

RICARDO SARAVY DE ARAUJO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA (DBS) NO
COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS, APÓS LESÃO UNILATERAL DO
FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL COM 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA),
COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

CAMPO GRANDE

2016

RICARDO SARAVY DE ARAUJO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA (DBS) NO
COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS, APÓS LESÃO UNILATERAL DO
FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL COM 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA),
COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

CAMPO GRANDE

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

RICARDO SARAVY DE ARAUJO

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA (DBS) NO
COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS, APÓS LESÃO UNILATERAL DO
FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL COM 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA),
COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza
Instituição - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Marco Hiroshi Naka
Instituição - Universidade Católica Dom Bosco - UCDB

Prof. Dr. Fátima Del Fava
Instituição - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

DEDICATÓRIA

A **Deus**, razão de todas as minhas manhãs, minha Luz nos momentos mais escuros, e a Cor dos dias mais ensolarados.

À minha noiva, **Ana Paula Dias Padilha**, pela paciência nos momentos de ausência, e pelas doces palavras de incentivos no transcorrer desse trabalho.

À minha mãe, **Maria Auxiliadora Martins Saravy de Araújo**, minha primeira professora, doce remanso onde repousa minha calma em todos os momentos de incerteza.

Ao meu pai, **Ulzam Ribas de Araújo**, pelos muitos momentos que segurou minha mão e me deu forças para seguir, desde os primeiros dias de escola, até o último dia deste trabalho.

Ao meu irmão, **Rafael Saravy de Araújo**, pela amizade, parceria e pela ajuda no desenvolvimento de alguns dos dispositivos usados na construção dos eletrodos.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza, o qual ministrou minha primeira aula nessa instituição e o qual nunca mais abandonei. Obrigado pela excelência profissional, luz para os que estão ao seu redor, pela paciência em entender o tempo de aprendizagem de cada aluno, e acima de tudo pelo caráter e moral, pois de nada vale a ciência se não estiver nas mãos dos bons e dos justos. Minha eterna gratidão por ter me ajudado a caminhar até aqui.
- À acadêmica de Fisioterapia da UFMS, Angelita Viana Veronez, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho, pelos momentos de fé frente às tantas dificuldades enfrentadas durante a elaboração deste trabalho. Muito obrigado pelo empenho.
- Ao técnico de laboratório, Luiz, pela disponibilidade em ajudar nos momentos de necessidade e cuidar com tamanho zelo das instalações do nosso laboratório.
- Ao professor Dr. Mauro Conti Pereira e seus alunos de graduação, Anízio Carlos da Silva, Rossini Arashiro Taira e Luis Alberto S. P. S. da Silva Pereira, pela amizade e comprometimento na construção do eletroestimulador usado nessa trabalho.
- Aos meus amigos, pelas palavras de incentivo que fizeram toda a diferença nos transcorrer da elaboração desse trabalho.

RESUMO

Araújo, R. S. Efeito da estimulação cerebral profunda (DBS) no comportamento de camundongos, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como modelo animal da doença de parkinson. Campo Grande. 2016. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A doença de Parkinson (DP) é primariamente uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância negra. O tratamento sintomático da DP com L-dopa e drogas agonistas de dopamina predominam a terapia desta doença, e elas são altamente efetivas em tratar os estágios iniciais da doença. Todavia, a introdução de drogas dopaminérgicas está associada com efeitos colaterais agudos. Mais recentemente, a eletroestimulação cerebral vem sendo indicada como uma forma de reverter os sintomas motores da DP em casos mais graves, quando a terapia medicamentosa não surte os efeitos esperados. Assim, neste trabalho nos propusemos a testar o efeito da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico, no comportamento motor e não motor de camundongos suíços, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial (FPM) com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como modelo animal da DP. Foram utilizados 32 camundongos Suíços, machos, pesando entre 20 e 30 gramas. Os animais receberam injeção unilateral (intracerebral) de salina ou 6-hidroxidopamina no FPM, seguida ou não por DBS unilateral no núcleo subtalâmico. A morte da substancia negra por meio da 6-OHDA foi utilizado como modelo farmacológico da DP, sendo que o DBS foi utilizada como forma de reversão dos sintomas da DP. O comportamento motor dos animais foi avaliado por meio do teste de comportamento rotatório, pelo teste do campo aberto no que se refere aos parâmetros locomotores, bem como a tigmotaxia, autolimpeza e número de bolos fecais. Todos avaliados três semanas após a lesão e uma semana após o início do tratamento com DBS. A lesão com 6-OHDA alterou o comportamento motor dos animais. Contudo, não alterou o comportamento não motor. Observamos que o DBS não reverteu o comportamento motor e não motor, embora, tenha apresentado um efeito ansiolítico independente de lesão. Assim, nossos resultados sugerem que há uma forte relação entre a modulação da atividade do núcleo subtalâmico e as respostas não motoras, sendo o DBS um potencial terapêutico no tratamento dos distúrbios não motores da DP.

Palavras-chaves: doença de Parkinson, 6-OHDA, DBS, núcleo subtalâmico

ABSTRACT

Araújo, R. S. The effect of deep brain stimulation (DBS) in the behavior of rats after unilateral lesion of the medial forebrain bundle with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) as an animal model of Parkinson's disease. Campo Grande. 2016. [Dissertation - Federal University of Mato Grosso do Sul].

Parkinson's disease (PD) is primarily a disease of the extrapyramidal motor function caused by severe degeneration of dopaminergic neurons of the substantia nigra. The symptomatic treatment of PD with L-dopa and dopamine agonists drug prevail the therapy of this disease, and they are highly effective in treating the early stages of the disease. However, the introduction of dopaminergic drugs is associated with acute side effects. More recently, cerebral electrostimulation has been indicated as a way to reverse the motor symptoms of PD in the most serious cases, when the drug therapy does not produce the expected effects. Thus, in this study we have proposed to test the effect of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus, in the motor behavior and no motor one in swiss mice after unilateral lesions of the medial forebrain bundle (MFB) with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) as an animal model of PD. We used 32 swiss mice, male, weighing between 20 and 30 grams. The animals received unilateral (intracranial) saline or 6-hydroxydopamine injection in MFB, followed or not by unilateral DBS in the subthalamic nucleus. The death of the substantia nigra by 6-OHDA was used as pharmacological model of PD, being that the DBS was used as a way to reverse the symptoms of PD. The motor behavior of the animals was assessed by rotational behavior test, by the open field test concerning to the locomotor parameters, as well as tigmotaxia, self- cleaning and number of fecal boli. All of them were evaluated three weeks after the lesion, and one week after the initiation of the treatment with DBS. The lesion with 6-OHDA altered the motor behavior of the animals. However, it did not alter the non-motor behavior. We observed that the DBS did not reverse the motor behavior and no motor, although it has presented an anxiolytic effect regardless of injury. Thus, our results suggest that there is a strong relation between the modulation of the activity of the subthalamic nucleus and no motor responses, being that the DBS can be considered therapeutic potential in the treatment of non-motor disorders in the PD.

Keywords: Parkinson's disease, 6-OHDA, DBS, subthalamic nucleus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos núcleos da base (via direta e via indireta). Setas em vermelho indicam neurotransmissão excitatória e setas em preto neurotransmissão inibitória. Fonte: Ekman, 2000.....	18
Figura 2 - Imagem demonstrando a diferença na distribuição de frequência e o padrão de atividade de neurônios registrados no núcleo subtalâmico de ratos controle (1), e ratos com lesão dos neurônios dopaminérgicos, induzida por 6-OHDA (2) (Modificado de HASSANI, 1996).....	19
Figura 3- Cirurgia estereotáxica em roedores, para aplicação da droga direcionada ao FPM. 1 - bomba de microinfusão; 2 – estereotáxico.	24
Figura 4 - Foto ilustrando a eletroestimulação de dois camundongos.	25
Figura 5 - Foto mostrando o eletroestimulador.....	26
Figura 6 - Esquema ilustrando a construção do eletrodo.	27
Figura 7 - Esquema ilustrando a dinâmica da eletroestimulação.	27
Figura 8 - Esquema ilustrando a formação dos grupos bem como a organização dos testes experimentais.	28
Figura 9 - Foto ilustrando o teste de campo aberto.....	30
Figura 10 - Esquema ilustrando os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto.	30
Figura 11 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos em cada momento da utilização do DBS.	32
Figura 12 – Gráfico referente ao número de erguimentos em cada momento da utilização do DBS.	34
Figura 13 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos na periferia do campo aberto em cada momento da utilização do DBS.....	35
Figura 14 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto em cada momento da utilização do DBS.....	37
Figura 15 – Gráfico referente ao tempo de autolimpeza (em segundos) em cada momento da utilização do DBS.	38
Figura 16 – Gráfico referente ao número de episódios de autolimpezas em cada momento da utilização do DBS.	40

Figura 17 – Gráfico referente ao número de bolos fecais em cada momento da utilização do DBS.	41
Figura 18 – Gráfico referente a diferença entre as direções do teste de comportamento rotatório, em cada momento da utilização do DBS.....	43
Figura 19 – Gráfico referente a diferença entre as direções do teste de comportamento rotatório, em cada momento da utilização do DBS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados referentes à exploração horizontal no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	33
Tabela 2- Resultados referentes ao número de erguimentos no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	34
Tabela 3 - Resultados referentes ao número de quadrantes percorridos na periferia no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	36
Tabela 4 - Resultados referentes ao número de quadrantes percorridos na área central no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	37
Tabela 5 - Resultados referentes ao tempo de autolimpeza no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	39
Tabela 6 - Resultados referentes ao número de episódios de autolimpeza no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	40
Tabela 7 - Resultados referentes ao número de bolos fecais no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	42
Tabela 8 - Resultados referentes a diferença das direções no comportamento rotatório nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	43
Tabela 9 - Resultados referentes ao número de giros contralaterais nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATV - Área Tegmentar Ventral

DBS - Estimulação Cerebral Profunda

DP – Doença de Parkinson

FPM - Feixe Prosencefálico Medial

SNC - Sistema Nervoso Central

STn - Núcleo Subtalâmico

6-OHDA – 6-hydroxydopamina

SNc - Substância negra pars compacta

DA - Dopamina

S.C - Subcutâneo

GPe - Globo pálido externo

UCDB - Universidade Católica Dom Bosco

UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Sumário

1.0	INTRODUÇÃO	11
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.0	OBJETIVOS	21
3.1	Geral	21
3.2	Específicos	21
4.0	METODOLOGIA	22
4.1	Animais:	22
4.2	Grupos experimentais:	22
4.2.1	Via de administração da 6-OHDA por via intracerebral:	23
4.3	Implantação dos eletrodos:	24
4.3.1	Coordenadas para implantação de eletrodo intracerebral:	25
4.4	Estimulação elétrica intracraniana:	25
4.5	Eletroestimulador:	25
4.6	Eletrodo:	26
4.7	Avaliação Funcional dos animais:	28
4.7.1	Teste do campo aberto	29
4.7.2	Teste do comportamento rotatório	31
4.8	Análise estatística:	31
5.0	RESULTADOS	32
5.1	Campo Aberto	32
5.1.1	Exploração horizontal	32
5.1.2	Número de erguimentos	33
5.1.3	Tigmotaxia - Quadrantes percorridos na Periferia	35
5.1.4	Tigmotaxia - Quadrantes percorridos no centro	36
5.1.5	Tempo de autolimpeza	38

5.1.6	Número de comportamentos de autolimpeza	39
5.1.7	Quantidade de bolos fecais	41
5.2	Comportamento rotatório	42
5.2.1	Diferença entre as direções.....	42
5.2.2	Voltas contralaterais	44
6.0	DISCUSSÃO	46
7.0	CONCLUSÃO	50
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO A		56

1.0 INTRODUÇÃO

Os núcleos da base do cérebro e o cerebelo ajustam a atividade nos tratos descendentes do sistema nervoso, apesar da ausência de conexões diretas destes núcleos com os neurônios motores inferiores. Eles influenciam o movimento por vias diferentes, por meio do tálamo e áreas motoras do córtex cerebral, e por conexões com neurônios motores superiores. Fazem parte dos núcleos basais os núcleos caudado, putâmen, globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico e substância negra (parte compacta e reticulada) (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2014).

A doença de Parkinson é primariamente uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância negra, de onde partem projeções para os núcleos caudado e putâmen (estriado), os quais são os núcleos de entrada de informações provindas do córtex cerebral (FANG et al, 2006a; TORIUMI et al, 2009).

Atualmente, o principal tratamento da doença de Parkinson está baseado na terapia dopaminérgica, visando reverter os efeitos da depleção de dopamina (DA) estriatal induzida pela destruição da via nigro-estriatal.

O estudo de novas terapias para a doença de Parkinson está voltado para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos basais que vão além das vias nigroestriatais lesionadas. Vários agentes apresentando um potencial terapêutico têm sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores adenosinérgicos, glutamatérgicos, canabinóides, opióides, $\alpha 2$ -adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (JENNER, 2003).

Mais recentemente, estimulação cerebral profunda (DBS) vem sendo indicada como uma forma de reverter os sintomas motores da doença de Parkinson em casos mais graves, quando a terapia medicamentosa não surte os efeitos esperados.

A estimulação do núcleo subtalâmico e do globo pálido interno têm sido utilizadas como formas de tratamento eficaz para diminuição de tremores, rigidez e bradicinesia. O efeito da DBS está fundamentado na redução da atividade patológica neuronal, havendo dessa forma, uma modulação das oscilações anormais dos núcleos basais causada pela falta de dopamina no sistema nigroestriatal (PLENZ; KITAL, 1999).

Na fase final da doença de Parkinson, normalmente são observadas alterações na marcha e instabilidade postural, sendo estes sintomas menos responsivos à DBS, tanto do núcleo subtalâmico, como do globo pálido interno. A estimulação do núcleo pedunculopontino, tem sido apontado, como alvo terapêutico alternativo para tratamento daqueles pacientes com marcha grave e instabilidade postural (RAUCH; SCHWABE; KRAUSS, 2010).

Assim, neste trabalho nos propusemos a testar o efeito da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico, no comportamento motor e não motor de camundongos, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como modelo animal da doença de Parkinson.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

Os núcleos da base e o cerebelo são estruturas nervosas responsáveis pelos ajustes das atividades nos tratos descendentes do Sistema Nervoso Central (SNC). Estes núcleos regulam a contração e força muscular, os movimentos de múltiplas articulações e as sequências de movimentos. São compostos pelos seguintes núcleos, situados no cérebro e mesencéfalo: o caudado, o putâmen, o globo pálido, o núcleo subtalâmico e a substância negra. Com base na proximidade anatômica, alguns desses núcleos recebem nomes comuns: o globo pálido e o putâmen formam o núcleo lenticular e o conjunto do caudado e do putâmen formam o estriado (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2014).

