

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARINA KOHN CORDEIRO

**INFLUÊNCIA DA SUPRESSÃO DO NÚCLEO SUBTALÂMICO
E DA ZONA INCERTA NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS
EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS EM UM MODELO
ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**

**CURITIBA
2013**

KARINA KOHN CORDEIRO

**INFLUÊNCIA DA SUPRESSÃO DO NÚCLEO SUBTALÂMICO E DA ZONA
INCERTA NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS
DOPAMINÉRGICAS EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**

**Tese apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Doutor em Clínica
Cirúrgica pelo programa de Pós-
Graduação em Clínica Cirúrgica do
Departamento de Cirurgia do Setor de
Ciências da Saúde**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bernardo
Tenório**

**Co-orientador: Dr. Joacir Graciolli
Cordeiro**

**Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L.
Campos**

CURITIBA

2013

C794 Cordeiro, Karina Kohn.
Influência da supressão do núcleo subtalâmico e da zona incerta no transplante de células embrionárias dopaminérgicas em um modelo animal de doença de Parkinson / Karina Kohn Cordeiro. – Curitiba, 2013.
112 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Núcleo subtalâmico - lesões. 2. Doença de Parkinson. 3. Oxidopamina. 4. Células-tronco embrionárias – transplante. 5. Subtálamo – lesões. I. Título. II. Tenório, Sérgio Bernardo.

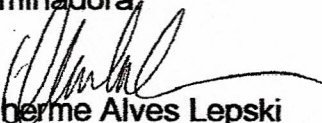
NLM: WL 359



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL - MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 156ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **KARINA KOHN CORDEIRO** Sob o TÍTULO INFLUÊNCIA DA SUPRESSÃO DO NÚCLEO SUBTALÂMICO E DA ZONA INCERTA NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON na **Linha de Pesquisa: Dor e Recuperação Pós-Operatória** Área de **Concentração: Clínica Cirúrgica** tendo como orientador Professor Doutor Sérgio Bernardo Tenório.

Às sete horas e trinta minutos do dia primeiro de março de dois mil e treze no Auditório da CAD 7º andar sala 702 do prédio central do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Guilherme Alves Lepski, Hélio Afonso Ghizoni Teive, Rohnelt Machado de Oliveira, Elizabeth Milla Tambara e João Cândido Araújo sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Vice-coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pela candidata das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou a candidata a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pela candidata, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A candidata foi **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à Sala de Sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para constar, eu, Regina Aparecida Sass Marques, Secretária da Pós-Graduação lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada será assinada pelos componentes da Banca Examinadora.


Guilherme Alves Lepski


Hélio Afonso Ghizoni Teive


Rohnelt Machado de Oliveira


Elizabeth Milla Tambara


João Cândido Araújo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO**

Aluna **KARINA KOHN CORDEIRO**

Título da tese: **INFLUÊNCIA DA SUPRESSÃO DO NÚCLEO SUBTALÂMICO E DA ZONA INCERTA NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Guilherme Alves Lepski	A	10,0
Hélio Afonso Ghizoni Teive	A	10,0
Rohnelt Machado de Oliveira	A	10,0
Elizabeth Milla Tambara	A	10,0
João Cândido Araújo	A	10,00

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO

Conceito: A Equivalência: 10,00

Curitiba, 01 de março de 2013.

MEMBROS	ASSINATURA
Guilherme Alves Lepski	
Hélio Afonso Ghizoni Teive	
Rohnelt Machado de Oliveira	
Elizabeth Milla Tambara	
João Cândido Araújo	

À minha família, alicerce para todas as intempéries
enfrentadas ao longo de minha vida.
Ao companheiro e amigo Joacir, pelo apoio em todos
os meus projetos e pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado não teria sido possível sem a participação e apoio de um grande conjunto pessoas. Gostaria portanto de expressar o meu reconhecimento e agradecimento a todas as pessoas e instituições que me ajudaram ao longo deste trabalho.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Pai, pela minha existência, saúde que torna possível alcançar os objetivos almejados e pela sua bondade e amor infinitos.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional, inicialmente no programa de residência médica e posteriormente nos programas de mestrado e doutorado em clínica cirúrgica.

À Universidade de Friburgo, Alemanha, pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos e por despertar em mim a paixão pela pesquisa com células embrionárias em modelos animais de doença de Parkinson.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Campos, coordenador do programa de pós-graduação em cirurgia da UFPR, pelo apoio e pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

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

Ao Dr. Joacir Graciolli Cordeiro, neurocirurgião e doutor pela Universidade Federal do Paraná, por ser co-orientador deste experimento, pela constante disponibilidade e pelo tempo despendido em valiosas discussões e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Guido Nikkhah, chefe do departamento de estereotaxia da Universidade de Friburgo - Alemanha, pelo suporte financeiro e por acreditar na proposta deste experimento.

Ao Dr. Máté Döbrössy, líder do grupo de pesquisa em células embrionárias da Universidade de Friburgo - Alemanha, pelo dedicado trabalho.

À CAPES, pelo incentivo à pesquisa em nosso país.

A todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho, particularmente aos amigos Luciano Lopes Furlanetti, Luis Azmitia e Joanna Alejandra Garcia Salazar.

“Discipline is the bridge between goals and accomplishment.”

Jim Rohn

RESUMO

A Doença de Parkinson (PD) é uma doença de grande implicação em saúde pública, pois acomete cerca de 1% da população idosa e gera altos gastos com o tratamento. Atualmente, o tratamento medicamentoso se baseia na combinação de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) com agonistas dos receptores dopaminérgicos. A principal desvantagem da terapia medicamentosa é o desenvolvimento de refratariedade e de efeitos colaterais incapacitantes, como discinesia e fenômeno *on-off*. Modalidades terapêuticas cirúrgicas foram, portanto, desenvolvidas, como técnicas ablativas (talamotomia, palidotomia), estimulação encefálica profunda (EEP) e transplante de células embrionárias dopaminérgicas. Atualmente a EEP é o padrão-ouro no tratamento da PD refratária ao tratamento medicamentoso. É proposto que a modulação do STN (núcleo subtalâmico) restabeleça o equilíbrio na circuitaria dos gânglios da base (GB), diminuindo a excitotoxicidade glutamatérgica ao *striatum*. EEP é uma terapia sintomática, a qual promove uma melhora transitória dos sintomas motores responsivos à dopamina. Por outro lado, o transplante celular oferece uma abordagem tecidual restauradora constituindo uma estratégia promissora no tratamento da PD, por tratar-se de um tratamento possivelmente curativo. Um fator limitante ao uso rotineiro de transplantes neuronais é a baixa taxa de sobrevida das células dopaminérgicas transplantadas.

Este estudo investiga o impacto da lesão do STN e/ou da ZI (Zona Incerta), ambas realizadas anteriormente ao transplante de células embrionárias provenientes do mesencéfalo ventral, na taxa de sobrevida das células dopaminérgicas e na resposta funcional motora. Com este objetivo, PD foi induzida pela injeção unilateral de 6-OHDA (6-hidroxidopamina) no feixe prosencefálico medial (FPM) de ratos, os quais foram separados em três grupos. O primeiro grupo foi submetido ao transplante estriatal de células embrionárias. Os outros dois grupos receberam injeção de ácido quinolínico no STN e/ou na ZI onze semanas antes do transplante, causando uma lesão parcial destas estruturas. Um quarto grupo (grupo controle puro), no qual nenhuma intervenção cirúrgica foi realizada, foi utilizado para comparar os efeitos dos procedimentos cirúrgicos com animais intactos. Após cada intervenção cirúrgica, testes comportamentais foram realizados, a fim de isolar o efeito de cada procedimento. Foi observado que no grupo submetido à lesão parcial do STN combinado ao transplante, obteve-se um aumento de 106% na taxa de sobrevida das células transplantadas comparado ao grupo submetido somente ao transplante. O grupo no qual a lesão parcial da ZI foi realizada, a taxa de sobrevida foi aumentada em 147% comparado ao grupo que recebeu o transplante como intervenção única. Adicionalmente, na bateria de testes comportamentais realizada após o transplante, o resultado da rotação induzida por apomorfina e dos testes comportamentais espontâneos foi superior no grupo submetido à lesão parcial do STN quando comparado ao grupo somente transplantado. Estes dados sugerem que a lesão parcial do STN e/ou da ZI possa ter reduzido a excitotoxicidade e logo otimizado o ambiente neuroquímico estriatal, aumentando a taxa de sobrevida das células transplantadas. Apesar de apresentar contagem celular semelhante ao grupo submetido à lesão parcial do STN, os ratos nos quais apenas a ZI foi lesionada não apresentaram melhora significativamente superior ao grupo somente transplantado nos testes comportamentais pós-transplante. Estes dados sugerem a existência de outros mecanismos envolvidos na melhora funcional motora. A combinação da supressão do STN com a terapia celular restauradora se revelou factível e de efeito sinérgico. Hipotetiza-se ser esta uma possível técnica para refinar o manejo da PD. Há necessidade de mais estudos a fim de investigar a aplicabilidade clínica da terapia combinada, incluindo o papel de outros métodos de modulação do STN (e.g. EEP) acoplado ao transplante celular como uma possível abordagem inovadora no tratamento da PD refratária.

Palavras-chave: lesão do núcleo subtalâmico, doença de Parkinson, 6-OHDA, transplante de células embrionárias, lesão da Zona Incerta.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) has a great implication on public health. It affects approximately 1% of the elderly and involves high expenses with its treatment. Currently the drug-based treatment is based in the combination of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) with dopamine receptors agonists. The principal disadvantage of the medical therapy is the development of refractoriness and disabling side-effects, i.e. dyskinesia and on-off phenomenon. Surgical modalities were, therefore, developed, e.g. ablative techniques (thalamotomy, pallidotomy), deep brain stimulation and embryonic dopaminergic cell transplantation. Currently, deep brain stimulation is the gold standard in the treatment of cases refractory to medication. It is proposed that the STN (subthalamic nucleus) modulation restores the equilibrium in the basal ganglia circuitry and reduces the excitotoxic glutamatergic input to the *striatum*. Deep brain stimulation is a symptomatic therapy, which promotes a transitory improvement of the dopamine-responsive motor symptoms. On the other hand, cell transplantation is a tissue restorative approach and represents a promising strategy in the treatment of PD, since it is a possible curative treatment. A limiting factor to the routine use of neuronal grafts is the poor dopaminergic cell survival.

This study investigates the impact of a STN and/or ZI (Zona Incerta) lesion, both performed prior to ventral mesencephalic embryonic cell transplantation in the dopaminergic cell survival and motor functional outcome. For this purpose, unilateral PD was induced by unilateral injection of 6-OHDA (6-hydroxydopamine) into the medial forebrain bundle of rats, which were assigned into three groups. The first group underwent ipsilateral embryonic cell grafting into the striatum. The other two groups received quinolinic acid injection into the STN and/or ZI eleven weeks prior to transplantation, causing a partial lesion of these structures. A fourth group (naive control group), in which no surgical intervention was performed, was used to compare the effects of the surgical procedures with intact animals. After each surgical intervention, behavioural tests were performed to isolate the effect of each procedure. It was observed that in the group that received a partial STN lesion combined with the graft, cell survival was boosted in 106% compared to the group that received solely the transplantation. The group in which a partial ZI lesion was performed the cell survival was enhanced in 147% compared to the group with transplantation as single intervention. Moreover, in the behavioural tests after transplantation, the results of apomorphine-induced rotation and spontaneous behavior tests were ameliorated on the STN-lesioned group to a greater extent than on the grafted only group. These data suggest that the STN and/or ZI partial lesion could reduce the excitotoxicity and therefore optimize the striatal neurochemical environment and promote an improvement in cell survival. Despite exhibiting similar cell counting compared to the group that received partial STN lesion, the rats in which only the ZI was lesioned, did not show significant greater improvement in the behavioural tests following transplantation compared to the grafted-only group. This data suggest the existence of other mechanisms involved in motor functional recovery. The combination of STN suppression and cell therapy revealed to be a feasible technique with synergic effect. More studies are required in order to investigate the clinical application of the combined approach including the role of other methods of STN modulation (e.g. deep brain stimulation) coupled to cell transplantation as an innovative approach in the treatment of refractory PD.

Key-words: subthalamic lesion, Parkinson's disease, 6-OHDA, embryonic cell transplantation, Zona Incerta lesion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MODELO CLÁSSICO DOS GÂNGLIOS DA BASE.....	25
FIGURA 2 – ESQUEMA DA DISSECÇÃO DO MV DE EMBRIÕES E-14 E FIGURA DA SUSPENSÃO CELULAR ÚNICA.....	46
FIGURA 3 – LESÃO DO FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL DIREITO PELA INJEÇÃO DE 6-OHDA.....	49
FIGURA 4 - CAIXA EM FORMATO CÔNCAVO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.....	52
FIGURA 5 – ANIMAL COLOCADO NA CAIXA E CONECTADO AO ROTÔMERO..	53
FIGURA 6 – BASE DO ROTÔMERO, DEMONSTRANDO O SISTEMA DE ROLAMENTOS, O QUAL ESTÁ CONECTADO AO COMPUTADOR PARA ANÁLISE DOS DADOS.....	54
FIGURA 7 – ANIMAL REALIZANDO O TESTE DO CILINDRO.....	55
FIGURA 8 – ANIMAL REALIZANDO O TESTE DO PASSO.....	56
FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS CORADOS COM TH DEMONSTRANDO O TRANSPLANTE EM UM ANIMAL SUBMETIDO À LESÃO PARCIAL DO STN.....	65
FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS DEMONSTRANDO O TRANSPLANTE EM UM ANIMAL SUBMETIDO À LESÃO PARCIAL DA ZI.....	66
FIGURA 11 - FOTOGRAFIA DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS DEMONSTRANDO O TRANSPLANTE EM UM ANIMAL DO GRUPO FPM/TX.....	67
FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DE PREPARADO HISTOLÓGICO COM A COLORAÇÃO NEU-N DEMONSTRANDO A LESÃO PARCIAL DO STN E DA ZI...	69
FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DE PREPARADO HISTOLÓGICO COM NEU-N DEMONSTRANDO A LESÃO PARCIAL DA ZI PELO ÁCIDO QUINOLÍNICO.....	70

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

TABELA 1 – GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
TABELA 2 – DESENHO DO EXPERIMENTO.....	45
TABELA 3 – COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO PARA A LESÃO DO FPM, PARA A LESÃO DO STN E/OU DA ZI E PARA O TRANSPLANTE DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.....	48
TABELA 4 – TABELA REPRESENTATIVA DO NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS NO TRANSPLANTE E DA PORCENTAGEM DE REINERVAÇÃO ESTRIATAL ADJACENTE AO TRANSPLANTE EM CADA ANIMAL INCLUÍDO NO ESTUDO.....	64
GRÁFICO 1 – MÉDIAS DO NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS NO TRANSPLANTE E DE REINERVAÇÃO DO <i>STRIATUM</i> POR FIBRAS PROVENIENTES DO TRANSPLANTE.....	68
GRÁFICO 2 – COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO PELA INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE APOMORFINA.....	71
GRÁFICO 3 – COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ANFETAMINA.....	72
GRÁFICO 4 – DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TESTE DO CILINDRO.....	74
GRÁFICO 5 – DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TESTE DO PASSO.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	- 6-hidroxidopamina
AMPC	- monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	- <i>Analysis of Variance</i>
ADN	- ácido desoxirribonucleico
AP	- antero-posterior
ATP	- adenosina trifosfato
ATV	- área tegmentar ventral
BD	- barra de dentes
COMT	- catecol-O-metil-transferase
CPu	- <i>caudate-putamen-unit</i>
cx	- grupo controle
DO	- densidade óptica
DV	- dorso-ventral
E - 10,5	- dia embrionário 10,5
E - 14	- dia embrionário 14
EEP	- estimulação encefálica profunda
EPM	- erro padrão da média
FGF-8	- fibroblast growth factor-8
FPM	- feixe prosencefálico medial
GB	- gânglios da base
GFAP	- <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GP	- globo pálido
GPe	- globo pálido externo
GPI	- globo pálido interno
HBSS	- <i>Hank`s balanced salt solution</i>
Ho	- hipótese nula
L	- lateral
L-DOPA	- L-3,4-dihidroxifenilalanina
m/hO	- organizador mesencéfalo-rombencéfalo
MPTP	- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MV	- mesencéfalo ventral
Nac	- Núcleo acumbente

Neu-N	- Núcleo Neuronal
NIH	- <i>National Institut of Health</i>
MAO-B	- monoamino oxidase-B
NMDA	- N-metil-D-aspartato
NPP	- Núcleo pedúnculo pontino;
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
PD	- Doença de Parkinson
PET	- tomografia por emissão de pósitrons
r.p.m.	- rotações por minuto
SIDA	- síndrome da imunodeficiência adquirida
Shh	- <i>Sonic hedgedog</i>
SN	- substância negra
SNc	- substância negra porção compacta
SNC	- sistema nervoso central
SNr	- substância negra porção reticular
STN	- núcleo subtalâmico
TGF- β	- <i>transforming growth factor-β</i>
TH	- tirosina hidroxilase
UPDRS	- <i>Unified Parkinson Disease Rating Scale</i>
VL	- núcleo ventro-lateral do tálamo
ZI	- Zona Incerta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS: PERDA DE ATIVIDADE FUNCIONAL E DEGENERAÇÃO TRÓFICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	16
2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	18
2.3 DOENÇA DE PARKINSON VERSUS PARKINSONISMO.....	19
2.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	20
2.5 PATOGÊNESE E CORRELATOS ANATÔMICOS.....	21
2.6 A CIRCUITARIA DOS GÂNGLIOS DA BASE.....	22
2.7 A ZONA INCERTA.....	25
2.8 O PAPEL DO STN NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE PARKINSON..	27
2.9 ORGANIZAÇÃO DO MESENCÉFALO DURANTE A EMBRIOGÊNESE..	28
2.10 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DA DOENÇA DE PARKINSON..	30
2.11 TRATAMENTO CIRÚRGICO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	31
2.12 TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS PROVENIENTES DO MV.....	32
2.13 MODELO ANIMAL DE 6-OHDA PARA DOENÇA DE PARKINSON...	34
2.14 LESÃO DO STN PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO QUINOLÍNICO.....	38
2.15 TERAPIA CELULAR RESTAURADORA NO MODELO ANIMAL DE 6-OHDA.....	38
3. MÉTODO.....	42
3.1 POPULAÇÃO ANIMAL.....	42
3.2 SUBDIVISÃO EM GRUPOS.....	43
3.3 DISSECÇÃO DO MESENCÉFALO VENTRAL DE EMBRIÕES E PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR ÚNICA.....	46
3.4 ANESTESIA E PREPARAÇÃO DO ANIMAL.....	47
3.5 LESÃO DO FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL DIREITO.....	48
3.6 LESÃO DO STN E/OU DA ZI COM ÁCIDO QUINOLÍNICO.....	50

3.7	TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS ORIGINÁRIAS DO MESENCÉFALO VENTRAL.....	50
3.8	ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.....	51
3.9	TESTE DO CILINDRO.....	54
3.10	TESTE DO PASSO.....	55
3.11	PERFUSÃO DO ANIMAL E FIXAÇÃO DO CÉREBRO EM FORMALDEÍDO.....	56
3.12	CORTE E COLETA DO TECIDO CEREBRAL.....	57
3.13	COLORAÇÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	58
3.14	ANÁLISE MORFOLÓGICA: NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS, DENSIDADE DE FIBRAS DOPAMINÉRGICAS PROVENIENTES DO TRANSPLANTE E ANÁLISE DA LESÃO DO STN E DA ZI.....	60
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
4.	RESULTADOS.....	62
4.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TRANSPLANTE.....	62
4.2	ANÁLISE DA LESÃO DO NÚCLEO SUBTALÂMICO E/OU DA ZONA INCERTA COM ÁCIDO QUINOLÍNICO.....	69
4.3	ANÁLISE DA ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.....	70
4.4	ANÁLISE DO TESTE DO CILINDRO.....	73
4.5	ANÁLISE DO TESTE DO PASSO.....	74
5.	DISCUSSÃO.....	76
5.1	SOBREVIDA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS E REINERVAÇÃO DO <i>STRIATUM</i> ADJACENTE.....	76
5.2	TESTE DE ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.....	82
5.3	TESTE DO CILINDRO.....	87
5.4	TESTE DO PASSO.....	88
6.	CONCLUSÕES.....	91
7.	ANEXO 1.....	92
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A PD é uma síndrome neurodegenerativa causada pela perda neuronal progressiva na substância negra (SN) a qual leva a um déficit dopaminérgico no *striatum*. Estudos recentes demonstraram que a PD caracteriza-se por uma disfunção monoaminérgica múltipla, incluindo déficits dos sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (TEIVE, 2005). Estima-se que a prevalência em países desenvolvidos seja de aproximadamente 1% na população acima de 60 anos. Os mecanismos que induzem a perda neuronal na doença de Parkinson ainda são desconhecidos. Acredita-se que mutações genéticas, defeitos metabólicos, estresse oxidativo e toxicidade por glutamato estejam envolvidos.

O STN provê parte do *input* glutamatérgico ao *striatum* (PAUL et al., 2004). Por sua vez, na PD, a depleção dopaminérgica no *striatum* induz uma desinibição do STN pela via indireta. Portanto propõe-se que a modulação do STN possa reestabelecer o equilíbrio na circuitaria dos gânglios da base (ALEXANDER e CRUTCHER, 1990; DELONG, 1990). Este dado é corroborado por estudos clínicos e experimentais nos quais a supressão do STN, seja por lesão ou por EEP, melhorou os sinais motores observados em pacientes e em modelos animais de PD (CARVALHO e NIKKHAH, 2001; PAUL et al., 2004; TIR et al., 2007). Outros estudos, entretanto, demonstraram que a lesão total do STN pode induzir déficits motores e cognitivos em ratos submetidos ao modelo animal unilateral de 6-OHDA (HENDERSON et al., 1999).

Estudos avaliando o efeito neuroprotetivo da lesão do STN realizada anteriormente à lesão estriatal terminal através da neurotoxina 6-OHDA indicou que a supressão do STN preveniu a perda neuronal na SN (PIALLAT et al., 1996). O efeito da combinação da inibição do STN com o transplante de células embrionárias

dopaminérgicas no *striatum* continua inexplorado. É proposto que a inibição do STN possa influenciar a sobrevivência das células transplantadas pela diminuição do *input* glutamatérgico ao *striatum* denervado.

Embora a EEP do STN represente atualmente o padrão-ouro no tratamento da PD refratária ao tratamento medicamentoso, resultados clínicos favoráveis foram também obtidos com a estimulação de contatos localizados na ZI (GUEHL et al., 2008; PATEL et al., 2003; PLAHA et al., 2006; VOGES et al., 2002). A ZI envia aferências glutamatérgicas à SNr (substância negra porção reticular), à SNc (substância negra porção compacta), ao tálamo e ao *striatum* (HEISE E MITROFANIS, 2004; RICARDO, 1981; ROMANOWSKI et al., 1985). Adicionalmente, a ZI se torna hiperativada após destruição do trato nigroestriatal (PERIER, 2000).

Terapias celulares restauradoras, como o transplante de células embrionárias dopaminérgicas provenientes do mesencéfalo ventral (MV) no *striatum* carente de dopamina, representam um tratamento promissor para a PD. Estudos duplo-cego sugerem que a idade do paciente, o estágio da doença e a quantidade de tecido implantado podem ser decisivos no sucesso do transplante (FREED ET AL., 2001; OLANOW ET AL., 2003). Nestes estudos, uma melhora funcional mais pronunciada foi observada nos pacientes com maior taxa de sobrevivência de células dopaminérgicas transplantadas e com maior reinervação do *striatum* (GOYA et al., 2007). Mesmo com a otimização das técnicas de coleta e implante estereotáxico, a taxa de sobrevivência das células dopaminérgicas transplantadas gira em torno de apenas 5%.

1.1 JUSTIFICATIVA

Dada a disponibilidade de modalidades terapêuticas para a PD com atuação em diferentes estruturas envolvidas na neuro-circuitaria da mesma, sugere-se que a

combinação (ainda inexplorada) de certas intervenções cirúrgicas apresentaria efeito sinérgico no tratamento desta doença. Para este fim, avaliou-se o efeito da combinação da lesão parcial do STN e/ou da ZI com o transplante de células embrionárias dopaminérgicas.

1.2 OBJETIVOS

A. Estudar o efeito da lesão parcial do STN e/ou da ZI no modelo animal de 6-OHDA de PD no desempenho dos animais em testes comportamentais.

B. Estudar o efeito do transplante de células embrionárias dopaminérgicas no modelo animal de 6-OHDA de PD no desempenho dos animais em testes comportamentais.

