros procedimentos.



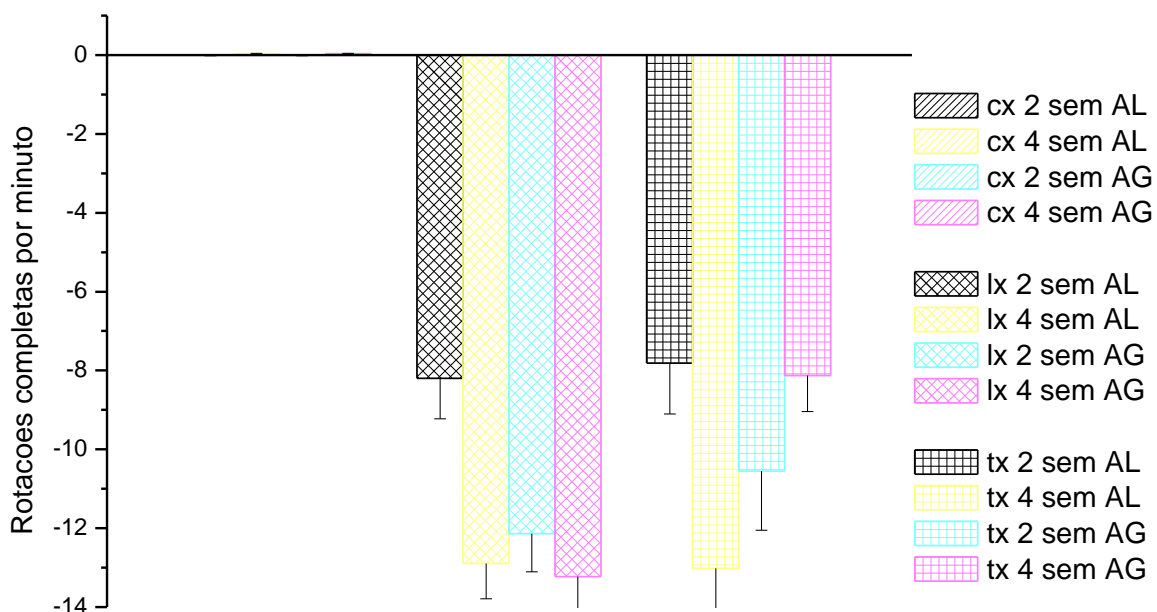
Dados expressos por média e EP

4.3 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO POR DROGAS

O teste de rotação induzida por drogas é um teste bem estabelecido para se avaliar o déficit de dopamina após a lesão e a sua recuperação após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas. Neste projeto, os testes de rotação foram realizados duas e quatro semanas após a lesão e duas e quatro semanas após o transplante. No teste de rotação induzida por drogas, rotação completa para a direita é marcada como números positivos e rotação completa para a esquerda é sinalizada por números negativos.

No gráfico 6 observa-se o comportamento rotacional induzido por apomorfina duas e quatro semanas após a lesão (AL) e duas e quatro semanas após o transplante (AG).

Gráfico 6 Comportamento rotacional induzido por apomorfina após a lesão e após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas.



Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados duas semanas após a lesão, observa-se diferença estatística entre o grupo cx e lx ($p < 0,001$) e cx e tx ($p < 0,001$), mas não entre os grupos lx e tx ($p = 0,79$).

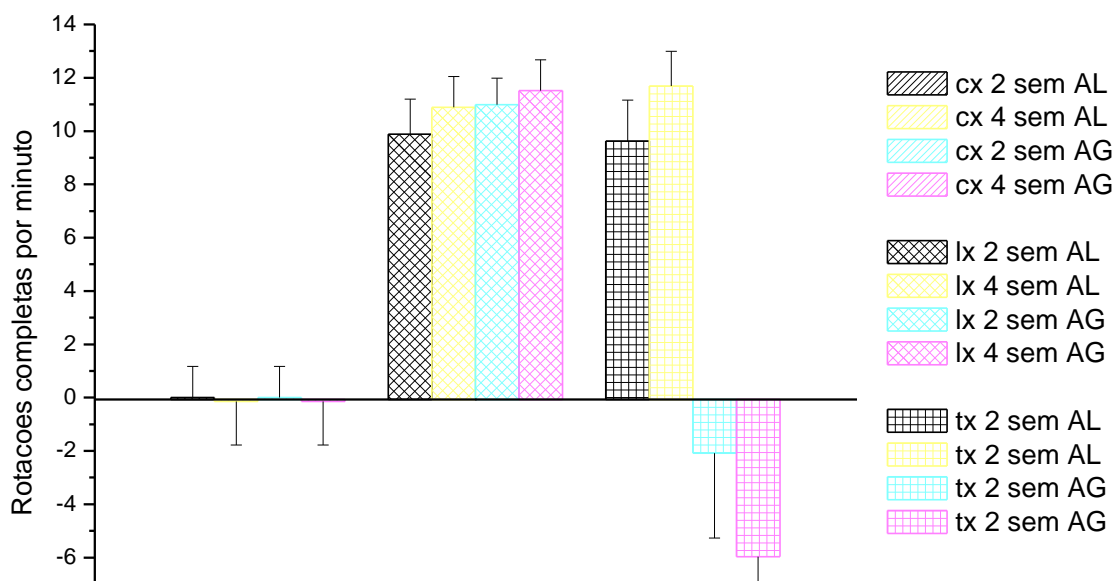
Quatro semanas após a lesão, observa-se que não há diferença estatística significativa entre os grupos lx e tx ($p = 0,72$). Em contrapartida, o grupo cx é significativamente diferente dos grupos lx e tx ($p < 0,001$).

Duas semanas após o transplante (AG) de células tronco, na análise dos dados os grupos lx e tx são estatisticamente semelhantes ($p = 0,26$). Portanto, não se observou o efeito do transplante de células embrionárias dopaminérgicas.

Quatro semanas AG, observou-se diferença estatística entre os grupos lx e tx ($p < 0,001$). Afirma-se portanto que, quatro semanas após o transplante o seu efeito positivo, caracterizado pela redução das rotações após injeção subcutânea de apomorfina, foi observado. Significativamente diferentes são também os grupos os grupos cx e lx e cx e tx (ambos $p < 0,001$).

No gráfico 7 observa-se o comportamento rotacional induzido por anfetamina duas e quatro semanas AL e duas e quatro semanas AG.

Gráfico 7 Comportamento rotacional induzido por anfetamina após a lesão e após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas.



Dados expressos por média e EP

Duas semanas após a lesão, percebe-se que há diferença estatística entre os grupos cx e lx ($p < 0,001$) e cx e tx ($p < 0,001$) mas não entre os grupos lx e tx.

Na análise estatística dos dados quatro semanas após a lesão, conclui-se que os grupos lx e tx são estatisticamente semelhantes. O grupo cx, em contrapartida, é estatisticamente diferente de lx e tx ($p < 0,001$).

Duas semanas após o transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas, os grupos lx e tx apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,001$) e o grupo tx apresentou o fenômeno de *overcompensation*, no qual o sentido da rotação induzida por anfetamina muda de ipsi para contralateral à lesão após o transplante de células dopaminérgicas. Os grupos cx e lx também são estatisticamente diferentes ($p < 0,001$). O grupo cx e tx são estatisticamente semelhantes por esta análise.