A substância negra é um núcleo mesencefálico, designado assim pela coloração de suas células. Algumas células deste núcleo contêm melanina, fazendo com que o mesmo tenha uma coloração escura. A substância negra é constituída de duas partes: a parte compacta e a parte reticular. A parte compacta da substância negra fornece dopamina essencial para o estriado. A parte reticular da substância negra e a parte interna do globo pálido são as vias de saída do sistema dos núcleos da base. A saída desses núcleos inibe o tálamo motor e o núcleo pedunculopontino do mesencéfalo. A estimulação do núcleo pedunculopontino provoca comportamentos rítmicos, como aquele dos padrões locomotores. Embora o funcionamento dos núcleos da base seja vital para os movimentos normais, eles não têm conexões diretas com os motoneurônios inferiores. Sua influência é exercida por áreas de planejamento motor do córtex cerebral, e pelo núcleo pedunculopontino do mesencéfalo. A influência sobre a área motora suplementar do córtex cerebral é indireta, por meio do tálamo. Um circuito importante dos núcleos da base conecta as áreas motoras do córtex ao putâmen, o putâmen aos núcleos de saída (por vias direta e indireta) e os núcleos de saída ao tálamo motor, sendo que o tálamo motor excita as áreas do córtex cerebral (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2014).

A influência dos núcleos da base sobre o tálamo motor, na via direta, inicia-se com a excitação do putâmen produzida pelas áreas corticais motoras. Na via direta, o putâmen inibe os núcleos de saída. Como as eferências dos núcleos de saída são inibitórias para o tálamo motor e para o núcleo pedunculopontino, o efeito final do aumento das entradas (*input*) para o putâmen, pela via direta, é o de

aumentar a saída (*output*) excitatória do tálamo motor para as áreas corticais motoras. Portanto, aumentam as atividades nas vias córtico fugais, que inervam os músculos apendiculares (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2014).

Já a via indireta sai do putâmen, inibindo a parte externa do globo pálido, até a inibição do núcleo subtalâmico, excitação da parte reticular da substância negra e inibição do tálamo motor, resultando em menor excitação das áreas motoras do córtex cerebral. Por conseguinte, a atividade pela via indireta reduz o nível de atividade nas vias córtico fugais.

Sendo assim, ressalta-se que, na via indireta, os núcleos da base tem um efeito inibitório tônico sobre a via tálamo cortical, consequentemente ligada à moderação do movimento. Portanto, quando o córtex excita os núcleos da base, o efeito inibitório da via tálamo cortical é reduzido, o que resulta na facilitação de movimentos de modo adequado dos músculos apendiculares e dos músculos posturais.

A dopamina produzida na parte compacta da substância negra aumenta a atividade do córtex motor por se ligar a dois diferentes tipos de receptores, D1 e D2, no circuito dos núcleos da base. A ligação da dopamina a receptores D1 facilita a atividade na via direta, enquanto a ligação de dopamina a receptores D2 inibe a atividade na via indireta (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2014).

O distúrbio motor mais comum dos núcleos da base é a doença de Parkinson (DP), caracterizada por rigidez muscular, marcha festinante, postura curvada, tremores musculares rítmicos e expressão facial semelhante à de uma máscara. Esta doença é uma desordem neurológica progressiva da função motora extrapiramidal causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância negra. Os déficits causados pela depleção de dopamina incluem mais comumente rigidez, tremor e acinesia (FANG et al, 2006a; TORIUMI et al, 2009). Embora a DP seja diagnosticada por meio dos sintomas motores, um vasto conjunto de evidências sugerem que estes sejam apenas um dos aspectos de um distúrbio multifacetado. O que se observa é que cerca de 60% das pessoas com DP apresentam também sintomas não motores, tais como distúrbios psiquiátricos e cerca de 40% deles apresentam transtornos de ansiedade e/ou depressão (BRANCHI et al, 2010).

Modelos animais têm sido utilizados com sucesso na investigação da DP. Dentre os modelos animais da DP mais comuns está aquele obtido por lesão

unilateral da substância negra, por meio de injeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial (FPM), tanto em ratos como em camundongos (BRANCHI et al, 2010) . Outra região não menos comum utilizada como alvo para modelos de DP produzidos com 6-OHDA é o estriado (FANG et al, 2006a; FANG et al, 2010b). Nestes modelos a molécula de 6-OHDA é transportada pelas fibras dos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, para os terminais nervosos (movimento anterógrado) e seus corpos celulares (movimento retrógrado), podendo causar degeneração tanto dos terminais nervosos, como do corpo celular destes neurônios. Microinjeção de 6-OHDA no FMP pode causar uma destruição total da substância negra pars compacta (SNc) e da área tegumentar ventral (ATV) (GOMES; DEL BEL, 2003).

Um modelo animal clássico da DP é aquele obtido pela aplicação intraperitoneal ou intracerebral de haloperidol. O haloperidol é uma droga neuroléptica conhecida por induzir catalepsia através do bloqueio de receptores D2 de dopamina no estriado e no núcleo accumbens (FONTANA et al, 2005). Nos roedores, a catalepsia é apresentada como ausência de movimento voluntário em uma posição antinatural ao animal, onde os membros ao permanecerem imóveis, imitam a rigidez característica em pacientes com DP (SHOOK et al, 2010).

Outra maneira de reproduzir a DP em animais é pela lesão eletrolítica da substância negra. Esse tipo de lesão induz a destruição não específica de células neuronais e gliais, bem como do tecido conjuntivo, nas proximidades da ponta do eletrodo. Pode, portanto, destruir outras vias neuronais além do trato nigroestriatal ascendente (GOMES; DEL BEL, 2003).

As alterações motoras e não motoras da DP nos modelos animais causadas pelos diferentes mecanismos de lesão podem ser avaliadas por diferentes testes. Deficit de habilidades motoras tais como acinesia, podem ser avaliadas através do teste de campo aberto, entre outros; desordem da coordenação motora e assimetrias podem ser avaliadas por meio do teste de comportamento rotatório e do teste de remoção de adesivo (FANG et al, 2010b; RAUCH; SCHWABE; KRAUSS, 2010); deficiências não motoras como ansiedade e depressão podem ser avaliadas por meio dos testes de labirinto em cruz elevado (HOMBERG et al, 2011) e teste de nado forçado, respectivamente (BRANCHI et al, 2010).

Outra forma, de se avaliar ansiedade no comportamento animal é por meio do teste de tigmotaxia. A tigmotaxia seria a tendência dos roedores de se

esconderem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinadas. Portanto, o teste de tigmotaxia estaria relacionada com a avaliação de comportamentos envolvendo ansiedade (CHOLERIS et al., 2001).

O tratamento sintomático da DP com L-dopa e drogas agonistas de dopamina predominam a terapia desta doença e elas são altamente efetivas em tratar os estágios iniciais da doença. Todavia, a introdução de drogas dopaminérgicas está associada com efeitos colaterais agudos, tais como náusea, vômito e hipotensão, além de uma série de complicações relacionadas ao tratamento a longo prazo, as quais aumentam em severidade com a progressão da doença. Além disso, todas as terapias utilizadas tratam os sintomas e não modificam significativamente a progressão da doença. Como consequência disso, há a necessidade do desenvolvimento de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da doença de Parkinson. Novas manipulações devem produzir agentes com ação anti-parkinsonianas em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de discinesias (JENNER, 2003).

O estudo de novas terapias para a doença de Parkinson está voltada para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos basais que vão além das vias nigroestriatais lesionadas (BROTCHIE, 1998; JENNER, 2000). Vários agentes apresentando um potencial terapêutico têm sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores adenosinérgicos, glutamatérgicos, canabinóides, opióides, α_2 -adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (JENNER, 2003).

Entre as manipulações não farmacológicas se destaca o transplante de células catecolaminérgicas como uma estratégia alternativa para restaurar o sistema dopaminérgico danificado. Testes clínicos de transplante usando tecidos fetais resultam em um alívio sintomático, porém, por apresentar dificuldades técnicas e éticas na obtenção dos tecidos de enxerto, esta terapia vem apresentando limitações de sua aplicação clínica em humanos. Por outro lado, estudos vêm demonstrando a possibilidade de células tronco embrionárias superarem as limitações éticas, pois estas células também possuem a capacidade de se renovar e se diferenciar, como aquelas do tecido fetal (TORIUMI et al, 2009).

Outra manipulação não farmacológica é a estimulação cerebral profunda (DBS), a qual despontou na última década, como um tratamento eficaz para uma variedade de desordens neurológicas, incluindo a doença de Parkinson (DP). Apesar

da sua notável eficácia terapêutica, os mecanismos subjacentes aos efeitos da DBS não foram completamente elucidados (CHANG et al, 2008).

Experimentos utilizando DBS em animais foram pela primeira vez realizados em primatas, como modelo de DP. Um método comportamental de pontuação semelhante ao utilizado em pacientes com DP foi empregado para avaliar os sintomas parkinsonianos. A DBS do núcleo subtalâmico (STN) induziu efeitos benéficos em parkinsonianos primatas não-humanos que foram similares aos observados em pacientes humanos com DP. A investigação com DBS foi expandida para incluir estudos com roedores em que as respostas eletrofisiológicas e neuroquímicas associadas à DBS poderiam ser examinadas em detalhes. Os primeiros estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, em roedores anestesiados, forneceram informações detalhadas sobre as respostas à estimulação neural de alta frequência que imita a DBS aplicada clinicamente. No entanto, uma limitação dos estudos da DBS em animais anestesiados, não permite a avaliação das modificações do comportamento animal (CHANG et al, 2008). Por outro lado, alguns estudos têm evidenciado o efeito da DBS no comportamento motor e não motor de roedores (FRIEDMAN et al, 2009), todavia, os resultados ainda não são conclusivos.

Nos últimos anos, a DBS vem sendo indicada como uma forma de reverter os sintomas motores da doença de Parkinson em casos mais graves, quando a terapia medicamentosa não surte os efeitos esperados (FANG et al, 2010b).

A estimulação do núcleo subtalâmico e do globo pálido interno têm sido utilizadas como forma de tratamentos eficazes para a diminuição de tremores, rigidez e bradicinesia. É sabido que o STn apresenta disparos excitatório para os núcleos de saída, enquanto o globo pálido (GPe) se relaciona com o STn por meio de disparos inibitórios (figura 1) (PLENZ; KITAL, 1999).



Figura 1 - Representação dos núcleos da base (via direta e via indireta). Setas em vermelho indicam neurotransmissão excitatória e setas em preto neurotransmissão inibitória. Fonte: Ekman, 2000.

Além dessa relação básica dos dois núcleos com a circuitaria dos núcleos da base, ambos formam um sistema de biofeedback entre si. Juntos, estes núcleos, o STn e o GPe, constituem um marca-passo central, modulado pela inibição promovida pelo estriado. Este marca-passo pode ser responsável pela alteração do padrão de disparos da circuitaria dos núcleos da base, tanto promovendo o equilíbrio deste padrão de disparos, em um sistema normal, quanto alterando este padrão, em situações patológicas (PLENZ; KITAL, 1999)

Hassani e colaboradores (1996) descreveram, por meio de registros eletrofisiológicos, o padrão de disparos do núcleo subtalâmico, tanto em animais saudáveis, quanto em animais após lesão dos neurônios dopaminérgicos com 6-hidroxidopamina. Estes autores observaram que os neurônios do STn dos animais controles, ou seja, sem lesão dos neurônios dopaminérgicos, apresentavam um padrão de disparo relativamente regular, contudo, aqueles com lesão dos neurônios dopaminérgicos apresentaram uma frequência maior de disparos, quando comparado com os animais do grupo controle, além de um padrão de disparos irregular, com trens de pulso (“burst”), como ilustrado na figura 2.

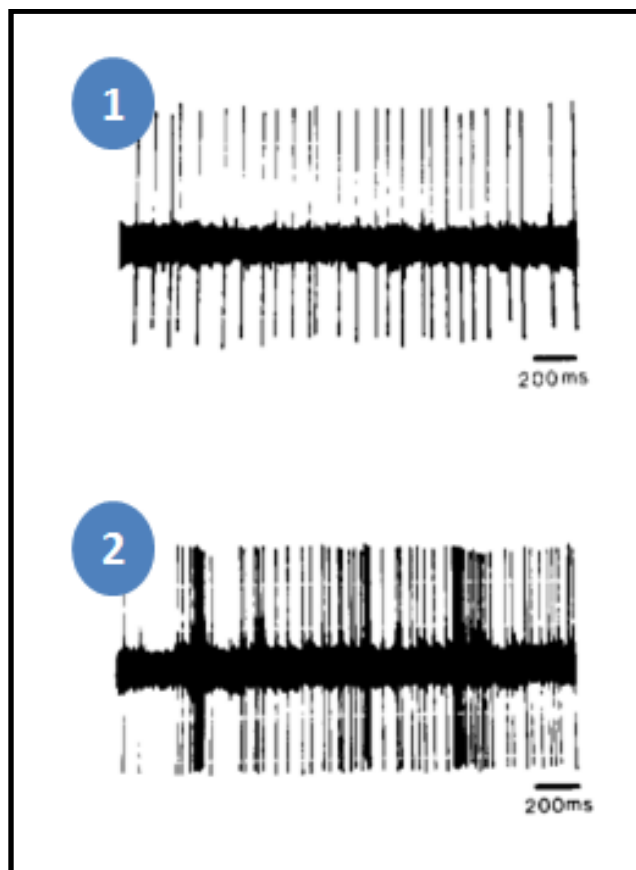


Figura 2 - Imagem demonstrando a diferença na distribuição de frequência e o padrão de atividade de neurônios registrados no núcleo subtalâmico de ratos controle (1), e ratos com lesão dos neurônios dopaminérgicos, induzida por 6-OHDA (2) (Modificado de HASSANI, 1996).

Na doença de Parkinson, a degeneração de neurónios dopaminérgicos da substância negra conduz à hiperatividade do estriado, e hipo e hiper-atividade do GPe e STn, respectivamente, que em conjunto contribuem para a saída inibitória excessiva dos gânglios da base parkinsoniano (FANG et al, 1012)

O efeito da DBS está fundamentado na redução da atividade patológica neuronal, havendo dessa forma, uma modulação das oscilações anormais dos núcleos basais causada pela falta de dopamina no sistema nigroestriatal (FANG et al, 2006a; FANG et al, 2010b; RAUCH; SCHWABE; KRAUSS, 2010; YOUNG et al, 2009).

Na fase final da doença de Parkinson, normalmente são observadas alterações na marcha e instabilidade postural, sendo estes sintomas menos responsivos à DBS, tanto do núcleo subtalâmico, como do globo pálido interno. A estimulação do núcleo pedunculopontino, tem sido apontado, como alvo terapêutico alternativo para o tratamento daqueles pacientes com marcha grave e instabilidade postural (RAUCH; SCHWABE; KRAUSS, 2010; YOUNG et al, 2009).

Assim, neste trabalho nos propusemos a testar o efeito da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico, no comportamento motor e não motor de camundongos suíços, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como modelo animal da doença de Parkinson.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da estimulação cerebral profunda no comportamento de camundongos, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como modelo animal da doença de Parkinson.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico, no comportamento motor de camundongos, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), por meio do teste do campo aberto e comportamento rotatório;

Avaliar o efeito da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico, no comportamento não motor de camundongos, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), por meio do teste campo aberto no que se refere aos parâmetros de tigmotaxia, autolimpeza e número de bolos fecais;

Avaliar a eficiência da 6-OHDA para lesão da substância negra, como modelo animal da doença de Parkinson em camundongos.