C. Avaliar o efeito histológico e comportamental da lesão parcial do STN e/ou ZI combinada ao transplante de células embrionárias dopaminérgicas, no modelo animal de 6-OHDA de PD.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 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) estresse 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, neoplasia, hipóxia, intoxicação, entre outras. Em contrapartida, apoptose define morte celular programada e controlada induzida por desencadeantes extra ou intracelulares que resulta 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 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) glutamatérgicos induzindo morte celular. Toxicidade externa é reportada como paradigma patológico na PD e na doença de Huntington, assim como em vários distúrbios neurológicos agudos como crises convulsivas, acidente vascular cerebral isquêmico e trauma mecânico (IKONOMIDOU E TURSKI, 1995; OLNEY, 2003; RAO E BALACHANDRAN, 2002).

O estresse oxidativo resulta de um desbalanço entre radicais livres, os quais são catabólitos reativos do oxigênio ou nitrogênio, e antioxidantes que podem ser enzimas intracelulares como a superóxido desmutase, moléculas endógenas como a glutatona ou nutrientes como as vitaminas C e E. Ocorre um dano às membranas celulares lipídicas, proteínas celulares e moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) levando à morte celular induzida pelo estresse oxidativo (BARNHAM et al., 2004 e BERGAMINI et al., 2004). O estresse oxidativo foi reportado na Doença de Alzheimer, na PD, na esclerose múltipla, na esclerose lateral amiotrófica, na demência relacionada à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e a muitos outros distúrbios neurodegenerativos.

Todos os três mecanismos de morte neuronal são encontrados no sistema nigroestriatal de pacientes com PD. Exames *post-mortem* de espécimes cerebrais comprovaram que há comprometimento metabólico, especialmente do metabolismo mitocondrial (MIZUNO et al., 1998; SCHAPIRA, 1998). Além disto, a toxina mitocondrial 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produz parkinsonismo por lesão seletiva da SN em primatas (LANGSTON, 1987; SPOOREN et al., 1998). Outros estudos demonstraram haver toxicidade externa na SN e no globo pálido interno (GPi) via *input* excitatório glutamatérgico do STN e do neocórtex, assim como interações entre estes mecanismos citotóxicos e prejuízo do metabolismo mitocondrial (RODRIGUEZ et al., 1998). Está estabelecido que o estresse oxidativo influencia a patogênese da PD. Estudos *post-mortem* em tecidos cerebrais nigrais de

pacientes portadores da doença apresentaram um aumento de lipídios de membrana e moléculas de ADN oxidados (ALAM et al., 1997).

2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

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), 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, podendo acometer a cabeça. A hipocinesia pode se manifestar através de acinesia, bradicinesia e/ou “*freezing*” que é a cessação repentina de todos os movimentos. A instabilidade postural pode incluir ataxia e festinação, significando aumento progressivo 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 e YAHR, 1967), *Schwab and England Activities of Daily Living* (GILLIGHAM, 1969) e *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS) (FAHN E ELTON, 2003). No Anexo 1, está detalhada a classificação de *Hoehn e Yahr* para a DP. 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) a 0% (paciente totalmente dependente, acamado, com disfunção vegetativa). A UPDRS é mais acurada e mais complexa, descrevendo o desenvolvimento longitudinal dos sintomas parkinsonianos, os quais são divididos entre: (1) inteligência, comportamento e humor, (2) atividades da vida diária e (3) exame motor. O escore total de 199 pontos pode ser atingido, o que significa comprometimento total e zero significando nenhuma deficiência.

2.3 TIPOS DE PARKINSONISMO

O termo doença de Parkinson, ou parkinsonismo primário, inclui 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 doença idiopática, resultado provavelmente na combinação de diversos fatores patogênicos, como previamente mencionado. Cerca de 10% dos pacientes que apresentam sintomas parkinsonianos podem ser definidos como

casos de parkinsonismo secundário, o qual apresenta etiologia conhecida. Parkinsonismo secundário pode ser causado por doenças infecciosas (doença de Lyme, encefalite viral), intoxicações exógenas (monóxido de carbono, organofosforados, metanol, manganês, herbicidas), por medicamentos (antieméticos, neurolépticos, bloqueadores do canal de cálcio, amiodarona e outras), doenças metabólicas (doença de Wilson, hipoparatiroidismo) ou por destruição direta do sistema nervoso central (SNC) por meio de trauma, tumor, ou processos hipóxicos vasculares (SCHOLZ e OERTEL, 2003; GLEIXNER et al., 2004). Importante observar que o parkinsonismo induzido por drogas pode persistir por semanas ou meses após a retirada do agente causador. Dessa forma os dados de anamnese devem ser bastante minuciosos em relação a este aspecto. Outro tipo de parkinsonismo é o parkinsonismo-plus ou atípico, caracterizado pela presença de uma síndrome parkinsoniana associada a distúrbios autonômicos, cerebelares, piramidais, de neurônio motor inferior ou de motricidade ocular extrínseca. Esta forma de parkinsonismo está relacionada a uma série de doenças neurodegenerativas ou dismetabólicas. Finalmente, distingue-se o parkinsonismo heredo-degenerativo, condição incomum, a qual tem um padrão de herança identificado (BARBOSA e SALLEM, 2005)

2.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

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 em pacientes acima de 65 anos aumenta para 0,5 - 1%. Dados estatísticos revelam que a prevalência da PD na população é de 150 a

200 casos por 100.000 habitantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de quatro milhões de pessoas em todo mundo sofrem com a doença. A estimativa é que esse número dobre até 2040, com o aumento da população idosa. Não existem números exatos no Brasil, pois como não é contagiosa nem epidêmica, a PD não é de notificação compulsória às autoridades de saúde, o que dificulta a formulação de estatísticas.

2.5 PATOGÊNESE E CORRELATOS ANATÔMICOS

A PD é caracterizada por uma degeneração progressiva da circuitaria dos GB levando a uma progressiva depleção dopaminérgica nas vias que conectam a 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 ocorrem quando há uma diminuição 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 à intensificação da sintomatologia clínica (RIEDERER e WUKETICH, 1976; FEARNLEY e LEES, 1991; FOLEY e RIEDERER, 1999). Os GB são compostos por núcleos subcorticais e basicamente contém quatro unidades funcionais: o *striatum*, o globo pálido (GP), a SN e o STN. O *striatum* representa o principal *input* do sistema dos GB e pode ser subdividido em núcleo caudado, putâmen. O *striatum* pode ser também dividido em *striatum* dorsal e *striatum* ventral, o qual inclui o núcleo acumbente (Nac). O *striatum* recebe aferências principalmente da SNc e de virtualmente todas as áreas do córtex cerebral, além de aferências do STN. Estas conexões são mais esparsas e terminam principalmente na parte motora do *striatum* (CARPENTER et al., 1981a; 1981b, 1991; DEVITO et al., 1980; NAKANO,

et al., 1990; NAUTA e COLE 1978; PARENT, 1990; PARENT e HAZRATI 1993, 1995a, 1995b; PARENT e SMITH, 1987; PARENT et al. 1989). Como principais aferências são definidas a SNr e o GPi, os quais conduzem seus sinais via tálamo e tronco cerebral para o córtex motor e medula espinhal (KANDEL et al., 2000).

Funcionalmente, esta circuitaria é organizada em cinco alças paralelas, as quais se originam de diversas áreas do córtex cerebral e inervam diferentes setores de cada estrutura, definindo alças funcionais segregadas: motora, oculomotora, dorsolateral pré-frontal, lateral orbitofrontal e límbica.

Anatomicamente, divide-se em alça dorsal, que exerce influência sobre a função motora e a alça ventral, pertencente ao sistema límbico (ALEXANDER et al., 1986; ALBIN et al., 1989). A alça dorsal conecta as aferências ao córtex, provenientes do *striatum* dorsal, GP, SNc e SNr com aferências ao tálamo e novamente ao córtex. A alça ventral recebe aferências do córtex pré-frontal e as conecta via Nac, área tegmentar ventral (ATV) e GP com o tálamo e novamente ao 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.

2.6 A CIRCUITARIA DOS GÂNGLIOS DA BASE

Os GB formam uma rede complexa de alças paralelas que integram regiões cerebrais, os núcleos dos GB e o tálamo. A neuro-circuitaria motora é a mais diretamente envolvida na fisiopatologia dos distúrbios do movimento, incluindo a PD. Em 1989, Albin et al. compilaram os dados disponíveis sobre a organização anátomo-funcional dos GB e propuseram o modelo clássico desta circuitaria. Neste modelo duas vias, a via direta e a via indireta, conectam o *striatum* aos núcleos de

saída dos GB. Os núcleos de saída dos GB incluem o GPi e a SNr. O GPi e a SNr são estruturas gabaérgicas e inervam basicamente os núcleos talâmicos motores e recebem aferências do *striatum* através de duas vias principais: uma diretamente do *striatum* (via direta) e a segunda através de conexões no globo pálido externo (GPe) e no STN (via indireta). Mais detalhadamente, neurônios corticais mandam eferências para o *striatum*, onde estabelecem conexões glutamatérgicas excitatórias com neurônios motores. Estes neurônios originam duas vias, as quais conectam o *striatum* aos principais núcleos de saída dos GB, e.g. ao GPi e à SNr. Neurônios da via direta projetam diretamente do putâmem ao GPi e à SNr, proporcionando um efeito inibidor direto nestas estruturas. Neurônios da via indireta conectam o putâmem ao GPi e à SNr através de sinapses no GPe e no STN. As projeções do putâmem para o GPe e do GPe para o STN são gabaérgicas e logo inibitórias. Neurônios originários do STN usam glutamato como neurotransmissor e ativam os neurônios no GPi e na SNr. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNc induz, na via indireta, supressão do GPe, desinibição do STN e excitação do GPi e da SNr (Figura1).

Em 1990, DeLong aprimorou esta teoria da alça motora pela introdução das disfunções associadas à perda neuronal dopaminérgica na SNc e a subsequente deficiência de dopamina no *striatum*, caracterizando a PD. Este modelo sugere que o STN e o GPi estão hiperativados na PD, levando aos sintomas motores característicos da doença.

A dopamina produzida na SNc inibe a atividade neuronal da via indireta, através da ação em receptores do tipo D2 e excita os neurônios da via direta através da ação em receptores do tipo D1. A ativação de receptores dopaminérgicos tipo D1 está ligada à proteína G_{sa} , a qual ativa a adenilato ciclase aumentando a concentração intracelular do mensageiro secundário monofosfato cíclico de

adenosina (AMPc). A ativação de receptores dopaminérgicos tipo D2 está ligada à proteína $G_{i\alpha}$, a qual inibe diretamente a formação de AMPc pela inibição da enzima adenilato ciclase (NEVES et al., 2002). O modelo prevê que a ativação reduzida dos receptores estriatais de dopamina, causada pela deficiência deste neurotransmissor, resulta em uma redução da inibição dos neurônios da via indireta e uma diminuição da excitação dos neurônios da via direta. Inibição reduzida da via indireta induz aumento da inibição do GPe, desinibição do STN e aumento da excitação dos neurônios no GPi e na SNr. A ativação reduzida da via direta leva à uma redução do seu efeito inibitório no GPi e na SNr. O resultado final é uma excessiva ativação dos neurônios do GPi e da SNr, acompanhada por excessiva inibição do sistema motor, induzindo as características motoras observadas na PD (OBESO et al. 2000).

Atualmente, acredita-se que a divisão em vias direta e indireta originalmente proposta é uma simplificação da complexa circuitaria dos GB e das conexões do STN pela demonstração que o STN também manda eferências para o *striatum* (NAKANO et al., 1990; PARENT, 1990; PARENT e HAZRATI 1993, 1995a, 1995b). Estas eferências são mais escassas que as conexões para o GPi e a SNc, originam-se da parte rostral do STN e terminam na sua maioria no parte motora do *striatum* (CARPENTER et al., 1981a, 1981b, 1991; DEVITO et al., 1980; NAKANO et al., 1990; NAUTA e COLE 1978; PARENT 1990; PARENT e HAZRATI 1993, 1995a, 1995b; PARENT e SMITH 1987; PARENT et al. 1989).

do tronco cerebral (JONES, 1985; POWER e MITROFANIS, 2001; ROGER e CADUSSEAU, 1985; ROMANOWSKI et al., 1985; SHAMMAH-LAGNADO et al., 1985). Segunda, a ZI é composta por células extremamente heterogêneas, diferentes em tamanho e forma. Em muitas áreas células semelhantes estão agrupadas, formando setores distintos. Em ratos dois a seis setores foram descritos (KAWANA e WATANABE, 1981; NICOLELIS et al., 1992, 1995, ROMANOWSKI et al., 1985). Terceira, a ZI é composta por células neuroquimicamente diversas com descrição de mais de 20 tipos celulares neuroquimicamente distintos (KOLMAC e MITROFANIS, 1999; NICOLELIS et al., 1995). Consequentemente, é proposto que a ZI esteja envolvida em diversas funções. A região caudal modula funções motoras, incluindo a geração de movimentos axiais e dos membros proximais necessários à locomoção. As outras regiões, i.e. rostral, dorsal, ventral, estão relacionadas à funções de controle visceral e movimentos da cabeça e dos olhos (MOGENSON et al., 1985; MILNER e MOGELSON, 1988; MURER e PAZO, 1993; PERIER et al., 2002). A ZI envia projeções excitatórias glutamatérgicas para ambos os segmentos da SN, para o tálamo e para o *striatum* (HEISE e MITROFANIS, 2004; RICARDO, 1981; ROMANOWSKI et al., 1985). Em modelos animais foi demonstrado que a ZI se torna hiperativada após lesão do trato nigroestriatal (o que simula alterações patológicas da PD) e que a inibição da ZI foi capaz de reduzir os níveis elevados de glutamato no *striatum* denervado a valores normais. Esta redução dos níveis de glutamato no *striatum* foi semelhante à observada após supressão do STN (WALKER et al., 2009). A partir deste resultado infere-se que a ZI mande projeções diretamente ao *striatum* ou influencie indiretamente os níveis estriatais de glutamato. Clinicamente foi demonstrado que a EEP da ZI reverteu os sintomas principais da PD, e.g. bradicinesia, tremor e rigidez (PATEL et al., 2003; PLAHA et al., 2006). Outros autores, entretanto, relataram efeito clínico insatisfatório associado à

estimulação de contatos localizados na ZI, e regiões H1 e H2 de Forel (HERZOG et al., 2004). Esta variação nos resultados obtidos pode ser devida às diferentes funções da ZI e à heterogeneidade na topografia dos eletrodos.

2.8 O PAPEL DO STN NA PATOGÊNESE DA DOENÇA DE PARKINSON

O STN é uma pequena estrutura localizada ventralmente à ZI e dorsalmente ao pedúnculo cerebral. De acordo com o modelo original da neurotransmissão motora, proposta por DeLong em 1990, os déficits motores observados na PD são reforçados pela hiperatividade do STN, a qual induz ao excesso de *input* excitotóxico glutamatérgico ao GPi e à SNr pela via indireta. Adicionalmente, na PD o STN desinibido envia também excesso de eferências excitotóxicas glutamatérgicas à SNc. De acordo com esta teoria, é proposto que a lesão do STN possa ter um papel neuroprotetor na PD, prevenindo a perda neuronal na SNc. Corroborando esta hipótese, observou-se em experimentos envolvendo lesão do STN realizada anteriormente à lesão unilateral do FPM, que aquela impediu o declínio da atividade dopaminérgica na SNc (PIALLAT et. al., 1996). Entretanto, considerando que existe uma profunda perda neuronal dopaminérgica na SNc anterior ao aparecimento dos sintomas característicos da PD, a aplicabilidade de uma terapia profilática é questionável. Descreve-se que a lesão do STN e a conseqüente redução da excitotoxicidade glutamatérgica ao GPi e à SNr aumente o *input* talâmico excitatório às áreas motoras facilitando a iniciação e execução de movimentos (HENDERSON et. al., 1998).

2.9 ORGANIZAÇÃO DO MESENCÉFALO DURANTE A EMBRIOGÊNESE

A formação do SNC (sistema nervoso central) é um processo complexo e requer uma interação acurada entre os fatores que definem a segmentação entre prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, fatores que induzem a neurogênese e fatores que garantem a sobrevivência e manutenção neuronal, crescimento de fibras e formação de conexões sinápticas. Neurônios dopaminérgicos que formam a SN derivam de células progenitoras provenientes do MV. Uma particularidade destes progenitores é sua geração a partir da linha média do MV (o assoalho da placa neural) o qual inicialmente é ocupado por células gliais que expressam a proteína *Sonic hedgehog* (Shh) (ANDERSON et al., 2005; PLACZEK et al., 1993; PLACZEK e BRISCOE, 2005). A teoria descreve que no 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 (fibroblast growth factor-8). Shh e FGF-8 são necessários para a proliferação destes progenitores neuronais antes da sua migração e diferenciação em uma célula com neurotransmissores específicos. Adicionalmente, TGF- β (*transforming growth factor- β*) é necessário para a indução da função dopaminérgica nas células mesencefálicas da SN 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

(monoaminérgicos) 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 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 (NUNES et al., 2003; PRAKASH e WURST, 2006; SIMEONE et al. 2005;). 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 ATV, são necessárias para a sobrevivência e a manutenção das células mesencefálicas dopaminérgicas.

As primeiras células que posteriormente se tornarão células dopaminérgicas são encontradas no MV de ratos no seu E-10,5 (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 após o nascimento (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).

2.10 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DA DOENÇA DE PARKINSON

Entre as opções terapêuticas para a PD cita-se a terapia medicamentosa, física e a cirúrgica. A terapia medicamentosa modula a sintomatologia da doença por reforçar a neurotransmissão dopaminérgica na circuitaria dos GB, de forma a balancear os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos. A terapia farmacológica foi estabelecida em 1961 com a introdução da terapia de substituição dopaminérgica com L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), molécula precursora de dopamina, visto que esta substância não atravessa a barreira hematoencefálica. A L-DOPA é convertida em dopamina por neurônios dopaminérgicos pela enzima dopa-descarboxilase (BIRKMAYER e HORNYKIEWICZ, 2001; COTZIAS, 1968). Além da L-DOPA, agonistas da dopamina, os quais estimulam diretamente receptores dopaminérgicos pós-sinápticos, têm utilidade no tratamento de estágios iniciais da PD para a prevenção ou retardo do aparecimento dos efeitos colaterais da L-DOPA, como flutuações motoras e discinesias. Além destes efeitos colaterais, há ainda a perda do efeito terapêutico da L-DOPA com o uso crônico (GLEIXNER et al., 2004). Após aproximadamente cinco anos de terapia com L-DOPA os pacientes apresentam flutuações no alívio dos sintomas e efeitos adversos do uso crônico da droga, como discinesias e fenômeno *on-off*. A combinação de L-DOPA com inibidores periféricos da dopa-descarboxilase, drogas que bloqueiam a degradação periférica da L-DOPA em dopamina, permite certo prolongamento do tratamento medicamentoso livre dos efeitos colaterais da L-DOPA. Além disso, esta associação permite uma redução da dose equivalente de L-DOPA (FEUERSTEIN, 2001). Drogas inibidoras da monoamina oxidase-B (MAO-B) e inibidoras da catecol-O-metil-transferase (COMT) aumentam a concentração de dopamina na fenda sináptica pela redução da degradação da dopamina e de precursores dopaminérgicos. Drogas

anticolinérgicas têm utilidade no tratamento da doença em estágio inicial e agem inibindo neurônios estriatais colinérgicos inibitórios. 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.

2.11 TRATAMENTO CIRÚRGICO DA DOENÇA DE PARKINSON

A principal indicação para procedimentos cirúrgicos é o tratamento de sintomas motores refratários à terapia medicamentosa (IACORNO et al., 1995). O tratamento neurocirúrgico foi primeiramente desenvolvido em 1930, baseado na ablação do córtex motor ou de parte do sistema dos GB. Poucas décadas depois, baseado na experiência adquirida com a cirurgia, em 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. A talamotomia é um procedimento utilizado com sucesso para a melhora do tremor refratário. Desvantagens desta técnica são o seu uso praticamente restrito ao tratamento sintomático do tremor e o aparecimento de efeitos adversos quando a cirurgia é realizada bilateralmente (HENDERSON e DUNNETT 1998). Entre as técnicas ablativas descreve-se a palidotomia, a qual apresenta efeito na diminuição das discinesias induzidas por L-DOPA. Efeitos colaterais como hemianopsia homônima parcial, disfagia e fraqueza foram relatados em 15% dos casos. A utilização de métodos de monitorização eletrofisiológica intraoperatória para mapear a zona sensório-motora pode reduzir drasticamente estes efeitos colaterais (OBESO et al., 1997). A palidotomia bilateral está associada

a relatos frequentes de hipofonia e disfagia. Atualmente, a modulação do STN através da EEP é o padrão-ouro no tratamento dos sintomas motores responsivos à dopamina. A supressão do STN está relacionada à melhora na tríade motora da PD, e.g. tremor, rigidez e hipocinesia. A lesão do STN foi associada ao aparecimento de movimentos involuntários espontâneos, como hemibalismo e coréia. Interessantemente, a EEP, reduz o risco destes efeitos adversos e apresenta a vantagem da reversibilidade (HENDERSON e DUNNETT, 1998). Foi proposto que a lesão do STN possa exercer efeito neuroprotetor sobre os neurônios dopaminérgicos da SNc. A lesão unilateral do STN impediu a queda da atividade da TH na SNc em um modelo unilateral de PD (PIALLAT et al., 1996). Interessantemente, estudos clínicos demonstraram que a supressão do STN não evita a progressão da doença (RODRIGUEZ et al., 1998). Estudos mais recentes reportando resultados pós-operatórios de longo prazo demonstraram progressão natural da doença apesar da bem sucedida modulação do STN (KLEINER-FISMAN ET AL., 2003; KRACK et al., 2003; RODRIGUEZ-OROZ et al., 2004).

2.12 TRANSPLANTE DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS PROVENIENTES DO MV

Uma modalidade cirúrgica em fase experimental inclui terapia celular restauradora através do transplante intraestriatal de células embrionárias dopaminérgicas provenientes do MV. O transplante celular permite a reinervação do *striatum* receptor e uma liberação continuada fisiológica de dopamina. Com esta técnica, almeja-se o tratamento dos casos refratários incluindo sintomas mais resistentes à EEP do STN e à terapia com L-DOPA, como o tempo de reação e o tempo de movimento para uma seqüência de movimentos (BROWN et al., 1999;

JAHANHAHI et al., 2000). Adicionalmente, espera-se melhora em outros sintomas específicos sensíveis à deficiência de dopamina como estimação de tempo e comportamento baseado em recompensa (ARRIEDA et al., 1992; SCHULTZ et al., 1993).

Ensaio clínico realizados no início da década de 90, os quais não utilizaram nenhum grupo controle ou processo de cegamento, forneceram dados de que neurônios embrionários nigrais humanos, retirados durante 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* hospedeiro, 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, estudos placebo-controlados e duplamente encobertos foram fomentados pela NIH (*National Institute of Health*). Nestes estudos havia um grupo controle, o qual era submetido à cirurgia, mas não recebia o transplante de células dopaminérgicas e o protocolo era duplamente encoberto. O resultado destes estudos foi desapontador, mas importante, ao fornecer as primeiras observações de alguma melhora promovida pelo transplante, claramente distinguível 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 subgrupo 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 estudos comprovou-se que vários fatores estão envolvidos no sucesso do transplante celular. Foi observado que pacientes com idade inferior a 60 anos, com doença em estágio inicial (UPDRS \leq 49) e que receberam quantidade maior de tecido proveniente do MV apresentaram melhora clínica motora significativa. Além disso, pacientes que apresentaram maior taxa de sobrevivência das células transplantadas e maior reinervação do *striatum* denervado, analisadas através de PET, obtiveram os melhores resultados clínicos (FREED et al., 2001; OLANOW et al., 2003). Quanto à terapia de restituição neuronal através do transplante de células embrionárias dopaminérgicas, existe a necessidade de pesquisa adicional para padronização da técnica de transplante e seleção adequada dos pacientes que se beneficiarão com a técnica. A substituição celular constitui uma técnica promissora para o tratamento da PD. Antes de sua utilização clínica em maior escala, faz-se necessário, entretanto, a realização de mais estudos em cultura celular e em modelos animais, pois estes fornecem melhor compreensão das interações existentes entre as células transplantadas e o hospedeiro, bem como da integração funcional das células dopaminérgicas no *striatum* acometido.

2.13 MODELO ANIMAL DE 6-OHDA PARA 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 dentro do sistema dos GB por meio de cirurgia estereotáxica, uma vez que a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (CENCI et al., 2002). Esta substância é ativamente absorvida pelos axônios de neurônios dopaminérgicos e é transportada ao corpo celular, onde age por meio de comprometimento metabólico mitocondrial, toxicidade enzimática e estresse oxidativo (BLUM et al., 2001;

OLANOW, 1993). Portanto, através do uso localizado de 6-OHDA, obtêm-se degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais.