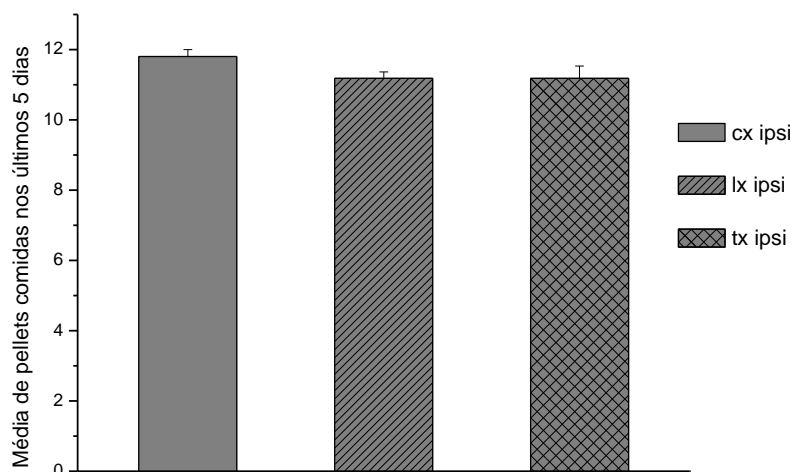
Quatro semanas após o transplante, observa-se que os grupos lx e tx diferem estatisticamente ($p < 0,001$), assim como os grupos cx e lx ($p = 0,008$). Os grupos cx e tx são semelhantes com relação ao comportamento rotacional induzido por anfetamina quatro semanas após o transplante. O efeito positivo do transplante de células embrionárias dopaminérgicas, caracterizado pela redução da amplitude de rotação e pelo fenômeno de *overcompensation*, puderam ser observados no teste de rotação induzida por anfetamina duas e quatro semanas após o transplante.

4.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS NO TESTE DA ESCADA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO

A fim de avaliar o grau recuperação funcional após o transplante, o teste da escada foi realizado novamente cinco semanas após o transplante e continuado por 25 dias. Os dados foram analisados com relação ao número de *pellets* comidas, ao número de *pellets* movidas e à taxa de sucesso.

No gráfico 8 observa-se os dados referentes à média das *pellets* comidas no teste da escada realizado após o transplante nos últimos cinco dias de teste, ipsilateralmente aos procedimentos.

Gráfico 8 *Pellets* comidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado ipsilateral aos procedimentos.

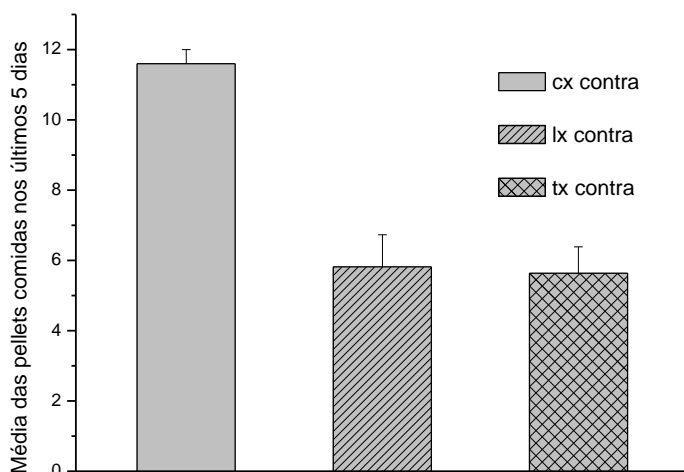


Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados, não há diferença estatística entre nenhum dos grupos. Portanto, neste estudo, nem a lesão, nem o transplante de células embrionárias dopaminérgicas exercem um efeito com relação às *pellets* comidas no teste da escada ipsilateralmente aos procedimentos.

No gráfico 9 vê-se a média das *pellets* comidas no teste da escada nos últimos cinco dias de teste após o transplante, contralateralmente aos procedimentos.

Gráfico 9 *Pellets* comidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado contralateral aos procedimentos

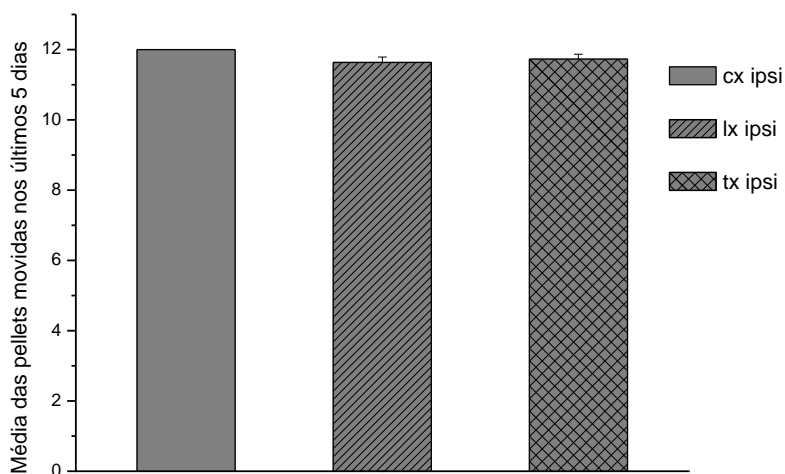


Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados, os grupos lx contra e tx contra são estatisticamente semelhantes. Portanto, o teste da escada não foi capaz de comprovar melhora funcional após o transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas, pela avaliação através das *pellets* comidas. Em contrapartida, há diferença estatística entre os grupos cx contra e lx contra e entre os grupos cx contra e tx contra (ambos $p < 0,001$). Isto demonstra que os efeitos da lesão, mas não do transplante, foram observados no grupo lx contra e no grupo tx contra.

No gráfico 10, observa-se a média de *pellets* movidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, ipsilateralmente aos procedimentos. O parâmetro *pellets* movidas é adequado para avaliar o grau de motivação do animal na realização da tarefa.

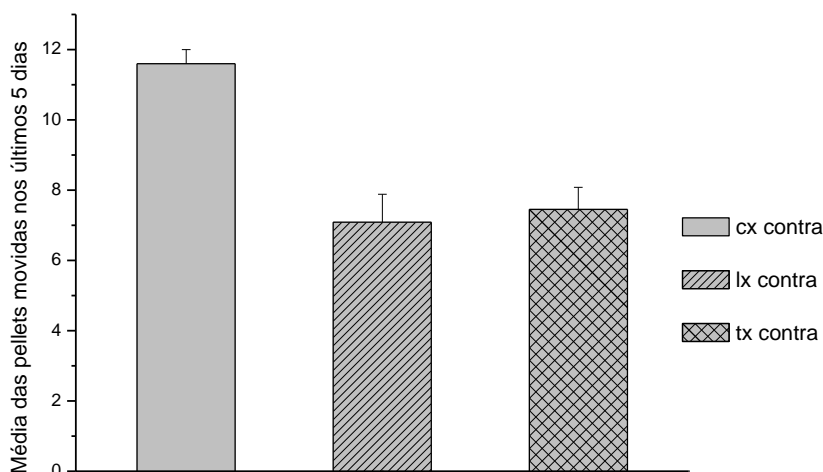
Gráfico 10 *Pellets* movidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, ipsilateralmente aos procedimentos .



Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados, não há diferença estatística entre nenhum dos grupos. Portanto, não se pode observar os efeitos nem da lesão nem do transplante com relação às *pellets* movidas, ipsilateralmente aos procedimentos. No gráfico 11, observa-se os dados referentes às *pellets* movidas no teste da escada após o transplante, contralateralmente aos procedimentos.

Gráfico 11 *Pellets* movidas nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, contralateralmente aos procedimentos.

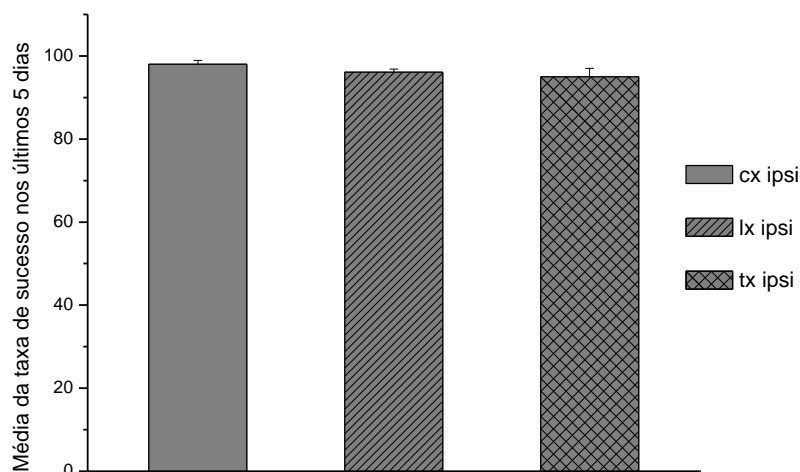


Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados, não se observa diferença estatística entre o grupo lx contra e tx contra. Portanto, não se comprovou um efeito positivo do transplante com relação às *pellets* movidas no teste da escada realizado após o transplante. O grupo cx contra é estatisticamente diferente do grupo lx contra e do tx contra (ambos $p < 0,001$). O efeito da lesão é portanto clara nos grupos lx contra e tx contra, contralateralmente aos procedimentos.

No gráfico 12 observa-se a média da taxa de sucesso, ipsilateralmente à lesão, nos últimos cinco dias de teste. A taxa de sucesso foi calculada como a razão entre as *pellets* comidas sobre movidas. Este valor indica a percentagem de *pellets* movidas que foram efetivamente comidas pelo animal.

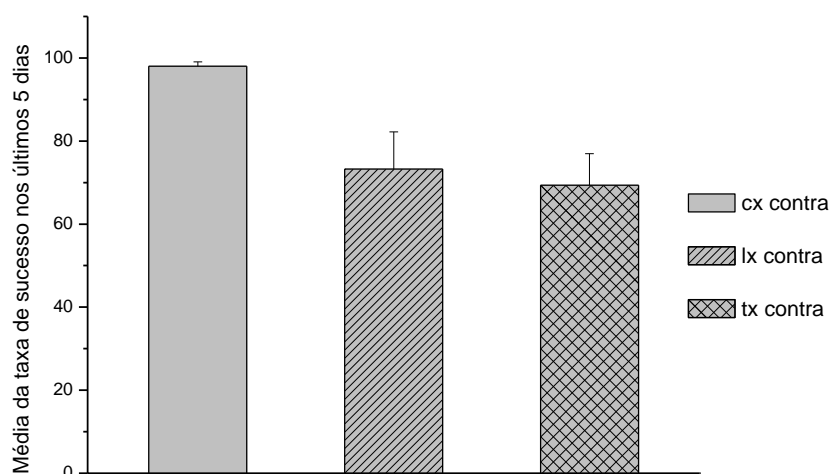
Gráfico 12 Taxa de sucesso nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado ipsilateral aos procedimentos.



Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados, observa-se semelhança estatística entre todos os grupos. Portanto, ipsilateralmente aos procedimentos, não se observou um efeito nem da lesão, nem do transplante. No gráfico 13 observa-se a média da taxa de sucesso obtida nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, contralateralmente à lesão.

Gráfico 13 Taxa de sucesso nos últimos cinco dias de teste da escada após o transplante, lado contralateral aos procedimentos.



Dados expressos por média e EP

Na análise dos dados, não se constata diferença estatística entre os grupos lx contra e tx contra. Os grupos cx contra e lx contra e cx contra e tx contra (ambos $p < 0,001$) são estatisticamente diferentes.

5 DISCUSSÃO

A motricidade fina das extremidades depende de uma neurotransmissão dopaminérgica intacta e está substancialmente prejudicada tanto na PD em humanos, como no modelo de PD que utiliza animais submetidos à lesão unilateral do feixe prosencefálico medial. A terapia de reposição celular, como o transplante intra-estriatal de células embrionárias dopaminérgicas, é capaz de melhorar o desempenho dos animais em tarefas menos elaboradas como a rotação induzida por drogas. Contudo, em que extensão esta terapia pode influenciar a motricidade fina dos membros permanece incerta. Por esta razão, utilizou-se, neste estudo, o teste

da escada associado ao teste de rotação induzida, devido ao fato de aquele ser composto por tarefas motoras mais elaboradas. Pode-se citar como exemplos de atividade motora fina: alcançar, segurar e manipular objetos. Estes movimentos representam, portanto, parâmetro comportamental relevante em estudos sobre degeneração e regeneração do CNS (Nikkhah e Bjorklund, 1993; Nikkhah, 2001; Pisa, 1988; Pisa e Schranz, 1988). Levando isto em consideração, houve o desenvolvimento de outros sistemas para avaliar a motricidade fina do animal. Dentre eles, destacam-se os tubos para alimentação (Rodter, 2000), pequenas aberturas para alimentação (Sabol, 1985), cinturões com movimentação constante (Evenden, 1984) e pressionamento de alavanca para recompensa (MacRae, 1988). Através destes testes é avaliado somente o grau da preferência por uma pata em relação à outra e o desempenho geral bilateral.

O teste da escada foi criado por *Montoya et al.* em 1990, como um teste eficaz para avaliar o efeito de diferentes tipos de lesão cerebral na motricidade fina dos animais. Pela primeira vez, foi possível a mensuração objetiva do desempenho de cada pata dianteira independentemente, sem a necessidade de algum tipo de restrição, como bandagens ou bloqueio neuromuscular, uma vez que as patas dianteiras do animal estão separadas entre si enquanto o corpo repousa sobre a plataforma. Após sua invenção, o teste da escada foi extensivamente empregado em modelos animais de PD e HD para avaliar o comprometimento motor após lesões cerebrais (Abrous, 1993; Rodter, 2000; Rodter, 2001), os efeitos funcionais dos transplantes (Abrous, Torres, 1993; Abrous, 1992; Nikkhah, 1994; Nikkhah, 1993; Nikkhah, 2001; Nikkhah, 1998; Rodter, 2001) e fatores ambientais envolvidos na recuperação funcional (Abrous, 1993; Dobrossy, 2000; Nikkhah, 1994). Outra aplicação do mesmo na neurociência é o estudo da atividade sensório-motora em ratos neonatos submetidos a modelos experimentais de acidente vascular isquêmico

(Tomimatsu, 2002; Biernaskie, 2001) e acidente vascular hemorrágico estriatal (DeBow, 2003).

