

MIGUEL CESAR MERINO RUIZ

**ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA PRECOCE NO MODELO DA DOENÇA
DE PARKINSON INDUZIDA PELA INFUSÃO INTRAESTRIATAL DE 6-
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

BRASÍLIA

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MIGUEL CESAR MERINO RUIZ

**ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA PRECOCE NO MODELO DA DOENÇA
DE PARKINSON INDUZIDA PELA INFUSÃO INTRAESTRIATAL DE 6-
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.

Orientadora: Márcia Renata Mortari
Coorientador: Jair Trapé Goulart

BRASÍLIA

2024

MIGUEL CESAR MERINO RUIZ

**ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA PRECOCE NO MODELO DA DOENÇA
DE PARKINSON INDUZIDA PELA INFUSÃO INTRAESTRIATAL DE 6-
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde, pelo Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.

APROVADO EM ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Márcia Renata Mortari: Presidente.

Universidade de Brasília

Prof. Dra. Alessandra Mussi Ribeiro: Membro.

Universidade Federal de São Paulo

Dra. Pérola de Oliveira: Membro.

Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

Prof. Dr. Gabriel Avohay Alves Campos: Membro.

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Andreia Biolchi Mayer: Membro suplente.

Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus Trino, pelas suas constantes amostras de amor, compaixão e generosidade.

Aos meus pais, Edgardo e Nella, pela vida, pela fé e pelo suporte.

À minha esposa, Fernanda, pelo amor, pela fé, pela paciência e pelo apoio constante e corajoso.

Aos meus filhos, Miguel e Inês, pela sua generosidade e pela paciência.

À minha orientadora, profa. Dra. Márcia Mortari e ao meu coorientador, prof. Dr. Jair Goulart, pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório, pela ajuda eficaz e pelo suporte.

Às estagiárias, Gabriely Penha e Ingrid Araújo, pelo apoio.

Ao Dr. Danilo Gustavo Rodrigues de Oliveira, pela ajuda no processamento do material histológico.

À Dra. Heveline Becker de Moura Brito, Dra. Andreia Portilho de Brito Pinto e Dr. Júlio Salgado Antunes, do serviço de Patologia Cirúrgica da Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação - Sede Brasília, pelo apoio e ajuda com o uso do equipamento da Instituição para a realização das microfotografias desta tese.

À bibliotecária Izabel Martins Silva, da Biblioteca da Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação - Sede Brasília, pelo apoio e ajuda com a confecção das referências bibliográficas desta tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Brasil, 2018).

“A força não provém da capacidade física, mas sim de uma vontade indomável”
(Gandhi, 1942).

RESUMO

A estimulação cerebral profunda de núcleos cerebrais, ou DBS na sua sigla em inglês (*Deep Brain Stimulation*), é uma estratégia terapêutica sintomática eficaz para o tratamento da Doença de Parkinson (DP). Diferentemente dos resultados obtidos em seres humanos, há evidências de neuroproteção mediada pela DBS nos roedores, nos quais foi induzido parkinsonismo de forma experimental. Essas evidências derivam de protocolos realizados fora da fase aguda da indução experimental da doença. O estudo aqui apresentado tem como objetivo investigar respostas motoras e de neuroproteção induzidas pela DBS na fase aguda da indução de parkinsonismo, pela injeção intraestriatal da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), em camundongos. Para tanto, foram definidos três grupos experimentais: o primeiro (6-OHDA+DBS) recebeu uma lesão nigroestriatal à esquerda e a implantação de um eletrodo intracerebral ipsilateral ativado de DBS, para neuromodular o Núcleo Subtalâmico (NST) (n=6); o segundo (6-OHDA) foi submetido ao mesmo procedimento, mas o eletrodo permaneceu inativo (n=8) e o terceiro (*Naive*) foi um grupo sem lesão ou qualquer estímulo (n=5). As intervenções ocorreram no dia zero (D0). Nos quatro dias subsequentes (D1 a D4), foram conduzidas avaliações comportamentais nos três grupos, assim como a aferição da resistência elétrica do sistema encéfalo-eletrodo no grupo 6-OHDA+DBS. A massa corporal dos animais foi aferida do D0 ao D4 e no D7, antes da eutanásia. Realizou-se também um estudo imuno-histoquímico com marcação da Tirosina Hidroxilase (TH) na *Substantia Nigra* (SN) e do estriado, para quantificar a diferença no número de neurônios dopaminérgicos nigrais, assim como a densidade dos terminais dopaminérgicos estriatais entre o lado lesionado e o lado intacto. Identificou-se um ganho de massa corporal, um efeito motor favorável, uma redução da perda de terminações dopaminérgicas estriatais e um efeito neuroprotetor, tanto globalmente quanto compartimentalizado, na SN de camundongos que receberam quatro dias de DBS, em comparação com aqueles que não a receberam. O dispositivo de estimulação cerebral profunda desenvolvido mostrou eficácia, baixo custo, estrutura favorável ao ancoramento no crânio e dimensões adequadas ao encéfalo de camundongos. Na atual busca pelo diagnóstico e tratamento da DP em estágios pré motores da doença, os achados contribuem para enriquecer a discussão sobre estratégias terapêuticas neuroprotetoras, sugerindo a neuromodulação invasiva como uma ferramenta terapêutica potencialmente útil, dentro de um contexto apropriado.