4.0 METODOLOGIA

Este estudo caracteriza-se como um estudo experimental com animais, realizado no Laboratório de Biofisiofarmacologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

4.1 Animais:

Neste estudo foram utilizados 32 camundongos Suíços, machos, oriundos do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pesando entre 20 e 30g. Durante os experimentos os animais foram mantidos em microambientes, no laboratório de Biofisiofarmacologia, com água e comida *ad libitum* até o final dos experimentos. O ciclo de luz (12/12 hs, luzes ligadas às 6:00 h) e a temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) serão controlados. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o protocolo nº 299/2011 (Anexo 1).

4.2 Grupos experimentais:

Foi realizado um experimento, com 4 grupos, como descrito a seguir, sendo cada grupo constituído de 8 camundongos. Cada animal foi utilizado somente em um dos grupos experimentais.

Neste experimento os animais receberam injeção unilateral (intracerebral) de salina ou 6-hidroxidopamina (1µl por hemisfério cerebral) no FPM, seguida ou não por DBS unilateral no STn. Foram realizados os seguintes grupos experimentais.

(Salina+DBS(-)): Os animais receberam injeção intracerebral unilateral de salina (FPM), implantação unilateral de eletrodos (STn), sem DBS;

(Salina+DBS(+)): Os animais receberam injeção intracerebral unilateral de salina (FPM), implantação unilateral de eletrodos (STn), com DBS;

(6-OHDA+DBS(-)): Os animais receberam injeção intracerebral unilateral de 6-OHDA (FPM), implantação unilateral de eletrodos (STn), sem DBS;

(6-OHDA+DBS(+): Os animais receberam injeção intracerebral unilateral de 6-OHDA (FPM), implantação unilateral de eletrodos (STn), com DBS;

4.2.1 Via de administração da 6-OHDA por via intracerebral:

A lesão da substância negra foi realizada por meio de infusão intracerebral de 6 – hidroxidopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial (FPM), em um volume de 1µl hemisfério esquerdo, a uma dose de 3µg/µl, preparada em uma solução salina com 0,1% de ácido ascórbico. Assim, cada animal recebeu um total de 3µg de 6-OHDA, sendo aplicação da droga no hemicérebro direito. Para as injeções intracerebrais de 6-OHDA no FPM, os animais foram anestesiados (via i.p.) com quetamina (dose de 70mg/kg) e xilasina (10mg/kg), misturadas na mesma seringa e submetidos a uma cirurgia estereotáxica (estereotáxico marca Insight) para implantação unilateral da agulha de infusão. A agulha de aço inox ligadas a uma bomba de microinfusão (KD Scientific) por um tubo de polipropileno foi direcionada ao FPM de acordo com as coordenadas (Antero posterior -1,2 mm, latero-medial -1,3 e dorso-ventral -4,75mm) referenciadas pelo atlas de Paxinos e Franklin (2008) e utilizada por Iancu et al. (2005) (Figura 3). As drogas e os respectivos veículos foram infundidos no FPM (1µl por hemisfério), a uma taxa de infusão de 0,333µl/minuto. Após a infusão da droga, a agulha de injeção foi deixada na mesma posição por mais 1 minuto para permitir a difusão da droga no tecido nervoso. Após aplicação as agulhas de infusão foram removidas e o animal foi submetido à implantação do eletrodo.

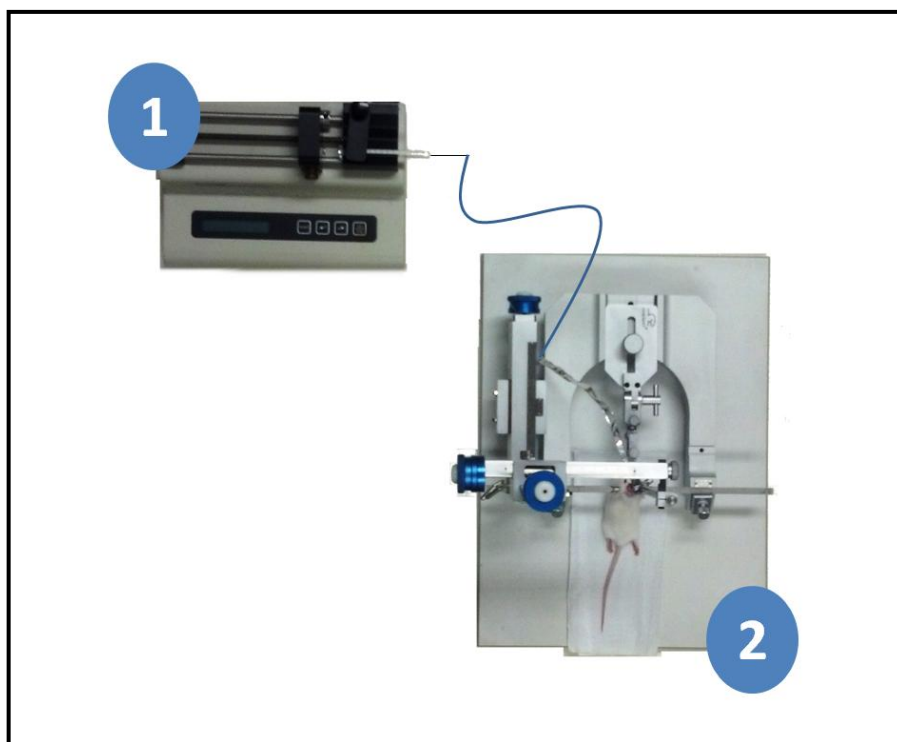


Figura 3- Cirurgia estereotáxica em roedores, para aplicação da droga direcionada ao FPM. 1 - bomba de microinfusão; 2 – estereotáxico.

4.3 Implantação dos eletrodos:

Os eletrodos foram implantados imediatamente após a aplicação das drogas, com o animal ainda anestesiado, por meio de cirurgia estereotáxica. Os eletrodos compostos de aço inox e cobre dispostos em paralelo e isolados, foram direcionados ao STn, unilateralmente, de acordo com as coordenadas referenciadas pelo atlas de Paxinos e Franklin (2008). Os eletrodos foram fixados ao crânio com parafusos de joalheiro, cimento dental e um soquete ligado ao eletrodo por onde posteriormente foi conectado o cabo de estimulação onde os impulsos elétricos foram conduzidos até o núcleo alvo do DBS. Após este procedimento o animal foi deixado para se recuperar da cirurgia até o dia de início dos testes comportamentais (após 3 semanas). Nesse período não foi usado nenhum analgésico, pois envolvem um nível aceitável de dor pós-cirúrgica.

4.3.1 Coordenadas para implantação de eletrodo intracerebral:

Coordenadas do núcleo subtalâmico - coordenadas: Antero posterior -1,9 mm, lateromedial -1,6 mm, e dorso-ventral -4,4 mm (PAXINOS, 2008).

4.4 Estimulação elétrica intracraniana:

Após 3 semanas da cirurgia os animais dos grupos eletroestimulados, foram submetidos a eletroestimulação por uma semana durante uma hora, como mostra a figura 4. Foram utilizados os seguintes parâmetros: Ondas quadráticas com largura de pulso de 90 μ s, 130 Hz de frequência, com tensão de 100 μ A.

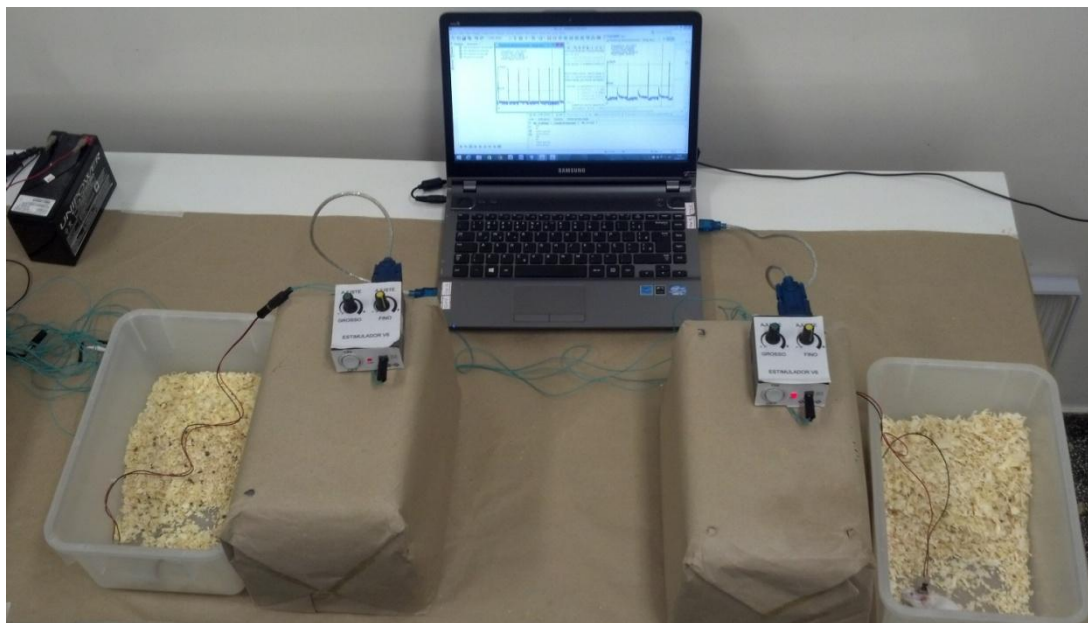


Figura 4 - Foto ilustrando a eletroestimulação de dois camundongos.

4.5 Eletroestimulador:

O estimulador (Figura 5) desenvolvido em parceria com a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) é composto de conversor max232, filtro RC, ponte H e dois microcontroladores PIC12 e PIC16. O sistema é composto de hardware e software

para formação da onda utilizada, amplitude máxima de 5 V, níveis de tensão entre 1-3,5V e largura de pulso é compreendida entre 60-210 μ s e a frequência de 130-185 Hz.

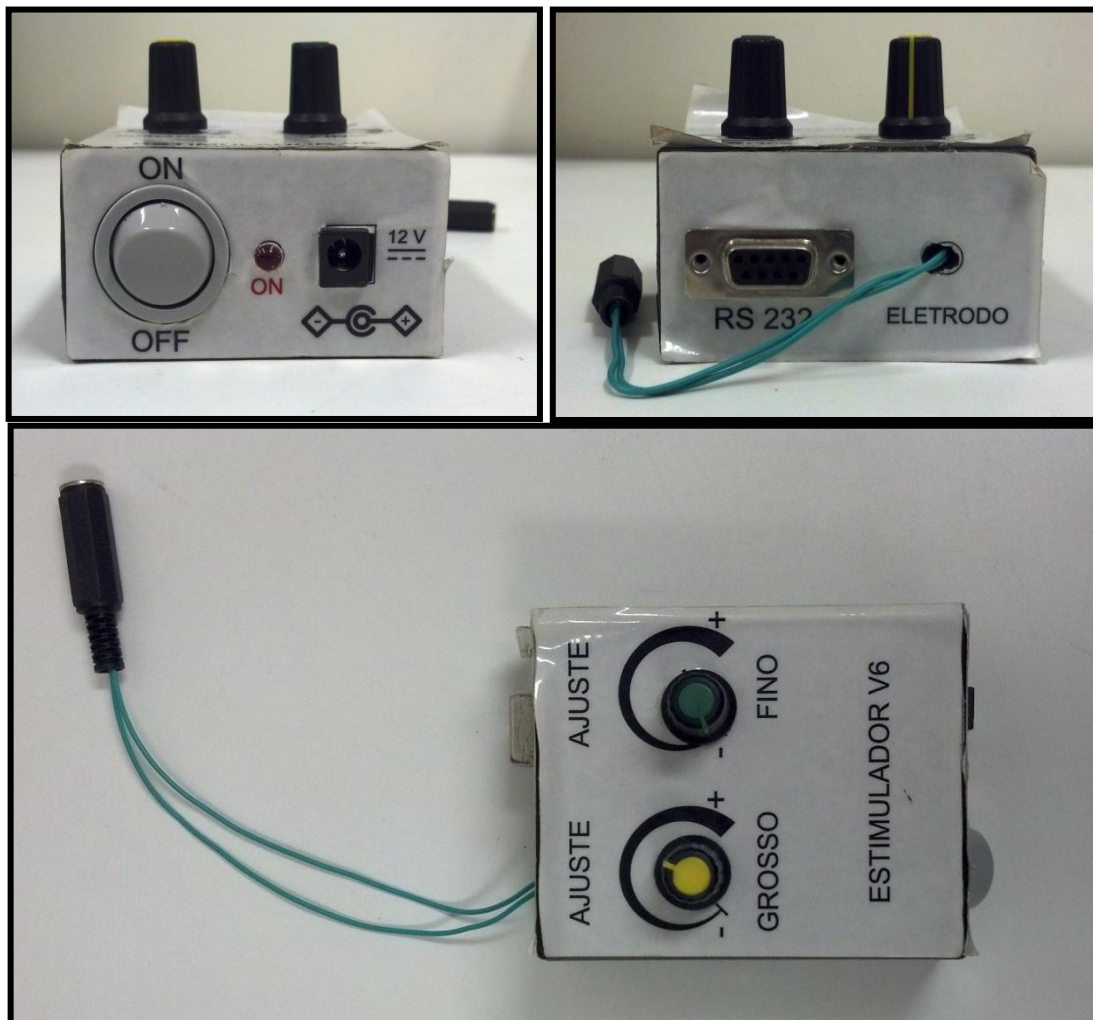


Figura 5 - Foto mostrando o eletroestimulador.

4.6 Eletrodo:

O eletrodo bipolar foi construído, usando como base um pin header, que serviu como apoio para a colocação dos polos do eletrodo, os quais foram construídos utilizando uma agulha e fio de cobre (figura 6). O eletrodo é encaixado em um pin header fêmea para ser conectado ao eletroestimulador (figura 7).