Na maioria dos estudos, o desempenho dos animais no teste da escada é apresentado como a média das *pellets* comidas e movidas. Os resultados obtidos após transplante de células tronco dopaminérgicas são, entretanto, divergentes. Na Universidade Clínica de *Freiburg* (Alemanha) é observada, no teste da escada, recuperação funcional dos animais após o transplante de células tronco embrionárias dopaminérgicas. Na Universidade de *Cardiff* (Grã-Bretanha), onde o teste da escada foi desenvolvido, menores índices de recuperação funcional são observados após o neurotransplante. Questiona-se se esta diferença é devida à caixa de *paw reaching*, à quantidade de *pellets* utilizadas em cada degrau ou à técnica de transplante utilizada.

Na Universidade de *Cardiff* usa-se de duas a três *pellets* por degrau e na técnica de transplante utiliza-se uma cânula metálica. Já na Universidade Clínica de *Freiburg* utiliza-se de oito a dez *pellets* por degrau e é empregada a técnica de microtransplante com capilar de vidro. Neste trabalho optou-se por utilizar o teste da escada com duas *pellets* por degrau para estudar a influência do número das mesmas no resultado do teste.

5.1 TREINAMENTO NO TESTE DA ESCADA

A realização de movimentos finos de extremidades, como movimentos de alcançar, agarrar e levar a comida até a boca, é avaliada no teste da escada e requer integridade das projeções estriatais neuronais, do sistema dopaminérgico nigroestriatal, e o córtex sensório-motor (Whishaw, 1986). A lesão citotóxica unilateral no *striatum* dorsolateral acarreta prejuízo na motricidade fina na pata

contralateral, o qual permanece estável (Fricker, 1997; Montoya, Dunnett, 1990; Nakao, 1996). Os estudos reportam a ocorrência ocasional de déficit motor na pata ipsilateral associado ao déficit contralateral. (Nakao, 1997). Não está definido se a diferença nos resultados reflete o desenho experimental, ou o grau e a localização da perda neuronal (Fricker, 1997; Nakao, 1997; Pisa, 1988).

Acredita-se que a integridade da circuitaria córtico-estriatal e a diminuição do *input* dopaminérgico ao *striatum* exerçam um papel relevante na motricidade fina de extremidades. A integridade destas vias é necessária para a execução e o aprendizado de novas tarefas, assim como para garantir a estabilidade postural (Montoya, 1990). Em 2003, Fricker-Gates publicou seu trabalho sobre a importância do treinamento no teste da escada realizado antes da lesão cerebral, em um modelo animal de HD. No trabalho é relatado que o grupo que recebeu treinamento apresentou menor variabilidade da média com relação às *pellets* coletadas e que o grupo que não recebeu treinamento apresentou uma demora no aprendizado da tarefa. O treinamento, portanto, promove um padrão resposta mais estável no teste, o que permite uma avaliação mais confiável do déficit motor após a lesão.

Com base neste e em outros estudos, foi optado pela realização do treinamento extensivo dos animais no teste da escada antes do procedimento estereotáxico ablativo. O treinamento teve a duração de 22 dias e, ao final deste período, os animais apresentaram estabilidade com relação às *pellets* comidas. Observou-se também que no teste da escada realizado após a lesão, não houve comprometimento motor da pata ipsilateral, como observado em estudos no qual o treinamento não foi realizado. Este fato corrobora a importância do treinamento dos animais, para que haja menor variabilidade da média com relação às *pellets* comidas. Neste estudo, foi observado também que o desempenho dos animais no teste da escada realizado após a lesão e o transplante retornou rapidamente aos

níveis basais. Isto permite comparações imediatas com relação aos efeitos da lesão e do transplante no desempenho dos animais no teste da escada.

5.2 ROTAÇÕES INDUZIDA POR DROGAS

A lesão do feixe nigroestriatal com 6-OHDA é um modelo de PD freqüentemente utilizado em pesquisas com neurotransplante. Este modelo leva a uma depleção dopaminérgica unilateral quase completa (superior a 95%), induzindo déficits motores (Bjorklund e Gage, 1985; Fawcett et al, 2001; Kelly et al., 1975; Schwarting e Huston, 1996; Annett et al., 1993; Carey, 1986). Esta depleção dopaminérgica se dá, preferencialmente, no corpo estriado e no núcleo *accumbens* ipsilaterais à lesão. A perda dopaminérgica é também observada em outras regiões cerebrais como nos tubérculos olfatórios, na área septal e o no córtex pré-frontal. No *striatum* e no núcleo *accumbens* ocorre o fenômeno de *up-regulation* dos receptores dopaminérgicos, tanto em número quanto em sensibilidade. Diferenças na fisiologia da dopamina entre o *striatum* intacto e o lesionado compõem a base da assimetria observada no teste de rotação induzida por apomorfina e por anfetamina (Torres, 2006). No presente estudo, foi usado o teste de rotação como primeiramente descrito por Ungerstedt e Arbuthnott em 1970, usando uma caixa de assoalho côncavo, a fim de não distrair o animal com o ambiente externo.

A avaliação do comportamento rotacional após a injeção de um agonista dopaminérgico indireto, como a anfetamina constitui a ferramenta mais valiosa para avaliar a eficácia da lesão com 6-OHDA e do transplante de células dopaminérgicas (Torres, 2006). A anfetamina é um agonista dopaminérgico pré-sináptico (indireto) que causa aumento da liberação e redução da recaptação de dopamina, resultando em um aumento da disponibilidade desta substância nos receptores pós-sinápticos.

Em ratos que receberam uma lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-OHDA, há uma deaferentação quase completa de dopamina (depleção entre 95-99%) principalmente no *striatum*, no núcleo *accumbens*. Portanto, nestes animais, o comportamento rotacional induzido por anfetamina pode ser visto como o resultado da ativação do sistema dopaminérgico no hemisfério intacto e da pouca ou não ativação no hemisfério cerebral lesionado. Sobre esta perspectiva, a característica da rotação observada em animais lesionados é a resposta do *striatum* intacto à anfetamina. Em ratos unilateralmente lesionados, a aplicação de anfetamina induz à rotação ipsilateral à lesão na ordem de 6-20 rotações/min. Este efeito pode durar por até duas horas após a administração da droga. O implante de células embrionárias dopaminérgicas provenientes do VM no E14 melhora a assimetria rotacional induzida pela injeção intraperitoneal de anfetamina, produzindo uma redução na amplitude de rotação e classicamente uma resposta de supercompensação. Supercompensação ou *overcompensation* é uma resposta na qual o sentido da rotação muda de ipsilateral para contralateral à lesão, na faixa de até 25 rotações por minuto (Bjorklund et al., 1980; Dunnett et al., 1983). A situação encontrada nos ratos lesionados e transplantados é mais complexa, visto que a anfetamina estimula a liberação de dopamina tanto pelo *striatum* intacto quanto pelas células transplantadas no hemisfério lesionado. A ativação do hemisfério intacto desencadeia uma resposta rotacional no sentido ipsilateral à lesão, enquanto que a ativação das células transplantadas no lado lesionado resulta em rotação no sentido contralateral. Portanto, em um certo ponto, a resposta rotacional observada em animais lesionados e transplantados resultará de diferenças de amplitude das respostas à dopamina em ambos os hemisférios cerebrais (Schwartzing e Huston, 1996; Dunnett et al., 1988b). Acredita-se que a supercompensação da rotação vista em animais lesionados e transplantados é o resultado de uma liberação sub-normal