Palavras-chave: Neuroproteção; Estimulação cerebral profunda; Doença de Parkinson; 6-OHDA; Roedores.

SUMMARY

Deep brain stimulation (DBS) of brain nuclei is an effective symptomatic therapeutic strategy for the treatment of Parkinson's disease (PD). Unlike in humans, there is evidence of DBS-mediated neuroprotection in rodents in which parkinsonism was experimentally induced in protocols conducted outside the acute phase of experimental disease induction. This study aims to investigate motor responses and neuroprotection resulting from DBS in the acute phase of parkinsonism induction through intrastriatal injection of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in mice. Three experimental groups were defined: the 6-OHDA+DBS group, which received a left nigrostriatal lesion and the implantation of an activated ipsilateral intracerebral DBS electrode to neuromodulate the Subthalamic Nucleus (STN) (n=6); the 6-OHDA group, which underwent the same procedure, but the electrode remained inactive (n=8); and the Naive group, with no interventions (n=5). The experimental protocol occurred on day zero (D0). During the initial four days following the procedures (D1 to D4), behavioral assessments were conducted across the three groups, alongside measurement of the electrical resistance of the brain-electrode system in the 6-OHDA+DBS group. The animals' body mass was measured from D0 to D4 and on D7, immediately before euthanasia. Additionally, the groups underwent an immunohistochemical study using Tyrosine Hydroxylase (TH) staining on sections of the Substantia Nigra (SN) and striatum to quantify differences in the number of nigral dopaminergic neurons and the density of dopaminergic terminals in the striatum between the lesioned and intact sides. Despite the animals' poor clinical condition during the acute phase of parkinsonism induction, those that underwent four days of DBS showed an increase in body mass, favorable motor effects, a reduction in the loss of striatal dopaminergic terminals, and both global and compartmentalized neuroprotective effects in the SN compared to those that did not. The deep brain stimulation device developed for this study was cost-effective, with a suitable design for cranial anchoring and dimensions appropriate for the mouse brain. In the current pursuit of diagnosing and treating PD in pre-motor stages, these findings contribute to enriching the discussion on neuroprotective therapeutic strategies, suggesting invasive neuromodulation as a potentially useful therapeutic tool within an appropriate context.

Keywords: Neuroprotection; Deep Brain Stimulation; Parkinson's disease; Rodent; 6-OHDA.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| 6-OHDA | 6-Hidroxi dopamina |
| °C | Graus centígrados |
| A | Ampere |
| CL | Corpúsculos de Lewy |
| cm | Centímetro |
| CONCEA | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal |
| COX-2 | Ciclooxigenase – 2 |
| D0 | Dia do procedimento cirúrgico, ou dia zero |
| D1 | Primeiro dia |
| D2 | Segundo dia |
| D3 | Terceiro dia |
| D4 | Quarto dia |
| D7 | Sétimo dia |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro |
| DBS | Estimulação cerebral profunda, na sua sigla em inglês (<i>Deep Brain Stimulation</i>) |
| DCSREM | Distúrbio comportamental do dono REM |
| DO | Densidade óptica |
| DP | Doença de Parkinson |
| Gpi | Globo pálido interno |
| GWAS | Estudo de Associação Ampla de Genoma (<i>Genome-Wide Association Study</i>) |
| Hz | Hertz |
| L-DOPA | Levodopa |
| M | Molar |
| MAO - B | Monoamino oxidase B. |
| MDS | Sociedade dos Distúrbios de Movimento (<i>Movement Disorders Society</i>) |
| MDS - UPDRS | Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson da Sociedade dos Distúrbios de Movimento (<i>Movement Disorders Society – Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>) |
| mA | Miliampere |
| ml | Mililitro |