A 6-OHDA pode ser injetada bilateralmente ou unilateralmente no FPM ou diretamente no *striatum*, produzindo diferentes modelos de PD. A injeção unilateral ou bilateral intraestriatal de 6-OHDA resulta em uma lesão parcial do sistema dopaminérgico nigroestriatal. Este modelo, conhecido como lesão terminal é análogo a estágios iniciais e/ou intermediários da PD em humanos (ROEDTER et al., 2000; ROEDTER et al., 2001). Lesão bilateral do FPM resulta em acinesia e déficits sensório-motores graves, incluindo afagia e adipsia. Animais com lesão bilateral do FPM 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 FPM direito (lesão completa). Este modelo de hemiparkinsonismo permite comparação direta dos efeitos da lesão e dos resultados terapêuticos em cada animal pela comparação dos dois hemisférios. Este é o modelo mais frequentemente usado e mimetiza o estágio avançado da PD, incluindo vários dos sintomas como: bradicinesia, instabilidade postural e déficit na motricidade fina (CENCI et al., 2002). Após quatro a seis semanas da injeção de 6-OHDA, a lesão do FPM resulta em uma depleção grave das células dopaminérgicas na SNc (SCHMIDT et al., 1982). Isto leva a uma depleção de dopamina no *striatum* ipsilateral superior a 97% (SCHMIDT et al., 1983; KIRIK et al., 1998). Este intenso déficit dopaminérgico não pode ser espontaneamente recuperado nem parcialmente compensado pelo lado contralateral à lesão (NIKKHAH e BRANDIS, 1995). A depleção dopaminérgica induz diversas alterações funcionais e estruturais no sistema nigroestriatal. Há uma hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos remanescentes por um aumento reativo dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos estriatais (receptores D2) (CREESE et al., 1997). Adicionalmente,

ocorrem mudanças nas vias colinérgicas, gabaérgicas e glutamatérgicas, além de alterações no metabolismo de neuropeptídeos e na atividade elétrica cerebral (SCHWARTING e HUSTON, 1996). Como resultado do desbalanço do sistema nigroestriatal, os animais apresentam déficits sensório-motores unilaterais, os quais podem ser avaliados por testes comportamentais.

Após a lesão unilateral com 6-OHDA os animais exibem uma tendência a rodar no sentido do hemisfério lesado ao caminhar (UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970). Este comportamento pode ser reforçado pelo estresse e, em particular, durante as rotações induzidas por anfetamina. Com a injeção intraperitoneal de anfetamina, ocorre liberação de dopamina e inibição da sua recaptação no hemisfério intacto, resultando em rotação no sentido ipsilateral à lesão (UNGERSTEDT e ARBUTHNOTT, 1970). A duração deste efeito é superior a 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 atua nos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos hipersensibilizados induz rotação em sentido contralateral à lesão (CREESE et al., 1997; MARSHALL e 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. O grau de depleção dopaminérgica se correlaciona com o comportamento rotacional (HUDSON et al., 1993). Rotação contralateral significativa após injeção de apomorfina somente é percebida após depleção dopaminérgica estriatal superior a 90%. Lesões parciais (75-90%) resultam em rotações moderadas com anfetamina, mas não há rotação com apomorfina. Uma lesão superior a 90% pode ser

comprovada funcionalmente por uma rotação significativa com apomorfina combinada com uma rotação com anfetamina superior a 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).

Após o transplante de células liberadoras de dopamina, redução das rotações induzida pela administração de apomorfina pode ser observada. Isto é consequência da produção de dopamina pelas células transplantadas e da diminuição da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos no *striatum* lesado (SAVASTA et al., 1992).

Embora a rotação induzida por drogas no modelo unilateral de doença de Parkinson esteja correlacionada com déficits motores observados na PD, bem como as discinesias induzidas por L-DOPA, a análise do comportamento motor mais complexo é necessária para uma avaliação mais precisa dos déficits motores destes animais (NIKKHAH e BRANDIS, 1995). Após lesão unilateral do FPM utilizando 6-OHDA, os animais apresentam um significativo déficit contralateral na coordenação e na motricidade fina dos membros anteriores (DUNNETT et al., 1983a; DUNNETT e IVERSEN, 1982; WHISHAW et al., 1986). Em 1992, Schalert et al. publicaram um método para avaliar a acinesia de membros anteriores e problemas de marcha em animais submetidos ao modelo unilateral de 6-OHDA, o teste do passo (“*stepping test*”). Neste teste, o animal é segurado pelo examinador pelo tronco e pelas patas traseiras enquanto é movido lateralmente sobre uma superfície plana. Enquanto o animal é movido, uma pata dianteira é bloqueada, e o número de passos dados pelo rato para recuperar o equilíbrio, em cada sentido da mobilização, é anotado.

Outro teste comportamental que avalia o comportamento exploratório do animal e a acinesia de membros anteriores é o teste do cilindro. Os ratos são

exploradores incansáveis, tanto em seu ambiente natural quanto em laboratório. Para explorar superfícies verticais, o animal levanta-se sobre os membros posteriores enquanto explora a superfície com as patas anteriores. O teste do cilindro se vale deste comportamento espontâneo do animal para avaliar a acinesia de membros anteriores, deficiências na iniciação de movimentos e controle de equilíbrio estático, principalmente do centro de gravidade (SCHALLERT E WOODLEE, 2005).

2.14 LESÃO DO STN PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO QUINOLÍNICO

O ácido quinolínico é um dos produtos da degradação do triptofano. É um agonista dos receptores NMDA e é produzido e liberado *in vivo* por macrófagos e pelas células da micróglia. Considera-se atualmente que seja uma excitotoxina cerebral endógena, com envolvimento em várias doenças neuroinflamatórias. Em concentrações patológicas, o ácido quinolínico exerce efeito citotóxico pela ativação de receptores NMDA. Além disso, essa neurotoxina também induz aumento da liberação de glutamato pelos neurônios, inibição da receptação de glutamato pelos astrócitos e inibição da glutamina sintetase levando a níveis elevados de glutamato e à neurotoxicidade (GUILLEMIN, 2012). Além de ser neurotóxico, o ácido quinolínico também é gliotóxico e induz apoptose dos astrócitos (LEE et al., 2010).

2.15 TERAPIA CELULAR RESTAURADORA NO MODELO ANIMAL DE 6-OHDA

Restauração do sistema nigroestriatal no modelo animal de 6-OHDA foi primeiramente demonstrada em 1979. Experimentos com transplante de tecido embrionário proveniente do MV implantado no neocórtex ou no ventrículo de ratos lesados com 6-OHDA demonstraram tanto 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* carente de dopamina. O número de fibras que desenvolveram conexões com o *striatum* apresentou correlação direta com o número de células sobreviventes e a redução das rotações induzidas por drogas (BJORKLUND et al., 1980). Em 1980, a técnica de neurotransplante experimental de células embrionárias foi padronizada, sendo o MV embrionário mecanicamente e enzimaticamente triturado até a obtenção de uma suspensão celular única. Esta suspensão era injetada, através de cirurgia estereotáxica, no *striatum* hospedeiro (BJORKLUND et al., 1983a). Os embriões eram retirados e preparados 14 dias após a fecundação (E-14). Neste estágio, os neurônios do MV completam o seu último ciclo mitótico e expressam marcadores dopaminérgicos, mas não exibem crescimento de dendritos ou axônios. Se dissecados em estágios anteriores, a diferenciação a um fenótipo dopaminérgico estaria diminuído. Em estágios mais avançados, a trituração retiraria os axônios das células e diminuiria sua viabilidade (VOORN et al., 1988; BJORKLUND e STENEVI, 1984). Células originárias de tecido doador que originalmente inervariam o *striatum* mostraram taxa de integração e sobrevivência após o transplante significativamente maior do que tecidos doadores provenientes de regiões cerebrais que normalmente não apresentam conexões com o *striatum* (ABROUS et al., 1988).

A eficácia da reconstrução funcional nigroestriatal provou ser dependente: (1) da taxa de sobrevivência e crescimento celulares, (2) dos tipos celulares e estágios evolutivos dos tecidos doadores (3) da técnica de implantação (4) do estabelecimento de conexões intercelulares após o transplante e (5) do grau dos déficits motores e comportamentais anteriores ao transplante (WINKLER et al.,

2000). Apesar dos avanços técnicos, a taxa de sobrevivência das células dopaminérgicas transplantadas não ultrapassou 5%, o nível de dopamina no hemisfério transplantado atingiu somente 10-30% comparado ao lado contralateral saudável, o crescimento das fibras das células dopaminérgicas transplantadas foi limitado a 1-2 mm de distância e a reinervação promovida pelos neurônios transplantados não excedeu 40% comparado ao hemisfério saudável (BRUNDIN e BJORKLUND, 1987; SCHMIDT et al., 1983; RIOUX et al., 1991; BJORKLUND et al., 1983a; 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 e reduziu o trauma mecânico da cirurgia estereotáxica e transformou o transplante neuronal com o uso de suspensão celular proveniente do MV embrionário uma técnica padronizada, 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 para a preparação de uma suspensão celular homogênea, pois agrupamentos celulares adeririam ao capilar de vidro. Esta técnica, conhecida como microtransplante, alcançou uma taxa de sobrevivência de células TH positivas cerca de dez vezes maior, um volume do transplante duas vezes maior e uma densidade de fibras TH positivas duas a três vezes maior. O trauma mecânico, o qual pode ser avaliado através da formação de cicatrizes astrogiais por imunohistoquímica por *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, esta técnica tornou o transplante em pequenas regiões cerebrais, como a SN ou em cérebros embrionários ou de ratos neonatais possível (NIKKHAH et al., 1995^a; NIKKHAK et al., 1995b). Os transplantes deste experimento foram realizados segundo o protocolo de microtransplante acima descrito.

3 MÉTODO

3.1 POPULAÇÃO ANIMAL

Foram utilizadas 60 ratas *Sprague-Dawley* (do laboratório *Charles River, Sulzfeld, Alemanha*), adultas jovens (dois 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 Universidade de Friburgo - Alemanha. As ratas foram alojadas em condições padrão desta universidade. O ciclo circadiano foi mantido alternando 12 horas com luz (diurno) e 12 horas sem luz (noturno). Os animais foram alojados em gaiolas transparentes de plexiglas em grupos de cinco ou seis. O acesso à comida e água foi *ad libitum* durante todo o experimento. 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* adultas jovens não gestantes
- Peso entre 250 e 300 gramas no início do experimento.
- Lesão adequada do FPM direito, comprovada pelo teste de rotação induzida por anfetamina (mais do que 5 rotações por minuto para a direita) e pelo teste do cilindro (menos de 25% de uso da pata contralateral à lesão).
- Lesão parcial do STN e/ou da ZI, comprovado por análise histológica, com as

colorações de Nissl e Neu-N (Núcleo Neuronal) nos grupos em que este procedimento foi realizado. Lesão parcial foi demonstrada pela perda da integridade tecidual e gliose.

- Contagem celular dopaminérgica igual ou superior a 700 células no *striatum* transplantado, comprovado por análise histológica através da coloração com TH, indicando técnica correta do transplante.

Critérios de exclusão:

- Ausência de lesão adequada do FPM direito.
- Ausência de lesão parcial do STN e/ou da ZI direita, nos grupos em que este procedimento foi realizado
- Número inferior a 700 células dopaminérgicas no *striatum* direito.

3.2 SUBDIVISÃO EM GRUPOS

Quatro semanas após a chegada dos animais, foi realizada a lesão do FPM direito em todas as ratas (n=50), excluindo-se as do grupo controle (grupo Cx, n=10), nas quais nenhum procedimento cirúrgico foi realizado. Quatro animais morreram durante a cirurgia. Depleção unilateral de dopamina foi confirmada pelo teste rotação induzida por drogas, realizado duas e quatro semanas após a lesão. Os animais que apresentaram menos de quatro rotações por minuto após injeção de apomorfina e menos que cinco rotações por minuto após aplicação de anfetamina no teste de rotação realizado duas semanas após a lesão do FPM foram novamente lesados. O teste do cilindro e o teste do passo foram realizados seis semanas após a lesão do FPM direito. Quatro ratas foram excluídas por não apresentarem lesão adequada de acordo com o teste de rotação com anfetamina e com o teste do cilindro. O

balanceamento para a divisão em grupos foi realizado para se obter grupos homogêneos, o que permite comparações posteriores entre os grupos. A lesão do STN e/ou da ZI (n=30) através da injeção de ácido quinolínico foi realizada sete semanas após a lesão do FPM, sendo que dois animais não sobreviveram à cirurgia. Os testes comportamentais induzidos por drogas e espontâneos e foram realizados quatro e seis semanas após este procedimento, respectivamente. Todos os animais sobreviventes (n=40), excluindo-se os pertencentes ao grupo controle, receberam transplante de células embrionárias provenientes do MV no *striatum* carente de dopamina onze semanas após a lesão do STN e/ou da ZI. Um animal cujo STN fora previamente lesado morreu durante este procedimento. Após o transplante, seguiram-se dois blocos dos testes comportamentais previamente descritos. A última sessão ocorreu uma semana antes da perfusão e análise histológica. Os animais que não apresentaram lesão parcial do STN e/ou da ZI confirmada por perda de integridade tecidual e gliose nas colorações de Nissl e Neu-N foram excluídos da análise estatística (n=4). Onze animais (cinco do grupo apenas transplantado) apresentaram menos do que 700 células dopaminérgicas transplantadas no *striatum* direito e foram excluídos. A análise histológica demonstrou em oito animais lesões parciais confinadas à ZI (grupo ZI/Tx) e em nove animais lesão parcial do STN a qual se estendia para a ZI (grupo STN/Tx). Os animais do grupo Tx (n=7) receberam transplante de células embrionárias como terapia única. Dos animais excluídos por apresentarem transplante com contagem celular insuficiente, cinco pertenciam ao grupo STN/Tx, um pertencia ao grupo ZI/Tx e cinco pertenciam ao grupo Tx. Todos os experimentos conduzidos neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade de Friburgo – Alemanha e foram realizados de acordo com este.

TABELA 1 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo	n	lesão do FPM	Lesão da ZI	Lesão do STN	Transplante
STN/Tx	9	+	+	+	+
ZI/Tx	8	+	+	-	+
Tx	7	+	-	-	+
Cx	10	-	-	-	-

FONTE: Dados do estudo

TABELA 2 - DESENHO DO EXPERIMENTO

Tempo (semanas)			Protocolo experimental
Após lesão do FPM	Após lesão do STN e/ou da ZI	Após o transplante	
-4			Chegada dos animais
0			Lesão do FPM
2			Rotação induzida por drogas
4			Rotação induzida por drogas
6			Testes do cilindro e do passo
7	0		Lesão do STN e/ou da ZI
	4		Rotação induzida por drogas
	6		Testes do cilindro e do passo
	11	0	Transplante
		4	Rotação induzida por drogas
		6	Testes do cilindro e do passo
		12	Rotação induzida por drogas + Testes do cilindro e do passo
		13	Perfusão + Histologia

FONTE: Dados do estudo.

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

Embriões no E-14, 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 MV do embrião foi dissecado. Na figura 2 observa-se um desenho esquemático da dissecção e preparação do MV embrionário até a obtenção da suspensão celular única.

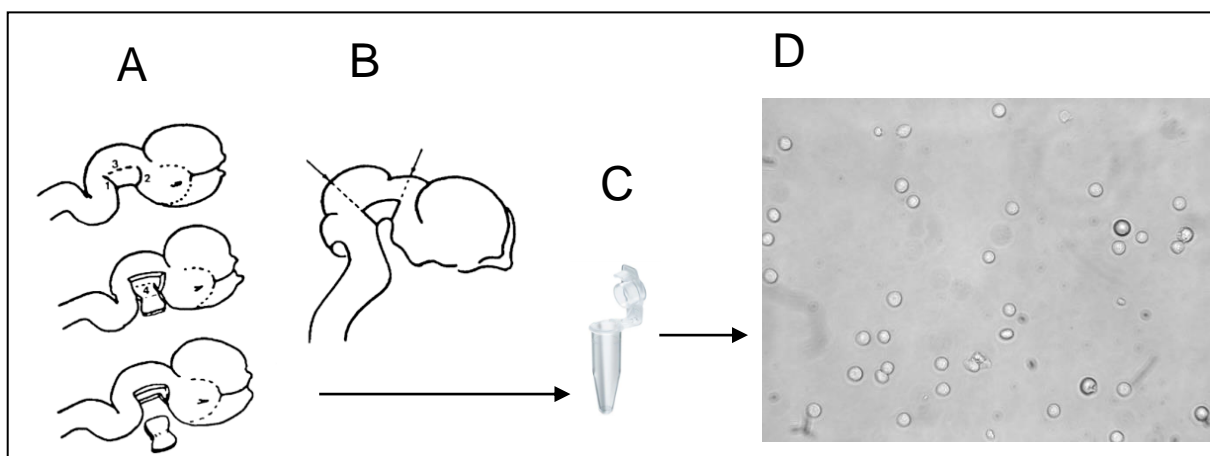


FIGURA 2 - ESQUEMA DA DISSECÇÃO DO MV DE EMBRIÕES E-14 E FIGURA DA SUSPENSÃO CELULAR ÚNICA.

A) SNC embrionário, B) esquema de dissecção do mesencéfalo ventral, C) digestão enzimática e trituração mecânica, D) suspensão celular única.

FONTE: Dados do estudo.

As ratas prenhas foram anestesiadas através de injeção intraperitoneal de Ketamina 10% (0,1 ml/kg; *Essex, Munique, Alemanha*) e Xilazina (*Rompum®*, 2%, 0,01ml/kg; *Bayer, Leverkusen, Alemanha*). 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 tripsina 0,1% e DNase 0,05% por 20 minutos à 37°C. Na seqüência, a suspensão foi lavada quatro vezes em DNase 0,05% diluída em HBSS. Após remoção do sobrenadante, o tecido foi mecanicamente triturado utilizando-se pontas de pipeta de 1000µl e 200µl polidas a fogo. A suspensão celular única resultante foi ajustada para uma concentração de 130.000 células/µl e uma viabilidade maior que 98%, a qual foi avaliada pelo método de azul de triptano.

3.4 ANESTESIA E PREPARAÇÃO DO ANIMAL

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com anestesia geral inalatória. A anestesia foi induzida com isoflurano 4% (*Abbott*, Alemanha) e fluxo de oxigênio de 4l/min e a manutenção foi realizada com isoflurano 2-2,5% e fluxo de oxigênio de 2l/min. O sítio cirúrgico foi tricotomizado (aparelho de barbear da empresa *Braun*, Alemanha) e lavado com iodo alcoólico (*Mundipharma*, Alemanha). As córneas foram protegida pela aplicação de pomada ocular (*Bepanthen* creme, da empresa *Roche*, Alemanha). Subsequentemente, os animais foram fixados no *frame* estereotáxico (*Stoelting*, *frame* estereotáxico número 51600, *Stoelting*, Estados Unidos da América) e foi realizada incisão longitudinal de dois centímetros para exposição do crânio e do bregma como marcos anatômicos. Nas coordenadas estereotáxicas apropriadas (Tabela 3) foram realizados orifícios de 1-2 mm utilizando *Microdrill* (*Proxxon Micromot* 40, da empresa *Proxxon*, Alemanha) sem lesar a dura-máter. Após os procedimentos a pele foi suturada com cliques cirúrgicos e novamente lavada com iodo. Analgesia pós-operatória foi conferida pela injeção subcutânea de dipirona (50 mg/kg), aplicada após todos os procedimentos cirúrgicos.

TABELA 3 - COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO PARA LESÃO DO FPM, PARA LESÃO DO STN E/OU DA ZI E PARA O TRANSPLANTE DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS.

Procedimento cirúrgico	Barra de dentes (BD)	Antero-posterior (AP)	Lateral (L)	Dorso-ventral (DV)
Lesão do núcleo prósencefálico medial direito	+3,4 // -2,3	-4 // -4,4	-0,8 // -1,2	-8 // -7,8
Lesão do núcleo subtalâmico direito	-3,3	-3,3	-2,6	-7,4 // -7,2
Transplante de células embrionárias dopaminérgicas	0 // 0	0 // +1,2	-2,5	-5 // -4

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Dados em milímetros.

3.5 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 (3,6µg/µl em 0,2% de ácido ascórbico e 0,9% de solução salina) no FPM direito em dois trajetos (Figura 3). Duas injeções estereotáxicas foram realizadas nas seguintes coordenadas em relação ao bregma e à dura-mater (PAXINOS E WATSON, 2007). Primeiro trajeto (em mm): BD= +3,4; AP= -4,0; L= -0,8; DV= -8,0. Segundo trajeto (em mm): BD= -2,3; AP= -4,4; L= -1,2; DV= -7,8.

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 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) numa velocidade de injeção de 2 μ l/min. Antes de ser retirada, a cânula foi mantida na mesma posição por três minutos para permitir a difusão da toxina no tecido circundante. Para prevenir oxidação, a solução de 6-OHDA foi mantida em gelo e protegida da luz.

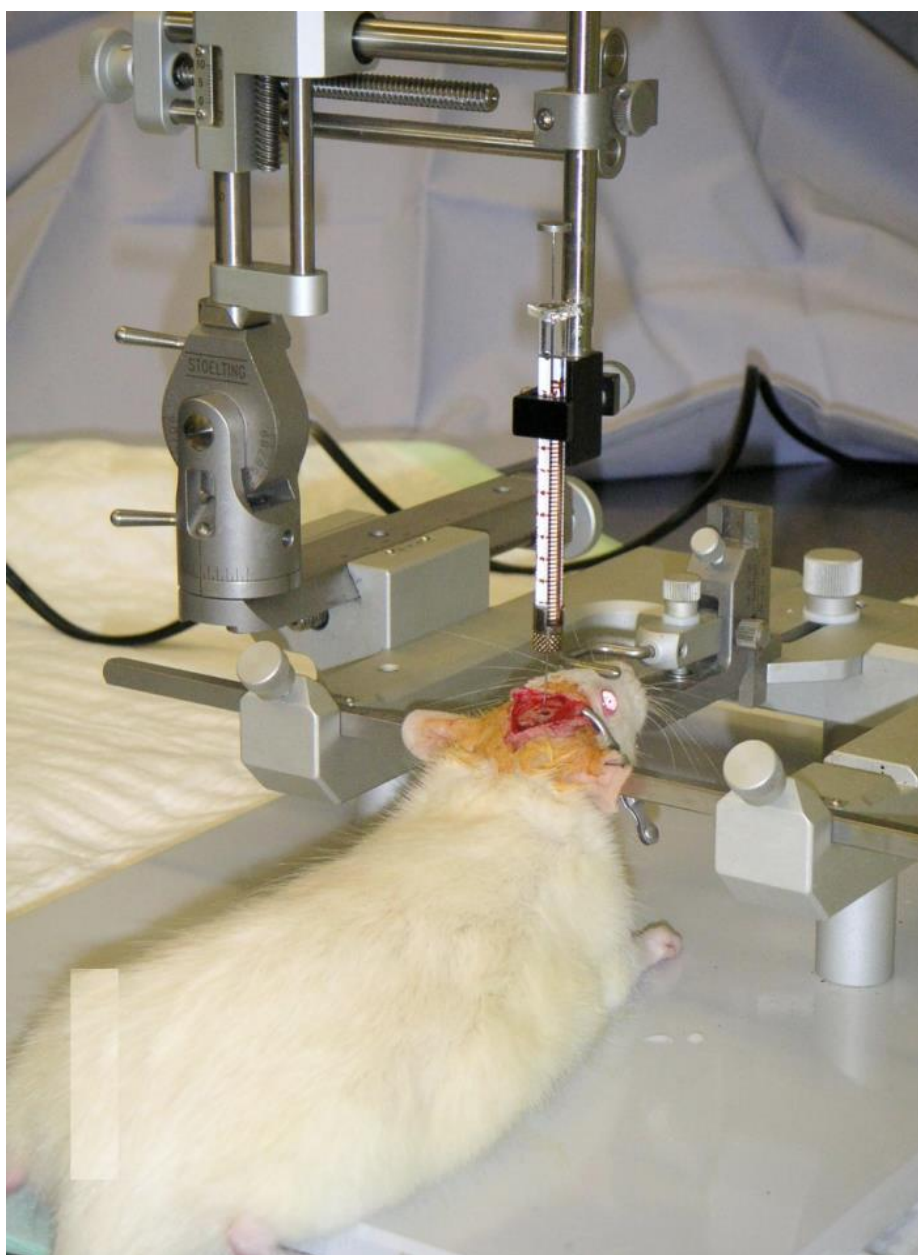


FIGURA 3 LESÃO DO FEIXE PROSENFÁLICO MEDIAL DIREITO PELA INJEÇÃO 6-OHDA
FONTE: Dados do estudo.