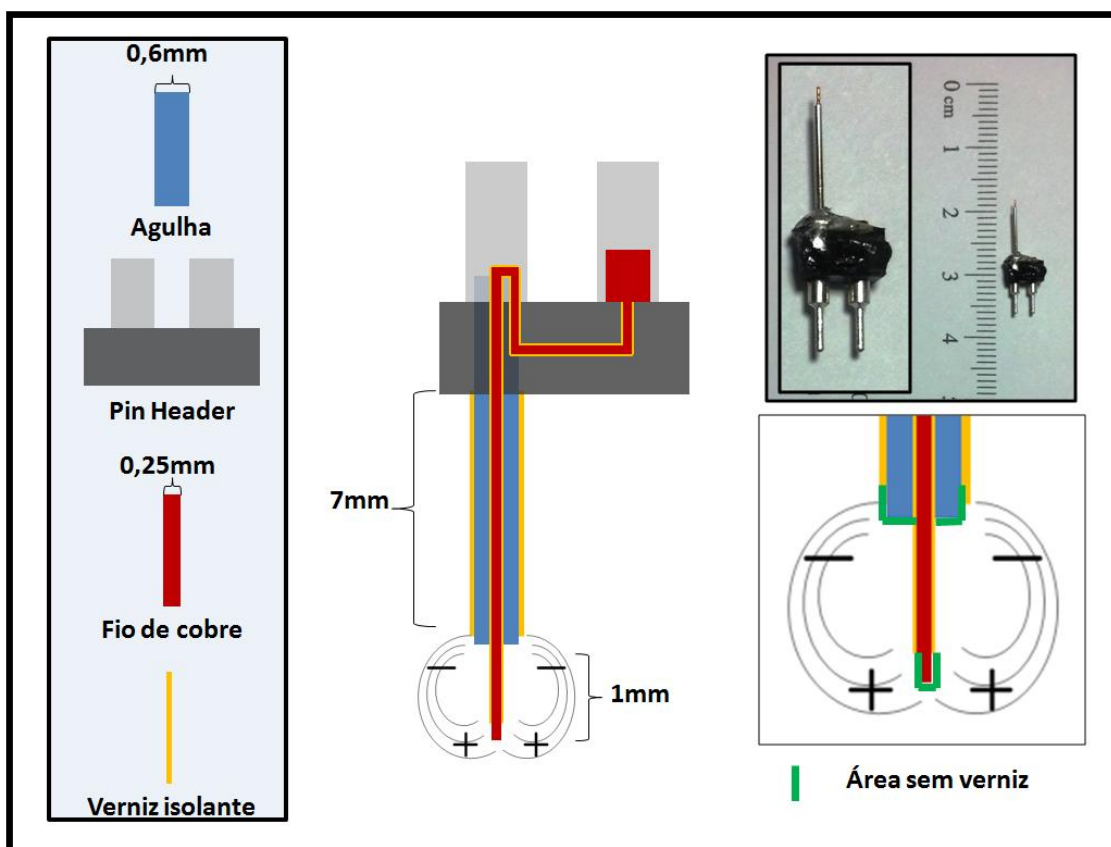


Figura 6 - Esquema ilustrando a construção do eletrodo.

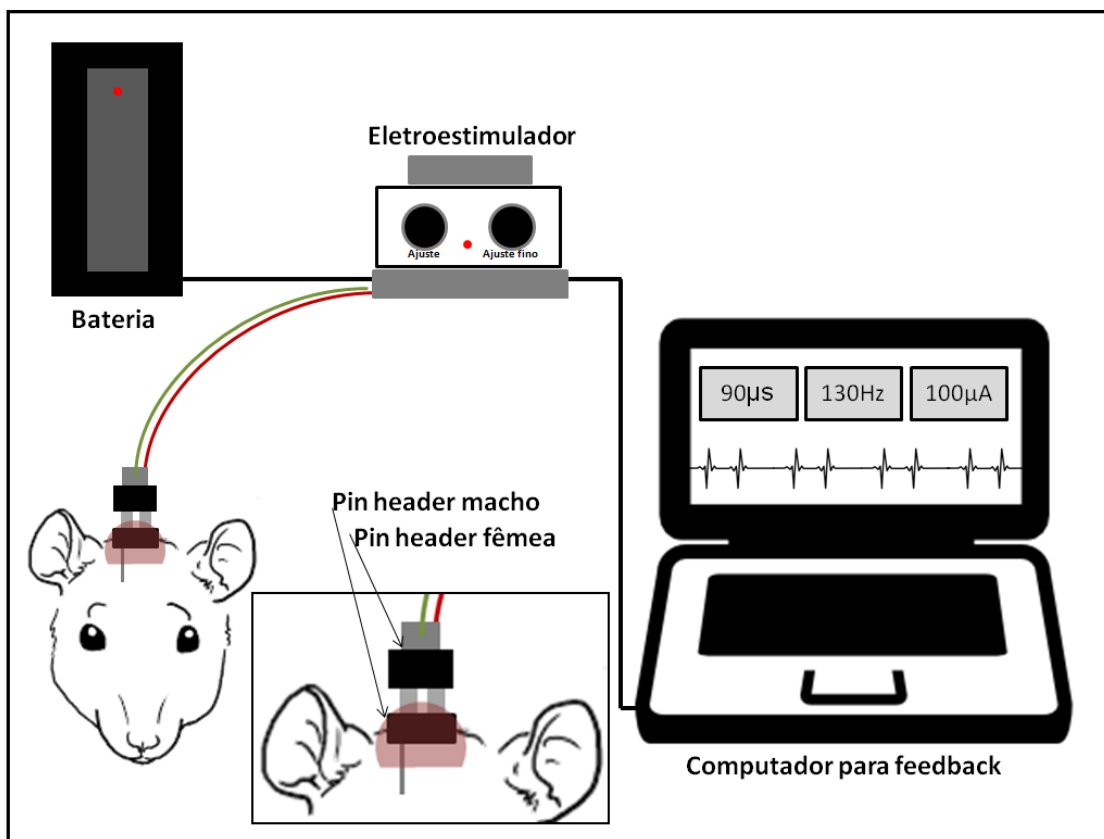


Figura 7 - Esquema ilustrando a dinâmica da eletroestimulação.

4.7 Avaliação Funcional dos animais:

A avaliação funcional dos animais, foi realizada por meio do teste do campo aberto, observando tanto os dados de locomoção, (WALSH; CUMMINS, 1976; WHIMBEY; DENENBERG, 1967), como a tigmotaxia, autolimpeza e número de bolos fecais (CHOLERIS et al., 2001) e do teste de comportamento rotatório (TATENHORST, 2014). Após os testes de comportamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. E os tecidos cerebrais armazenados para posterior análise histológica.

Os testes de comportamento foram realizados sempre no mesmo horário e local, como descritos a seguir (figura 8):

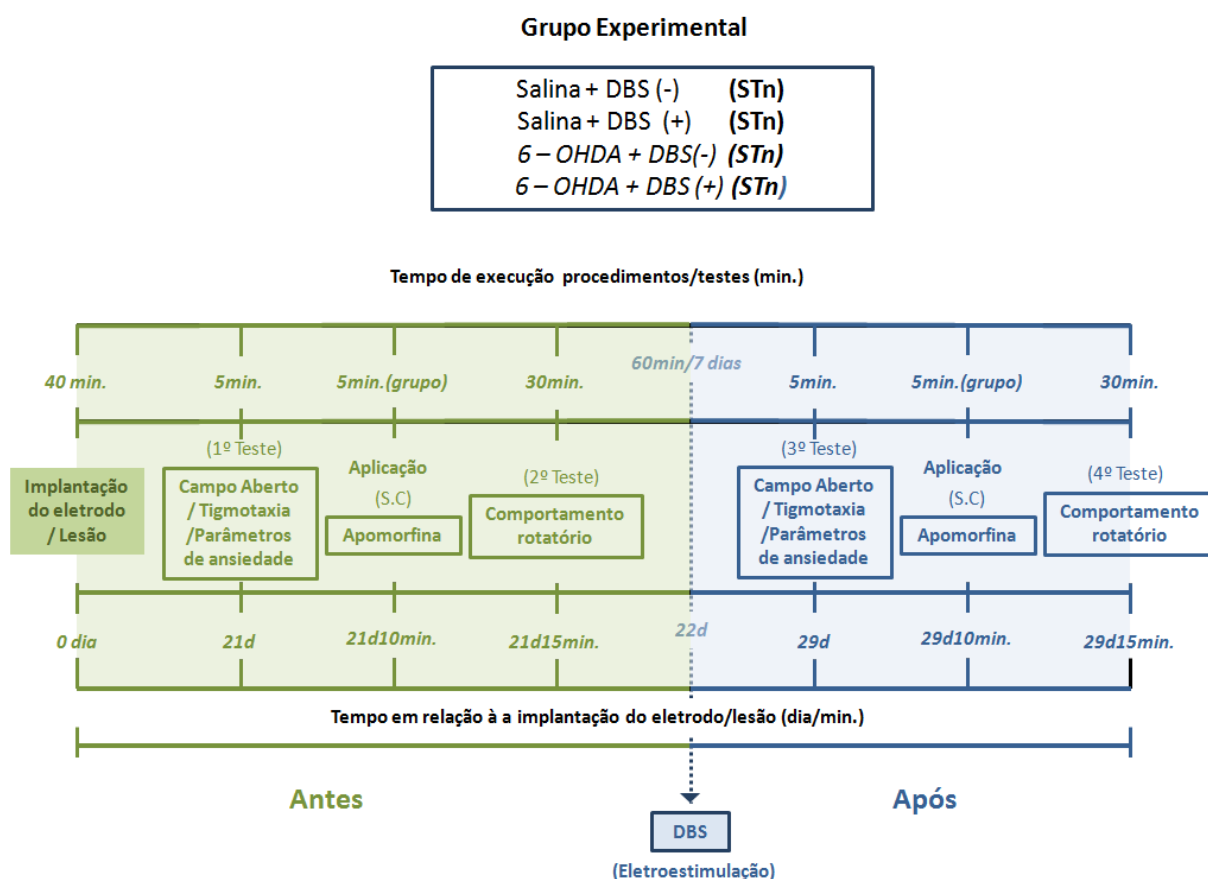


Figura 8 - Esquema ilustrando a formação dos grupos bem como a organização dos testes experimentais. No quadro superior do fluxograma são apresentados os grupos experimentais. Na linha de tempo superior, são demonstrados os tempos de execução dos procedimentos e testes. Na linha de tempo inferior, são demonstrados os momentos em ordem cronológica de cada procedimento do estudo.

4.7.1 Teste do campo aberto

Este teste foi primeiramente descrito por Calvin S. Hall na década 1930, sendo modificado, posteriormente na década de 1960 por P.L. Broaderhurst, que evidenciou que o número de bolos fecais eliminados pelos ratos estava relacionado com o medo. Gradativamente, outros parâmetros de avaliação foram sendo acrescentados ao teste, sendo que, até 1976 já haviam sido acrescentados mais de 30 itens (WALSH; CUMMINS, 1976).

O teste do campo aberto foi realizado em uma arena cilíndrica (figura 9) de 40 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido de 30 cm de altura, colocada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, a qual foi subdividida em 12 quadrantes de $104,7 \text{ cm}^2$ cada um deles. Em nosso estudo, avaliamos os seguintes parâmetros: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal, que é a quantidade de quadrantes percorridos em 5 minutos, e exploração vertical, quantidade de erguimentos realizados pelo animal nos mesmos 5 minutos. Durante o teste de campo aberto, na mesma arena cilíndrica foram avaliados outros dados comportamentais, além da tigmotaxia. A tigmotaxia, é a tendência dos roedores de se esconderem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinadas. Portanto, assim a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no campo aberto (CHOLERIS et al., 2001). Dessa forma, foi ponderado o número de quadrantes percorridos no centro e na periferia do campo aberto durante os 5 minutos. Além dos parâmetros já mencionados, foram analisados os seguintes dados comportamentais: número e tempo de autolimpeza e número de bolos fecais (Figura 10). Para que pudéssemos extrair todos os dados comportamentais e minimizar falhas de contagem, o teste foi filmado e em seguida foram feitas as mensurações por contagem manual, de cada variável avaliada.

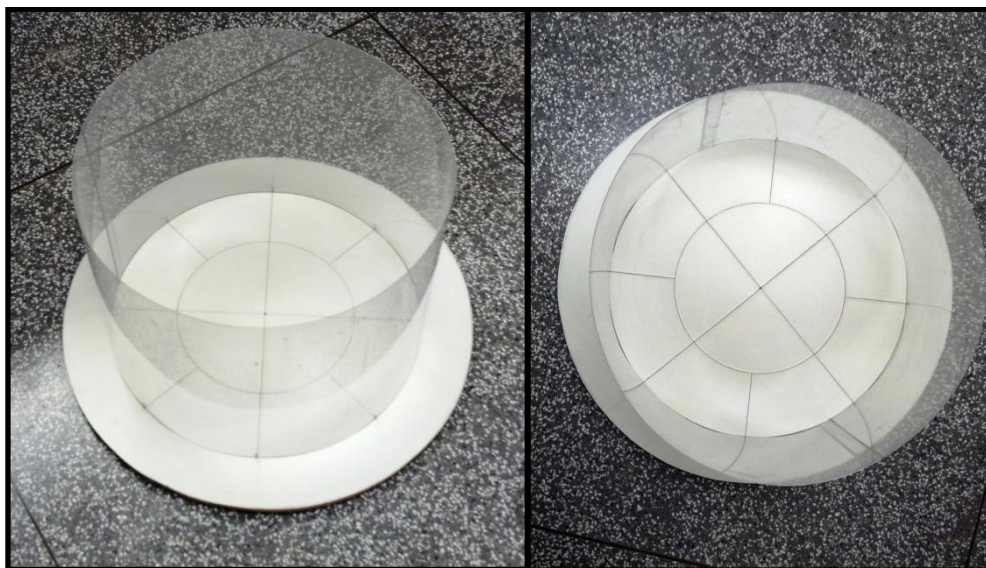


Figura 9 - Foto ilustrando o teste de campo aberto.

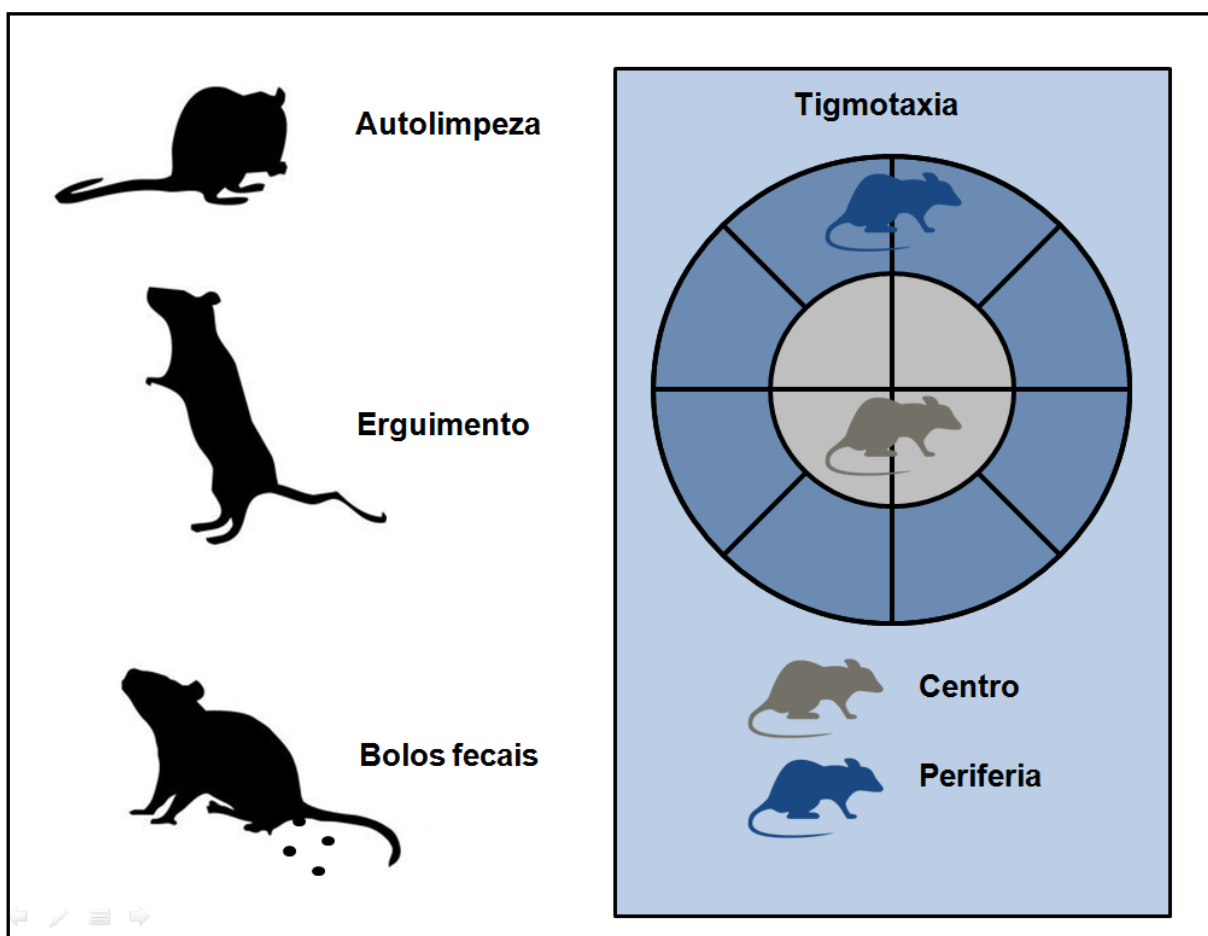


Figura 10 - Esquema ilustrando os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto.