| | |
|---------------|---|
| mm | Milímetro |
| ms | Milissegundos |
| mV | Milivolts |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| MPPP | 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina |
| nM | Nanomoles |
| NMT | Núcleo Medial Terminal do Trato Óptico Acessório |
| NST | Núcleo Subtalâmico |
| Ω | Ohms |
| PAP | Complexo Peroxidase – Anti-Peroxidase |
| PBS | Tampão salino tamponado com fosfato. |
| PBST | Tampão salino tamponado com fosfato associado ao tensoativo hidrofílico Tween – 20 |
| RGB | Microfotografias coloridas, contendo as cores primárias vermelho, verde e azul (<i>Red, Green and Blue</i>) |
| Rpm | Revoluções por minuto |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| S | Segundos |
| SEM | Erro padrão da média |
| SN | <i>Substantia Nigra</i> |
| SNpr | <i>Substantia Nigra pars reticulata</i> |
| SNpc | <i>Substantia Nigra pars compacta</i> |
| STN | Núcleo Subtalâmico, na sua sigla em inglês (<i>Subthalamic Nucleus</i>) |
| TH | Tirosina Hidroxilase. |
| TH+ | Marcação positiva para a enzima Tirosina Hidroxilase. |
| NST | Núcleo subtalâmico. |
| μm | Micrômetro |
| μA | Microampere |
| μL | Microlitro |
| μs | Microsssegundos |
| V | Volts |
| VTA | Área Tegmental Ventral, nas suas siglas em inglês (<i>Ventral Tegmental Area</i>). |
| ZI | Zona Incerta |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 -Fatores de risco associados à DP. Modificado de Tsalenchuk; Gentleman; Marzi (2023)..... | 33 |
| Figura 2 - Esquema do dispositivo de estimulação cerebral, com uma visão aumentada do eletrodo desenvolvido com agulha 26G e, dentro dele, fio de platina/irídio isolado. | 49 |
| Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados na pesquisa - a) Grupo 6-OHDA + DBS, b) Grupo 6-OHDA e c) Naive | 53 |
| Figura 4 - Cirurgia estereotáxica para a infusão de 6-OHDA e fixação de parafuso no lado contralateral | 58 |
| Figura 5 - Esquema do circuito de verificação da resistência (R2) do sistema, assim como a definição da voltagem (i) necessária para entregar a amperagem definida..... | 59 |
| Figura 6 - a) Camundongo fazendo contato na parede do cilindro com a pata esquerda. b) com a pata direita e c) com as duas patas | 65 |
| Figura 7 - Coloração de Nissl mostrando posição do eletrodo: a) no aumento 4X e b) no aumento 10X. NST: Núcleo subtalâmico. O círculo vermelho representa o campo elétrico induzido pelo eletrodo, de 250 µm de rádio | 65 |
| Figura 8 - Representação esquemática da reação imuno-histoquímica - Complexo Peroxidase – Anti Peroxidase para a detecção de TH. Adaptada de Katikireddy e O’Sullivan (2011)..... | 66 |
| Figura 9 - Identificação e divisão da SNpc: a) quando o NMT é identificado e b), quando não foi identificado, recorreu-se à identificação do pedúnculo cerebral..... | 69 |
| Figura 10 - Processamento de imagens. À esquerda, duas imagens do mesmo setor da SNpc, com foco discretamente diferente. À direita, o processamento das imagens, sendo colocadas uma ao lado da outra, transformada numa escala de cinzas e colocada uma grade para facilitar o processo de contagem de neurônios | 70 |
| Figura 11 - Células TH+, compatíveis com neurônios dopaminérgicos | 70 |
| Figura 12 - Processo de reconhecimento neuronal: a) Reconhecimento positivo; b) Reconhecimento negativo | 71 |
| Figura 13 - Corte coronal na coordenada antero-posterior +0,5 mm em relação à linha do bregma (Paxinos; Franklin, 2019) que mostra a divisão do estriado do camundongo, representado em cor verde, realizada para definir o local de onde foram obtidas as microfotografias a serem processadas para avaliação da DO da marcação TH+ | 72 |