3.6 LESÃO DO STN E/OU DA ZI COM ÁCIDO QUINOLÍNICO

Após indução da anestesia os animais foram posicionados no *frame* estereotáxico com a BD à -3,3 mm. Um pequeno orifício foi drilado no crânio para injeção estereotáxica de ácido quinolínico (ácido 2,3 pirinodicarboxílico) nas seguintes coordenadas AP= -3,3; L= -2,6; DV₁= -7,4; DV₂= -7,2 (PAXINOS e WATSON, 2007). A lesão foi realizada com uma seringa de *Hamilton* de 10µl conectada a uma cânula de aço de 26 Gauge. Em cada coordenada 0,15 µl da solução de ácido quinolínico 0,12-M (*Sigma - Aldrich* – Estados Unidos da América) em solução salina (pH = 7,4) foi injetada a uma velocidade de 0,1 µl por 15 segundos. Após a injeção, a cânula foi mantida em posição por 3 minutos para permitir a dispersão da solução no tecido adjacente. Ao término do procedimento, os animais receberam 5 mg/kg de diazepam intraperitoneal para suprimir crises convulsivas no período pós-operatório imediato e dipirona 50 mg/kg subcutânea foi administrada para conferir analgesia.

3.7 TRANSPLANTE DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS ORIGINÁRIAS DO MESENCÉFALO VENTRAL

O transplante da suspensão celular única no *striatum* depletado de dopamina foi realizado onze semanas após a lesão do STN e/ou da ZI. Para reduzir o trauma mecânico foi utilizado um capilar de vidro (Universidade de Friburgo, Alemanha) com diâmetro de 50 µm conectado a uma seringa de *Hamilton* (*Hamilton Europe*, Suíça) de 2 µl. Após lavar o capilar de vidro com solução acelular foi realizado o transplante de células embrionárias provenientes do MV em dois trajetos e quatro depósitos (vide tabela 3). Cada depósito recebeu 0,5 µl da suspensão celular única, a qual tinha a concentração de 130.000 células/µl, resultando num total de 260.000 células

transplantadas por *striatum*. A viabilidade das células na suspensão celular era superior a 98%, avaliada através do método de azul de triptano. Após injeção da suspensão celular, o capilar foi mantido em cada posição por 3 minutos antes de sua lenta retirada. Este processo foi repetido para cada tracto. Depois de retirada, a seringa foi novamente lavada com solução acelular.

3.8 ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS

Este teste foi realizado quatro semanas após cada procedimento cirúrgico e adicionalmente doze semanas após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas. Em cada sessão, primeiramente foi realizado o teste de rotação induzida pela injeção subcutânea de apomorfina e dois dias após foi realizado o teste de rotação induzida pela injeção intraperitoneal de anfetamina. Este intervalo de dois dias entre os testes foi dado para garantir a completa metabolização da apomorfina antes da posterior rotação com anfetamina.

A solução de apomorfina (*Sigma*, Estados Unidos da América) foi preparada diluindo-se 0,5 mg de hidrocloreto de apomorfina e 2 mg de ácido ascórbico em 10ml de solução salina isotônica estéril. Após o preparo, a solução foi mantida a 4°C no escuro até sua completa utilização para evitar oxidação. Após injeção subcutânea de 0,05 mg/kg de apomorfina, os animais foram conectados ao rotômetro e seu comportamento rotacional analisado por 40 minutos. Para o teste de rotação induzida por anfetamina, a solução de anfetamina foi preparada adicionando-se 12,5 mg de sulfato de D-anfetamina (da empresa *Sigma*, Estados Unidos da América) à 5 ml de solução salina isotônica estéril, obtendo-se uma concentração de 2,5 mg/ml. Após conexão do animal ao rotômetro, esta solução foi injetada intraperitonealmente na dose de 2,5 mg/kg e o padrão rotacional foi gravado por 90 minutos.

Para realização do teste de rotação induzida por drogas utilizou-se rotômeros de acordo com o modelo de Ungerstedt e Arbuthnott, 1970. Os rotômeros empregados tinham o formato côncavo, parecido com uma tija (figura 4). Para contagem, os animais foram individualmente conectados ao sistema de aferição, constituído de um fio elástico preso ao redor do tórax do animal, imediatamente posterior à pata dianteira. O elástico era ajustado de modo confortável a fim de não restringir os movimentos ou perturbar o animal (figura 5).

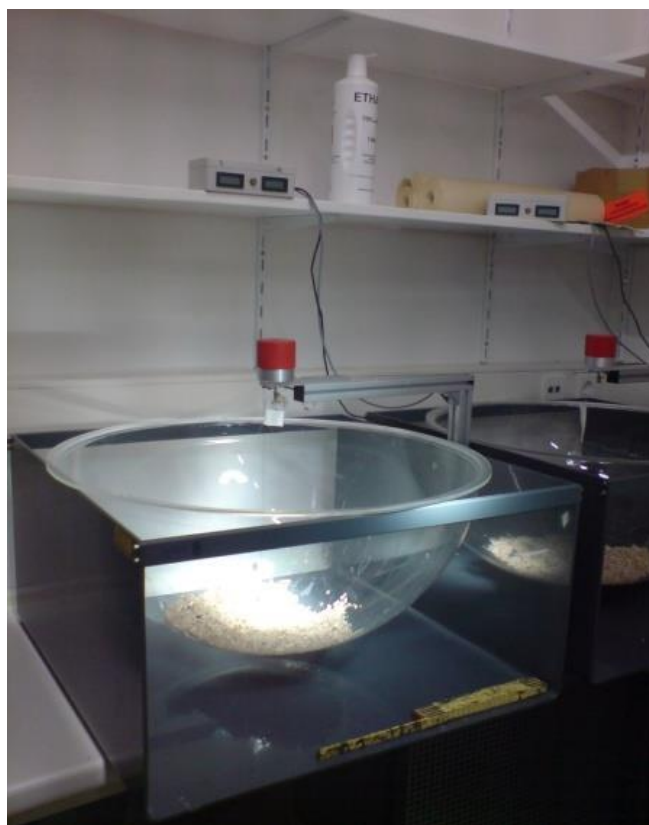


FIGURA 4 - CAIXA EM FORMATO CÔNCAVO PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DE ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.
FONTE: Dados do estudo.



FIGURA 5 - ANIMAL COLOCADO NA CAIXA E CONECTADO AO ROTÔMETRO
FONTE: Dados do estudo.

Um fio de aço de 0,4 mm de diâmetro é preso tanto ao elástico que envolve o animal quanto à base do rotômetro (Universidade de *Hannover*, Alemanha). Na base, localizada no centro geométrico de uma esfera, um sistema composto de rolamentos o qual reage a cada rotação do animal permite a contagem eletrônica de dez animais simultaneamente (figura 6). Os dados obtidos pela base 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 no 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.

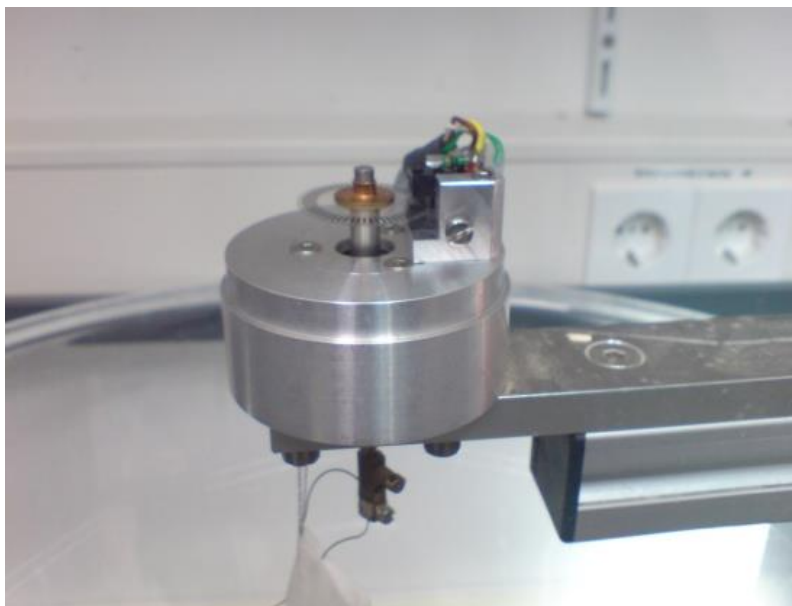


FIGURA 6 - BASE DO ROTÔMETRO, DEMONSTRANDO O SISTEMA DE ROLAMENTOS, O QUAL ESTÁ CONECTADO AO COMPUTADOR PARA ANÁLISE DOS DADOS.
FONTE: Dados do estudo.

Este desenho não restringe os movimentos do animal e impede que o fio que o conecta a base seja demasiadamente esticado.

3.9 TESTE DO CILINDRO

O teste do cilindro (Figura 7) é comumente empregado em modelos animais de doença de Parkinson. Este teste utiliza o comportamento explorador espontâneo do animal para avaliação da assimetria motora das patas dianteiras. Os ratos foram submetidos ao teste do cilindro seis semanas após cada procedimento cirúrgico e adicionalmente doze semanas após o transplante celular. Para tal, os mesmos foram colocados no centro de um cilindro transparente de plexiglas (Universidade de Friburgo – Alemanha) de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura por 4 minutos. O comportamento explorador do animal foi gravado por uma câmera de vídeo localizada acima do cilindro. O número de vezes que o animal tocou a parede lateral do cilindro com sua pata dianteira direita ou esquerda foi contado. Os resultados

foram analisados como a porcentagem de toques da pata dianteira contralateral aos procedimentos cirúrgicos em relação ao total de toques com as duas patas.



FIGURA 7 – ANIMAL REALIZANDO O TESTE DO CILINDRO
FONTE: Dados do estudo

3.10 TESTE DO PASSO

Acinesia do membro anterior foi testada através do teste do passo, o qual foi realizado seis semanas após cada procedimento cirúrgico e adicionalmente doze semanas após o transplante de células. Neste teste, o animal é movido lateralmente sobre uma superfície plana 60 cm para a direita e 60 cm para a esquerda durante aproximadamente 4 segundos para cada lado, enquanto uma pata dianteira é bloqueada (Figura 8). O número de vezes que o animal se apoia na superfície plana com a pata não bloqueada, movimento semelhante a um passo, foi contado e anotado separadamente para cada sentido, medial e lateral. Em cada sessão este

processo foi repetido três vezes com a pata contralateral aos procedimentos e os resultados foram expressos como a média de passos em cada sentido em cada sessão. Para realização deste teste é necessário que o animal esteja acostumado com o examinador e a ser manipulado, uma vez que exige que o animal esteja confortável para sua correta execução.

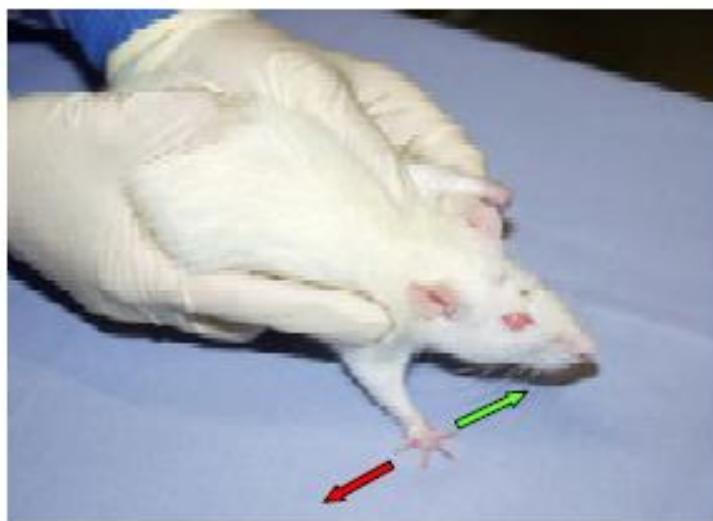


FIGURA 8 – ANIMAL REALIZANDO O TESTE DO PASSO.

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: O animal é segurado pelo examinador, o qual bloqueia uma pata dianteira do animal.

3.11 PERFUSÃO DO ANIMAL E FIXAÇÃO DO CÉREBRO EM FORMALDEÍDO

A acurada perfusão e fixação do cérebro do animal é um passo crucial para a preservação do tecido e para a análise histológica. Treze semanas após o transplante de células embrionárias provenientes do MV, os animais foram terminalmente anestesiados com uma *overdose* de ketamina e xilasina. O abdômen foi aberto, o músculo diafragma incisado e o conteúdo da caixa torácica exposto para visualização do coração e dos grandes vasos da base. Após abertura do ventrículo esquerdo, uma cânula de metal de 18G com ponta romba conectada a uma bomba de perfusão foi inserida transcordialmente até atingir a aorta

ascendente. Nesta posição a cânula foi fixada com auxílio de uma pinça cirúrgica tipo hemostática. O ventrículo direito foi aberto com uma tesoura cirúrgica para permitir a evasão do líquido perfundido excedente e a aorta abdominal foi clampeada. Os animais foram primeiramente perfundidos com 300 ml de uma solução gelada de 1xPBS e posteriormente com 300 ml de uma solução gelada de formaldeído a 4%. A velocidade de perfusão foi ajustada para 1.500 ml/h. Após o término da perfusão os animais foram decapitados, os cérebros retirados e pós-fixados em uma solução contendo formaldeído 4% por 12 horas. Posteriormente, os cérebros foram cuidadosamente transferidos para frascos de vidro contendo sucrose 30% e mantidos a 4 °C até que os mesmos afundassem. Isto significa que o tecido estava embebido em sucrose e adequado para o corte.

3.12 CORTE E COLETA DO TECIDO CEREBRAL

Os cérebros fixados e embebidos em sucrose 30% foram cortados com um criótomo (Criótomo SM 2000R, *Leica*, Alemanha) após congelamento a -40°C. O córtex direito foi marcado através de um corte superficial com um bisturi. O cérebro foi preso no criótomo com uma solução de *Tissue-Tec* (*Sacura*, Holanda) e congelado a -40°C. Os cortes coronais rostrais de 40 µm de espessura foram coletados em frascos de vidro contendo 1XPBS até visualização do hipocampo em 1:6 séries. Os cortes caudais incluindo o STN foram cortados a 30 µm de espessura e coletados em 1:2 séries para permitir melhor controle histológico da lesão do STN e/ou da ZI.

3.13 COLORAÇÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA

Os cortes rostrais foram corados com tirosina hidroxilase (TH) para análise do transplante, e os cortes caudais com Nissl e Neu-N para verificação da lesão do STN e/ou da ZI.

TH é um marcador imunohistoquímico de neurônios monoaminérgicos, incluindo os dopaminérgicos. Na cascata metabólica da dopamina, a TH catalisa a hidroxilação de tirosina à L-DOPA, a qual *in vivo* é descarboxilada à dopamina. A imunohistoquímica foi realizada pela técnica de *free-floating* utilizando dois mililitros de reagente para cada frasco de vidro. Durante todos os períodos de incubação os frascos foram mantidos em uma plataforma em constante agitação à temperatura ambiente. Caso não mencionado o contrário, após cada passo os cortes foram lavados três vezes com 1xPBS. Primeiramente, os cortes rostrais foram incubados por 10 min em 3% H₂O₂/10% Metanol dissolvido em 1xPBS para inativar a peroxidase endógena. A fim de bloquear possíveis sítios ligadores inespecíficos, o tecido foi incubado com solução bloqueadora por duas horas. O anticorpo primário (#T1299, *mouse anti-TH*, Sigma – Estados Unidos da América, diluído a 1:2000 de solução bloqueadora) foi adicionado, sem lavagem da solução bloqueadora e incubado por 12 horas. O anticorpo secundário (#E0464, *goat anti-mouse*, marcado com biotina, Dako – Dimamarca, diluído a 1:200 de 1xPBS) foi adicionado aos frascos contendo os cortes e incubado por 1 hora. Após incubação com solução ABC (Vectasin, Estados Unidos da América) por 1 hora, os cortes foram tratados com DAB (Merck, Alemanha). O período de incubação, de 2 a 4 minutos, foi analisado individualmente até a intensidade ideal da coloração por DAB ser atingida. Após lavagem cuidadosa os cortes foram montados em lâminas e secados à temperatura ambiente por 12 horas. Finalmente, o tecido foi desidratado por

submersão na seqüência de álcoois descrita a seguir: 70% EtOH - 70% EtOH - 96% EtOH - 96% EtOH - 100% EtOH - 100% EtOH – Xilol – Xilol. Imediatamente após, as lâminas foram cobertas com cola *Histofluid* (*Zitt-Thoma*, Alemanha) e lamínulas e deixadas para secar por 12 horas a temperatura ambiente.

Neu-N reage com a maioria das células neuronais maduras, incluindo as células dos gânglios da base. Foi utilizado, em conjunto com a coloração de Nissl para identificar a lesão do STN e/ou da ZI. Para coloração com Neu-N foi utilizado técnica de imunohistiquímica por *free-floating*. Os passos foram idênticos à coloração com TH, diferindo somente pelos anticorpos empregados. O anticorpo primário utilizado foi o *mouse-anti-NeuN* (#MAB377, p30 Merck Millipore – Estados Unidos da América) na diluição 1:250 de solução bloqueadora. O anticorpo secundário utilizado foi *rabbit-anti-mouse IgG* marcado com biotina (#E0464, Dako - Dinamarca) diluído à 1:200 de 1xPBS.

Para a coloração de Nissl os cortes cerebrais foram primeiramente montados em lâminas, as quais foram imersas em uma seqüência de soluções. A solução de Nissl 0,1% foi preparada pela adição de 0,5g de Violeta de Cresila, 0,103g de acetato de sódio e aproximadamente 1,65ml de ácido acético para cada 500 ml de solução. O pH foi ajustado para 3,5 através da adição de ácido acético. Primeiramente, as lâminas foram imersas brevemente em água acética (ácido acético em água bidestilada 1:1000), seguida por submersão na solução de 0,1% de Violeta de Cresila por 10 a 20 min até atingir a intensidade de coloração desejada. Subseqüentemente as lâminas foram novamente mergulhadas na solução de água acética e posteriormente desidratadas por imerção numa seqüência crescente de álcoois: 70% EtOH – 70% EtOH - 90% EtOH – 100% EtOH – 100% EtOH – Xilol – Xilol. Após a coloração, as lâminas foram imediatamente cobertas com cola *Histofluid* e lamínula e deixadas para secar por 12 horas em temperatura ambiente.

3.14 ANÁLISE MORFOLÓGICA: NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS, DENSIDADE DAS FIBRAS DOPAMINÉRGICAS PROVENIENTES DO TRANSPLANTE E ANÁLISE DA LESÃO DO STN E DA ZI

A contagem de células TH positivas foi realizada no microscópio *Leica DMRB* (*Leica* – Alemanha) usando o programa *Stereoinvestigator* (versão 5.05.1, *MicroBrightField*, Estados Unidos da América) como paradigma estereológico. Os cortes ântero-posteriores foram analisados e as células dopaminérgicas sobreviventes no transplante contadas em uma série rostral completa. O número total de células foi calculado através da fórmula de *Abercrombie* (*ABERCROMBIE*, 1946). $P = M / (D + M) * A * N$, onde P= número total de células dopaminérgicas; M= espessura dos cortes, aqui 40 μm ; D= diâmetro da células dopaminérgicas, aqui 17,12 μm ; A= número de células contadas; N= número de séries, no caso, seis.

A reinervação promovida pelo transplante no *striatum* carente de dopamina foi analisada por meio da densidade óptica (DO) das fibras nervosas adjacentes ao transplante. Esta DO foi comparada à densidade óptica do *striatum* intacto e à DO do corpo caloso, a qual foi utilizada como controle. A DO foi calculada em quatro coordenadas ântero-posteriores selecionadas (+1,7; +1,0; +0,48; -0,4) e foi realizada no microscópio *Olympus AX70* (Microscópio *Olympus* com câmera *Olympus C-12*, Alemanha) através do programa *analySIS* (*Soft Imaging System*, Alemanha). A densidade de fibras TH positivas foi expressa como a porcentagem relativa do *striatum* transplantado comparado ao *striatum* intacto e foi expressa como uma proporção: $(\text{DO do } \textit{striatum} \text{ transplantado} - \text{DO do corpo caloso} / \text{DO do } \textit{striatum} \text{ saudável} - \text{DO do corpo caloso}) * 100$.

Os cortes caudais foram analisados no microscópio *Olympus AX70* para detectar a presença da lesão do STN e/ou da ZI utilizando as colorações de Nissl e

Neu-N. Todos os cortes ântero-posteriores foram analisados com ambas as colorações. A lesão parcial do STN e/ou da ZI foi caracterizada como perda da integridade tecidual, gliose e atrofia nas estruturas estudadas. Como critério para inclusão dos animais no grupo STN/Tx, considerou-se lesão de aproximadamente 40%-60% do STN, na análise microscópica visual. Em todos os animais deste grupo foi observado, na análise microscópica, adicionalmente, lesão discreta da ZI. Estas lesões localizaram-se praticamente da totalidade dos casos na região caudal da ZI e acometeram aproximadamente 5-10% desta estrutura. Os animais incluídos no grupo ZI/Tx, apresentaram lesões, caracterizadas por perda da arquitetura tecidual, gliose e atrofia, envolvendo 20% a 40% da ZI e se localizaram praticamente da totalidade dos casos na região rostro-lateral. Adicionalmente, observou-se que as lesões descritas estavam confinadas no STN e/ou na ZI, não acometendo estruturas adjacentes.

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após confirmação da distribuição normal dos dados, a análise estatística foi realizada através do *software Statistica (StatSoft, Estados Unidos da América)* usando o *one-way ANOVA (Analysis of Variance)* ou *two-way ANOVA* com mensurações repetidas. Caso a hipótese nula (H_0), isto é, as médias de todos os grupos são as mesmas fosse ser descartada pelo ANOVA, aplicava-se o *Newman Keuls* como teste *post-hoc* para definir quais médias diferiam estatisticamente. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EPM). Para confecção dos gráficos foi utilizado o programa *Sigma Plot (Systat Software – Estados Unidos da América)*.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TRANSPLANTE

A coloração com TH foi realizada para contagem de neurônios dopaminérgicos sobreviventes e para avaliar a reinervação por fibras neuronais no *striatum* adjacente ao transplante, através da DO. Nas figuras 9, 10 e 11 observa-se preparados histológicos corados com TH demonstrando o transplante em animais submetidos à lesão do STN, à lesão da ZI e ao transplante celular como intervenção única, respectivamente, nas coordenadas +1,7; +1,0; +0,48 e -0,4. Em todos os grupos, os animais apresentaram transplantes com células dopaminérgicas agrupadas na interface entre o *striatum* hospedeiro e o transplante ou dentro do núcleo do transplante. Todos os transplantes revelaram uma morfologia clássica com a maioria das células agrupadas na periferia e apenas poucas células e reinervação no núcleo. Na contagem do número de células dopaminérgicas existentes no transplante, o grupo STN/Tx apresentou uma média de 1769 (\pm 211) células, o grupo ZI/Tx 2123 (\pm 222) e o grupo Tx 857 (\pm 53) (Tabela 4). Observou-se um efeito de grupo no *one-way ANOVA* ($F(2,21)=10,80, p=0,0005$). Aplicando-se o teste post-hoc, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos STN/Tx e Tx ($p=0,003$) e entre os grupos ZI/Tx e Tx ($p=0,0005$). A reinervação do *striatum* foi mensurada através da DO do *striatum* adjacente ao transplante, excluindo os núcleos celulares. Embora uma intensa tendência a uma melhor reinervação do *striatum* hospedeiro tenha sido observada nos grupos que receberam lesão parcial do STN e/ou da ZI, esta não atingiu diferença estatística significativa ($F(2,21)=2,95, p=0,07$). As médias de reinervação obtidas foram de 44,17% (\pm 4,23%) no grupo STN/Tx, 45,64% (\pm 2,6%) no grupo ZI/Tx e 34,6%

($\pm 2,3\%$) no grupo Tx (Tabela 4). No gráfico 1, estão representadas as médias \pm EPM do número de células no transplante e da taxa de reinervação do *striatum* hospedeiro por fibras provenientes do transplante em cada grupo experimental.

TABELA 4 – TABELA REPRESENTATIVA DO NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS NO TRANSPLANTE E DA PORCENTAGEM DE REINERVAÇÃO ESTRIATAL ADJACENTE AO TRANSPLANTE EM CADA ANIMAL INCLUÍDO NO ESTUDO.