de dopamina atuando sobre receptores hipersensibilizados no striatum lesionado, levando a uma ativação pós-sináptica maior que o normal. Portanto, liberação de dopamina pelas células transplantadas, mesmo em concentrações sub-normais, induz uma resposta exagerada no hemisfério ipsilateral quando comparado com o hemisfério intacto. A resultante é uma resposta rotacional no sentido contralateral aos procedimentos (Torres, 2006). No presente estudo, o teste de rotação induzida por anfetamina, na dose de 2,5 mg/kg, intraperitoneal, foi realizado duas e quatro semanas após a lesão e duas e quatro semanas após o transplante de células dopaminérgicas. Os resultados encontrados no teste de rotação induzida por anfetamina realizado duas e quatro semanas após a lesão do feixe prosencefálico medial direito claramente apontam para uma depleção dopaminérgica no hemisfério lesionado. Nos ratos transplantados, observa-se neste estudo o fenômeno de supercompensação acima descrito no teste de rotação induzido por anfetamina. Neste teste, duas semanas após o transplante, o grupo tx teve uma média de $-2,08 \pm 3,18$ rotações/min e quatro semanas após o transplante o mesmo grupo obteve uma média de $-5,96 \pm 3,27$ rotações/min. Estes resultados apontam para uma recuperação funcional proporcionada pelas células transplantadas. Esta recuperação é devido à produção de dopamina pelas células transplantadas, aliada à ativação de receptores dopaminérgicos hipersensíveis no lado lesionado. Esta ativação dos receptores no striatum lesionado suplanta a ativação no lado intacto, resultando na rotação contralateral à lesão. Em estudos anteriores ficou comprovado uma correlação existente entre o grau de reinervação estriatal pelo tecido transplantado e a recuperação funcional no teste de rotação por anfetamina (Dunnett et al., 1988a; Yurek e Fletcher-Turner, 2002).

Em ratos lesionados, um *bias* importante no teste de rotação induzido por anfetamina pode ser observado após uma perda de aproximadamente 50% dos

neurônios dopaminérgicos, avaliado por imunohistoquímica com TH. O mesmo não ocorre com apomorfina, agonista dopaminérgico pós-sináptico, o qual induz rotação no sentido contralateral à lesão pela estimulação de receptores D-2 supersensibilizados no striatum denervado (Ungerstedt, 1971). Hipersensibilidade pós-sináptica ocorre somente após eliminação da maioria (aproximadamente 90%) dos neurônios dopaminérgicos na SNc (Hefti, Wurtman, 1980). Com perdas celulares menores, as células restantes na SNc aumentam compensatoriamente a produção de dopamina (Agid, Glowinski, 1973) e, conseqüentemente, os níveis de dopamina endógena extracelular no CPu (*caudate-putamen-unit*) denervado estão mantidos (Castaneda, Robinson, 1990). Estes dois fatos evitam o desenvolvimento de hipersensibilidade. Animais com lesão mais restrita não demonstram assimetria rotacional com apomorfina. No presente estudo, os resultados encontrados no teste de rotação induzida por apomorfina realizado após a lesão, são compatíveis com uma depleção total de dopamina no sistema nigroestriatal. Quatro semanas após o transplante de células dopaminérgicas, ocorreu uma diminuição do *bias* rotacional induzido por apomorfina neste estudo. Isto indica uma diminuição da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos induzida pelo transplante.

5.3 RESULTADOS NO TESTE DA ESCADA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS.

Em modelos animais de PD, já está bem estabelecido que o transplante de células embrionárias dopaminérgicas induz uma recuperação funcional de comportamentos motores simples, como por exemplo, da rotação induzida por drogas (Brundin, 1994), da rotação espontânea e da negligência sensório-motora (Dunnett et al., 1983; Dunnett et al., 1987; Mandel et al. 1990; Nikkhah et al., 1993;

Bjorklund, 1994). Em contraste, comportamentos mais complexos, como por exemplo, motricidade fina das patas dianteiras testado pelo teste da escada, tem-se mostrado mais resistentes à recuperação funcional induzida pelo transplante (Dunnett et al., 1987; Montoya et al., 1990; Mandel et al., 1990; Abrous et al., 1993; Nikkhah et al., 1993). Importante salientar, que o teste da escada permite uma análise quantitativa dos parâmetros estudados, como número de *pellets* comidas, movidas e taxa de sucesso, porém falha na avaliação qualitativa dos movimentos da pata dianteira individualmente, os quais podem ser afetados diferentemente pela lesão e pelo transplante (Kloth et al., 2006). Neste estudo, apesar dos animais transplantados terem obtido recuperação funcional no teste de rotação induzida por drogas, o mesmo não foi observado no teste da escada. A capacidade dos animais de realizar movimentos finos com a pata dianteira avaliada pelo teste da escada não foi melhorada com o transplante, em nenhum dos parâmetros estudados: *pellets* comidas, movidas e taxa de sucesso. O grupo lx apresentou uma redução de aproximadamente 50% no número de *pellets* comidas quando comparados ao grupo cx, contralateralmente à lesão. O grupo tx, não obteve melhora no desempenho no teste da escada quando comparado ao grupo lx, contralateralmente aos procedimentos. Não se observou nenhum deterioramento motor nos ratos lesionados e/ou transplantados no lado ipsilateral à lesão. Este fato é provavelmente devido ao longo período de treinamento empregado. A não recuperação funcional do grupo tx não pode ser explicada pela inviabilidade das células transplantadas, visto que a viabilidade destas foi maior do que 96% quando dissecadas do VM de embriões no E14. Adicionalmente, as células transplantadas exerceram benefícios funcionais em outros testes comportamentais, como a rotação induzida por apomorfina e por anfetamina. Uma explicação, pode ser o fato das células dopaminérgicas terem sido transplantadas em um lugar inapropriado para melhora