| | |
|--|----|
| Figura 14 - Eletrodo em 3D: a) na perspectiva supero lateral direita (b) lateral esquerda e c) e supero lateral esquerda | 76 |
| Figura 15 - Vista lateral do dispositivo de estimulação cerebral profunda, mostrando a) o eletrodo, b) o conector e c) o circuito impresso | 76 |
| Figura 16 - Vista superior do dispositivo de estimulação cerebral profunda, mostrando o segmento A (azul) contendo os componentes do eletrodo e o segmento B (vermelho), contendo os pinos conectores que receberão os conectores provenientes do estimulador elétrico..... | 79 |
| Figura 17 - Vista lateral do dispositivo de estimulação cerebral profunda, mostrando a face ventral (amarela), voltada ao crânio do animal, que recebeu a agulha 26G romba e a face dorsal (verde), voltada para o conector fêmea proveniente do estimulador elétrico, que recebeu o local de fixação do fio de platina e irídio, assim como os pinos conectores positivo e negativo | 79 |
| Figura 18 - Esquema sagital mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos foram localadas, com o campo elétrico provocado por elas, nos animais do grupo 6-OHDA + DBS. Modificado de Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b)..... | 81 |
| Figura 19 - Cortes coronais mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos foram localadas, com o campo elétrico provocado por elas, nos animais do grupo 6-OHDA + DBS. O corte a) corresponde à coordenada anteroposterior -1,94 mm em relação à linha do bregma, o b), à coordenada -2,06 mm, o c), à coordenada -2,18 mm, o d), à coordenada -2,3 mm e o e) à coordenada -2,46 mm. Modificado de Paxinos e Franklin (2019) e Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b) | 81 |
| Figura 20 - Esquema sagital mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos, representadas pela cor amarela, foram localadas nos animais do grupo 6-OHDA. Modificado de Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b)..... | 83 |
| Figura 21 - Cortes coronais mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos, representadas pela cor amarela, foram localadas nos animais do grupo 6-OHDA. O corte a) corresponde à coordenada anteroposterior -2,3 mm em relação à linha do bregma e o b) à coordenada -2,46mm. Modificado de Paxinos e Franklin (2019) e Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b)..... | 84 |
| Figura 22 - Comportamento da resistência em kOhms (kΩ), em função do tempo..... | 85 |
| Figura 23 - Mudança da massa corporal, medida em gramas, no decorrer do tempo - ANOVA de Duas Vias..... | 86 |
| Figura 24 - a) Tempo de permanência no Rotarod dos grupos 6-OHDA + DBS e Naive. Teste t de student. *** p<0.001. b) Tempo de permanência no Rotarod dos grupos 6-OHDAe Naive. Teste de Mann - Withney. ** p<0.01 | 88 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25 - Tempo de permanência no Rotarod dos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA. Teste de Mann - Withney | 88 |
| Figura 26 - Coeficiente de assimetria dos três grupos - ANOVA de duas vias | 89 |
| Figura 27 - IPM – Análise por dias | 90 |
| Figura 28 - IPM – Valores totais. | 91 |
| Figura 29 - Número de células TH+ contabilizadas nas microfotografias na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6-OHDA + DBS SN D), na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6-OHDA + DBS SN E), na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6-OHDA SN D) e na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6-OHDA SN E) - ANOVA de Uma Via com correção de Welch | 92 |
| Figura 30 - Número de células TH+ contabilizadas no grupo 6OHDA + DBS, tanto à direita (6OHDA + DBS SN D) como à esquerda (6-OHDA+DBS SN E) - Teste t de student pareado | 94 |
| Figura 31 - Número de células TH+ contabilizadas no grupo 6OHDA, tanto à direita (6OHDA SN D) como à esquerda (6-OHD SN E) - Teste t de student pareado..... | 94 |
| Figura 32 - Número de células TH+ contabilizadas na SNpc do grupo 6OHDA + DBS, à esquerda (6OHDA+DBS SN), e as contabilizadas na SNpc do grupo 6-OHDA à esquerda (6-OHDA SN E) - Teste t de student com correção de Welch | 96 |
| Figura 33 - Número de neurônios da região medial, central e lateral, da SNpc direita do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA+DBS SN D), da SNpc esquerda do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA+DBS SN E), da SNpc direita do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e da SNpc esquerda do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e da SNpc esquerda do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Duas Vias | 98 |
| Figura 34 - DO do estriado direito do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS D), do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS E), do estriado direito do grupo 6-OHDA (6OHDA D) e do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA (6OHDA E) - ANOVA de Uma Via. | 99 |
| Figura 35 - DO do estriado direito do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS D) e do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS E) - Teste t de Student pareado | 100 |
| Figura 36 - DO do estriado direito do grupo 6-OHDA (6OHDA D) e do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA (6OHDA E) - Teste t de student pareado | 100 |