Grupo	Animal	Células	Reinervação
STN/Tx	1	2176,84	23,70
STN/Tx	2	2960,00	46,83
STN/Tx	3	1393,68	42,70
STN/Tx	4	2000,00	48,22
STN/Tx	5	2029,47	58,78
STN/Tx	6	1132,63	41,99
STN/Tx	7	1730,53	56,91
STN/Tx	8	1722,11	53,61
STN/Tx	9	778,95	24,76
Média		1769	44,17
EPM		211	4,23
ZI/Tx	1	2164,21	39,63
ZI/Tx	2	2652,63	56,49
ZI/Tx	3	2370,53	41,27
ZI/Tx	4	2766,32	46,28
ZI/Tx	5	1511,58	45,02
ZI/Tx	6	2736,84	57,05
ZI/Tx	7	1701,05	37,83
ZI/Tx	8	1086,32	41,56
Média		2123	45,64
EPM		222	2,6
Tx	1	850,53	27,73
Tx	2	1035,79	44,89
Tx	3	880,00	34,26
Tx	4	707,37	29,30
Tx	5	757,89	37,59
Tx	6	720,00	30,47
Tx	7	1052,63	37,94
Média		857	34,6
EPM		53	2,3

NOTA: Dados do estudo.

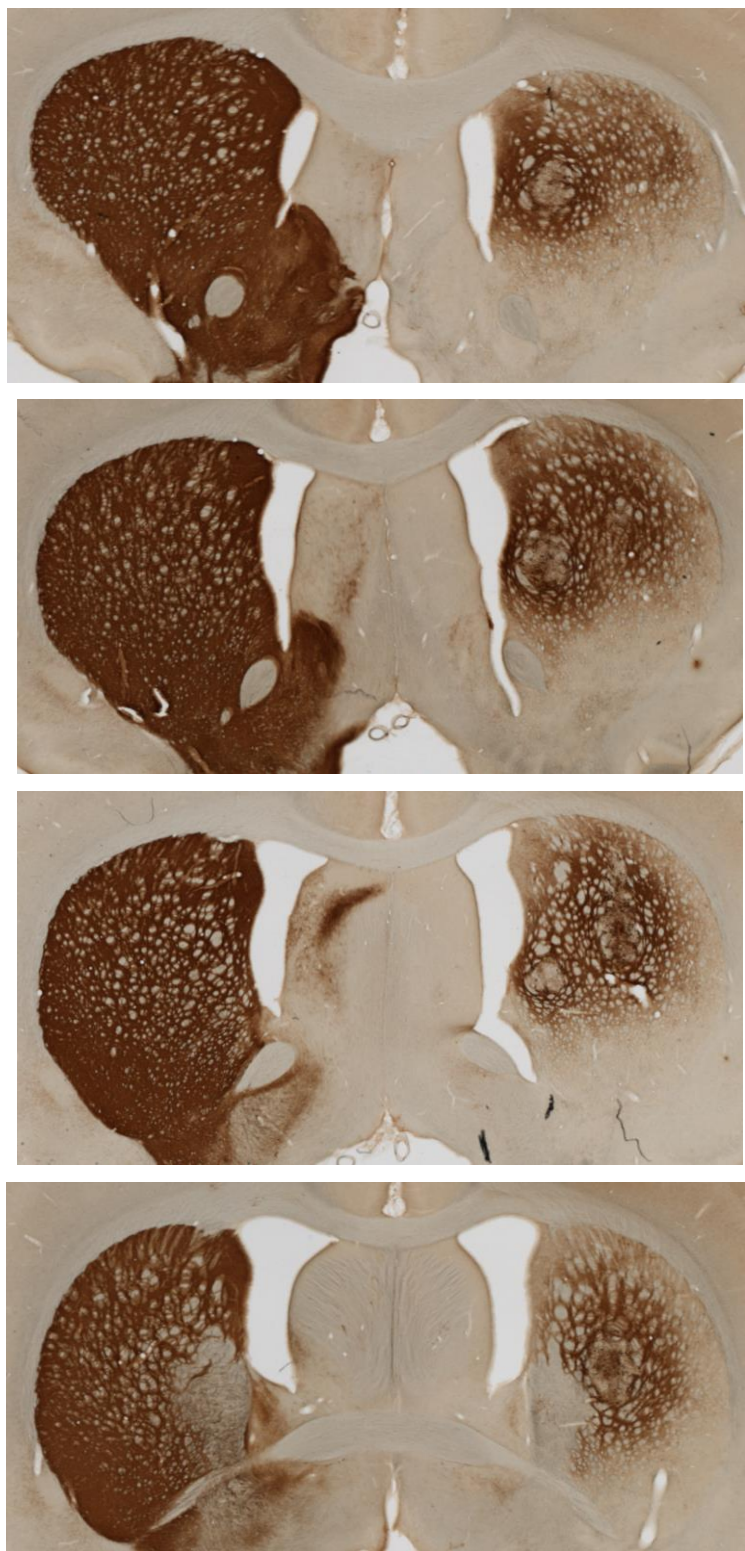


FIGURA 9 – FOTOGRAFIAS DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS CORADOS COM TH DEMONSTRANDO O TRANSPLANTE EM UM ANIMAL SUBMETIDO À LESÃO PARCIAL DO STN
FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Observa-se no lado esquerdo da foto o *striatum* intacto, com coloração marrom escura. No lado direito da foto, observa-se o *striatum* carente de dopamina (marrom claro) pela lesão do FPM direito. Observa-se também, o transplante de células embrionárias no *striatum* carente de dopamina (núcleos celulares e reinervação do *striatum* adjacente).

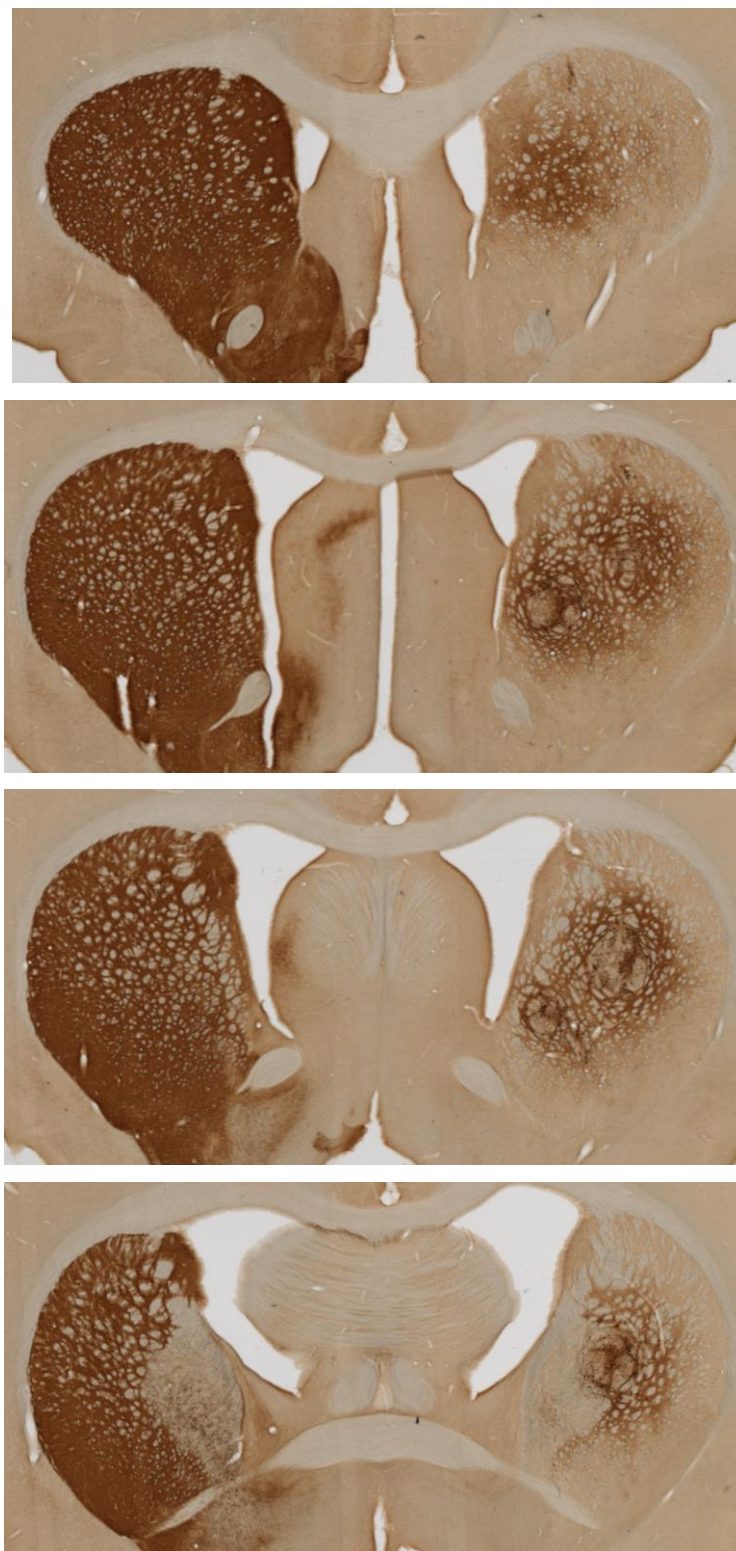


FIGURA 10 – FOTOGRAFIAS DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS DEMONSTRANDO O TRANSPLANTE EM UM ANIMAL SUBMETIDO À LESÃO PARCIAL DA ZI FONTE. Dados do estudo.

NOTA: Preparado histológico corado com TH, onde se observa o transplante celular dopaminérgico no striatum direito (da foto). As células transplantadas reinervam o striatum adjacente e o transplante apresenta a característica clássica com células predominantemente na periferia e poucas células e reinervação no centro do transplante.

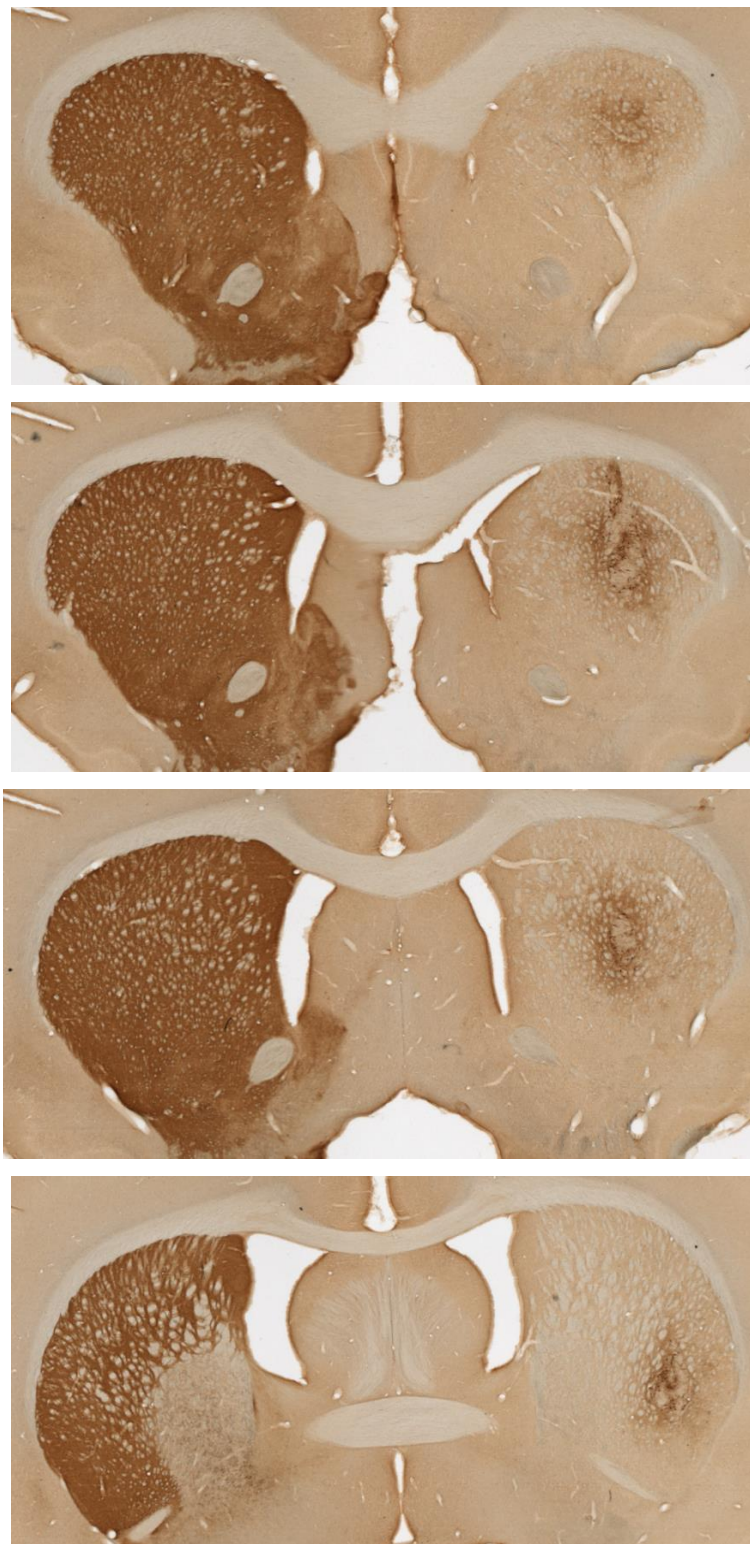


FIGURA 11 – FOTOGRAFIAS DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS DEMONSTRANDO O TRANSPLANTE EM UM ANIMAL DO GRUPO TX

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Observa-se o transplante no *striatum* de um animal submetido unicamente à terapia de restauração celular nas mesmas coordenadas ântero-posteriores das figuras 9 e 10. Nota-se a reinervação por fibras dopaminérgicas provenientes dos neurônios transplantados no *striatum* direito. Comparando-se as figuras, observa-se claramente maior coloração por TH (corante de neurônios dopaminérgicos) nos transplantes dos animais submetidos à lesão do STN e/ou da ZI.

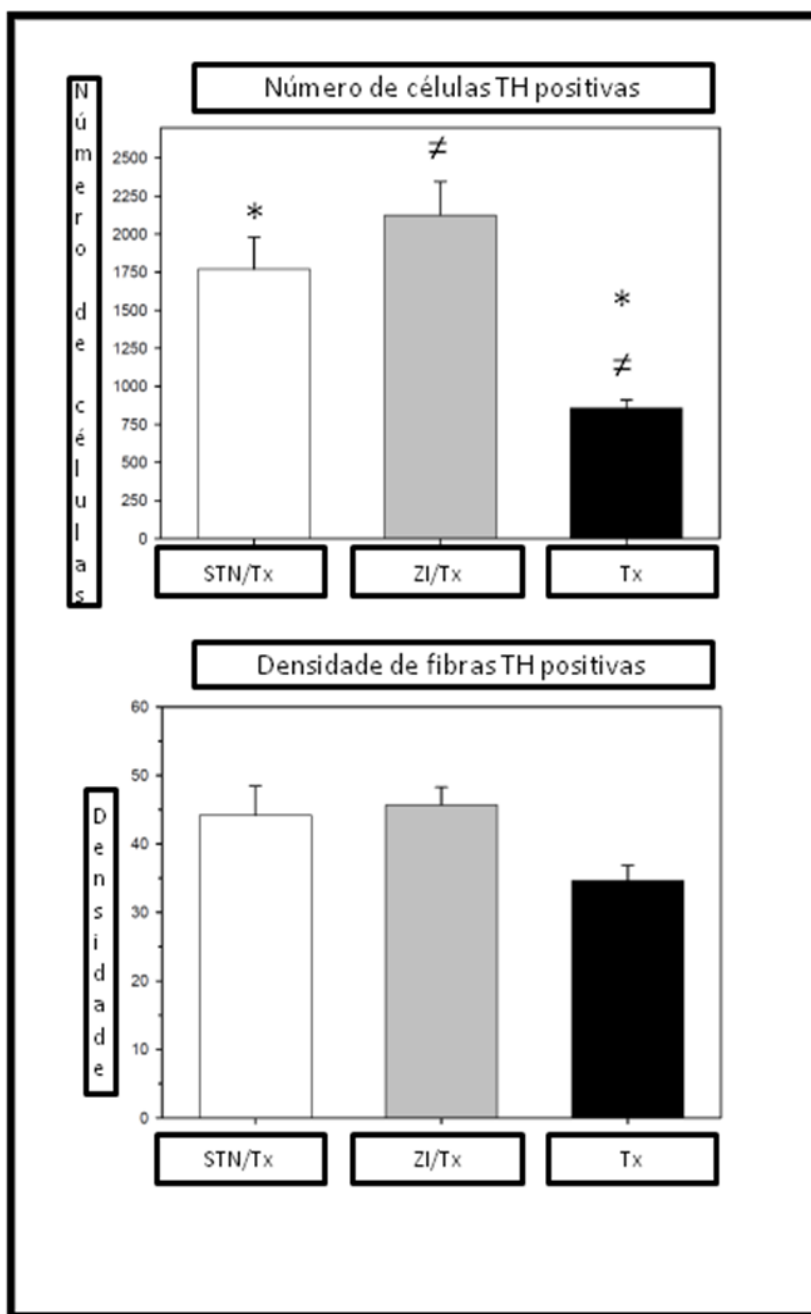


GRÁFICO 1 – MÉDIAS DO NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS NO TRANSPLANTE E DE REINERVAÇÃO DO *STRIATUM* POR FIBRAS PROVENIENTES DO TRANSPLANTE

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Número de células corrigido pela fórmula de *Abercrombie* e DO expressa em porcentagem em relação ao *striatum* contralateral intacto. No primeiro gráfico, referente à contagem celular, observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos STN/Tx e Tx e entre os grupos ZI/Tx e Tx. No segundo gráfico, referente à reinervação do *striatum* ipsilateral por fibras dopaminérgicas provenientes do transplante, não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os dados são expressos em médias e a barra de erro em EPM. (* $p=0,003$) STN/Tx versus Tx; ($\neq p=0,0005$) ZI/Tx versus Tx.

4.2 ANÁLISE DA LESÃO DO NÚCLEO SUBTALÂMICO E/OU DA ZONA INCERTA COM ÁCIDO QUINOLÍNICO

A lesão do STN e/ou da ZI foi confirmada através da coloração de Nissl e Neu-N. Análise histológica demonstrou que nove animais apresentaram lesão parcial do STN a qual se estendia para a ZI (grupo STN/Tx) (Figura 12) e que oito animais tinham lesão parcial confinada à ZI (grupo ZI/Tx) (Figura 13). A injeção de ácido quinolínico resultou em uma lesão apenas parcial das estruturas em estudo em todos os animais experimentais.

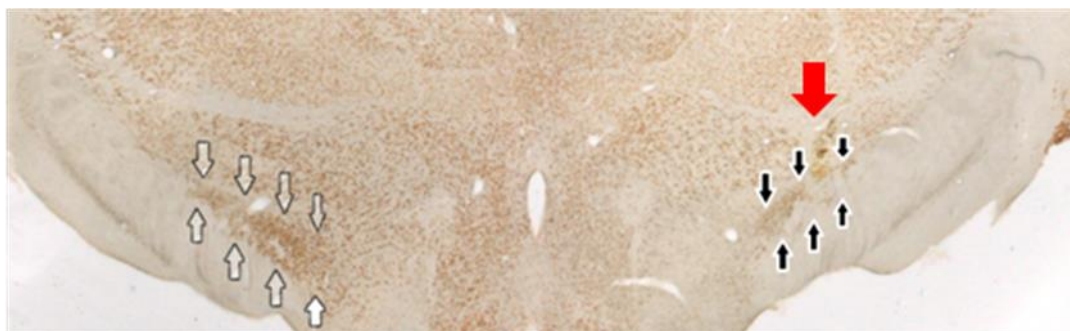


FIGURA 12 – FOTOGRAFIA DE PREPARADO HISTOLÓGICO COM A COLORAÇÃO NEU-N DEMONSTRANDO A LESÃO PARCIAL DO STN E DA ZI

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Observa-se no lado direito da foto a lesão do STN pela injeção de ácido quinolínico comparando-se ao lado esquerdo intacto. As setas pretas cheias no lado direito delimitam o STN lesado. No lado esquerdo, as setas delimitam o STN intacto. No lado direito nota-se atrofia do STN, além de gliose e perda da arquitetura tecidual. Além disso, observa-se a lesão da ZI adjacente (seta vermelha), caracterizada por discreta atrofia e gliose da parte lateral desta estrutura.

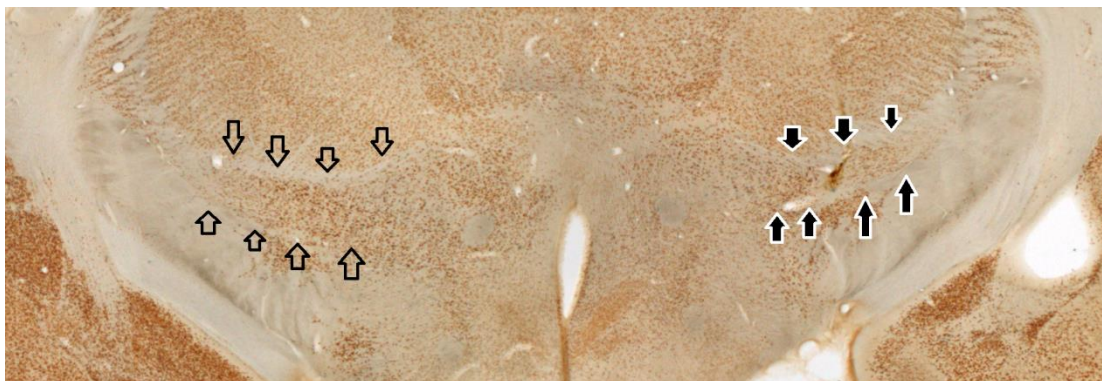


FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DE PREPARADO HISTOLÓGICO COM NEU-N DEMONSTRANDO LESÃO PARCIAL DA ZI PELO ÁCIDO QUINOLÍNICO

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Neste preparado histológico corado por Neu-N observa-se a lesão parcial da ZI, indicada por flexas negras cheias no lado direito da foto. Observa-se atrofia e perda da arquitetura tecidual da ZI lesada. No lado esquerdo, a ZI intacta está delimitada por flexas com contorno negro.

4.3 ANÁLISE DA ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS.

A rotação induzida pela aplicação de apomorfina e anfetamina foi avaliada após cada lesão e após o transplante. Após a lesão do FPM, os animais lesados apresentaram o clássico comportamento rotacional contralateral induzido pela administração de apomorfina. Na análise utilizando o teste *two-way ANOVA* com mensurações repetidas, observou-se um efeito entre os grupos e as sessões ($F(9,90)=7,24, p=7,3 \times 10^{-8}$). A lesão parcial do STN e/ou da ZI não exerceu influência no comportamento rotacional dos animais após administração de apomorfina. Contudo, comparando-se as sessões pré- e quatro semanas pós-transplante, observou-se uma redução significativa da assimetria rotacional, caracterizando melhora motora funcional, nos grupos STN/Tx ($p=0,001$) e ZI/Tx ($p=0,0002$). Comparando os os testes pré- e doze semanas pós-transplante, uma redução significativa da assimetria rotacional foi observada em todos os grupos experimentais ($p<0,001$ em todos os grupos), excetuando-se o grupo controle.

Na comparação entre os grupos, em sessões equivalentes, observou-se que o grupo STN/Tx apresentou melhora significativamente superior ao grupo Tx tanto às

quatro ($p=0,003$) como doze semanas após o transplante ($p=0,02$). O mesmo padrão de resposta não foi observado no grupo ZI/Tx, o qual não diferiu significativamente do grupo Tx em ambas as sessões pós-transplante (Gráfico 2).