da motricidade fina de extremidades. O *striatum* dos mamíferos é organizado topograficamente, de modo que não somente lesões semelhantes em regiões diferentes produzem diferentes padrões de déficits comportamentais (Divac 1967; Dunnett, 1981; Dunnett, 1982), como também o transplante de células tronco dopaminérgicas em diferentes regiões do *striatum* influenciam o padrão de recuperação motora observado (Dunnett, 1985; Dunnett, 1983; Dunnett 1983; Dunnett 1981; Dunnett 1981). Outra hipótese para este resultado seria que níveis maiores de dopamina sejam necessárias para a realização de algumas tarefas, como o uso coordenado das patas dianteiras, por exemplo, do que outras, como a redução das assimetrias no teste de rotação induzida por apomorfina e por anfetamina. Portanto, supõe-se e que o teste da escada seja mais sensível à depleção moderada de dopamina e requeira uma reinervação dopaminérgica mais extensa para exibir recuperação funcional quando comparado ao teste de rotação induzida por drogas. Até então, diversos estudos reportaram recuperação parcial ou completa no teste de rotação induzida por drogas após o transplante de células dopaminérgicas, mas sem melhora nos testes comportamentais sensório-motores espontâneos (Nikkhah et al., 1993; Dunnett et al., 1981; Dunnett et al., 1983; Dunnett et al., 1987; Mandel et al., 1990). Mesmo em transplantes pequenos, a liberação dopaminérgica pelas células transplantadas pode ser suficiente para reduzir ou normalizar a hipersensibilidade dos receptores, desde que o transplante esteja localizado em áreas apropriadas no *striatum*. No caso da rotação induzida por anfetamina, alguns autores reportaram que inervação dopaminérgica estriatal de 3-5% do normal é suficiente para produzir uma compensação completa (Nikkhah et al., 1993; Björklund et al., 1980). No presente estudo, recuperação funcional no teste da escada como parâmetro de comportamento motor complexo não foi alcançado. Publicações anteriores demonstraram que restauração de comportamentos motores

complexos no modelo animal de 6-OHDA para PD pode ser atingido se: (1) a técnica de microtransplante for utilizada, resultando em uma maior distribuição das células transplantadas e em um maior tamanho do transplante no striatum hospedeiro (Nikkhah et al., 1993); (2) os ratos transplantados não apresentarem uma lateralização hemisférica importante no uso das patas dianteiras antes das cirurgias de lesão e transplante (Nikkhah et al., 2001); e se (3) um transplante combinado de neurônios dopaminérgicos no striatum e de neurônios gabaérgicos estriatais na SN ipsilateral for realizado (Winkler et al., 1999). Outros estudos são necessários para esclarecer se o transplante de células dopaminérgicas é capaz de promover recuperação funcional no teste da escada.

Concluindo, neste estudo não se observou recuperação funcional no teste da escada com 12 *pellets* por lado, em nenhum dos parâmetros estudados, após o transplante de células dopaminérgicas. Razões para este fato podem ser o (1) o número de *pellets* utilizadas, (2) a localização das células transplantadas no striatum (3) o volume do transplante e a densidade das fibras e (4) a possibilidade dos animais apresentarem uma preferência no uso das patas anteriores, a qual não foi testada anteriormente aos procedimentos.

Outros estudos levando em consideração estes fatos precisam ser realizados para uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na recuperação da motricidade fina após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas.

6 CONCLUSÕES

- A. Após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas houve recuperação funcional no teste de rotação induzida por drogas.
- B. Após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas não houve recuperação funcional no teste da escada realizada com duas *pellets* por degrau.

ANEXO 1

Classificação de *Hoehn and Yahr* para PD, publicada em 1967.

I	Sintomas leves unilaterais, inconvenientes mas não incapacitantes; usualmente tremor de um membro; mudanças mínimas na postura, marcha e expressão facial.
II	Sintomas bilaterais, incapacidade mínima, postura e marcha afetadas.
III	Lentificação significativa dos movimentos, prejuízo do equilíbrio, disfunção generalizada moderada.
IV	Sintomas graves, rigidez, bradicinesia, limitação da caminhada, paciente dependente de cuidados.
V	Invalidez completa, caquexia, paciente acamado necessitando cuidados de enfermagem constantes.

Fonte: Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17: 427-442.

Referências bibliográficas

Abrous N, Guy J, Vigny A, Calas A, Le Moal M, Herman JP (1988) Development of intracerebral dopaminergic grafts: a combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. *J Comp Neurol* 273(1):26-41.

Abrous DN, Wareham AT, Torres EM, Dunnett SB (1992) Unilateral dopamine lesions in neonatal, weanling and adult rats: comparison of rotation and reaching deficits. *Behav Brain Res* 51: 67-75.

Abrous DN, Torres EM, Dunnett SD (1993) Dopaminergic grafts implanted into the neonatal or adult striatum: comparative effects on rotation and paw reaching deficits induced by subsequent unilateral nigrostriatal lesions in adulthood. *Neuroscience* 54: 657-668.

Abrous DN, Shaltot AR, Torres EM, Dunnett SB (1993) Dopamine-rich grafts in the neostriatum and/or nucleus accumbens: effects on drug induced behaviours and skilled paw reaching. *Neuroscience* 53: 187-197.

Agid Y, Javoy F, Glowinski J (1973) Hyperactivity of remaining dopaminergic neurones after partial destruction of the nigro-striatal dopaminergic system in the rat. *Nat New Biol* 245: 150-151.

Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, Halliwell B (1997) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69: 1196-1203.

Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE (2000) Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol* 60: 409-470.

Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, Perlmann T, Ericson J (2005) Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell* 124: 393-405.

Annett LE, Reading PJ, Tharumaratnam D, Abrous DN, Torres EM, Dunnett SB (1993) Conditioning versus priming of dopaminergic grafts by amphetamine.

Experimental Brain Research 93: 46-54.

Ballermann M, Metz GA, McKenna JE, Klassen F, Whishaw IQ (2001) The pasta matrix reaching task: a simple test for measuring skilled reaching distance, direction, and dexterity in rats. *J Neurosci Methods* 106: 39-45

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3: 205-214.

Beal MF (2003) Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991: 120-131.

Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C (2004) Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 10: 1611-1626.

Birkmayer W, Hornykiewicz O (2001) The effect of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) on akinesia in parkinsonism. 1961. *Wien Klin Wochenschr* 113: 851-854.

Bjorklund A, Stenevi U (1979) Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* 177: 555-560.

Bjorklund A, Dunnett SB, Stenevi U, Lewis ME, Iversen S (1980a) Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res* 199:307-333.

Bjorklund A, Schmidt RH, Stenevi U (1980b) Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 212: 39-45.

Bjorklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH (1983a) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol Scand Suppl* 522: 1-7.

Bjorklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH (1983b) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand Suppl* 522:9-18.

Bjorklund A, Stenevi U (1984) Intracerebral neural implants: neuronal replacement and reconstruction of damaged circuitries. *Annu Rev Neurosci* 7: 279-308.

Bjorklund A, Gage FH (1985) Neural grafting in animal models of neurodegenerative diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 457: 53-81.

Bjorklund A, Dunnett SB, Nikkhah G (1994) Nigral transplants in the rat Parkinson model – functional limitations and strategies to enhance nigrostriatal reconstructions. *3rd Raven Press, New York*, 47-69.

Biernaskie J, Corbett D (2001) Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci* 21: 5272-5280.

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

Brundin P, Bjorklund A (1987) Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. *Prog Brain Res* 71: 293-308.

Brundin P, Duan WM, Sauer H (1994) Functional effects of mesencephalic dopamine neurons and adrenal chromaffin cells grafted to the rodent striatum. *2nd Raven Press, New York*, 9-46.

Burke RE (2004) Ontogenetic cell death in the nigrostriatal system. *Cell Tissue Res.* 318(1):63-72.

Carey RJ (1986) A conditioned anti-Parkinsonian drug effect in the hemi-Parkinsonian rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 89: 269-272.