| Figura 37 - DO E/D - Teste t de student..... | 101 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Coeficiente de assimetria (Woodlee <i>et al.</i> , 2008) | 60 |
| Quadro 2 - Índice de Preservação da Motricidade (IPM)..... | 61 |
| Quadro 3 - DO dos valores aferidos no estriado esquerdo, e divididos pelos do estriado direito (DO E/D) | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Critérios de exclusão do diagnóstico de DP (Postuma <i>et al.</i> , 2015) | 20 |
| Tabela 2 - Critérios de suporte para o diagnóstico de DP (Postuma <i>et al.</i> , 2015)..... | 20 |
| Tabela 3 - Bandeiras vermelhas (<i>Red Flags</i>) no diagnóstico de DP (Postuma <i>et al.</i> , 2015).... | 21 |
| Tabela 4 - Sinais não motores (Zesiewicz, 2019)..... | 23 |
| Tabela 5 - Diferença percentual na massa corporal em relação ao tempo dos grupos 6-OHDA + DBS, 6-OHDA e Naive | 87 |
| Tabela 6 - Diferenças entre os números de células TH+ contabilizados nas microfotografias na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN D), na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN E), na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Uma Via com correção de Welch | 93 |
| Tabela 7 - Diferenças entre os números de células TH+ contabilizados nas microfotografias da região medial da SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN D), na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN E), na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Duas Via com correção de Geisser-Greenhouse | 97 |
| Tabela 8 - Valores dos Tamanhos de Efeito calculados para comparações entre os DO dos estriados direito e esquerdo dos Grupos 6-OHDA+DBS e 6-OHDA - g de Hedges | 99 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1. DEFINIÇÃO | 17 |
| 1.2. DIAGNÓSTICO | 17 |
| 1.3. DP PRÉ-MOTORA E NÃO MOTORA | 22 |
| 1.4. HISTÓRICO | 25 |
| 1.5. NEUROLOGIA DA DP..... | 26 |
| 1.6. ETIOLOGIA DA DP | 26 |
| 1.7. EPIDEMIOLOGIA DA DP..... | 30 |
| 1.7.1. FATORES GENÉTICOS..... | 31 |
| 1.7.2. FATORES AMBIENTAIS..... | 32 |
| 1.8. TRATAMENTO | 35 |
| 1.9. ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA (DBS)..... | 37 |
| 1.10. CONCEITOS BÁSICOS DE ELETRICIDADE, DBS E MODULAÇÃO CEREBRAL | 38 |
| 1.11. O MODELO ANIMAL DE DP E A DBS | 39 |
| 1.12. O MODELO DE DP EM ROEDORES | 41 |
| 1.12.1. O MODELO DE DP EM ROEDORES INDUZIDO PELA INFUSÃO INTRACEREBRAL DE 6-OHDA..... | 41 |
| 1.13. DBS NOS ROEDORES | 42 |
| 1.14. A NEUROPROTEÇÃO COMO TERAPIA PARA A DP | 44 |
| 1.15. O DIAGNÓSTICO “BIOLÓGICO” DA DP E A SUA RELAÇÃO COM A NEUROPROTEÇÃO | 46 |
| 2. OBJETIVOS..... | 48 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 48 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 48 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 3.1. O DISPOSITIVO DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA | 49 |
| 3.2. ANIMAIS..... | 51 |
| 3.3. INDUÇÃO DO MODELO DE HEMIPARKINSONISMO INDUZIDO PELA 6-OHDA | 55 |
| 3.3.1. ANESTESIA E FIXAÇÃO NO APARELHO ESTEREOTÁXICO..... | 55 |
| 3.3.2. ANTISSEPSIA E TRICOTOMIA | 55 |
| 3.3.3. ANESTESIA LOCAL..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.4. ASSEPSIA DO CRÂNIO | 55 |
| 3.3.5. CÁLCULO DAS COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS | 56 |
| 3.3.6. INFUSÃO DA SOLUÇÃO DE 6-OHDA..... | 56 |
| 3.4. IMPLANTAÇÃO DO ELETRODO DE DBS | 56 |
| 3.5. O PROCEDIMENTO DA DBS PRECOCE | 58 |
| 3.6. MASSA CORPORAL | 60 |
| 3.7. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS | 60 |
| 3.7.1. TESTE DE DESEMPENHO MOTOR - ROTAROD | 60 |
| 3.7.2. TESTE DO CILINDRO | 61 |
| 3.8. EUTANÁSIA | 63 |
| 3.9. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO..... | 63 |
| 3.9.1. COLORAÇÃO DE NISSL | 64 |
| 3.9.2. VERIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DO ELETRODO..... | 65 |
| 3.9.3. PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO | 65 |
| 3.10. PROCESSAMENTO DAS IMAGENS..... | 68 |
| 3.10.1. CONTAGEM DE CÉLULAS COM MARCAÇÃO POSITIVA PARA ENZIMA TH | 68 |
| 3.10.2. DENSIDADE ÓPTICA (DO) DA MARCAÇÃO TH NOS ESTRIADOS | 72 |
| 3.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 74 |
| 3.11.1. ANÁLISE DE DADOS PARAMÉTRICOS | 74 |
| 3.11.2. ANÁLISE DE DADOS NÃO PARAMÉTRICOS | 75 |
| | |
| 4. RESULTADOS | 76 |
| | |
| 4.1. DESENVOLVIMENTO DO DISPOSITIVO DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA | 76 |
| 4.1.1. PRIMEIRA FASE: CONFEÇÃO DO ELETRODO INTRACEREBRAL..... | 77 |
| 4.1.2. SEGUNDA FASE: CONECTORES | 77 |
| 4.1.2.1. <i>Adaptação ao estimulador elétrico</i> | <i>77</i> |
| 4.1.2.2. <i>Instalação dos conectores</i> | <i>77</i> |
| 4.1.2.3. <i>Fixação dos conectores.....</i> | <i>78</i> |
| 4.1.3. TERCEIRA FASE: CONFEÇÃO DA PLACA DE CIRCUITO IMPRESSA | 78 |
| 4.1.3.1. <i>DIVISÃO DA PLACA</i> | <i>78</i> |
| 4.1.3.2. <i>Estrutura da placa</i> | <i>79</i> |
| 4.1.3.3. <i>Interconexão dos componentes na placa</i> | <i>80</i> |
| 4.2. LOCAL DE IMPLANTAÇÃO DOS ELETRODOS INTRACEREBRAIS | 80 |
| 4.3. COMPORTAMENTO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA..... | 84 |
| 4.4. IMPACTO DA DBS NA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS | 85 |
| 4.5. IMPACTO DA DBS NO TESTE DE ROTAROD..... | 87 |