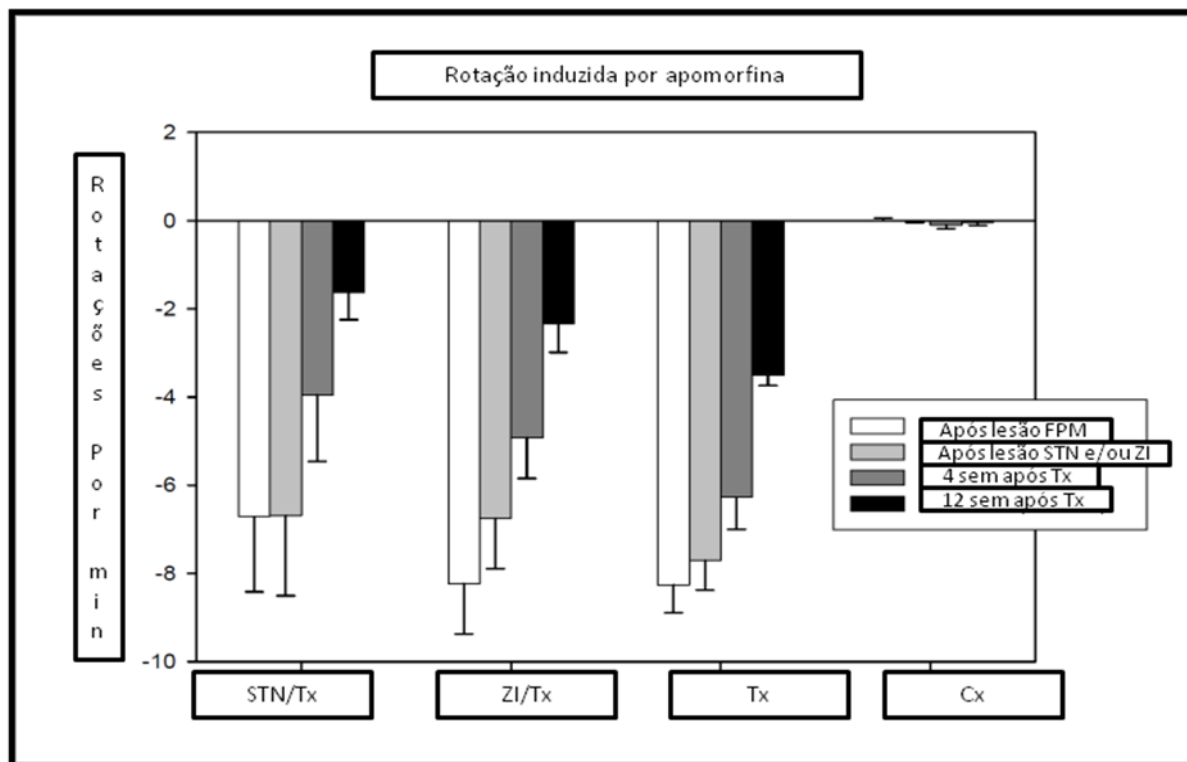


GRÁFICO 2 – COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO PELA INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE APOMORFINA

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Nos grupos STN/Tx e ZI/Tx, observa-se diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a terceira sessões e entre a primeira e a quarta sessões. No grupo Tx, observa-se diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a quarta sessões. Comparando-se os grupos, observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos STN/Tx e Tx, em ambas as sessões após o transplante. Dados expressos como médias do número de rotações por minuto. Barras de erro demonstrando o EPM.

Após a lesão do FPM, assimetria rotacional ipsilateral foi observada em todos os grupos após administração intraperitoneal de amfetamina, excetuando-se o grupo controle. O padrão de resposta após a lesão do FPM foi semelhante em todos os grupos lesados, os quais apresentaram uma média superior a cinco rotações por minuto após a administração da droga. Na análise estatística utilizando o teste *two-way ANOVA* com mensurações repetidas, observou-se um efeito entre os grupos e as sessões ($F(9,90)=21,57$, $p=1 \times 10^{-6}$). Na segunda sessão, após a lesão parcial do

STN e/ou da ZI, observou-se que estas não influenciaram a resposta rotacional induzida pela aplicação da droga. Após o transplante, observou-se a característica resposta de compensação excessiva após a injeção de anfetamina, na qual os animais invertem o sentido de rotação de ipsi para contralateral à lesão após a administração da droga. Em todos os grupos transplantados observou-se diferença estatisticamente significativa entre as sessões pré- e pós-transplante ($p < 0,001$ para todos os grupos). Na análise entre grupos, estes não diferiram significativamente entre si e apresentaram padrão similar de resposta em sessões equivalentes (Gráfico 3).

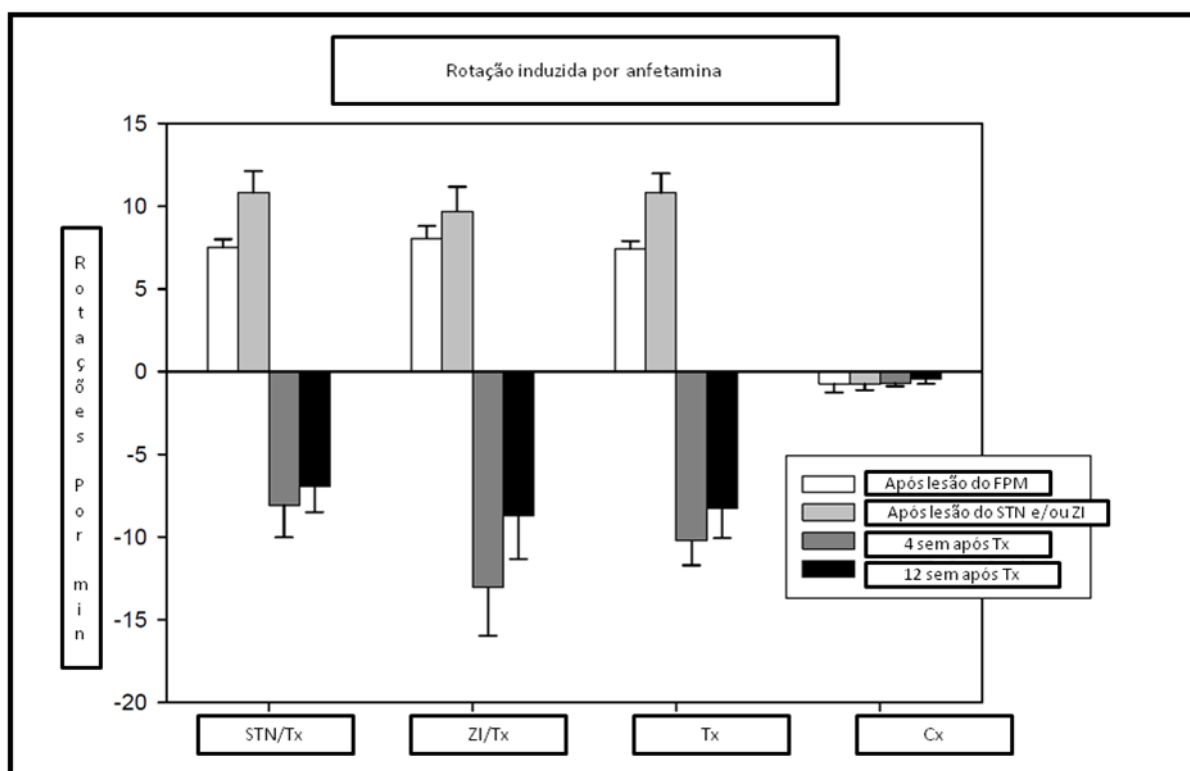


GRÁFICO 3 – COMPORTAMENTO ROTACIONAL INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ANFETAMINA

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Observa-se diferença estatisticamente significativa em todos os grupos, excetuando-se o grupo controle, comparando-se as sessões pré e pós-transplante ($p < 0,001$ para todos os grupos). Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparando-se sessões equivalentes. Dados expressos como médias do número de rotações por minuto. Barras de erro demonstrando o EPM.

4.4 ANÁLISE DO TESTE DO CILINDRO

Após a lesão do FPM todos os animais lesados tocaram a parede do cilindro menos freqüentemente com a pata contralateral, i.e. aproximadamente 10% do número total de toques. Na análise através do *two-way ANOVA* com mensurações repetidas, observou-se um efeito entre grupos e as sessões ($F(9,90)=2,58;p=0,01$). A segunda sessão revelou que a lesão do STN e/ou da ZI não alterou o desempenho dos animais no teste. Os testes realizados após o transplante demonstraram que somente o grupo STN/Tx apresentou recuperação funcional ($p=0,04$) na análise dentro do mesmo grupo. Os demais grupos apresentaram uma forte tendência de recuperação do uso da pata contralateral após o transplante, a qual, entretanto, não alcançou diferença estatisticamente significativa. Na análise entre os grupos observou-se que após o transplante o desempenho de todos os grupos não mais diferiu significativamente do grupo controle, comparando-se as mesmas sessões experimentais. É relevante atentar ao fato de que o grupo controle apresentou uma diminuição gradativa do uso da pata esquerda (“contralateral”) durante o experimento (Gráfico 4).

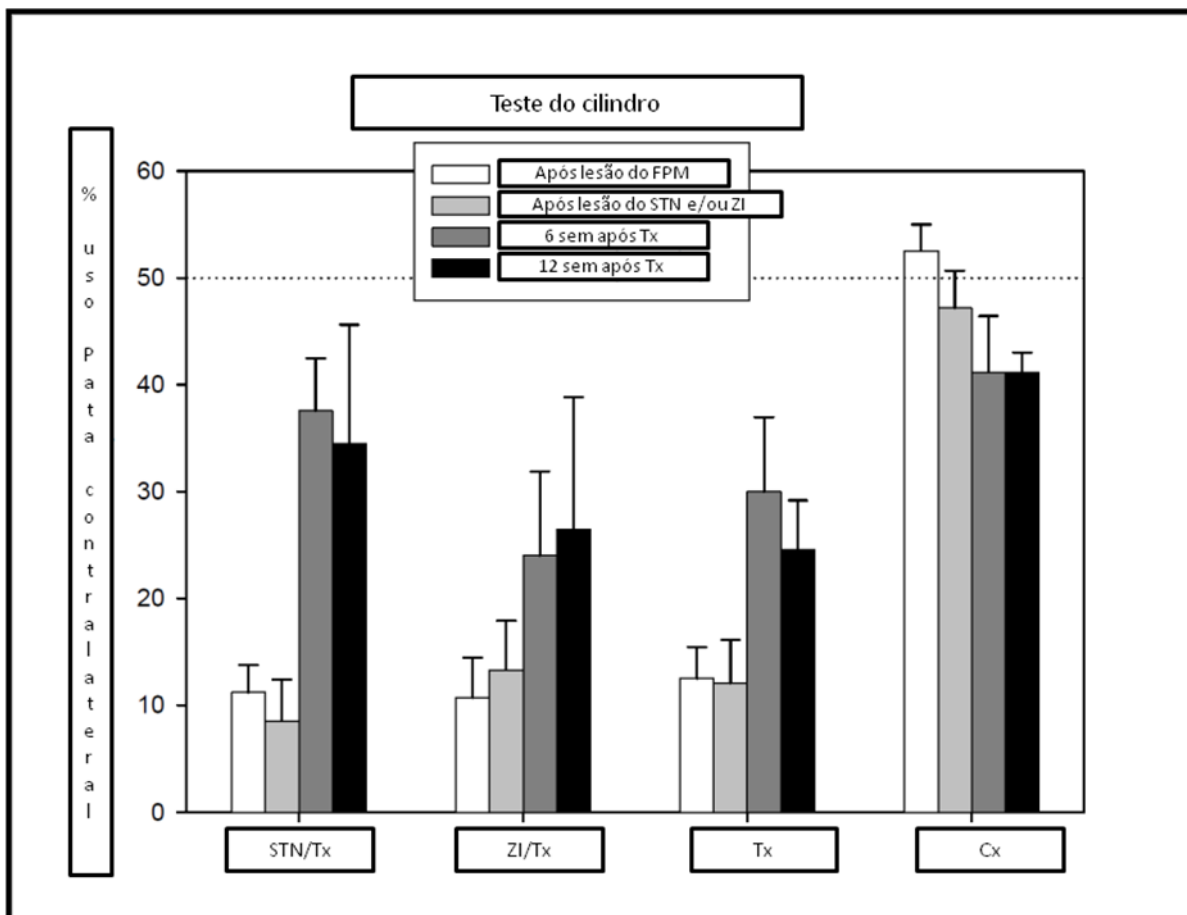


GRÁFICO 4 – DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TESTE DO CILINDRO

FONTE: Dados do estudo

NOTA: Observa-se diferença estatisticamente significativa após o transplante somente no grupo STN/Tx, comparando-se a primeira e a terceira sessões ($p=0,04$). Importante salientar que nas sessões após o transplante (terceira e quarta) o desempenho de todos os grupos não diferiu do grupo controle nas mesmas sessões. Dados expressos em porcentagem de toques realizados com a pata contralateral com relação ao número total de toques. Barras de erro demonstrando o EPM.

4.5 ANÁLISE DO TESTE DO PASSO

Acinesia da pata dianteira contralateral foi avaliada através do teste do passo, no qual diminuição do número de passos foi observada após a lesão do FPM em todos os grupos lesados. A lesão parcial do STN e/ou da ZI não exerceu influência no desempenho dos animais neste teste. No deslocamento em sentido medial, observou-se um efeito entre as sessões pré e pós transplante ($F(3,90)=7,99; p=8,75 \times 10^{-5}$), entretanto, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos e as sessões. No deslocamento em sentido lateral,

houve um efeito entre os grupos e as sessões no *two-way ANOVA* com mensurações repetidas ($F(9,90)=2,02;p=0,04$). Aplicando-se o teste post-hoc observou-se um aumento estatisticamente significativo no uso da pata contralateral nos grupos STN/Tx ($p=0,001$) e Tx ($p=0,01$) após o transplante. O grupo ZI/Tx não apresentou melhora no desempenho após o transplante. Análise entre os grupos demonstrou a mesma magnitude de melhora entre os grupos STN/Tx e Tx (Gráfico 5).

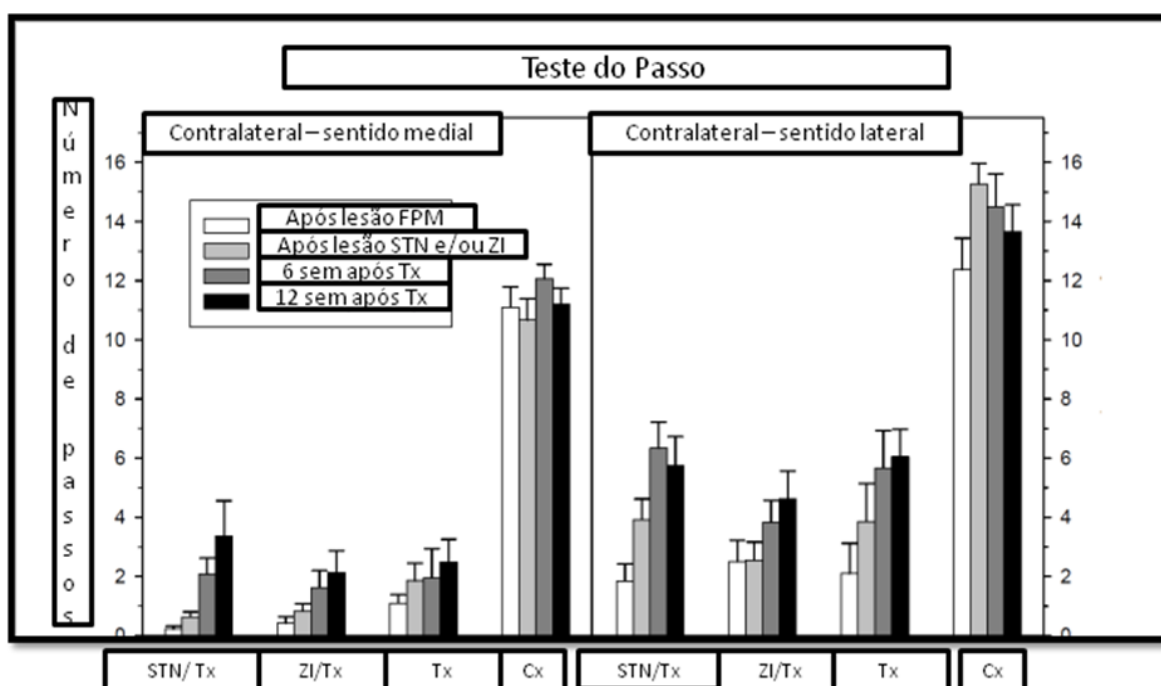


GRÁFICO 5 – DESEMPENHO DOS ANIMAIS NO TESTE DO PASSO.

FONTE: Dados do estudo.

NOTA: Gráfico demonstrativo do desempenho dos grupos experimentais no teste do passo. Dados expressos como a média de passos em cada sessão. Barras de erro demonstrando o EPM.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste experimento indicam que a lesão parcial do STN e/ou da ZI possa ser responsável por aumentar a sobrevivência das células dopaminérgicas transplantadas no *striatum* de ratos submetidos à lesão completa do feixe nigroestriatal. Interessantemente, o maior número de células encontrado nos grupos STN/Tx e ZI/Tx não se correlacionou com uma melhora significativa na reinervação do *striatum* adjacente ao transplante, apesar de uma forte tendência à maior reinervação ter sido observada nestes grupos. Adicionalmente, observou-se que a combinação da subtalamotomia parcial com o transplante celular aprimorou o desempenho dos animais no teste da rotação induzida por apomorfina e em testes comportamentais espontâneos superiormente ao transplante isolado. A lesão parcial da ZI aumentou a sobrevivência das células transplantadas, entretanto, a combinação desta com o transplante não se correlacionou com uma melhora nos testes comportamentais a um nível superior ao observado com o transplante como intervenção única.

5.1 SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DOPAMINÉRGICAS E REINERVAÇÃO DO *STRIATUM* ADJACENTE.

Neste experimento demonstrou-se que a combinação da lesão parcial do STN e/ou da ZI ao transplante de células embrionárias incrementou a sobrevivência das células dopaminérgicas transplantadas. No grupo que recebeu a lesão do STN, o número de células dopaminérgicas no *striatum* transplantado foi 106% superior ao grupo que recebeu o tratamento único. No grupo ZI/Tx a taxa de sobrevivência das células transplantadas foi 147% maior comparada ao grupo somente transplantado.

Este dado pode indicar uma influência neuroprotetora da lesão parcial do STN e/ou da ZI na sobrevivência das células transplantadas. Nos grupos submetidos à lesão parcial do STN e/ou da ZI, forte tendência a uma maior reinervação do *striatum* adjacente ao transplante foi observada em comparação ao grupo somente transplantado. Entretanto esta tendência não atingiu nível de diferença estatisticamente significativa.

O STN fornece parte do *input* excitotóxico glutamatérgico aos principais núcleos de saída dos gânglios da base pela via indireta, e em menor parte, ao *striatum*. Na PD, a hiperativação do STN está diretamente relacionada a diversos sintomas da doença pela hiperativação do GPi e da SNr (MARSHALL et al. 1981; MILLER e DELONG 1987; MITCHELL et al., 1989; BERGMAN et al., 1990; PORTER et al., 1994; BURBAUD et al., 1995). Como consequência, o tálamo motor é patologicamente inibido, diminuindo o fluxo talâmico ao córtex. A inativação funcional do STN melhora drasticamente sintomas motores da PD (LIMOUSIN et al., 1995). Experimentos demonstraram que a ablação do STN também impediu mudanças na expressão de genes no *striatum* e no GP (globo pálido) induzida pela lesão do feixe nigroestriatal (DELFS et al., 1995). A importância do STN na patofisiologia da PD é respaldada pela observação que a inativação do STN realizada anteriormente à lesão do FPM com 6-OHDA reduziu a perda neuronal dopaminérgica na SNc afetada pela atividade da TH (PIALLAT et al., 1996).

O excesso de glutamato torna-se neurotóxico através da ativação dos receptores NMDA quando os níveis energéticos intracelulares estão reduzidos (NOVELLI et al., 1987). Experimentos demonstraram redução na atividade do complexo I mitocondrial em pacientes com PD, exclusivamente na SNc (PARKER et al., 1989; HATTORI et al., 1991; SCHAPIRA et al., 1994). Antagonistas dos receptores NMDA são utilizados com sucesso como agentes neuroprotetores em

modelos animais de PD, corroborando a hipótese de que a toxicidade por glutamato mediada pelos receptores NMDA esteja envolvida na patogênese da doença. Em modelos animais de metanfetamina em ratos, antagonistas dos receptores NMDA mostraram efeito protetor contra a lesão de neurônios dopaminérgicos (SONSALA et al., 1991; O'DELL et al., 1992; MARSHALL et al., 1993). O envolvimento neurotóxico dos receptores NMDA foi confirmado em experimentos nos quais a administração intraestriatal de NMDA incrementou a neurotoxicidade induzida pela metanfetamina (SONSALA et al., 1989). No entanto, o efeito da diminuição do *drive* glutamatérgico no *striatum* através da lesão parcial do STN sobre a sobrevivência de células embrionárias provenientes do MV permanecia desconhecido. Neste experimento, a inativação parcial do STN apresentou efeito neuroprotetor sobre células embrionárias dopaminérgicas provenientes do MV transplantadas no *striatum* em um modelo de lesão completa do feixe nigroestriatal. O STN manda eferências excitatórias glutamatérgicas para a parte motora do *striatum*. Apesar de serem em menor quantidade em comparação às eferências à SNr e ao GPI, a inibição parcial do STN se mostrou capaz de aumentar a sobrevivência das células transplantadas no *striatum*, provavelmente devido à promoção de melhor ambiente neuroquímico estriatal. Efeito semelhante na sobrevivência das células transplantadas foi observado com a inibição parcial da ZI.

A ZI, uma das estruturas da região subtalâmica do diencefalo, está envolvida em diversas funções: ativação cortical, sede, discriminação visual, nocicepção e respostas motoras. Do ponto de vista anatômico a ZI é uma estrutura notável: poucas regiões subcorticais exibem comparável convergência de informações neurais provenientes de diversas estruturas. Aferências à ZI originam-se do cerebelo, do núcleo *gracilis* e *cuneatus*, do núcleo trigeminal, da medula espinhal, do colículo superior, da região pretectal, da substância negra periaquedutal, da

formação reticular mesencefálica, dos núcleos da *raphe*, do hipotálamo, e de diversas áreas do córtex cerebral. Entre as principais eferências da ZI cita-se o tálamo, o hipotálamo, o tronco cerebral e o córtex cerebral (MITROFANIS, 2005). A ZI envia projeções ao *striatum* e aos núcleos intralaminares do tálamo, os quais se conectam intensamente ao *striatum* (RICARDO, 1981). Experimentos utilizando técnicas de microdiálise demonstraram que em ratos submetidos à lesão unilateral por 6-OHDA os níveis de glutamato no *striatum* estão patologicamente aumentados. Nestes animais, a lesão da ZI reduziu os níveis de glutamato no *striatum* a valores normais (WALKER et al., 2010). Adicionalmente, esta redução foi comparável à obtida pela supressão do STN (WALKER et al. 2009). Outros experimentos confirmaram que a ZI está hiperativada em ratos submetidos ao modelo de 6-OHDA (PERIER et al.,2000). Experimentos demonstraram que a estimulação da ZI mostrou efeito semelhante à estimulação do STN na reversão dos efeitos metabólicos provocados pela depleção de dopamina em ratos hemiparkinsonianos (BENAZZOUZ et al., 2004). No presente experimento, a lesão parcial da ZI teve efeito semelhante à lesão parcial do STN no aumento da sobrevivência de células embrionárias transplantadas no *striatum*. Este fato pode ser explicado pela redução da excitotoxicidade glutamatérgica ao *striatum* carente de dopamina por meio da lesão parcial da ZI.

Apesar de forte tendência a uma melhor taxa de reinervação do *striatum* adjacente nos grupos submetidos à lesão parcial do STN e/ou da ZI comparado ao grupo somente transplantado, esta diferença não se mostrou significativa.

O transplante de células embrionárias provenientes do MV é uma técnica promissora no tratamento da PD. Devido ao fato de a PD apresentar uma neuropenia focal (SNc) e específica do sistema dopaminérgico, esta se torna uma das patologias mais promissoras a serem tratadas pela terapia celular restauradora

(GOYA et al., 2007). Esta técnica objetiva restabelecer a transmissão dopaminérgica ao *striatum*, por esta ser a área cerebral que sofre perda das aferências dopaminérgicas. Estudos em animais utilizando o modelo de 6-OHDA em ratos e o modelo de MPTP em macacos demonstraram que as células dopaminérgicas transplantadas sobrevivem o transplante, reinervam o *striatum* carente de dopamina e melhoram a função motora. Estudos em roedores comprovaram que os neurônios transplantados são ativos e que restabelecem a síntese e a liberação basais de dopamina a níveis normais nas áreas reinervadas pelo transplante (WINKLER et al., 2005). Estudos clínicos demonstraram que os neurônios transplantados são capazes de sobreviver ao transplante, integrar-se ao *striatum* e funcionar por um período superior a 10 anos, indicando que a melhora clínica pode ser mantida por um período prolongado (LINDVALL et al., 2000; DUNNETT et al., 2001; HAGELL et al., 2001). Estudos duplo-cego mostraram fatores favoráveis ao sucesso do transplante, entre eles: pacientes com doença em estágios iniciais (UPDRS \leq 49), pacientes com perda dopaminérgica confinada ao *striatum* dorsal, pacientes com idade inferior a 60 anos e pacientes que receberam maior quantidade de tecido proveniente do MV. Este último ponto é apoiado pelo fato de que os melhores resultados clínicos foram obtidos em pacientes com maior número de células dopaminérgicas sobreviventes no transplante (FREED et al., 2001; OLANOW et al., 2003). A baixa taxa de sobrevivência das células embrionárias implantadas tem sido uma dificuldade persistente para a utilização rotineira do transplante. Em modelos animais e em ensaios clínicos a taxa de sobrevivência das células implantadas é inferior a 10% (BRUNDIN et al., 2000; DUNNETT, 1991; KORDOWER et al., 1997; LINDVALL, 1994; OLANOW et al., 1996; SORTWELL et al., 2000). Em outras palavras, 90% dos precursores dopaminérgicos ou não sobrevivem ao implante ou não desenvolvem o fenótipo dopaminérgico maduro. Em ensaios clínicos os melhores resultados

motores foram obtidos utilizando-se 5-6 doadores por hemisfério cerebral transplantado. Organizar esta quantidade de embriões na idade correta é um fator logístico limitante no uso rotineiro do transplante celular. O aumento da sobrevivência das células dopaminérgicas em aproximadamente 100% alcançada neste experimento representa um avanço importante na técnica do transplante celular e no possível uso combinado destas terapias com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Outro fator limitante do uso da técnica de restauração celular é o desenvolvimento de discinesia induzida pelo transplante em alguns pacientes. Discinesia e distonia foram relatados em pacientes transplantados após a redução ou retirada da medicação dopaminérgica (FREED et al., 2001; OLANOW et al., 2003). O aparecimento dos sintomas ocorreu aproximadamente seis meses após o transplante e estabilizou após 12 a 24 meses do procedimento. As causas do desenvolvimento de discinesias induzidas pelo transplante estão sendo investigadas. Acredita-se que diversos fatores estejam implicados, como técnica cirúrgica, preparação tecidual, composição do transplante, imunossupressão e seleção dos pacientes (WINKLER et al. 2005). Estudos experimentais são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e prevenção das discinesias induzidas pelo transplante.