Castaneda E, Whishaw IQ, Robinson TE (1990) Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion: Variation as a function of lesion size. *J Neurosci* 10: 1847-1854.

Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E (2003) Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *PNAS* 100(22): 12747-12752.

Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002b) Animal models of neurological deficits:

how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3: 574-579.

Cotzias GC (1968) L-Dopa for Parkinsonism. *N Engl J Med* 278: 630.

Creese I, Burt DR, Snyder SH (1977) Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* 197: 596-598.

Divac I, Rosvold HE, Szwarcbart MK (1967) Behavioral effects of selective ablation of the caudate nucleus. *J Comp Physiol Psychol* 63: 184-190.

Dobrossy MD, Le Moal M, Montaron MF, Abrous N (2000) Influence of environment on the efficacy of intrastriatal dopaminergic grafts. *Exp Neurol* 165: 172-183.

DeBow SB, Davies ML, Clarke HL, Colbourne F (2003) Constraint-induced movement therapy and rehabilitation exercises lessen motor deficits and volume of brain injury after striatal hemorrhagic stroke in rats. *Stroke* 34: 1021-1026.

Doucet G, Brundin P, Descarries L, Bjorklund A (1990) Effect of Prior Dopamine Denervation of Survival and Fiber Outgrowth from Intrastriatal Fetal Mesencephalic Grafts. *Eur J Neurosci* 2: 279-290.

Dunnett SB, Bjorklund A, Stenevi U, Iversen SD (1981) Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 229:209-217.

Dunnett SB, Iversen SD (1982) Sensorimotor impairments following localized kainic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the neostriatum. *Brain Res* 248: 121-127.

Dunnett SB, Bjorklund A, Schmidt RH, Stenevi U, Iversen SD (1983a) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites. *Acta Physiol Scand Suppl* 522: 29-37.

Dunnett SB, Bjorklund A, Schmidt RH, Stenevi U, Iversen SD (1983b) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions. *Acta Physiol Scand Suppl* 522: 39-47.

Dunnett SB, Bjorklund A, Gage FH, Stenevi U. (1985) Transplantation of mesencephalic dopamine neurons to the striatum of adult rats. *Neural Grafting in the Mammalian CNS, Elsevier, Amsterdam*: 451-469.

Dunnett SB, Whishaw IQ, Rogers DC, Jones GH (1987) Dopamine-rich grafts ameliorate whole body motor asymmetry and sensory neglect but not independent limb use in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res*. 415: 63-78.

Dunnett SB, Hernandez TD, Summerfield A, Jones GH, Arbuthnott G (1988). Graft-derived recovery from 6-OHDA lesions: specificity of ventral mesencephalic graft tissues. *Experimental Brain Res* 71: 411-424.

Dunnett SB, Isacson O, Sirinathsinghji DJ, Clarke DJ, Bjorklund A (1988) Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions - III. Recovery from dopamine-dependent motor asymmetry and deficits in skilled paw reaching. *Neuroscience* 24: 813-820.

Evenden JL, Robbins TW (1984) Effects of unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the caudate-putamen on skilled forepaw use in the rat. *Behav Brain Res* 14: 61-68.

Fahn S, Elton RL (2003) The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations. *Mov Disord* 18: 738-750.

Farkas LM, Dünker N, Roussa E, Unsicker K, Kriegstein K (2003) Transforming Growth Factor- β s Are Essential for the Development of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vitro and In Vivo. *J Neurosci* 23(12):5178-5186.

Fawcett J, Rosser AE, Dunnett SB (2001) Brain Damage, Brain Repair, 1st edition Oxford University Press.

Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5): 2283-2301.

Feuerstein TJ (2001) Pharmakotherapie des Morbus Parkinson. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Urban und Fischer, München, S.327-333

Foley P, Riederer P (1999) Pathogenesis and preclinical course of Parkinson's

disease. *JNeural Transm Suppl* 56: 31-74.

Fricker RA, Torres EM, Hume SP, Myers R, Opacka-Juffry J, Ashworth S, Dunnett SB (1997) The effects of donor stage on the survival and function of embryonic striatal grafts. II. Correlation between positron emission tomography and reaching behaviour. *Neuroscience* 79: 711-722

Fricker-Gates RA, Smith R, Muhith J, Dunnett SB (2003) The role of pre-training on skilled forelimb use in an animal model of Huntington's disease. *Cell Transplantation* 12: 257-264.

Gilligham FJ (1969) Schwab and England activities of daily living. *Third Symp of Parkinson's Disease, Scotland, E&S Livingstone* 152-157.

Gleixner C (2004) Extrapyramidale Syndrome. In: Gleixner C, Wirth S, Müller M (Hrsg) *Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis*. 4. Auflage *Medizinische Verlags- und Informationsdienste*, Breisach, S. 75-87.

Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: Biochemical characterization. *Brain Res* 195: 123-137.

Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17: 427-442.

Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 29;626(1-2):167-74.

Ikonomidou C, Turski L (1995) Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 8: 487-497.

Jackson-Lewis V, Vila M, Djaldetti R, Guegan C, Liberatore G, Liu J, O'Malley KL, Burke RE, Przedborski S (2000) Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice. *J Comp Neurol*. 424(3):476-488.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000) *Principles of Neural Science*. 4th Edition, *Appleton and Lange*: Stamford.

Kelly PH, Seviour PW, Iversen SD (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res* 94: 507-522

Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A (1998) Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152: 259-277.

Kloth V, Klein A, Loettrich D, Nikkhah G (2006) Colour-coded pellets increase the sensitivity of the staircase test to differentiate skilled forelimb performances of control and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res, Bull.* 1: 68-80.

Langston JW (1987) MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *Eur Neurol* 26 Suppl 1: 2-10.

Langston JW (1990) Predicting Parkinson's disease. *Neurology* 40: suppl-4.

Langston JW (1998) Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. *Ann Neurol* 44: 45-52.

Leenders KL, Salmon EP, Tyrrell P, Perani D, Brooks DJ, Sager H, Jones T, Marsden CD, Frackowiak RS (1990) The nigrostriatal dopaminergic system assessed in vivo by positron emission tomography in healthy volunteer subjects and patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 47: 1290-1298.

MacRae PG, Spirduso WW, Wilcox RE (1988) Reaction time and nigrostriatal dopamine function: the effects of age and practice. *Brain Res* 451: 139-146.

Mandel RJ, Brundin P, Bjorklund A (1990) The importance of graft placement and task complexity for transplant-induced recovery of simple and complex sensorimotor deficits in dopamine denervated rats. *Eur J Neurosci* 2:888-894.

Marshall JF, Ungerstedt U (1977) Supersensitivity to apomorphine following destruction of the ascending dopamine neurons: quantification using the rotational model. *Eur J Pharmacol* 41(4):361-7.

Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann*

Neurol 44: S99-109.

Montoya CP, Astell S, Dunnett SB (1990) Effects of nigral and striatal grafts on skilled forelimb use in the rat. *Prog Brain Res* 82: 459-466.

Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB (1991) The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 36: 219-228.

Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P (1996) DARPP-32-rich zones in grafts of lateral ganglionic eminence govern the extent of functional recovery in skilled paw reaching in an animal model of Huntington's disease. *Neuroscience* 74: 959-970.