| | |
|--|------------|
| 4.6. IMPACTO DA DBS NO TESTE DE CILINDRO | 89 |
| 4.6.1. COEFICIENTE DE ASSIMETRIA | 89 |
| 4.6.2. ÍNDICE DE PRESERVAÇÃO DA MOTRICIDADE (IPM)..... | 90 |
| 4.7. IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 91 |
| 4.7.1. CONTAGEM DE CÉLULAS TH+ NA SNPC | 91 |
| 4.7.2. DO DAS FIBRAS NEURONAIS DOPAMINÉRGICAS ESTRIATAIS | 98 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO..... | 102 |
| | |
| 6. CONCLUSÃO..... | 118 |
| | |
| 7. DIFICULDADES VENCIDAS E PERSPECTIVAS FUTURAS | 119 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 121 |
| | |
| ANEXOS..... | 155 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. Definição

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa crônica do sistema nervoso central, que tem como marco neuropatológico a degeneração progressiva de neurônios da *Substantia Nigra* (SN) (Hasler, 1938), além da inclusão intracitoplasmática de α -sinucleína (Lewy, 1912). Essa degeneração resulta na diminuição das concentrações de dopamina nos núcleos da base, o que desencadeia os clássicos sinais parkinsonianos motores (Barbeau, 1961). É a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente, em seguida à doença de Alzheimer (Aamodt *et al.*, 2024).

Estima-se que na ocasião do início dos sinais motores, cerca de 50% dos neurônios dopaminérgicos já tenham sido perdidos (Fearnley; Lees, 1991; Marsden, 1990).

A causa exata da degeneração neuronal na DP ainda não é completamente compreendida, mas fatores genéticos e ambientais podem desempenhar um papel crucial no seu desenvolvimento (Jankovic; Tan, 2020).