Atualmente, está sendo realizado um estudo multicentrico europeu (TRANSEURO) com o objetivo de otimizar os resultados obtidos com a técnica de restauração tecidual. Este estudo, envolve cinco centros da Europa e se vale de décadas de estudos experimentais aprimorando a técnica de transplante celular, bem como estudos clínicos prévios. O TRANSEURO propõe a randomização de diversos aspectos inerentes ao transplante celular, como as técnicas de preparação e armazenamento das células provenientes do MV, estratégia cirúrgica, o uso

padronizado da imunossupressão e a seleção de pacientes mais propensos a se beneficiar com o transplante. Além de aspectos motores relacionados à PD, este estudo também propõe avaliar os aspectos cognitivos relacionados à doença e ao tratamento com células embrionárias, uma vez que estes são pobremente influenciados pela terapia medicamentosa e EEP (www.transeuro.org.uk).

5.2 TESTES DE ROTAÇÃO INDUZIDA POR DROGAS

A lesão completa do feixe nigroestriatal com 6-OHDA é um modelo frequentemente utilizado em pesquisas com neurotransplante. Este modelo induz 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 *striatum* e no Nac ipsilaterais à lesão. A perda dopaminérgica é também observada em outras regiões cerebrais como nos tubérculos olfatórios, área septal e córtex pré-frontal. No *striatum* e no Nac 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 lesado compõem a base da assimetria observada no teste de rotação induzida por apomorfina e por anfetamina (TORRES e DUNNETT, 2006). No presente experimento, o teste de rotação foi realizado conforme o modelo originalmente 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 E DUNNETT, 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 FPM com 6-OHDA, há uma depleção quase completa de dopamina (depleção entre 95-99%) no *striatum* e no Nac. Portanto, nestes animais, o comportamento rotacional induzido por anfetamina é o resultado da ativação do sistema dopaminérgico no hemisfério intacto e da pouca ou não ativação no hemisfério cerebral lesado. Sobre esta perspectiva, a característica da rotação observada em animais lesados é a resposta do *striatum* intacto à anfetamina. Em ratos unilateralmente lesados, a aplicação de anfetamina induz à rotação ipsilateral à lesão na ordem de 6-20 rotações/min. O implante de células embrionárias dopaminérgicas provenientes do MV no E-14 melhora a assimetria rotacional induzida pela injeção intraperitoneal de anfetamina, produzindo uma redução na amplitude de rotação e classicamente uma resposta de supercompensação. Supercompensação é uma resposta na qual o sentido da rotação muda de ipsilateral para contralateral à lesão (BJORKLUND et al., 1980; DUNNETT et al., 1983b). A situação encontrada nos ratos lesados e transplantados é mais complexa, visto que a anfetamina estimula a liberação de dopamina tanto no *striatum* intacto quanto pelas células transplantadas no hemisfério lesado. A ativação do hemisfério intacto desencadeia uma resposta rotacional no sentido ipsilateral à lesão, enquanto que a ativação das células transplantadas no lado lesado resulta em rotação no sentido contralateral. Portanto, a resposta rotacional observada em animais lesados e transplantados resultará da diferença de amplitude das respostas à dopamina em ambos os hemisférios cerebrais (SCHWARTING e HUSTON, 1996; DUNNETT et al., 1988b). Acredita-se que a supercompensação da rotação vista em animais lesados e transplantados é o

resultado de uma liberação ainda subnormal de dopamina, porém agindo sobre receptores hipersensibilizados no *striatum* lesado, levando a uma ativação pós-sináptica maior que o normal. Portanto, liberação de dopamina pelas células transplantadas, mesmo em concentrações subnormais, 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 e DUNNETT, 2006).

No presente experimento, o teste de rotação induzida por anfetamina, na dose de 2,5 mg/kg, intraperitoneal, foi realizado quatro semanas após cada procedimento cirúrgico e adicionalmente doze semanas após o transplante de células dopaminérgicas. No presente experimento, observou-se o típico viés rotacional ipsilateral após a lesão do FPM, indicando uma depleção dopaminérgica no hemisfério lesado. Neste experimento não foi observado melhora na assimetria rotacional após a lesão parcial do STN e/ou da ZI. Uma explicação pode ser a perda neuronal superior a 98% na SNc e a depleção dopaminérgica entre 95 e 98% no *striatum* promovida pela lesão do FPM, mimetizando estágios bastante avançados da doença de Parkinson. Experimentos anteriores demonstraram diminuição do viés rotacional no teste de rotação por anfetamina em animais submetidos à inibição do STN em modelos unilaterais de PD (CARVALHO e NIKKHAH, 2001; PAUL et al., 2004). Entretanto, nestes experimentos, a lesão do STN foi realizada anteriormente à lesão terminal estriatal com 6-OHDA. Este modelo mimetiza estágios iniciais da doença e induz uma perda parcial e progressiva dos neurônios dopaminérgicos na SNc. Em outros experimentos com lesão completa do feixe nigroestriatal foi observada melhora apenas parcial na assimetria rotacional induzida pela anfetamina em ratos hemiparkinsonianos após inibição do STN (HENDERSON et al., 1999).

Após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas, observou-se o

fenômeno de supercompensação no teste de rotação induzida por anfetamina em todos os grupos transplantados. Este resultado aponta para uma recuperação funcional proporcionada pelas células transplantadas. Esta resposta é consequência da produção de dopamina pelas células transplantadas, aliada à ativação de receptores dopaminérgicos hipersensíveis no lado lesado. Esta ativação dos receptores no *striatum* lesado suplanta a ativação no lado intacto, resultando na rotação contralateral à lesão. Em estudos anteriores, demonstrou-se correlação entre o grau de reinervação estriatal pelas células transplantadas e a recuperação funcional obtida no teste de rotação por anfetamina (DUNNETT et al., 1988a; YUREK e FLETCHER-TURNER, 2002). Nos ratos submetidos à combinação da lesão parcial do STN e/ou da ZI com o transplante celular, os resultados obtidos foram semelhantes aos animais somente transplantados. Este resultado pode indicar que exista um efeito máximo de recuperação funcional induzido pelo transplante neste teste, acima do qual não é observado melhora.

Em ratos hemiparkinsonianos, uma assimetria rotacional importante no teste de rotação induzida por anfetamina pode ser observada após uma perda de aproximadamente 50% dos neurônios dopaminérgicos, avaliado por imunohistoquímica com TH. O mesmo não ocorre com apomorfina, agonista dopaminérgico pós-sináptico, a qual induz rotação no sentido contralateral à lesão pela estimulação de receptores dopaminérgicos supersensibilizados no *striatum* denervado (UNGERSTEDT, 1971). Hipersensibilidade pós-sináptica ocorre somente após perda da maioria (aproximadamente 90%) dos neurônios dopaminérgicos na SNc (HEFTI et al., 1980). Com perdas celulares menores, as células restantes na SNc aumentam compensatoriamente a produção de dopamina (AGID et al., 1973). Conseqüentemente, o nível de dopamina endógena extracelular no *CPu* (*caudate-putamen-unit*) denervado é mantido (CASTANEDA et al., 1990). Estes dois fatos

evitam o desenvolvimento de hipersensibilidade. No presente experimento, os resultados encontrados no teste de rotação induzida por apomorfina realizado após a lesão do FPM, demonstram uma depleção extensa de dopamina no sistema nigroestriatal ipsilateral à lesão. Adicionalmente, a supressão parcial do STN e/ou da ZI não induziu melhora da assimetria rotacional após administração subcutânea de apomorfina. Experimentos, nos quais lesão parcial do STN foi realizada, também não obtiveram redução significativa da assimetria rotacional induzida por apomorfina em ratos submetidos ao modelo unilateral de PD (BLANDINI et al., 1997). Outros experimentos, nos quais uma lesão completa do STN foi utilizada, demonstraram redução da assimetria rotacional induzida pela apomorfina em animais hemiparkinsonianos (BURBAUD et al., 1995; DELFS et al., 1995). Uma interpretação deste fato é que a resposta à apomorfina seja primeiramente mediada pela via indireta, da qual o STN seria componente chave. A lacuna neste circuito provocada pela lesão do STN e a consequente abolição do *input* glutamatérgico à SNr pode interferir no comportamento motor.

Interessantemente, a aplicação de apomorfina induz rotação ipsilateral em ratos submetidos à lesão unilateral isolada do STN (DELFs et al., 1995; MURER et al., 1995). Consequentemente, a abolição do comportamento rotacional em animais submetidos à lesão do feixe nigroestriatal e do STN pode ser resultado da combinação de efeitos opostos. Nas sessões realizadas após o transplante, observou-se redução na assimetria rotacional induzida pela apomorfina em todos os grupos, indicando que as células transplantadas estavam integradas ao *striatum* hospedeiro e produziram dopamina. Redução da assimetria rotacional induzida pela apomorfina após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas em ratos hemiparkinsonianos está relacionada à redução da hipersensibilidade de receptores pós-sinápticos dopaminérgicos estriatais e foi relatada em vários experimentos

(ABROUS et al., 1993; CORDEIRO KK et al., 2010; HAHN et al., 2009). Faz-se importante ressaltar que, nas sessões realizadas após o transplante, o grupo submetido à lesão parcial do STN apresentou redução da assimetria rotacional induzida pela apomorfina estatisticamente superior comparado ao grupo somente transplantado. O maior número de células dopaminérgicas não poderia explicar este resultado, visto que o grupo submetido à lesão parcial da ZI apresentou resultados semelhantes ao grupo submetido ao transplante como intervenção única. Nota-se que os grupos submetidos à lesão parcial do STN e à lesão parcial da ZI apresentaram contagem celular dopaminérgica similar. Uma hipótese seria que a supressão parcial do STN exerça um efeito benéfico sobre as células transplantadas, pela redução do *drive* excitotóxico glutamatérgicos ao *striatum*, promovendo um aumento da produção e liberação de dopamina pelas células transplantadas e redução da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos.

No caso do grupo ZI/Tx, o predomínio das lesões localizaram-se na região rostral da ZI, setor ligado à funções de controle visceral e de movimento de cabeça e olhos. Esta lesão se mostrou insuficiente para obtenção de melhora superior ao transplante isolado no teste de rotação induzido por apomorfina. Possivelmente lesão na região caudal da ZI, ligada à função motora, possa exercer efeito similar à lesão do STN no ambiente neuroquímico estriatal.

5.3 TESTE DO CILINDRO

O teste do cilindro é um teste muito utilizado em modelos animais unilaterais de PD para observar o comportamento exploratório espontâneo do animal e acinesia de patas anteriores. Em animais submetidos à lesão unilateral completa do feixe

nigroestriatal pela aplicação de 6-OHDA observou-se diminuição importante do uso da pata contralateral, sendo aproximadamente 10% do número total de toques realizados. Em ratos submetidos à lesão do FPM pela 6-OHDA, ocorre redução da representação cortical dos movimentos com a pata anterior consequentemente reduzindo o *output* cortical para estas atividades (YOUNG et al., 2011). Após a lesão parcial do STN e/ou da ZI não houve modificação significativa no uso da pata contralateral no teste do cilindro. Após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas, recuperação funcional estatisticamente significativa foi observada somente no grupo submetido à lesão parcial do STN. Embora melhora funcional também tenha sido observada nos outros grupos após o transplante, esta não se mostrou estatisticamente significativa. Contudo, na análise entre os grupos, todos obtiveram desempenho equivalente ao grupo controle após o transplante. Este resultado pode ser explicado pela observação que os animais do grupo controle apresentaram leve redução no uso da pata esquerda, “contralateral”, ao longo das sessões, diminuindo o número relativo de toques com a pata contralateral na parede do cilindro por provável adaptação dos animais ao teste.

5.4 TESTE DO PASSO

O teste do passo é um teste comportamental utilizado para avaliar acinesia de membros anteriores, além de estudar a postura e a marcha do animal (OLSSON et al, 1995). Após a lesão do FPM observou-se redução importante do número de passos para manter o equilíbrio com a pata contralateral. A lesão do STN e/ou da ZI não modificou a resposta comportamental neste teste. No sentido lateral, após o transplante de células embrionárias dopaminérgicas, observou-se uma melhora significativa no uso da pata contralateral somente nos grupos submetidos à lesão

parcial do STN e no grupo submetido ao transplante como terapia única. Sabe-se que o teste no sentido lateral é mais sensível à melhora motora após procedimentos celulares restauradores de dopamina no sistema nigroestriatal. O grupo submetido à lesão parcial da ZI não apresentou melhora funcional neste teste, apesar de exibir número significativamente maior de células dopaminérgicas, comparado ao grupo somente transplantado. O mecanismo fisiopatológico envolvido neste achado pode ser devido à complexa citoarquitetura e conexões da ZI por ser uma região bastante heterogênea com diferentes subdivisões anatômicas e funcionais e conexões com inúmeras áreas cerebrais de diferentes atuações.

Apesar da EEP ser atualmente o padrão-ouro no tratamento dos sintomas motores refratários à terapia medicamentosa, o melhor alvo para estimulação ainda é controverso. Experimentos demonstraram melhora na rigidez, acinesia e tremor após estimulação da ZI (BENAZZOUZ, 2004; GUEL et al., 2008; PLAHA et al., 2006; VOGES et al., 2002;). Outros ensaios clínicos sugerem ser a área mais efetiva para estimulação a junção da parte dorsal do STN com a ZI (LANOTTE et al., 2002). Há relatos de diminuição de discinesias em pacientes submetidos à estimulação da ZI (PAHA et al., 2006; PATEL et al., 2003). Outros autores, entretanto, relataram que a estimulação de contatos de eletrodos posicionados na ZI, incluindo as zonas H1 e H2 de Forel, associaram-se a resultados clínicos menos expressivos (HERZOG et al., 2004). A ZI humana é dividida em quatro a seis regiões com funções distintas. A estimulação de diferentes regiões da ZI pode explicar a heterogeneidade dos resultados descritos. Similarmente, a ZI do rato é dividida em regiões as quais desempenham diferentes funções. Neste experimento, os ratos do grupo ZI/Tx apresentaram lesão predominante da região rostral da ZI. Esta região é sabidamente ligada a funções de controle visceral, enquanto a região caudal é responsável pelo controle motor. Os resultados obtidos no grupo submetido à lesão parcial da ZI

podem ser devido à heterogeneidade das funções da ZI, aliada à preponderância das lesões na região rostral desta estrutura.

6 CONCLUSÕES

A. A lesão parcial isolada do STN e/ou da ZI não modificou o desempenho dos animais nos testes comportamentais em ratos submetidos ao modelo unilateral de lesão do FPM por 6-OHDA.

B. O transplante de células embrionárias dopaminérgicas promoveu melhora funcional avaliada por testes comportamentais.

C. A lesão parcial do STN e/ou da ZI combinada ao transplante de células embrionárias dopaminérgicas aumentou a sobrevivência das células transplantadas no *striatum* carente de dopamina. A lesão parcial do STN, mas não da ZI, combinada ao transplante de células embrionárias melhorou a resposta comportamental em animais submetidos à lesão completa do feixe nigroestriatal de forma mais intensa que o transplante realizado isoladamente.

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

ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat.Rec.* 94:239-247 (Feb. 1946)

ABROUS N.; GUY J.; VIGNY A.; CALAS A.; LE MOAL M.; HERMAN J.P. 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 (1988)

ABROUS D.N.; TORRES E.M.; DUNNETT S.D. 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 (1993)

AGID Y.; JAVOY F.; GLOWINSKI J. Hyperactivity of remaining dopaminergic neurones after partial destruction of the nigro-striatal dopaminergic system in the rat. *Nat New Biol* 245: 150-151(1973).

ALAM Z.I.; JENNER A.; DANIEL S.E.; LEES A.J.; CAIRNS N.; MARSDEN C.D.; JENNER P.; HALLIWELL B. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69:1196-1203(1997)

ALBIN R.L.; YOUNG A.B.; PENNEY J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *TrendsNeurosci.* 12:366-375 (1989)

ALEXANDER G.E.; DELONG M.R.; STRICK P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu.Rev.Neurosci.* 9:357-381(1986).

ALEXANDER G.E.; CRUTCHER M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *TrendsNeurosci.* 13(7):266-271(1990).

ALEXI T.; BORLONGAN C.V.; FAULL R.L.; WILLIAMS C.E.; CLARK R.G.; GLUCKMAN P.D.; HUGHES P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog.Neurobiol.* 60:409-470 (2000)

ANDERSSON E.; TRYGGVASON U.; DENG Q.; FRILING S.; ALEKSEENKO Z.; ROBERT B.; PERLMANN T.; ERICSON J. Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell* 124: 393-405(2005).

ANNETT L.E.; READING P.J.; THARUMARATNAM D.; ABROUS D.N.; TORRES E.M.; DUNNETT S.B. Conditioning versus priming of dopaminergic grafts by amphetamine. *Experimental Brain Research* 93: 46-54(1993).

ARRIEDA J.; PASTOR M.A.; LACRUZ F.; OBESO J.A. Temporal discrimination is abnormal in Parkinson's disease. *Brain* 115: 199-210 (1992).

BARBOSA E.R. e SALLEM F.A.S. Doença de Parkinson – Diagnóstico. *Revista Neurociências* V13 N3:158-165 (Jul/Set 2005).

BARNHAM K.J.; MASTERS C.L.; BUSH A.I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat.Rev.DrugDiscov.* 3: 205-214(2004).

BENAZZOZ P.; TAI C.H.; MEISSNER W.; BIOULAC B.; BEZARD E.; GROSS C. High-frequency stimulation of both zona incerta and subthalamic nucleus induces a similar normalization of basal ganglia metabolic activity in experimental parkinsonism. *FASEB J.* 18:528-530 (2004)

BERGAMINI C.M.; GAMBETTI S.; DONDI A.; CERVELLATI C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr.Pharm.Des* 10:1611-1626(2004).

BERGMAN H.; WICHMANN T.; DELONG M.R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438(1990)

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

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

BJORKLUND A.; DUNNETT S.B.; STENEVI U.; LEWIS M.E.; IVERSEN S. Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *BrainRes.* 199:307-333(1980).

BJORKLUND A.; STENEVI U.; SCHMIDT R.H.; DUNNETT S.B.; GAGE F.H. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. I. Introduction and general methods of preparation. *ActaPhysiolScandSuppl* 522: 1-7(1983a).

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

BJORKLUND A.; GAGE F.H. Neural grafting in animal models of neurodegenerative diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 457: 53-81(1985).

BLANDINI F.; GARCIA-OSUMA M.; GREENAMYRE T. Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesions in rats. *Eur.J.Neurosci.* 9:1407-13 (1997).

BLUM D.; TORCH S.; LAMBENG N.; NISSOU M.; BENABID A.L.; SADOUL R.; VERNA J.M. 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(2001).

BROWN R.G.; DOWSEY P.L.; BROWN P.; JAHANSHAHI M.; POLLAK P.; BENABID A.L.; RODRIGUEZ-OROZ M.C.; OBESO J.; ROTHWELL J.C. Impact of deep brain stimulation on upper limb akinesia in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* Apr, 45(4):473-88 (1999).

BRUNDIN P.; BJORKLUND A. Survival, growth and function of dopaminergic neurons grafted to the brain. *Prog.BrainRes.* 71: 293-308(1987).

BRUNDIN P.; POGARELL O.; HAGELL P. Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarets in Parkinson's disease. *Brain* 123 (Part 7):1380-90(2000).

BURBAUD P.; GROSS P.; BENAZZOUZ A.; COUSSEMACQ M.; BIOULAC B. Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp.BrainRes.* 105:48-58(1995).

BURKE R.E. Ontogenetic cell death in the nigrostriatal system. *CellTissueRes.* 318(1):63-72(2004).

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

CARPENTER M.B.; BATTON R.R.; CARLETON S.C.; KELLER J.T. Interconnections and organization of pallidal and subthalamic nucleus in the monkey. *J.Comp.Neurol.* 197:579-603 (1981a)

CARPENTER M.B.; KELLER J.T.; CONTE P. Connections of the subthalamic nucleus in the monkey. *BrainRes.* 224:1-29(1981b).

CARPENTER M.B; JAYARAMAN A. Subthalamic nucleus afferents: anatomical and immunocytochemical features. The basal ganglia III, *Plenum Press*, New York:109-117(1991).

CARVALHO G.A.; NIKKHAH G. Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. *Exp.Neurol.* 171:405-417(2001).

CASTANEDA E.; WHISHAW I.Q.; ROBINSON T.E. Changes in striatal dopamine neurotransmission assessed with microdialysis following recovery from a bilateral 6-OHDA lesion: Variation as a functional of lesion size. *J.Neurosci.*10:1847-1854(1990)

CASTELO-BRANCO G.; WAGNER J.; RODRIGUEZ F.J.; KELE J.; SOUSA K.; RAWAL N.; PASOLLI H.A.; FUCHS E.; KITAJEWSKI J.; ARENAS E. Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *PNAS* 100(22):12747-12752(2003).

CENCI M.A.; WHISHAW I.Q.; SCHALLERT T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat.Rev.Neurosci.* 3:574-579(2002).

CORDEIRO K.K.; JIANG W.; PAPAZOGLU A.; TENÓRIO S.B.; DÖBRÖSSY M.; NIKKHAH G. Graft-mediated functional recovery on a skilled forelimb use paradigm in a rodent model of Parkinson's disease is dependent on reward contingency. *Behavioural Brain Research* 212:187-95(2010).

COTZIAS G.C. L-Dopa for Parkinsonism. *N.Engl.J.Med.* 278:630(1968).

CREESE I.; BURT D.R.; SNYDER S.H. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science*197:596-598(1977).

DELFS J.M.; CIARAMITARO V.M.; PARRY T.J.; CHESSELET M.F. Subthalamic nucleus lesions: widespread effects on changes in gene expression induced by nigrostriatal dopamine depletion in rats. *J.Neurosc.*15:6562-6575(1995).

DELONG M.R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13(7):281-285(July-1990)

DEVITO J.J.; ANDERSON M.E.; WALSH K.E. A horseradish peroxidase study of afferent connections of the Globus Pallidus in *Macaca mulatta*. *Exp.BrainRes.* 38(1):65-73(1980)

DOUCET G.; BRUNDIN P.; DESCARRIES L.; BJORKLUND A. Effect of Prior Dopamine Denervation of Survival and Fiber Outgrowth from Intrastratial Fetal Mesencephalic Grafts. *Eur.J.Neurosci* 2:279-290(1990).

DUNNETT S.B.; IVERSEN S.D. Sensorimotor impairments following localized kainic acid and 6-hydroxydopamine lesions of the neostriatum. *BrainRes.*248:121-127(1982).

DUNNETT S.B.; BJORKLUND A.; SCHMIDT R.H.; STENEVI U.; IVERSEN S.D. 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. *ActaPhysiol.Scand.Suppl* 522: 29-37(1983a).

DUNNETT S.B.; BJORKLUND A.; SCHMIDT R.H.; STENEVI U.; IVERSEN S.D. 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. (1983b)

DUNNETT S.B.; HERNANDEZ T.D.; SUMMERFIELD A.; JONES G.H.; ARBUTHNOTT G. Graft-derived recovery from 6-OHDA lesions: specificity of ventral mesencephalic graft tissues. *ExperimentalBrainRes.* 71: 411-424(1988a).