Nakao N, Brundin P (1997) Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 76: 749-761.

Nikkhah G, Duan WM, Knappe U, Jodicke A, Bjorklund A (1993a) Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model. *Neuroscience* 56(1):33-43.

Nikkhah G, Cunningham MG, Jodicke A, Knappe U, Bjorklund A (1994a) Improved Graft-Survival and Striatal Reinnervation by Microtransplantation of Fetal Nigral Cell-Suspensions in the Rat Parkinson Model. *Brain Res* 633: 133-143.

Nikkhah G, Olsson M, Eberhard J, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A (1994b) A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology. *Neuroscience* 63(1):57-72.

Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Bjorklund A (1994c) Intranigral Fetal Dopamine Grafts Induce Behavioural Compensation in the Rat Parkinson Model, *J Neurosci* 14; 3449-4361.

Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD, Bjorklund A (1995a) Dopaminergic Microtransplants Into the Substantia-Nigra of Neonatal Rats with Bilateral 6-OHDA Lesions. I. Evidence for Anatomical Reconstruction of the Nigrostriatal Pathway. *J Neurosci* 15: 3548-3561.

Nikkhah G, Cunningham MG, McKay R, Bjorklund A (1995b) Dopaminergic Microtransplants Into the Substantia-Nigra of Neonatal Rats with Bilateral 6-OHDA Lesions.II. Transplant-Induced Behavioral Recovery. *J Neurosci* 15: 3562-3570.

Nikkhah G, Rosenthal C, Falkenstein, G, Samii M. (1998) Dopaminergic graft-induced long-term recovery of complex sensorimotor behaviors in a rat model of Parkinson's disease. *Zentralbl. Neurochir* 59: 97-103.

Nikkhah G, Falkenstein G, Rosenthal C (2001) Restorative plasticity of dopamine neuronal transplants depends on the degree of hemispheric dominance. *J Neurosci* 21(16):6252-6263.

Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP (2002) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS* 100(7): 4245-4250.

Olanow CW (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 16: 439-444.

Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD (1972) Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 31: 464-488.

Olney JW (2003) Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 3: 101-109.

Parkinson J (1817) Essay on the Shaking Palsy. *Whittingham and Rowland*, London.

Pisa M (1988) Motor functions of the striatum in the rat: critical role of the lateral region in tongue and forelimb reaching, *Neuroscience*, 24: 453-463.

Pisa M, Schranz JA (1988) Dissociable motor roles of the rat's striatum conform to a somatotopic model, *Behav Neurosci* 102: 429-440.

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204: 643-647.

Placzek M, Jessel TM, Dodd J (1993) Induction of floor plate differentiation by contactdependent, homeogenetic signals. *Development* 117(1):205-218.

Placzek M, Briscoe J (2005) The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* 6(3):230-240.

Prakash N, Wurst W (2006) Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* 63(2): 187-206.

Raff M (1998b) Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119-122.

Rao AV, Balachandran B (2002) Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci* 5: 291-309.

Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38: 277-301.

Rioux L, Gaudin DP, Gagnon C, Di Paolo T, Bedard PJ (1991) Decrease of behavioral and biochemical denervation supersensitivity of rat striatum by nigral transplants. *Neuroscience* 44: 75-83.

Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44: 175-188.

Roedter A, Winkler C, Samii M, Nikkhah G (2000) Complex sensorimotor behavioral changes after terminal striatal 6-OHDA lesion and transplantation of dopaminergic embryonic micrografts. *Cell Transplant* 9: 197-214.

Roedter A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkhah G (2001) Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: Evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol* 432: 217-229.

Sabol KE, Neill SA, Wages WH, Church JB (1985) Dopamine depletion in a striatal subregion disrupts performance of a skilled motor task in the rat. *Brain Res* 335: 33-43

Savasta M, Mennicken F, Chritin M, Abrous DN, Feuerstein C, Le Moal M, Herman JP (1992) Intrastriatal dopamine-rich implants reverse the changes in dopamine D2 receptor densities caused by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway

in rats: an autoradiographic study. *Neuroscience* 46: 729-738.

Schapira AH (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta* 1366: 225-233.

Schmidt RH, Ingvar M, Lindvall O, Stenevi U, Bjorklund A (1982) Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [¹⁴C]2-deoxy-D-glucose autoradiography. *J Neurochem* 38: 737-748.

Schmidt RH, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Gage FH (1983) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and metabolism. *Acta Physiol Scand Suppl* 522: 19-28.

Scholz E, Oertel WH (2003) Parkinson-Syndrome. In: Brandt E (Hrsg) Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. *W Kohlhammer, Stuttgart*.

Schwartz RK, Huston JP (1996) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of mesostriatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol* 49: 215-266.

Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T (2003) Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 9: 360-365.

Simeone A (2005) Genetic control of dopaminergic neuron differentiation. *TRENDS in Neurosciences* 28(2): 62-65.

Spooren WP, Vassout A, Waldmeier P, Gentsch C (1998) Differences in pre- and postsynaptic sensitivity to apomorphine between saline and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57BL/6 mice as reflected in climbing activity. *Eur J Pharmacol* 353: 1-4.

Stachowiak H (1973) Allgemeine Modelltheorie. Springer, Wien. Stern G (1989) Did parkinsonism occur before 1817? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Suppl: 11-12.

Tomimatsu T, Fukuda H, Endoh M, Mu J, Watanabe N, Kohzaki M, Fujii E, Kanzaki T, Oshima K, Doi K, Kubo T, Murata Y (2002) Effects of neonatal hypoxic-ischemic brain injury on skilled motor tasks and brainstem function in adult rats. *Brain Res*

926: 108-117.

Torres EM, Dunnett SB (2006) Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *European Neuropsychopharmacology* 17: 206-214.

Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-110.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24: 485-493.

Ungerstedt U (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 95-122.

Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ (1988) The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25: 857-887.

Walter BL, Vitek JL (2004) Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 3:719-728.

Whishaw IQ, O'Connor WT, Dunnett SB (1986) The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain* 109 (Pt 5): 805-843.

Whishaw IQ, Castaneda E, Gorny BP (1992) Dopamine and skilled limb use in the rat: more severe bilateral impairments follow substantia nigra than sensorimotor cortex 6-hydroxydopamine injection. *Behav Brain Res* 47: 89-92.

Whishaw IQ, Woodward NC, Miklyaeva E, Pellis SM (1997) Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav Brain Res* 89: 167-177.

Winkler C, Bentlage C, Nikkhah G, Samii M, Bjorklund A (1999) Intranigral

transplants of GABA-rich striatal tissue induce behavioural recovery in the rat Parkinson model and promote the effects obtained by intrastriatal dopaminergic transplants. *Exp Neurol*. 155(2):165-186.

Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Dunnett SB (2000) Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. *Prog Brain Res* 127:233-265.

Winkler C, Kirik D, Bjorklund A (2005) Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *Trends Neurosci* 28: 86-92.

Yurek DM, Fletcher-Turner A (2002) Temporal changes in the neurotrophic environment of the denervated striatum as determined by the survival and outgrowth of grafted fetal dopamine neurons. *Brain Research* 931: 126-134.

Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276, 248-250.