4.7.2 Teste do comportamento rotatório

O teste de comportamento rotatório com apomorfina é utilizado para determinar a eficácia da lesão unilateral de 6-OHDA e para monitorizar uma possível recuperação do comportamento ao longo do tempo. Os animais receberam uma injeção subcutânea de apomorfina (0,5 mg / kg) (SIGMA - ALORICH) em 0,9% de solução salina. A apomorfina é um agonista de receptor de DA, que quando utilizada em doses baixas faz com que os animais apresentem comportamento rotatório contralateral, pois estimulam tanto os receptores D1 quanto D2, preferencialmente do lado desnervado (CREESE, 1977). O comportamento rotatório foi monitorado imediatamente após a injeção durante 30 minutos por filmagem. O teste foi realizado antes e após o tratamento administrado nos grupos experimentais (TATENHORST, 2014). Para que pudéssemos extrair todos os dados comportamentais e minimizar falhas de contagem, o teste foi filmado e em seguida foram feitas as mensurações por contagem manual, de cada variável avaliada.

4.8 Análise estatística:

A comparação entre os grupos experimentais, em relação às variáveis avaliadas no teste do campo aberto (tanto parâmetros locomotores quanto a tigmotaxia, autolimpeza e número de bolos fecais), e comportamento rotatório foi realizado por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5%.

5.0 RESULTADOS

5.1 Campo Aberto

5.1.1 Exploração horizontal

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 11.

Na avaliação dos dados referentes ao número de quadrantes percorridos não houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p < 0,671$), efeito do momento de análise ($p < 0,071$), bem como interação entre estes fatores ($p = 0,469$).

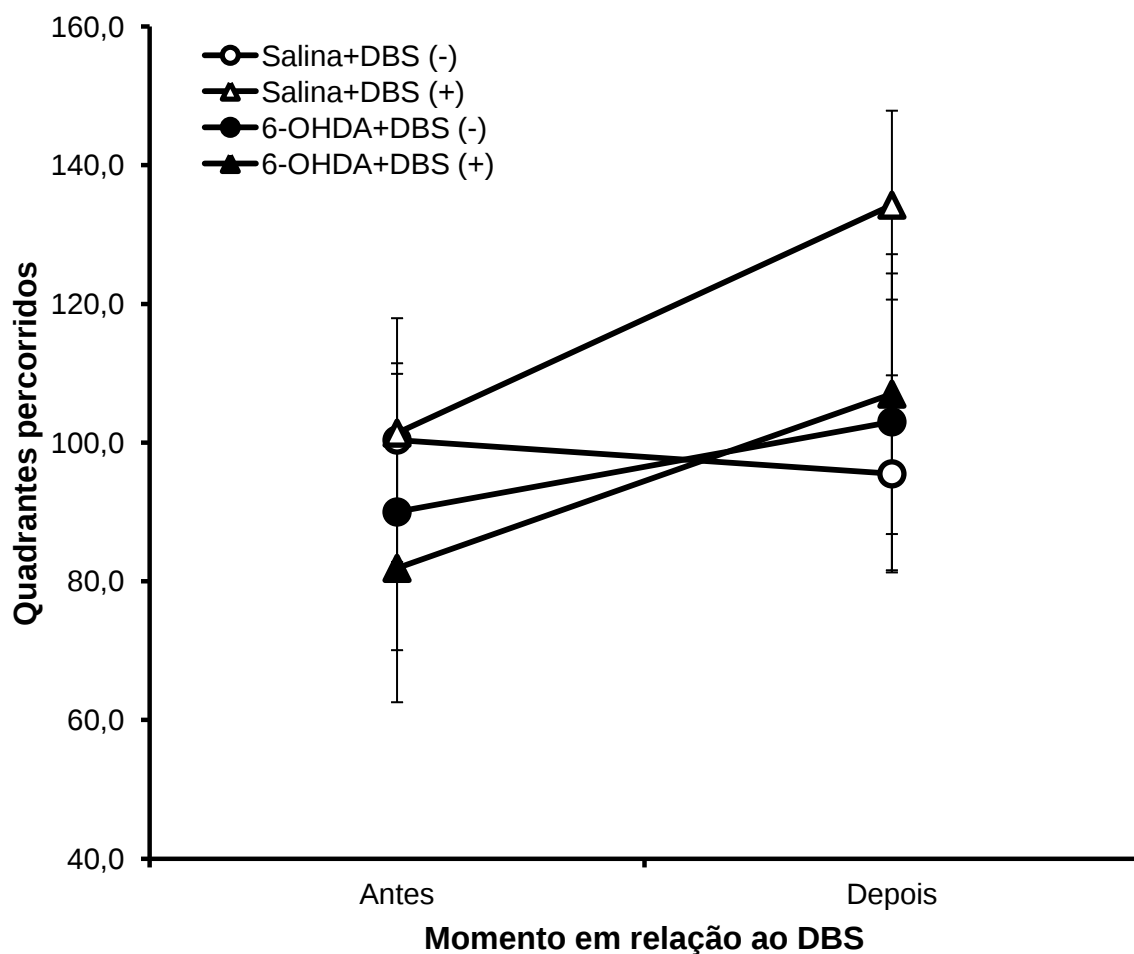


Figura 11 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 1 - Resultados referentes à exploração horizontal no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Quadrantes percorridos / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	100,38±17,57	95,50±14,21
Salina+DBS(+)	101,38±10,07	134,25±13,62
6-OHDA+DBS(-)	90,00±19,92	103,00±21,40
6-OHDA+DBS(+)	81,88±19,31	107,00±20,18

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.1.2 Número de erguimentos

Os resultados referentes ao número de erguimentos, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 12.

Na avaliação dos dados referentes ao número de erguimentos houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p=0,002$), efeito do momento de análise ($p=0,010$), bem como interação entre estes fatores ($p=0,045$). No momento pós DBS o número de erguimentos no grupo sem lesão da substância negra compacta com 6-OHDA e estimulado (salina+DBS(+)) foi maior do que aquele observado nos grupos com lesão (6-OHDA+DBS(+)) e 6-OHDA+DBS(-)) e do grupo salina sem eletroestimulação. Na comparação entre momentos, o grupo que recebeu o DBS sem lesão (Salina+DBS(+)) apresentou maior número de erguimentos, após a estimulação, quando comparados com o momento anterior a ela (Pós teste de Tukey $p<0,05$).

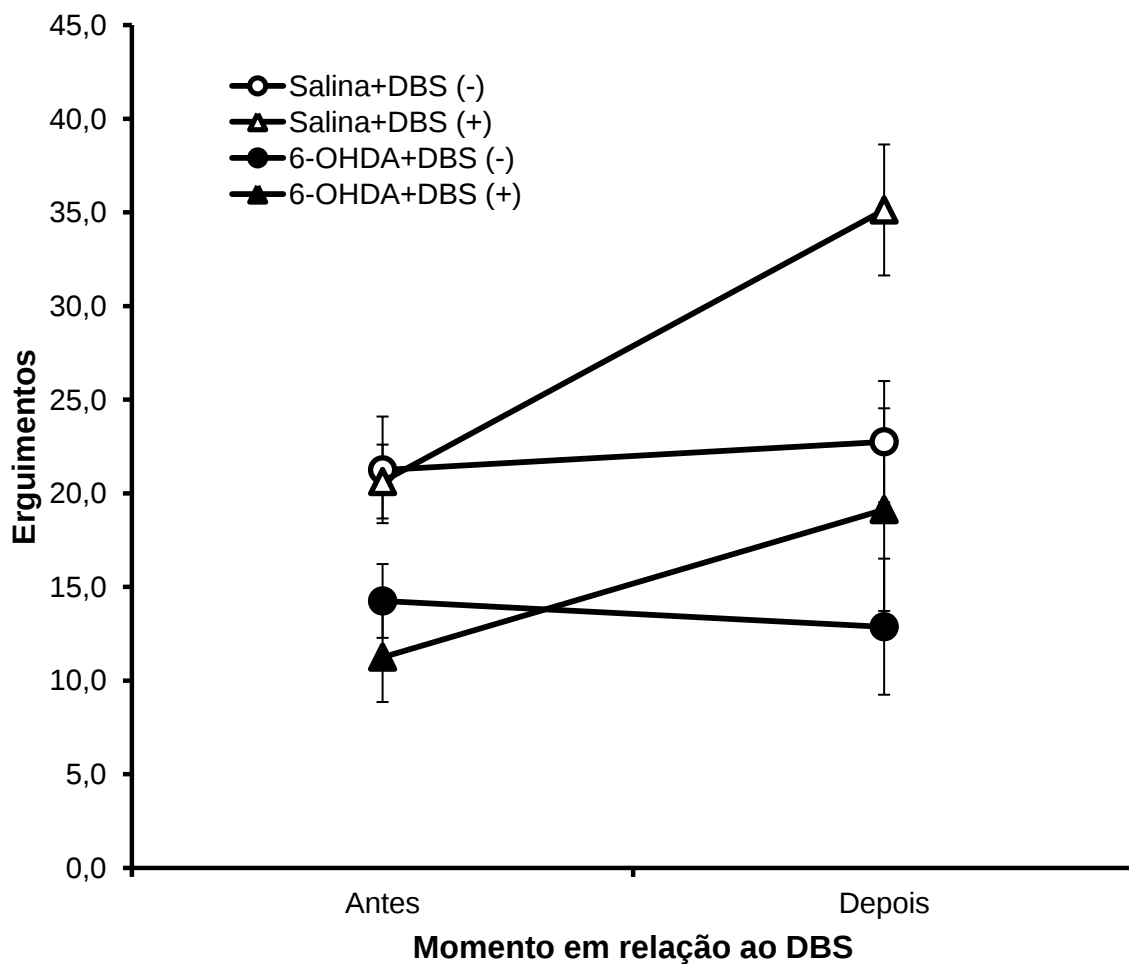


Figura 12 – Gráfico referente ao número de erguimentos em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 2- Resultados referentes ao número de erguimentos no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Número de erguimentos / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	21,25±2,85	22,75±3,24
Salina+DBS(+)	20,63±1,97	35,13±3,50
6-OHDA+DBS(-)	14,25±1,97	12,88±3,63
6-OHDA+DBS(+)	11,25±2,40	19,13±5,4

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.1.3 Tigmotaxia - Quadrantes percorridos na Periferia

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos na periferia do campo aberto, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 13.

Na avaliação dos dados referentes ao número de quadrantes percorridos na periferia do campo aberto não houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p=0,759$), efeito do momento de análise ($p<0,244$), bem como interação entre estes fatores ($p=0,846$).

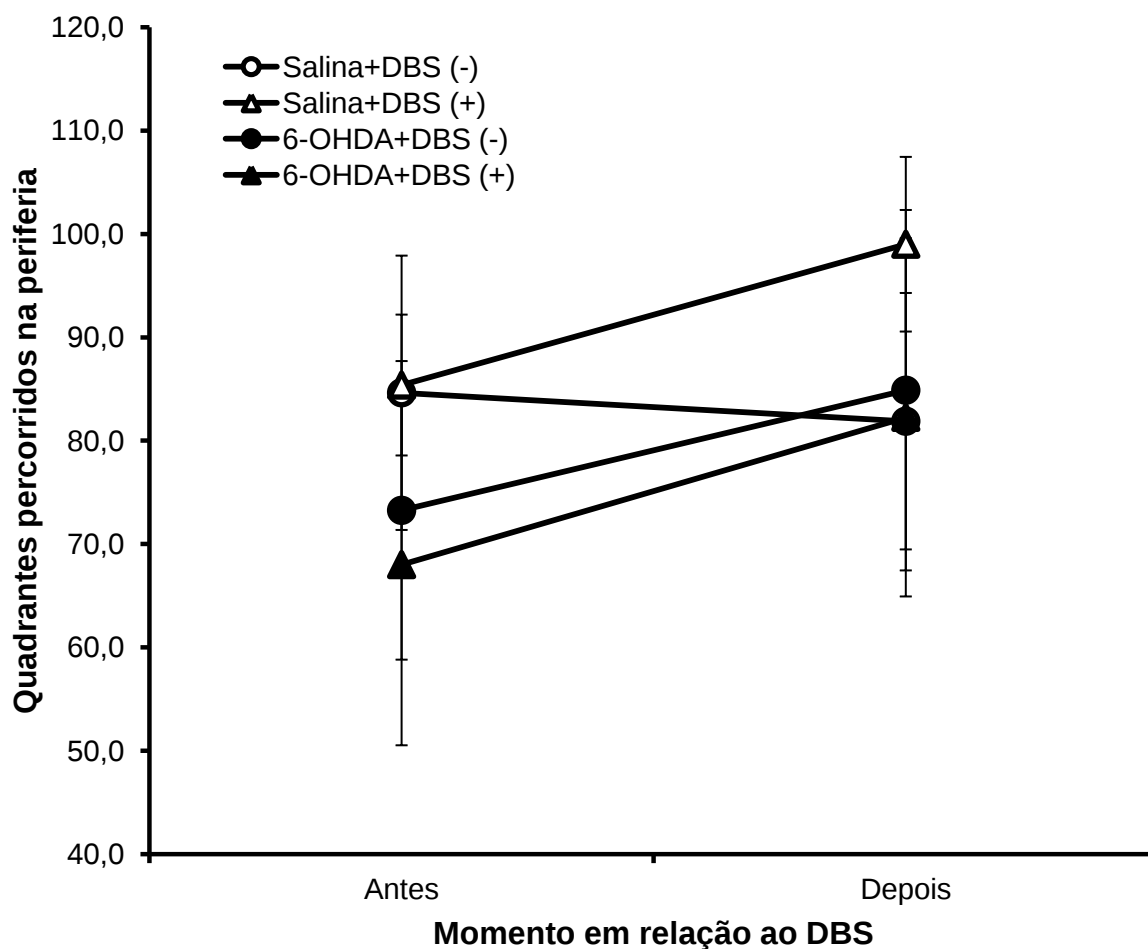


Figura 13 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos na periferia do campo aberto em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 3 - Resultados referentes ao número de quadrantes percorridos na periferia no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Número de quadrantes na periferia / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	84,63±13,27	81,88±12,41
Salina+DBS(+)	85,38±6,81	99,00±8,45
6-OHDA+DBS(-)	73,25±14,45	84,88±17,44
6-OHDA+DBS(+)	68,00±17,48	82,25±17,33

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.1.4 Tigmotaxia - Quadrantes percorridos no centro

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 4 e ilustrados na Figura 14.