1.2. Diagnóstico

O diagnóstico da Doença de Parkinson (DP) ainda é predominantemente clínico. Para o seu diagnóstico, os critérios do Banco de Cérebros de Londres (*UK Brain Bank criteria*), publicados em 1988 (Gibb; Lees, 1988), são atualmente os mais utilizados (Postuma *et al.*, 2015). Esses critérios serviram de base para o desenvolvimento e a publicação, em 2015, dos Critérios de Diagnóstico Clínico da Doença de Parkinson da MDS (MDS Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease) (Postuma *et al.*, 2015). A Sociedade dos Distúrbios de Movimento, ou MDS nas suas siglas sem inglês (*Movement Disorders Society*), é uma sociedade multidisciplinar com sede nos Estados Unidos da América, composta por médicos, cientistas e outros profissionais de saúde interessados no diagnóstico e tratamento de doenças que se manifestam clinicamente com movimentos anormais (INTERNATIONAL PARKINSON AND MOVEMENT DISORDER SOCIETY (MDS), 2024). Esses critérios revisados definem a presença de parkinsonismo clinicamente por meio da bradicinesia, associada a pelo menos uma das

seguintes variáveis clínicas: rigidez e tremor de repouso com frequência entre 4 e 6 Hertz (Hz).

A bradicinesia se define como o alentecimento do início do movimento voluntário com progressiva redução na velocidade e, quando esses movimentos são realizados de forma repetitiva, há também a redução da amplitude (Gibb; Lees, 1988). Os critérios diagnósticos da MDS sugerem, para a identificação e a quantificação da bradicinesia, o uso de manobras definidas previamente na parte III da Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson da Sociedade dos Distúrbios de Movimento ou nas suas siglas em inglês MDS – UPDRS (*Movement Disorders Society – Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) (Goetz *et al.*, 2008). Essa ferramenta clinimétrica é composta de quatro partes: Parte I (aspectos não motores da vida diária), Parte II (aspectos motores da vida diária), Parte III (avaliação motora) e Parte IV (complicações motoras) e é amplamente utilizada na prática clínica, assim como em pesquisa, para homogeneização da abordagem clínica dos pacientes portadores da DP (Goetz *et al.*, 2008). As manobras propostas são de bater os dedos das mãos, de abrir e fechar os dedos das mãos, de movimentos de prono supinação das mãos e a de bater os calcanhares e os pés (Postuma *et al.*, 2015).

O tremor de repouso é o sinal clínico mais característico da DP, presente em mais de 70% dos pacientes e afetando diferentes extremidades com gravidade variável, que acontece em uma frequência de 4-6 Hz (Sethi, 2002). O tremor de repouso em um segmento corporal ocorre quando esse segmento está relaxado ou fora da ação da gravidade e desaparece com ato motor voluntário (Pitágoras; Mattos, 1998). Somente a presença do tremor de repouso já é considerado para o diagnóstico da DP (Postuma *et al.*, 2015).

Em contrapartida, os tremores de ação acontecem com a contração voluntária dos músculos, podendo ser subdivididos em postural, cinético, de posição, de ação específica e isométricos (Pitágoras; Mattos, 1998). Os tremores de ação também fazem parte das manifestações clínicas da DP, porém não fazem parte dos critérios de diagnóstico da doença, segundo a MDS. Dentre os tremores de ação, o tremor postural re-emergente é o mais comum, sendo identificado em dois terços dos pacientes e considerado uma extensão do tremor de repouso, que reaparece após um curto período de latência (Dirkx *et al.*, 2018).

A rigidez é definida como o aumento contínuo e uniforme do tônus muscular, percebido como uma resistência constante nos movimentos passivos (Broussolle *et al.*, 2007). Na avaliação da rigidez, quando o avaliador movimentava as articulações dos

membros e da região cervical do paciente, identifica-se um aumento relativamente uniforme de tônus em todas as fases do movimento, o que levou a definir o fenômeno como rigidez em cano de chumbo. O tônus rígido é independente da velocidade em que a manobra é realizada e não está relacionada somente à dificuldade de relaxamento do paciente, a diferença da espasticidade ou da paratonia. Quando o tremor está presente e associado à rigidez, identifica-se um aumento de tônus que lembra a uma catraca, definido como rigidez em roda denteada (Fung; Thompson, 2007). Somente a rigidez em roda denteada sem o fenômeno de rigidez em cano de chumbo não permite definir a presença de rigidez parkinsoniana (Postuma *et al.*, 2015).

A instabilidade postural, ainda que não contemplada nos critérios de diagnóstico do parkinsonismo pela MDS, já foi previamente considerada como sinal cardinal da doença (Hughes *et al.*, 1992). É definida como a perturbação do equilíbrio que prejudica a capacidade do indivíduo de manter ou de alterar a sua postura ao levantar-se ou ao andar (Kim *et al.*, 2013). Ocorre geralmente nas fases mais avançadas da doença, não responde de forma adequada ao tratamento dopaminérgico e compromete muito a qualidade de vida do paciente (Bloem, 1992). Ao aparecer precocemente, pode sugerir outros diagnósticos (Köllensperger *et al.*, 2008).