DUNNETT S.B.; ISACSON O.; SIRINATHSINGHJI D.J.; CLARKE D.J.; BJORKLUND A. 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(1988b).

DUNNETT S.B. Transplantation of embryonic dopamine neurons: what we know from rats. *J.Neurol.* 238:65-74(1991)

DUNNETT S.B.; ROBBINS T.W. The functional role of mesotelencephalic dopamine systems. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.* 67(4):491-518 (Nov. 1992)

DUNNETT S.B. Cell therapy in Parkinson's disease – stop or go? *Nat.Rev.Neurosci.*

2:365-369(2001).

FAHN S.; ELTON R.L. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations. *Mov.Disord.* 18:738-750(2003).

FARKAS L.M.; DÜNKER N.; ROUSSA E.; UNSICKER K.; KRIEGLSTEIN K. Transforming Growth Factors Are Essential for the Development of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vitro and In Vivo. *J.Neurosci.* 23(12):5178-5186(2003).

FAWCETT J.; ROSSER A.E.; DUNNETT S.B. Brain Damage, Brain Repair, 1st edition *Oxford University Press* (2001).

FEARNLEY J.M.; LEES A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5):2283-2301(1991).

FEUERSTEIN T.J. 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(2001)

FOLEY P.; RIEDERER P. Pathogenesis and preclinical course of Parkinson's disease. *J.NeuralTransm.Suppl.* 56:31-74(1999).

FREED C.R.; GREENE P.E.; BREEZE R.E. et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.* 344(10):710-719 (2001).

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

GLEIXNER C. 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(2004).

GOYA R.L.; KUAN W.; BARKER R.A. The future of cell therapies in the treatment of Parkinson's disease. *ExpertOpin.Biol.Ther.* 7(10):1487-1498(2007).

GUEHL D.; VITAL A.; CUNY E.; SPAMPINATO U.; ROUGIER A.; BIOULAC B.; BURBAUD P. Postmortem proof of effectiveness of zona incerta stimulation in Parkinson disease. *Neurology* 70:1489-1490(2008).

GUILLEMIN G.J. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS Journal* 279: 1356-1365(2012).

HAGEL P. e BRUNDIN P. Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson's disease. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*60:741-752(2001).

HAHN M.; TIMMER M.; NIKKHAH G. Survival and early functional integration of dopamine progenitor cells following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Jour.Nerosci.Res.* 87:2006-19(2009).

HATTORI N.; TANKA M.; OZAWA T.; MIZUNO Y. Immunohistological studies on complexes I, II, III and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.*30:563-571(1991).

HEFTI F.; MELAMED E.; WURTMAN R.J. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: Biochemical characterization. *BrainRes.* 195:123-137(1980).

HEISE C.E. E MITROFANIS J. Evidence for glutamatergic projection from the zona incerta to the basal ganglia in rats. *J.Comp.Neurol.* 468:482-495 (2004)

HENDERSON J.M.; ANNETT L.E.; TORRES E.M.; DUNNETT S.B. Behavioural effects of subthalamic nucleus lesions in the hemiparkinsonian marmoset (*Callithrix jacchus*). *Eur.J.Neurosci.* Vol.10 Issue 2:689-98 (1998)

HENDERSON J.M.; DUNNETT S.B. Targeting the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. *BrainRes.Bull.* 46(6):467-474 (1998).

HENDERSON J.M.; ANNETT L.E.; RYAN L.J.; CHIANG W.; HIDAKA S.; TORRES E.M. Subthalamic nucleus lesions induce deficits as well as benefits in the hemiparkinsonian rat. *Eur.J.Neurosci.* 11:2749-2757(1999).

HERZOG J.; FIETZEK U.; HAMEL W.; MORSNOWSKI A.; STEIGERWALD F.; SCHRADER B.; WEINERT D.; PFISTER G.; MÜLLER D.; MEHDORN H.M.; DEUSCHL G.; VOLKMANN J. Most effective stimulation site in subthalamic deep brain stimulation for Parkinson's Disease. *Mov.Dis.* Vol.19;No.9:1050-99(2004).

HOEHN M.M.; YAHR M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17: 427-442(1967).

HUDSON J.L.; VAN HORNE C.G.; STROMBERG I.; BROCK S.; CLAYTON J.; MASSERANO J.; HOFFER B.J.; GERHARDT G.A. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *BrainRes.* 29:167-74(1993).

IACORNO R.P.; SHIMA F.; LONER R.; KUNIYOSHI S.; MAEDA G.; YAMODA S. The results, indications and physiology of posteroventral pallidotomy for patients with Parkinson's disease. *Neurosurgery*, 36(6):1118-1125;(1995)

IKONOMIDOU C.; TURSKI L. Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr.Opin.Neurol.* 8:487-497(1995).

JACKSON-LEWIS V.; VILA M.; DJALDETTI R.; GUEGAN C.; LIBERATORE G.; LIU J.; O'MALLEY K.L.; BURKE R.E.; PRZEDBORSKI S. Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice. *J.Comp.Neurol.* 424(3):476-488(2000).

JAHANSHAHI M.; ARDOUIN C.M.A.; BROWN R.G.; et al. The impact of deep brain stimulation on executive function in Parkinson's disease. *Brain*;123:1142-54 (2000).

JONES E.G. The thalamus. New York, *Plenum Press* (1985).

KANDEL E.R.; SCHWARTZ J.H.; JESSEL T.M. Principles of Neural Science. 4th Edition, *Appleton and Lange*: Stanford (2000).

KAWANA E.; WATANABE K. A cytoarchitectonic study of zona incerta in the rat. *J.Hirnforsch.* 22:535-541 (1981)

KELLY P.H.; SEVIOUR P.W.; IVERSEN S.D. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *BrainRes.* 94: 507-522(1975).

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

KLEINER-FISMAN G.; FISMAN D.N.; SIME E.; SAINT-CYR J.A.; LOZANO A.M.; LANG A.E. Long-term follow up of bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in patients with advanced Parkinson's disease. *J.Neurosurg* 99:489-95(2003)

KOLMAC C.I.; MITROFANIS J. Distribution of various neurochemicals within zona incerta: an immunocytochemical and histochemical study. *Anat.Embryol.* 199:265-280(1999)

KORDOWER J.H.; GOETZ C.G.; FREEMAN T.B.; OLANOW C.W. Dopaminergic transplants in patients with Parkinson's disease: neuroanatomical correlates of clinical recovery. *Exp.Neurol.* 144:41-6(1997).

KRACK P.; BALTIR A.; VAN BLERCOM N.; CHABARDES S.; FRAIX V.; ARDOUIN C.; KOUDSIE A.; LIMOUSIN P.A.; BENAZZOUZ A.; LEBAS J.F.; BENABID A.L.; POLLAK P. Five-year-follow-uo of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's Disease. *N.Engl.J.Med.*; 349:1925-34 (2003).

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

LANGSTON J.W. Predicting Parkinson's disease. *Neurology* 40: Suppl.4 (1990).

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

LANOTTE M.M.; RIZZONE M.; BERGAMASCO B.; FACCANI G.; MELCARNE A.; LOPIANO L. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus: anatomical and neurophysiological and outcome correlations with the effects of stimulation. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 72:53-8(2002).

LEE M.C.; TING K.K.; ADAMS S.; BREW B.J.; CHUNG R; GUILLEMIN G.J. Characterization of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS ONE* 5 E14123; (2010).

LEENDERS K.L.; SALMON E.P.; TYRRELL P.; PERANI D.; BROOKS D.J.; SAGER H.; JONES T.; MARSDEN C.D.; FRACKOWIAK R.S. 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(1990).

LIMOUSIN P.; POLLAK P.; BENAZZOUZ A.; HOFFMANN D.; LEBAS J.F.; BROUSOLE E.; PERRET J.E.; BENABID A. Effect on parkinsonian signs and

symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *The Lancet* 345:91-95(1995).

LINDVALL O. Clinical application of neuronal grafts in Parkinson's disease. *J.Neurol.* 242:S54-S56(1994).

LINDVALL O.; HAGELL P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. *Prog.BrainRes.* 127:299-320(2000).

MARSHALL J.F.; UNGERSTEDT U. Supersensitivity to apomorphine following destruction of the ascending dopamine neurons: quantification using the rotational model. *Eur.J.Pharmacol* 41(4):361-7(1977).

MARSHALL J.F.; CRITCHFIELD J.W.; KOZLOWSKI M.R. Altered succinate dehydrogenase activity of basal ganglia following damage to mesotelencephalic dopaminergic projection. *BrainRes.* 212:367-377(1981).

MARSHALL J.F.; O'DELL S.J.; WEIHMULLER F.B. Dopamine-glutamate interactions in methamphetamine-induced neurotoxicity. *J.Neurol.Transm.* 91:241-254(1993).

MILLER W.C. e DELONG M.R. Altered tonic activity of neurons in the globus pallidus and subthalamic nucleus in the primate MPTP model of parkinsonism. The basal ganglia, II. *Plenum Press, New York*:415-427(1987).

MILNER K.L.; MOGENSON G.J. Electrical and chemical activation of the mesencephalic and subthalamic locomotor regions in freely moving rats. *BrainRes.* 452:273-285 (1988).

MITCHELL I.J.; CLARKE C.E.; BOYCE S.; ROBERTSON R.G.; PEGGS D.E.; SAMBROOK M.A.; CROSSMAN A.R. Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurosci.* 32:226-231(1989).

MITROFANIS J. Some certainty for the "Zone of uncertainty"? Exploring the function of the Zona Incerta. *Neurosci.* 130:1-15(2005).

MIZUNO Y.; YOSHINO H.; IKEBE S.; HATTORI N.; KOBAYASHI T.; SHIMODAMATSUBAYASHI S.; MATSUMINE H.; KONDO T. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 44:99-109(1998).

MOGENSON G.J.; SWANSON L.W.; WU M. Evidence that projections from

substantia innominata to zona incerta, mesencephalic locomotor region contribute to locomotor activity. *BrainRes.* 334:65-67 (1985)

MURER M.G.; PAZO J.H. Circling behaviour induced by activation of GABA-A receptors in the subthalamic nucleus. *Neuroreport.* 4:1219-1222 (1993)

MURER M.G.; SINAY V.; PAZO J.H. Turning behaviour in rats with unilateral lesion of the subthalamic nucleus: synergism between D1 and D2 receptors. *J.NeuralTransm.* 100:123-135 (1995).

NAKANO K.; HASEGAWA Y.; TOKUSHIGE A.; NAKAGAWA S.; KAYAHARA T.; MIZUNO N. Topographical projections from the Thalamus, Subthalamic Nucleus and Pedunculo-pontine Tegmental Nucleus to the striatum in the Japanese monkey, *Macaca fuscata.* *BrainRes.* 537:54-68(1990).

NAUTA H.J.W. E COLE M. Efferent projections of the subthalamic nucleus: an autoradiographic study in monkey and cat. *J.Comp.Neurol.* 180:1-16 (1978).

NEVES S.R.; RAM P.T.; IYENGAR R. G-Protein Pathways. *Science* 296:1636-9 (Maio 2002).

NICOLELIS M.A.; CHAPIN J.K.; LIN R.C. Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus and brainstem. *BrainRes.* 577:134-141(1992).

NICOLELIS M.A.; CHAPIN J.K.; LIN R.C. Development of direct GABAergic projections from the zona incerta to the somatosensory cortex of the rat. *Neurosci.* 65:609-631 (1995).

NIKKHAH G.; CUNNINGHAM M.G.; JODICKE A.; KNAPPE U.; BJORKLUND A. Improved Graft-Survival and Striatal Reinnervation by Microtransplantation of Fetal Nigral Cell- Suspensions in the Rat Parkinson Model. *BrainRes.* 633:133-143(1994a).

NIKKHAH G.; OLSSON M.; EBERHARD J.; BENTLAGE C.; CUNNINGHAM M.G.; BJORKLUND A. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology. *Neuroscience* 63(1):57-72(1994b).

NIKKHAH G.; CUNNINGHAM M.G.; CENCI M.A.; MCKAY R.D.; BJORKLUND A. 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(1995a).

NIKKHAH G.; CUNNINGHAM M.G.; MCKAY R.; BJORKLUND A. Dopaminergic Microtransplants Into the Substantia-Nigra of Neonatal Rats with Bilateral 6-OHDA Lesions. II. Transplant-Induced Behavioral Recovery. *J.Neurosci.* 15:3562-3570(1995b).

NIKKHAH G. e BRANDIS A. Neurotransplantation for Parkinsons-Disease – Experimental and Clinical-Results of the functional reconstruction of the dioaminergic system. *Zentralbl.Neurochirur* 56:153-160 (1995)

NOVELLI A.; REILLY J.A.; LYSKO P.G.; HENNEBERRY R.C. Glutamate becomes neurotoxic via the NMDA receptor when intracellular energy levels are reduced. *BrainRes.* 451:205-212 (1987).

NUNES I.; TOVMASIAN L.T.; SILVA R.M.; BURKE R.E.; GOFF S.P. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS* 100(7): 4245-4250(2003).

OBESO J.A.; GURIDI J.; DELONG M.R. Surgery for Parkinson's disease. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiat.* 62:2-8 (1997).

OBESO J.A.; RODRÍGUEZ-OROZ M.C.; RODRÍGUEZ M.; LANCIEGO J.L.; ARTIEDA J.; GONZALO N.; OLANOW W. Patophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *TrendsNeurosci.* Vol.23,No.10:S8-S19 (2000).

O'DELL S.J.; WEIHMULLER F.B.; MARSHALL J.F. MK-801 prevents methamphetamine-induced striatal dopamine damage and reduces extracellular dopamine overflow. In Neurotoxins and Neurodegenerative disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 648:317-319 (1992).

OLANOW C.W. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TrendsNeurosci.* 16:439-444(1993).

OLANOW C.W.; KORDOWER J.H.; FREEMAN T.B. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *TrendsNeurosci.* 19:102-109(1996).

OLLANOW C.W.; GOETZ C.G.; KORDOWER J.H. et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 54(3): 403-414(2003).

OLNEY J.W.; SHARPE L.G.; FEIGIN R.D. Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 31:464-488(1972).

OLNEY J.W. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr.Opin.Pharmacol* 3: 101-109(2003).

OLSSON M.; NIKKHAH G.; BENTLAGE C.; BJORKLUND A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J.Neurosci* 15:3863-3875(1995).

PARENT A. E SMITH Y. Organization of efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as revealed by retrograde labeling methods. *BrainRes.* 436:296-310 (1987).

PARENT A.; SMITH Y.; FILION M.; DUMAS J.; Distinct afferents to internal and external pallidal segments in the squirrel monkey. *Neurosci.Lett.* 96:140-144(1989).

PARENT A. Extrinsic connections of the basal ganglia. *TrendsNeurosci.* 13:245-58 (1990).

PARENT A. E HAZRATI L.N. Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia. *TrendsNeurosci.* 16:111-116 (1993).

PARENT A.; HAZRATI L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The corticobasal ganglia-thalamocortical loop. *BrainRes.Rel.* 20:91-127 (1995a).

PARENT A.; HAZRATI L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *BrainRes.Rel.* 20:128-154 (1995b).

PARKER W.D.; BOYSON S.J.; PARKS J.K. Abnormality of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 26:719-723(1989)

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

PATEL N.K.; HEYWOOD P.; O'SULLIVAN K.; MCCARTER R.; LOVE S.; GILL S.S. Unilateral subthalamotomy in the treatment of Parkinson's disease. *Brain* 126:1136-45(2003).

PAUL G.; MEISSNER W.; REIN S.; HARNACK D.; WINTER C.; HOSMANN K.; MORGENSTERN R.; KUPSCH A. Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 185:272-280(2004).

PAXINOS AND WATSON. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition (2007).

PERIER C.; VILA M.; FEGER J.; AGID Y.; HIRSCH E.C. Functional activity of zona incerta neurons is altered after nigrostriatal denervation in hemiparkinsonian rats. *Exp.Neurol.* 162:215-224 (2000).

PERLOW M.J.; FREED W.J.; HOFFER B.J.; SEIGER A.; OLSON L.; WYATT R.J. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204:643-647(1979).

PIALLAT B.; BENAZZOUZ A.; BENABID A.L. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur.J.Neurosci.*8:1408-1414 (1996).

PLACZEK M.; JESSEL T.M.; DODD J. Induction of floor plate differentiation by contactdependent, homeogenetic signals. *Development* 117(1):205-218(1993).

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

PLAHA P.; BEN SCHLOMO Y.; PATEL N.K.; GILL S.S. Stimulation of the caudal zona incerta is superior to stimulation of the subthalamic nucleus in improving contralateral parkinsonism. *Brain* 129:1732-1747(2006).

PORTER R.H.; GREENE J.G.; HIGGINS D.S.; GREENAMYRE J.T. Polysynaptic regulation of glutamate receptors and mitochondrial enzyme activities in the basal ganglia of rats with unilateral dopamine depletion. *J.Neurosci.* 14:7192-7199 (1994).

POWER B.D.; MITROFANIS J. Zona Incerta: substrate for contralateral interconnectivity in the thalamus of rats. *J.Comp.Neurol.* 436:52-63 (2001).

PRAKASH N.; WURST W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *CellMol.LifeSci* 63(2):187-206(2006).

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

RAO A.V.; BALACHANDRAN B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr.Neurosci* 5:291-309(2002).

RICARDO J.A. Efferent connections of the subthalamic region in the rat. II. The Zona Incerta. *Brain Research*, 214:43-60(1981)

RIEDERER P.; WUKETICH S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J.NeuralTransm.* 38: 277-301(1976).

RIOUX L.; GAUDIN D.P.; GAGNON C.; DI PAOLO T.; BEDARD P.J. Decrease of behavioral and biochemical denervation supersensitivity of rat striatum by nigral transplants. *Neuroscience* 44:75-83(1991).

RODRIGUEZ M.C.; OBESO J.A.; OLANOW C.W. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol.* Sept, 44(3 Suppl.1):175-88 (1998).

RODRIGUEZ-OROZ M.C.; ZAMARBIDE I.; GURIDI J.; PALMERO M.R.; OBESO J.A. Efficacy of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease 4 years after surgery: double blind and open label evaluation. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 75:1382-85(2004).

ROEDTER A.; WINKLER C.; SAMII M.; NIKKHAH G. Complex sensorimotor behavioral changes after terminal striatal 6-OHDA lesion and transplantation of dopaminergic embryonic micrografts. *CellTransplant.* 9:197-214(2000).

ROEDTER A.; WINKLER C.; SAMII M.; WALTER G.F.; BRANDIS A.; NIKKHAH G. 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(2001).

ROGER M.; CADUSSEAU J. Afferents to the zona incerta in the rat: a combined retrograde and anterograde study. *J.Comp.Neurol.* 241:480-492 (1985).

ROMANOWSKI C.A.J.; MITCHELL I.J.; CROSSMAN A.R. The organization of the efferent projections of the zona incerta. *J.Anat.* 143:75-95 (1985)

SAVASTA M.; MENNICKEN F.; CHRITIN M.; ABROUS D.N.; FEUERSTEIN C.; LE MOAL M.; HERMAN J.P. 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(1992).

SCHALLERT T.; NORTON D.; JONES T.A. A clinically relevant unilateral rat model of parkinsonian akinesia. *Journal of Neural Transplantation and Plasticity*; Vol.3;No.4:332-333 (1992).

SCHALLERT T.; WOODLEE M.T. The behaviour of the laboratory rat: a Handbook with tests. *Oxford University Press* (2005).

SCHAPIRA A.H.V. Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – a critical appraisal. *Mov.Dis.* 9:125-138(1994).

SCHAPIRA A.H. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim.Biophys.Acta* 1366:225-233(1998).

SHAMMAH-LAGNADO S.J.; NEGRAO N.; RICARDO J.A. Afferent connections of the zona incerta: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neurosci.* 15:109-134 (1985).

SCHMIDT R.H.; INGVAR M.; LINDVALL O.; STENEVI U.; BJORKLUND A. Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum: neurotransmitter metabolism and [14C]2-deoxy-D-glucose autoradiography. *J.Neurochem* 38: 737-748(1982).

SCHMIDT R.H.; BJORKLUND A.; STENEVI U.; DUNNETT S.B.; GAGE F.H.; Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and metabolism. *ActaPhysiol.Scand.* Suppl.522:19-28(1983).

SCHOLZ E.; OERTEL W.H. Parkinson-Syndrome. In: Brandt E (Hrsg) Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. *W Kohlhammer, Stuttgart* (2003).

SCHULTZ W.; APICELLA P.; LIUNGBERG T.; et al. Reward-related activity in the monkey *striatum* and substantia nigra. *Prog.Brain Res.* 99:227-35(1993).

SCHWARTING R.K.; HUSTON J.P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of mesostriatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog.Neurobiol.* 49:215-266(1996).

SIMEONE A. Genetic control of dopaminergic neuron differentiation. *Trends in*

Neurosciences 28(2):62-65(2005).

SONSALA P.K.; NIKLAS W.J.; HEIKKILA R.E.; Role for excitatory amino acids in methamphetamine induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science* 243:398-400 (1989).

SONSALA P.K.; RIORDAN D.E.; HEIKKILA R.E. Competitive and non-competitive antagonists at NMDA receptors protect against methamphetamine-induced dopaminergic damage in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 256:506-512(1991).

SORTWELL C.E.; PITZER M.R.; COLLIER T.J. Time course of apoptotic cell death within mesencephalic cell suspension grafts: implications for improving grafted dopamine neuron survival. *Exp.Neurol.* 165:268-77(2000).

SPOOREN W.P.; VASSOUT A.; WALDMEIER P.; GENTSCH C. 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(1998).

STACHOWIAK H. Allgemeine Modelltheorie. Springer, Wien (1973).

STERN G. Did parkinsonism occur before 1817? *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* Suppl.:11-12(1989).

TANNER C.M.; GOLDMAN S.M. Epidemiology of Parkinson's Disease. *Neurol.Clin.* 14(2):317-335(May-1996)

TEIVE H.A.G. Etiopatogenia da Doença de Parkinson. *Revista Neurociências* V13 N14:201-214 (Out/Dez 2005).

TIR M.; DEVOS D.; BLOND S.; TOUZET G.; REYNS N.; DUHAMEL A.; COTTENCIN O.; DUJARDIN K.; CASSIM F.; DESTÉE A.; DEFEBVRE L.; KRYSTKOWIAK P. Exhaustive one-year follow-up of subthalamic nucleus deep brain stimulation in a large, single-center cohort of parkinsonian patients. *Neurosurg.* 61(2) 304-305(2007).

TORRES E.M.; DUNNETT S.B. Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. *European Neuropsychopharmacology* 17:206-214(2006).

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

UNGERSTEDT U.; ARBUTHNOTT G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *BrainRes.* 24:485-493(1970).

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

VOGES J.; VOLKMANN J.; ALLERT N.; LEHRKE R.; KOULOUSAKIS A.; FREUND H.J.; et al. Bilateral high-frequency stimulation in the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson disease: correlation of therapeutic effect with anatomical electrode position. *J.Neurosurg.* 96:269-79(2002).

VOORN P.; KALSBECK A.; JORRITSMABYHAM B.; GROENEWEGEN H.J. The pre- and post-natal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience* 25:857-887(1988).

WALKER R.H.; KOCH R.J.; SWEENEY J.E.; MOORE C.; MESHUL C.K. Effects of subthalamic nucleus lesions and stimulation upon glutamate levels in the dopamine-depleted striatum. *Neuroreport* 20:770-775(2009).

WALKER R.H.; DAVIES G.; KOCH R.J.; HAACK A.K.; MOORE C.; MESHUL CK. Effects of Zona Incerta lesions on striatal neurochemistry and behavioral asymmetry in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J.Neurosci.Res.* 88:2964-2975(2010)

WHISHAW I.Q.; O'CONNOR W.T.; DUNNETT S.B. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain* 109 (Pt 5):805-843(1986).

WINKLER C.; KIRIK D.; BJORKLUND A.; DUNNETT S.B. Transplantation in the rat model of Parkinson's disease: ectopic versus homotopic graft placement. *Prog.BrainRes.* 127:233-265(2000).

WINKLER C.; KIRIK D.; BJORKLUND A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? *TrendsNeurosci.* 28:86-92(2005).

YOUNG N.A.; VUONG J.; FLYNN C.; TESKEY G.C. Optimal parameters for microstimulation-derived forelimb movements thresholds and motor maps in rats and mice. *J.Neurosci.Meth.* 196:60-9(2011).

YUREK D.M.; FLETCHER-TURNER A. Temporal changes in the neurotrophic environment of the denervated striatum as determined by the survival and outgrowth of grafted fetal dopamine neurons. *BrainResearch* 931:126-134(2002).

ZETTERSTROM R.H.; SOLOMIN L.; JANSSON L.; HOFFER B.J.; OLSON L.; PERLMANN T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276: 248-250(1997).