Na avaliação dos dados referentes ao número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto, não houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p=0,379$), contudo houve efeito do momento de análise ($p=0,007$), bem como interação entre estes fatores ($p=0,028$). Na análise comparativa entre os grupos no momento antes da eletroestimulação não observamos diferença significativa em relação a nenhum dos grupos comparados. Já no momento após o DBS o número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto no grupo salina eletroestimulado (salina+DBS(+)) foi maior do que aquele observado no grupo sem lesão e não eletroestimulado (salina+DBS(-)). Na comparação entre momentos, ambos os grupos que receberam o DBS (6-OHDA+DBS(+) e salina+DBS(+)) apresentaram maior número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto, após a estimulação, quando comparados com o momento anterior a ela (Pós teste de Tukey $p<0,05$).

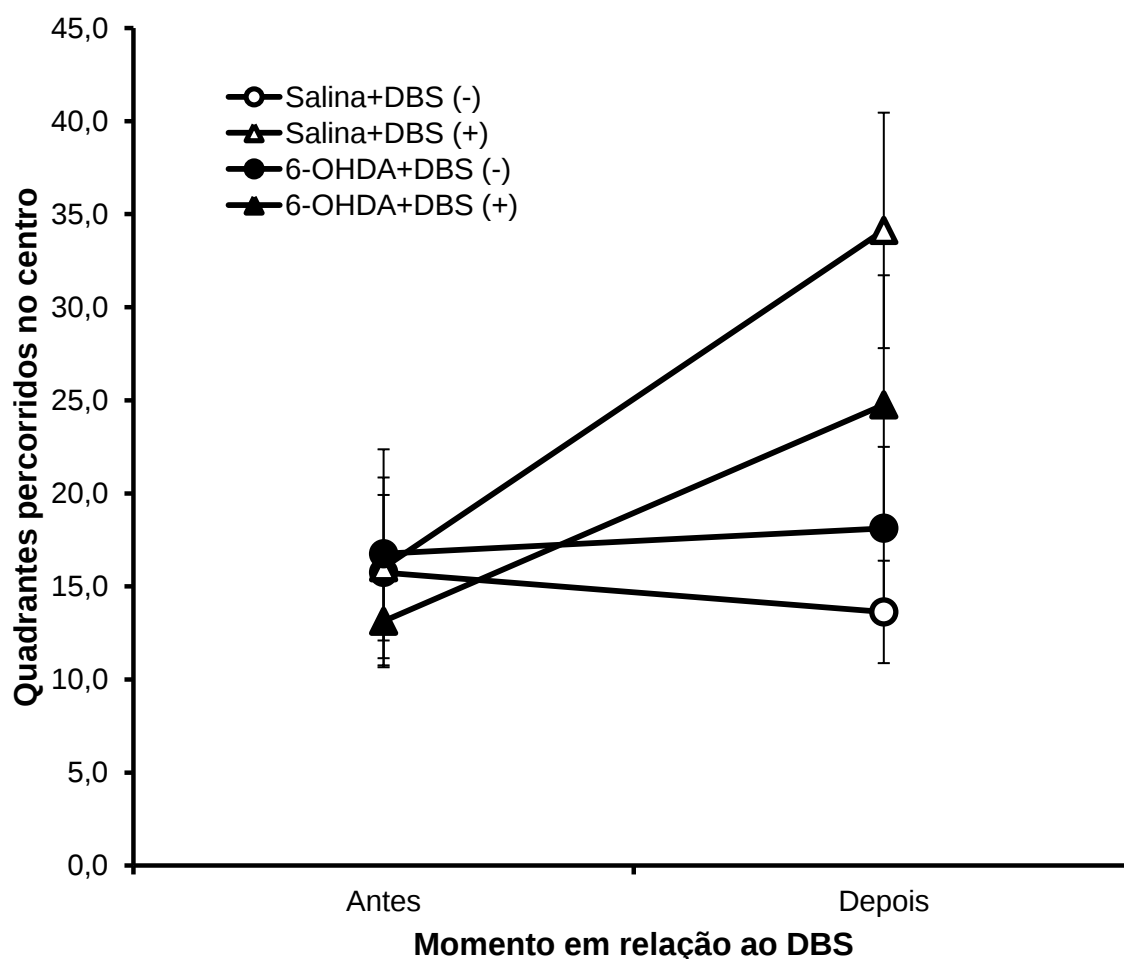


Figura 14 – Gráfico referente ao número de quadrantes percorridos no centro do campo aberto em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 4 - Resultados referentes ao número de quadrantes percorridos na área central no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Número de quadrantes no centro / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	15,75±5,10	13,63±2,75
Salina+DBS(+)	16,00±3,91	34,13±6,33
6-OHDA+DBS(-)	16,75±5,61	18,13±4,37
6-OHDA+DBS(+)	13,13±2,37	24,75±6,96

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.1.5 Tempo de autolimpeza

Os resultados referentes ao tempo de autolimpeza, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 5 e ilustrados na Figura 15.

Na avaliação dos dados referentes ao tempo de autolimpeza houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p=0,008$), efeito do momento de análise ($p=0,012$), bem como interação entre estes fatores ($p=0,003$). Na análise comparativa entre os grupos no momento antes da eletroestimulação não observamos diferença significativa em relação a nenhum dos grupos comparados. Já no momento pós eletroestimulação os animais do grupo sem lesão e sem eletroestimulação (salina+DBS(-)) apresentou um tempo maior de comportamento de autolimpeza, quando comparados com os grupos eletroestimulados (6-OHDA+DBS(+) e Salina+DBS(+)). Na comparação entre momentos, ambos os grupos que receberam o DBS (Salina+DBS(+) e 6-OHDA+DBS(+)) apresentaram um tempo menor de autolimpeza, após a estimulação, quando comparados com o momento anterior a ela (Pós teste de Tukey $p<0,05$).

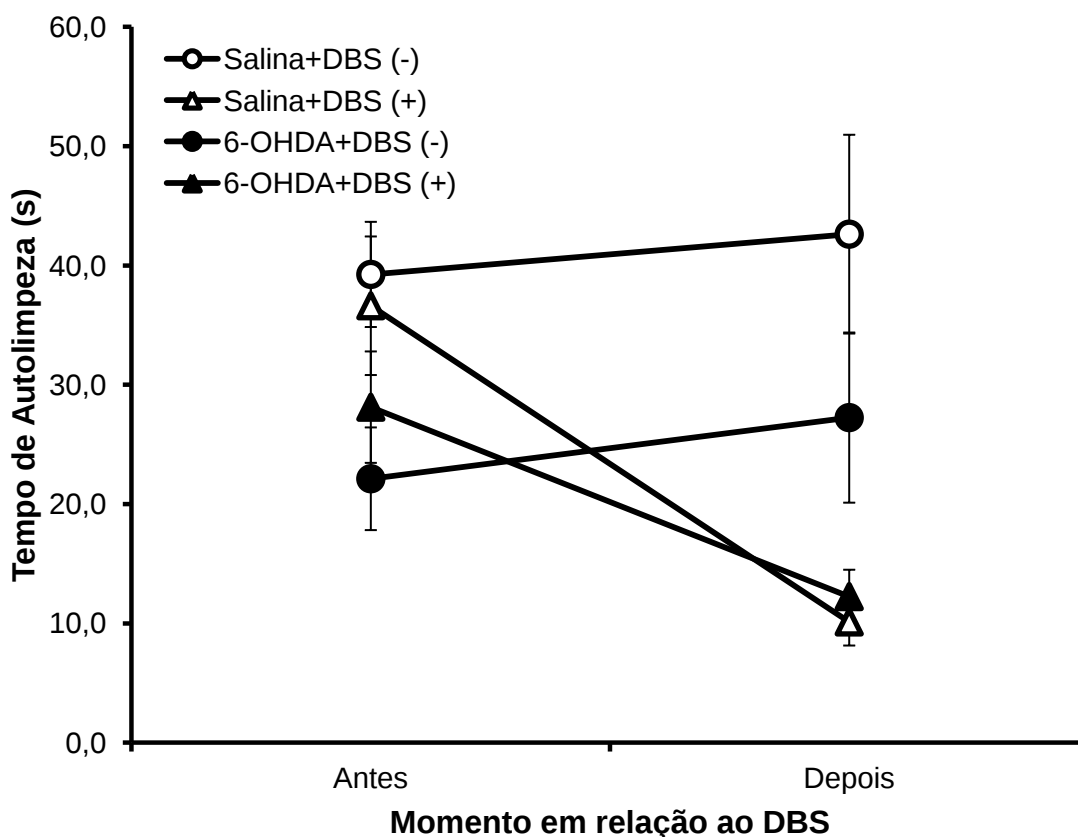


Figura 15 – Gráfico referente ao tempo de autolimpeza (em segundos) em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 5 - Resultados referentes ao tempo de autolimpeza no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Tempo de autolimpeza (s) / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	39,25±4,41	42,63±8,33
Salina+DBS(+)	36,63±5,81	10,13±1,98
6-OHDA+DBS(-)	22,13±4,30	27,25±7,13
6-OHDA+DBS(+)	28,13±4,67	12,25±2,25

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Tempo autolimpeza mensurado em segundos.

5.1.6 Número de comportamentos de autolimpeza

Os resultados referentes ao número de quadrantes percorridos, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 6 e ilustrados na Figura 16.

Na avaliação dos dados referentes a quantidade de autolimpeszas (Tabela 6) houve efeito do grupo experimental (Anova de duas vias de medidas repetitivas $p<0,001$), efeito do momento de análise ($p<0,001$), bem como interação entre estes fatores ($p=0,002$). No momento antes do DBS o número de autolimpeszas nos grupos com lesão da substância negra compacta com 6-OHDA (6-OHDA+DBS(-) e 6-OHDA+SDB(+)) foi menor do que aquele observado nos grupos sem lesão (salina+DBS(-) e salina+DBS(+)). Já no momento pós eletroestimulação os animais dos grupos salina+DBS(+), 6-OHDA+DBS(-) e 6-OHDA+DBS(+) apresentaram um numero menor de comportamento de autolimpeza, quando comparados com o grupo salina. Na comparação entre momentos, ambos os grupos que receberam o DBS (Salina+DBS(+) - 6-OHDA+DBS(+)) apresentaram menor numero de comportamento de autolimpeza, após a estimulação, quando comparados com o momento anterior a ela (Pós teste de Tukey $p<0,05$).

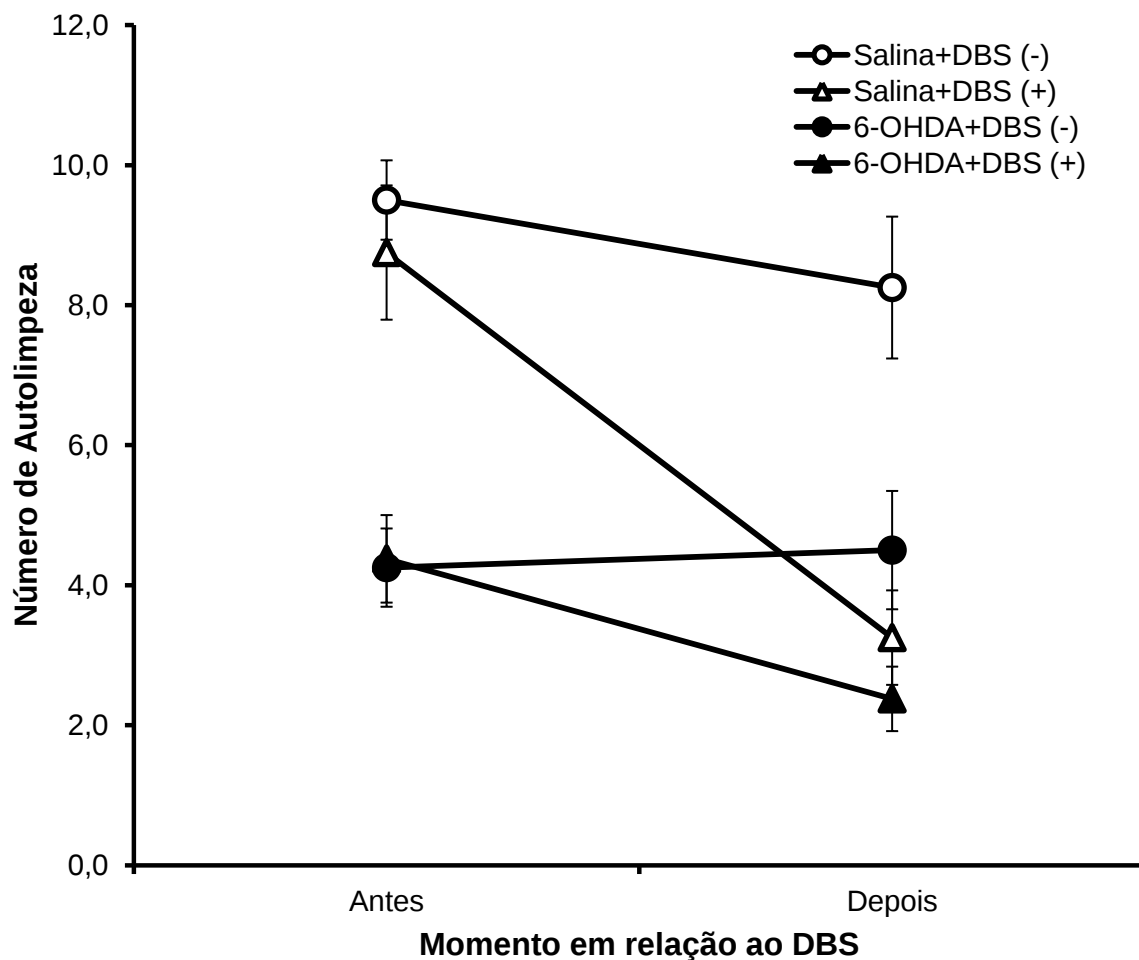


Figura 16 – Gráfico referente ao número de episódios de autolimpezas em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 6 - Resultados referentes ao número de episódios de autolimpeza no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Número de autolimpeza / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	9,50±0,57	8,25±1,01
Salina+DBS(+)	8,75±0,96	3,25±0,67
6-OHDA+DBS(-)	4,25±0,56	4,50±0,85
6-OHDA+DBS(+)	4,38±0,63	2,38±0,46

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.1.7 Quantidade de bolos fecais

Os resultados referentes ao número de bolos fecais, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 7 e ilustrados na Figura 17.

Na avaliação dos dados referentes ao número de bolos fecais não houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p=0,370$), efeito do momento de análise ($p=0,349$), bem como interação entre estes fatores ($p=0,203$).

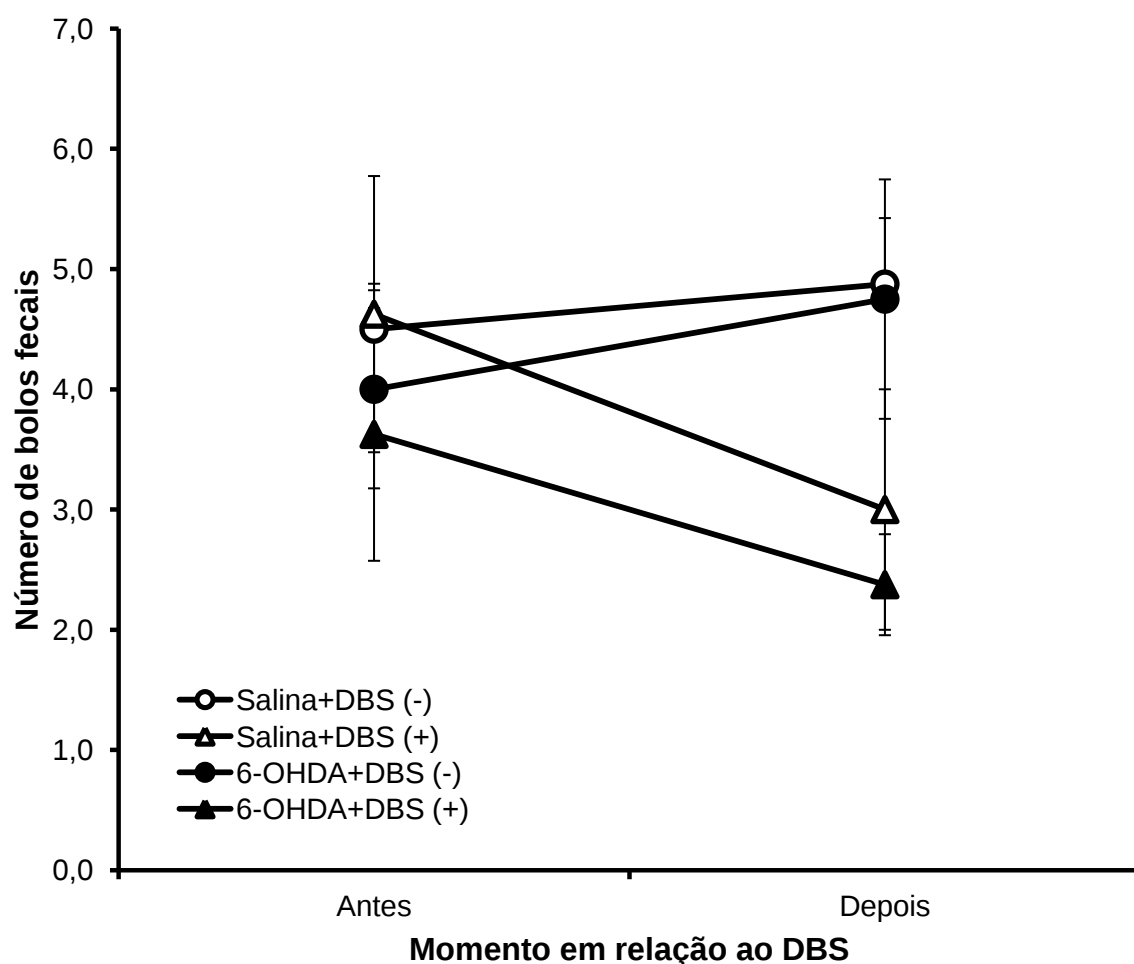


Figura 17 – Gráfico referente ao número de bolos fecais em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 7 - Resultados referentes ao número de bolos fecais no campo aberto nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais.

Grupos	Número de bolos fecais / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	4,50±0,38	4,88±0,55
Salina+DBS(+)	4,63±1,15	3,00±1,00
6-OHDA+DBS(-)	4,00±0,82	4,75±1,00
6-OHDA+DBS(+)	3,63±1,05	2,38±0,42

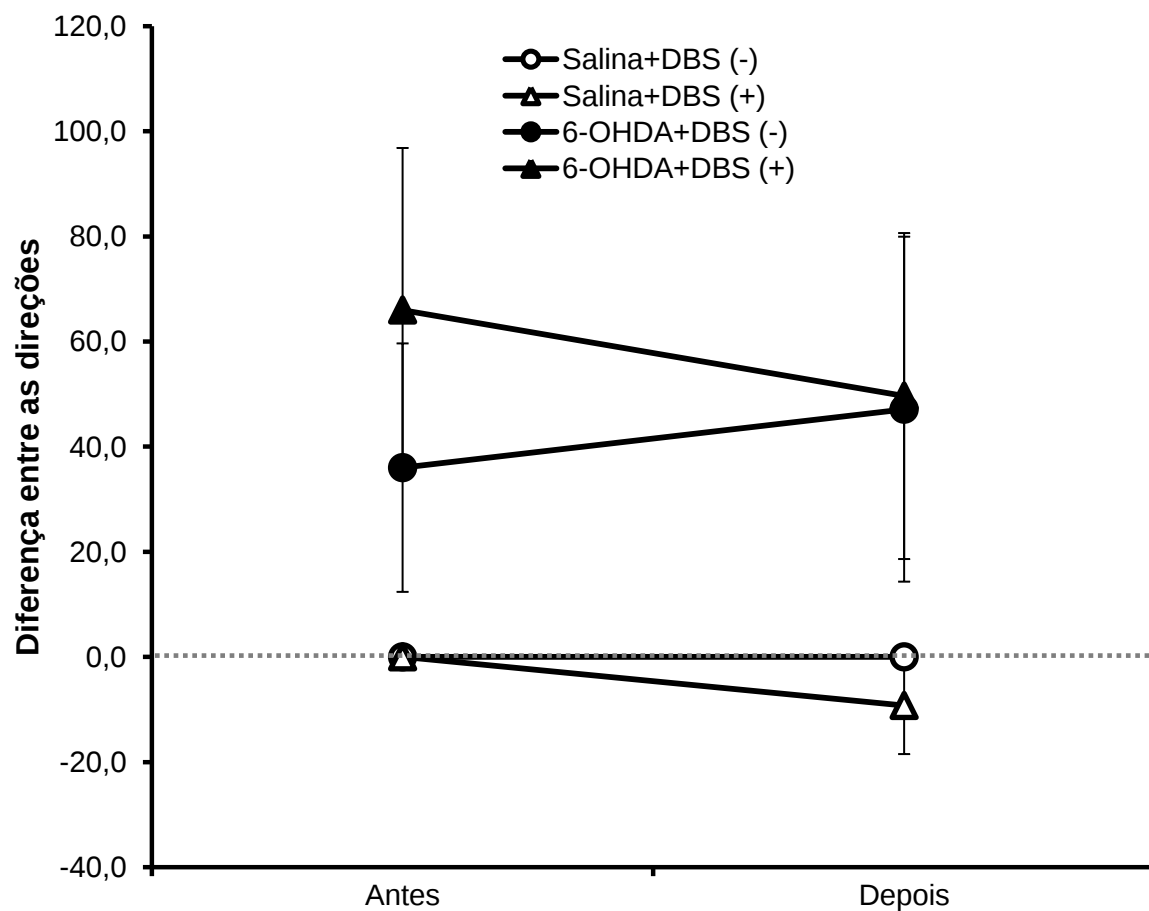
Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.2 Comportamento rotatório

5.2.1 Diferença entre as direções

Os resultados referentes a diferença entre as direções apresentadas no comportamento rotatório, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 8 e ilustrados na Figura 18.

Na avaliação dos dados referentes a diferença entre as direções apresentadas no comportamento rotatório não houve efeito do grupo experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetitivas $p < 0,094$), efeito do momento de análise ($p < 0,614$), bem como interação entre estes fatores ($p = 0,559$).



Momento em relação ao DBS

Figura 18 – Gráfico referente a diferença entre as direções do teste de comportamento rotatório, em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 8 - Resultados referentes a diferença das direções no comportamento rotatório nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais

Grupos	Diferença entre direções / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	0,00±0,00	0,00±0,00
Salina+DBS(+)	0,00±0,00	-9,25±9,25
6-OHDA+DBS(-)	36,00±23,64	47,13±32,82
6-OHDA+DBS(+)	66,00±30,82	49,63±31,01

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

5.2.2 Voltas contralaterais

Os resultados referentes ao número de giros contralaterais, nos diferentes grupos e momentos de análise, estão apresentados na Tabela 9 e ilustrados na Figura 19.

Na avaliação dos dados referentes a quantidade de giros contralaterais (Tabela 9) houve efeito do grupo experimental (Anova de duas vias de medidas repetitivas $p=0,013$). O grupo lesionado e estimulado (6-OHDA+DBS(+)) apresentou maior numero de voltas contralaterais, quando comparado com o grupo sem lesão e sem eletroestimulação (Salina+DBS(-)) e com o grupo sem lesão e estimulado (Salina+DBS(+)) (Pós teste de Tukey $p<0,05$).

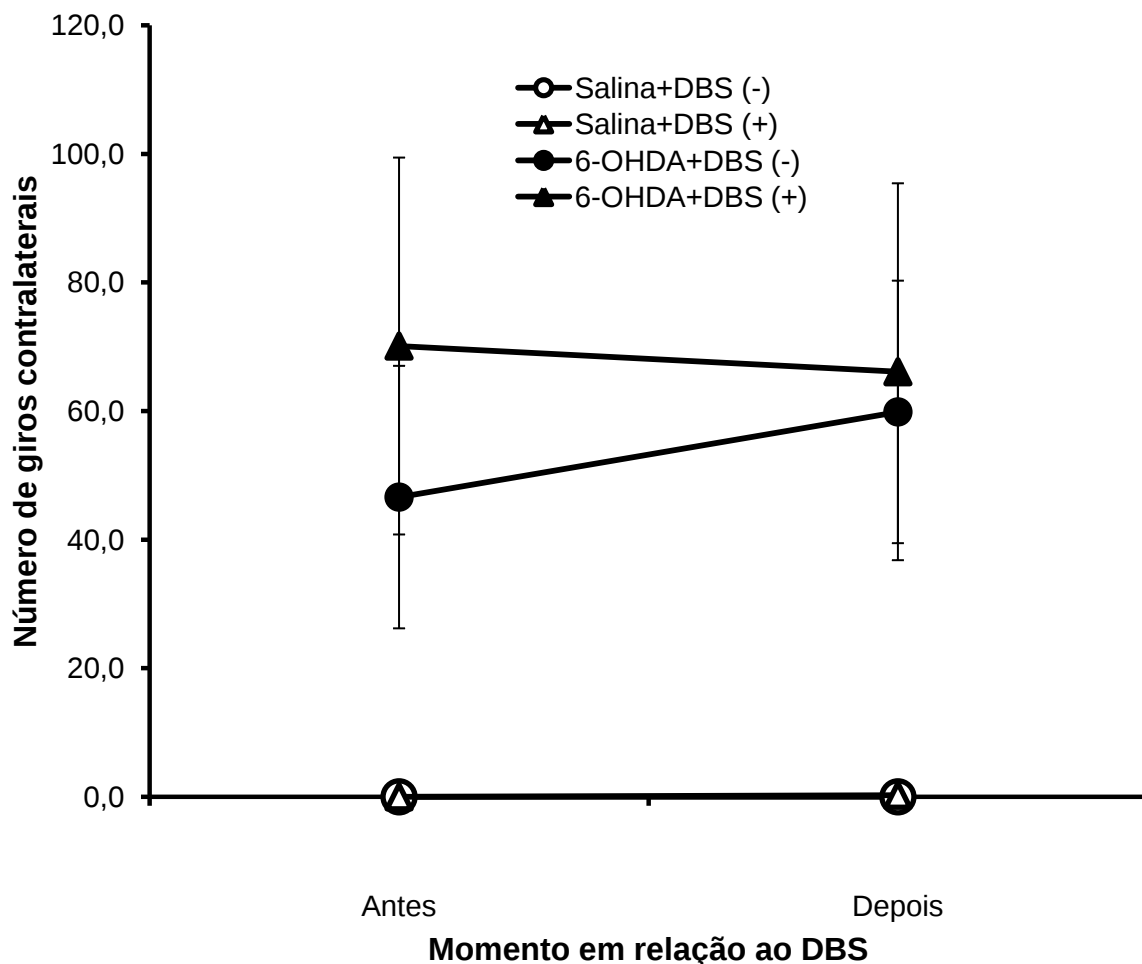


Figura 19 – Gráfico referente a diferença entre as direções do teste de comportamento rotatório, em cada momento da utilização do DBS.

Tabela 9 - Resultados referentes ao número de giros contralaterais nos momentos antes e depois em relação ao DBS, em cada um dos grupos experimentais

Grupos	Número de giros contralaterais / Momento	
	Antes	Depois
Salina+DBS(-)	0,00±0,00	0,00±0,00
Salina+DBS(+)	0,00±0,00	0,25±0,25
6-OHDA+DBS(-)	46,63±20,42	59,88±29,07
6-OHDA+DBS(+)	70,13±29,31	66,13±24,35

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão.

6.0 DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos que nosso modelo de lesão com 6-OHDA alterou o comportamento motor, quando comparando o grupo controle com o grupo lesionado. Observamos um aumento de giros contralaterais no teste do comportamento rotatório, bem como uma diminuição no número de autolimpeza dos grupos lesionados. Contudo, não observamos alteração do comportamento não motor em nenhum dos testes, quando comparados os grupos controles e lesionados.

Quando tratados, nenhum dos grupos eletroestimulados apresentou reversão das alterações motoras causadas pelo 6-OHDA. Ao observar os padrões no teste de campo aberto, tanto quanto aos parâmetros locomotores, como a resposta tigmotaxica, autolimpeza e número de bolos fecais e comportamento rotatório, nenhum desses apresentou reversão dos sintomas motores apresentados pelos animais.

No entanto, embora não tenhamos notado reversão de nenhum dos sintomas, foi observado um comportamento ansiolítico nos grupos tratados com DBS. No teste de campo aberto quanto a tigmotaxia foi observado uma diferença entre os animais estimulados no que se refere ao número de quadrantes percorridos no centro. Além disso, também foi observado uma diferença no tempo de autolimpeza e número de autolimpeza. Houve claramente um aumento de quadrantes percorridos no centro e diminuição do tempo e do número de autolimpeza.

A doença de Parkinson leva a uma perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta*, reduzindo assim a neurotransmissão de dopamina no estriado, principalmente no putâmen, e levando a sintomas motores, tais como rigidez, bradicinesia e tremor de repouso. Em estágios mais avançados da doença podem ocorrer distúrbios cognitivos e psiquiátricos (NELSON; KREITZER, 2014). Sendo assim, neste estudo nos propusemos avaliar o efeito da estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico, no comportamento motor e não motor de camundongos suíços, após lesão unilateral do feixe prosencefálico medial com 6-OHDA, como modelo animal da doença de Parkinson.

Quando as lesões são induzidas por injeção de 6-hidroxidopamina em camundongos, esta imita a patologia axonal que ocorre em pacientes com DP humanos, levando a degeneração axonal retrógrado, seguida por perda neuronal da substância negra compacta (TATENHORST, 2014). A toxicidade de 6-OHDA parece estar relacionada com a sua capacidade de produzir radicais livres e causar stress oxidativo, o que pode levar à indução de inflamação e finalmente, a morte celular (SHOBANA et al., 2012).

Em nosso trabalho observamos uma diferença motora entre os grupos controle e lesionado no teste de comportamento rotatório. Quando avaliado o teste de campo aberto, não percebemos diferença significativa. Contudo, é perceptível uma redução no número de autolimpeza dos animais do grupo lesionado (6-OHDA). Esse achado corrobora com o encontrado por Rauch (2010), o qual também não encontrou diferença significativa no teste do campo aberto entre o grupo lesionado com o grupo sem lesão. Contudo, o mesmo estudo observou sinais de bradicinesia nos animais lesionados, o que poderia explicar a diminuição do número de autolimpeszas encontrado em nosso estudo.

Como forma de avaliar a lesão apresentada pelos animais, elegemos a apomorfina como indutora do comportamento rotatório. A apomorfina é um agonista de receptor de DA, que quando utilizada em doses baixas faz com que os animais apresentem comportamento rotatório contralateral, pois estimulam tanto os receptores D1 quanto D2, preferencialmente do lado desnervado (CREESE, 1977). O comportamento rotatório para o lado contralateral surge devido ao aumento da estimulação dos receptores dopaminérgicos supersensibilizados no estriado desnervado (TATENHORST, 2014).

Na avaliação motora, por meio do teste de comportamento rotatório, observamos um aumento no número de giros contralaterais dos grupos lesionados com 6-OHDA em relação aos grupos não lesionados. Este dado comunga com os achados de Wu e colaboradores (2012) que observaram o mesmo comportamento após lesão com 6-OHDA no feixe prosencefálico medial, o mesmo que usamos como via para lesão da substância negra.

Vários estudos vem demonstrando a eficácia da eletroestimulação cerebral profunda em modelos animais de várias doenças motoras e não motoras (HOLTZHEIMER, 2012; HAMANI, 2012; LOZANO, 2012; BENABID). Dentre os núcleos estudados observamos o núcleo subtalâmico como importante núcleo de

estimulação para tratamento da doença de Parkinson e tremor essencial (TOFT, 2011).

Em nosso trabalho não observamos reversão dos efeitos motores em nenhum dos grupos tratados. WU e colaboradores (2012) avaliaram o comportamento rotatório de animais que receberam estimulação elétrica no núcleo subtalâmico no dia seguinte após a cirurgia, os animais foram avaliados quanto ao comportamento rotatório em 3 dias, uma semana e duas semanas após a cirurgia. Embora tenham observado uma diferença do número de giros contralaterais entre os grupos lesionados e não lesionados, já na primeira semana, só foi possível observar uma diferença entre o grupo estimulado em comparação com o grupo modelo de DP na segunda semana. O que pode sugerir que o tempo de eletroestimulação proposta por nosso protocolo não tenha sido o suficientemente sensível para observarmos mudanças no comportamento dos animais.

No entanto, no mesmo teste de campo aberto, observamos em nosso trabalho uma diferença significativa no que se refere a exploração vertical (número de erguimentos). O grupo eletroestimulado sem lesão (salina+DBS(+)) apresentou maior número de erguimentos quando comparado com os demais grupos, e quando comparado com ele mesmo em outro momento.

Esse resultado está em concordância com os achados por Tai (2012), que ressalta ainda a importância de se observar o aumento da exploração vertical em especial do grupo não lesionado, pois comprovaria a relevância do núcleo estimulado, como tendo um papel decisivo nas anormalidades eletrofisiológicas da patogênese sintomático da doença de Parkinson. Afinal é sabido que uma importante gama dos sintomas da Doença de Parkinson, parecem ser causadas pela redução da ativação do córtex motor primário, córtex pré motor e área motora suplementar, advinda da hiperatividade do globo pálido interno (GPI) / substância negra pars reticulada (SNr), o que levaria a uma descarga excitatória excessiva do núcleo subtalâmico (TAI, 2012; POLLAK 1997).

Estudos vêm demonstrando que cerca de 60% das pessoas com DP apresentam também sintomas não motores, tais como distúrbios psiquiátricos e cerca de 40% deles apresentam transtornos de ansiedade e/ou depressão (BRANCHI et al, 2010). A estimulação cerebral profunda (DBS) vem sendo investigada como uma terapêutica potencial para o tratamento de depressão (HOLTZHEIMER et al., 2012; KENNEDY et al., 2011; LOZANO et al., 2012). Dessa

forma, em nosso estudo decidimos realizar o teste de campo aberto utilizando o parâmetro de tigmotaxia, autolimpeza e número de bolos fecais que estaria relacionado com a ansiedade apresentada durante o teste do campo aberto (CHOLERIS et al., 2001).

Há poucos estudos demonstrando efeitos comportamentais do DBS em camundongos, em especial no que se refere a comportamentos não motores. Isso se deve ao tamanho reduzido do animal, espessura do crânio muito fino e delicado, aversão ao manuseio, alta ansiedade, fazendo com que todo o processo desde o implante até o manuseio para a eletroestimulação seja um verdadeiro desafio (HALPERN, 2013).

No que se refere ao comportamento não motor, identificamos recentemente estudos demonstrando o potencial ansiolítico do DBS (FAGGINI, 2015; VEERAKUMAR et al, 2014). Dournes e colaboradores (2013) demonstraram por meio de testes comportamentais que a eletroestimulação do córtex cingulado pode atenuar vários aspectos do comportamento depressivo, sugerindo ainda que esta abordagem pode representar uma alternativa válida para o tratamento de pacientes com depressão e ansiedade, resistentes aos medicamentos.

Em nosso estudo observamos um aumento de quadrantes percorridos no centro do campo aberto, aumento do número de elevações e diminuição do tempo e do número de autolimpeza nos grupos eletroestimulados. Esses comportamentos expressão uma competência ansiolítica do DBS. Faggiani e colaboradores (2015) demonstraram um possível efeito ansiolítico em ratos ao demonstraram a partir de um modelo animal com lesão bilateral de 6- OHDA, um aumento de permanência do animal nos braços abertos do labirinto em cruz o que indicaria uma melhora da ansiedade. Esse estudo corrobora com nossos achados já que o mesmo trabalho também eletroestimulou o núcleo subtalâmico.

Assim, sugere-se a realização de novos estudos para elucidar as questões remanescentes, tais como o efeito modulador do comportamento motor e não motor do núcleo subtalâmico, além de novos parâmetros e protocolos de estimulação, que sejam mais adequados para o tratamento da doença de Parkinson, capazes de modular tanto o comportamento motor quanto o não motor.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados observados neste estudo levam às seguintes conclusões:

- Neste estudo, observamos que nosso modelo de lesão da doença de Parkinson com 6-OHDA, foi efetivo, pois alterou o comportamento motor dos animais lesionados.
- Quando tratado o grupo eletroestimulado, não apresentou reversão das alterações motoras causadas pelo 6-OHDA.
- Embora não tenhamos notado reversão de nenhum dos sintomas motores, observamos um comportamento ansiolítico nos grupos tratados com DBS no núcleo subtalâmico.
- A resposta ansiolítica encontrada nos grupos tratados com DBS sugere que a mesma pode ter sua origem no reequilíbrio da ativação do núcleo subtalâmico. A modulação da atividade do mesmo núcleo por meio do DBS pode ter um potencial terapêutico importante no tratamento da doença de Parkinson no que se refere a distúrbios não motores.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENABID, A. L. et al. Functional neurosurgery for movement disorders: a historical perspective. **Prog Brain Res**, v. 175, p. 379-91, 2009.

BRANCHI, I. et al. Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 137-43, Mar 17 2010.

BROTCHIE, J. M. Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 13, n. 6, p. 871-6, Nov 1998.

CHANG, J. Y. et al. Studies of the neural mechanisms of deep brain stimulation in rodent models of Parkinson's disease. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 3, p. 352-66, 2008.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 235-60, May 2001.

CREESE, I.; BURT, D. R.; SNYDER, S. H. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. **Science**, v. 197, n. 4303, p. 596-8, Aug 5 1977.

DOURNES, C. et al. Deep brain stimulation in treatment-resistant depression in mice: comparison with the CRF1 antagonist, SSR125543. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 40, p. 213-20, Jan 10 2013.

EKMAN, L. L. **Neurociência: fundamentos para a reabilitação**. Guanabara Koogan S.A. 2000. Rio de Janeiro, R. J.

FAN, H. Y. Proliferation of external globus pallidus-subthalamic nucleus synapses following degeneration of midbrain dopamine neurons. **J Neurosci**, v.40, p. 1-7, 2012.

FAGGIANI, E.; DELAVILLE, C.; BENAZZOUZ, A. The combined depletion of monoamines alters the effectiveness of subthalamic deep brain stimulation. **Neurobiol Dis**, v. 82, p. 342-8, Oct 2015.

FANG, X. et al. Improvements in motor behavioral tests during deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats with different degrees of unilateral parkinsonism. **Brain Res**, v. 1120, n. 1, p. 202-10, Nov 20 2006.

FANG, X. et al. The different performance among motor tasks during the increasing current intensity of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in rats with different degrees of the unilateral striatal lesion. **Neurosci Lett**, v. 480, n. 1, p. 64-8, Aug 9 2010.

FONTANA, L. et al. Ginkgo biloba leaf extract (EGb 761) enhances catalepsy induced by haloperidol and L-nitroarginine in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 11, p. 1649-54, Nov 2005.

FRIEDMAN, A. et al. Programmed acute electrical stimulation of ventral tegmental area alleviates depressive-like behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 4, p. 1057-66, Mar 2009.

GOMES, M. Z.; DEL BEL, E. A. Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. **Brain Res Bull**, v. 62, n. 2, p. 107-15, Dec 15 2003.

HALPERN, C. H. et al. A step-wise approach to deep brain stimulation in mice. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 156, n. 8, p. 1515-21, Aug 2014.

HAMANI, C.; TEMEL, Y. Deep brain stimulation for psychiatric disease: contributions and validity of animal models. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 142, p. 142rv8, Jul 11 2012.

HASSANI, O.K.; MOUROUX, M.; FINGER, J. Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. **Neuroscience**, v. 72, n. 1, p. 105-115, 1996.

HOMBERG, J. R. et al. Fluoxetine exerts age-dependent effects on behavior and amygdala neuroplasticity in the rat. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16646, 2011.

HOLTZHEIMER, P. E. et al. Subcallosal cingulate deep brain stimulation for treatment-resistant unipolar and bipolar depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 69, n. 2, p. 150-8, Feb 2012.

IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 1-10, Jul 1 2005.

JENNER, P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology**, v. 61, n. 11 Suppl 6, p. S32-S38, Dec. 2003.

JENNER, P. Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. **J Neurol**, v. 247 Suppl 2, p. II43-50, Apr 2000.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. 5th ed., New York City, McGraw-Hill Medical, 2014.

KENNEDY, S. H. et al. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression: follow-up after 3 to 6 years. **Am J Psychiatry**, v. 168, n. 5, p. 502-10, May 2011.

LOZANO, A. M. et al. A multicenter pilot study of subcallosal cingulate area deep brain stimulation for treatment-resistant depression. **J Neurosurg**, v. 116, n. 2, p. 315-22, Feb 2012.

NELSON, A. B.; KREITZER, A. C. Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. **Annu Rev Neurosci**, v. 37, p. 117-35, 2014.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates Compact**. 3th ed., Salt Lake City, Academic Press, 2008, 256 p.

PLENZ, D.; KITAI, S. T. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. **Letters to nature**, v.400, p. 677-82, 1999.

POLLAK P.; BENABID A.L.; Limousin P.; Benazzouz A. The basal ganglia and new surgical approaches for Parkinson's disease. **Adv Neurol** 1997;74:213-220.

RAUCH, F.; SCHWABE, K.; KRAUSS, J. K. Effect of deep brain stimulation in the pedunculopontine nucleus on motor function in the rat 6-hydroxydopamine Parkinson model. **Behav Brain Res**, v. 210, n. 1, p. 46-53, Jun 26 2010.

SHOBANA, C.; KUMAR, R. R.; SUMATHI, T. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 7, p. 1099-112, Oct 2012.

SHOOK, B. C. et al. In vivo characterization of a dual adenosine A2A/A1 receptor antagonist in animal models of Parkinson's disease. **J Med Chem**, v. 53, n. 22, p. 8104-15, Nov 25 2010.

TAI, C. H. et al. Subthalamic discharges as a causal determinant of parkinsonian motor deficits. **Ann Neurol**, v. 72, n. 3, p. 464-76, Sep 2012.

TATENHORST, L. et al. Rho kinase inhibition by fasudil in the striatal 6-hydroxydopamine lesion mouse model of Parkinson disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 73, n. 8, p. 770-9, Aug 2014.

TOFT, M. et al. Long-term efficacy and mortality in Parkinson's disease patients treated with subthalamic stimulation. **Mov Disord**, v. 26, n. 10, p. 1931-4, Aug 15 2011.

TORIUMI, H. et al. Treatment of Parkinson's disease model mice with allogeneic embryonic stem cells: necessity of immunosuppressive treatment for sustained improvement. **Neurol Res**, v. 31, n. 3, p. 220-7, Apr 2009.

VEERAKUMAR, A. et al. Antidepressant-like effects of cortical deep brain stimulation coincide with pro-neuroplastic adaptations of serotonin systems. **Biol Psychiatry**, v. 76, n. 3, p. 203-12, Aug 1 2014.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, May 1976.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **J Comp Physiol Psychol**, v. 63, n. 3, p. 500-4, Jun 1967.

WU, S. T. et al. Effect of deep brain stimulation on substantia nigra neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Chin Med J (Engl)**, v. 125, n. 22, p. 4072-5, Nov 2012.

YOUNG, C. K. et al. Deep brain stimulation of the posterior hypothalamic nucleus reverses akinesia in bilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience**, v. 162, n. 1, p. 1-4, Aug 4 2009.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 299 do Pesquisador Albert Schiaveto de Souza, **“Efeito da estimulação cerebral profunda (DBS) no comportamento de camundongos, após lesão bilateral do feixe prosencefálico medial com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), como modelo animal da doença de Parkinson”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS**, em reunião de 14 de abril de 2011.

Campo Grande (MS), 14 de abril de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is written over the printed name.

Coordenadora da CEUA