Após a definição do parkinsonismo, visto que não somente a DP pode provocar esses sinais, os critérios diagnósticos permitem estabelecer o diagnóstico clínico da DP na ausência dos critérios de exclusão (Tabela 1), assim como a presença de pelo menos dois critérios de suporte (Tabela 2). Os critérios diagnósticos orientam também a ausência das chamadas bandeiras vermelhas (*Red flags*) (Tabela 3), frase derivada da língua inglesa e utilizada em sentido figurado, que sugere a presença de fatores que servem para despertar sinais de alerta que, no caso, possam sugerir a presença de diagnósticos alternativos.

Os critérios diagnósticos propostos pela MDS definem a DP clinicamente provável na ausência dos critérios absolutos de exclusão e da presença de bandeiras vermelhas contrabalançadas pelos critérios de suporte. Se houver uma bandeira vermelha, deve haver pelo menos um critério de suporte. Se houver duas bandeiras vermelhas, são necessários pelo menos dois critérios de suporte para contrabalançá-las. Porém, a presença de mais de duas bandeiras vermelhas inviabiliza o diagnóstico provável de DP.

Tabela 1 - Critérios de exclusão do diagnóstico de DP (Postuma *et al.*, 2015)

| Critérios de exclusão |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Anormalidades cerebelares claras, como marcha atáxica, ataxia de membros ou anormalidades oculomotoras cerebelares; 2. Alterações da motricidade ocular, como a paralisia supranuclear do olhar vertical para baixo ou lentidão seletiva das sacadas verticais para baixo; 3. Diagnóstico provável da variante comportamental da demência frontotemporal ou de afasia progressiva primária, dentro dos primeiros cinco anos do início dos sintomas; 4. Parkinsonismo restrito aos membros inferiores por mais de três anos; 5. Uso de agentes antidopaminérgicos em dose e tempo consistentes para induzir um parkinsonismo por drogas; 6. Ausência de resposta clínica visível a uma dose elevada de L-DOPA (>600mg/dia); 7. Perda sensorial cortical (agrafestesia, asterognosia com modalidades sensoriais primárias intactas), clara apraxia ideomotora de membros ou afasia progressiva; 8. Neuroimagem funcional do sistema dopaminérgico pré-sináptico sem alterações; 9. Documentação de alguma outra condição que possa provocar sinais parkinsonianos no paciente ou parecer de médico especialista, que, com base na avaliação diagnóstica completa, sugira tratar-se de uma síndrome outra mais provável que DP. |

Tabela 2 - Critérios de suporte para o diagnóstico de DP (Postuma *et al.*, 2015)

| Critérios de suporte: |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Clara e dramática resposta à terapia dopaminérgica, com retomada do desempenho motor de forma normal ou quase normal na fase inicial da doença. Na ausência de documentação clara da resposta inicial, uma resposta consistente pode ser classificada perante: <ol style="list-style-type: none"> a) Acentuada melhora no desempenho motor com o aumento da dose ou piora acentuada com a sua diminuição. A documentação da resposta motora poderá ser objetiva, com um aumento de 30% no MDS-UPDRS parte III decorrente da alteração no tratamento, ou subjetiva, por um histórico claramente documentado de alterações acentuadas de um paciente ou cuidador confiável; b) Flutuações motoras inequívocas associadas às mudanças no efeito da L-DOPA durante o dia, que incluam, em algum momento do dia, uma piora previsível no final da dose da medicação; |

2. Presença de discinesia induzida por L-DOPA;
3. Tremor em repouso de um membro, documentado no exame clínico;
4. A presença de perda olfativa ou identificação de desnervação simpática cardíaca na cintilografia com MIBG (metaiodobenzilguanidina), análogo da noradrenalina sem ação adrenérgica, utilizado nos pacientes com DP como marcador de receptores miocárdios de noradrenalina.

Tabela 3 - Bandeiras vermelhas (*Red Flags*) no diagnóstico de DP (Postuma *et al.*, 2015)

Bandeiras vermelhas (*Red Flags*):

1. Progressão rápida de dificuldades de marcha que demandem o uso regular de cadeira de rodas em até cinco anos após o início dos sintomas;
2. Ausência de progressão dos sintomas ou sinais motores da doença após cinco anos de início dos sintomas, a menos que essa estabilidade clínica seja decorrente do tratamento;
3. Disfunção bulbar precoce, com formas graves de disфонia, disartria (geralmente caracterizada por fala ininteligível) ou disfagia (exigindo alimentos macios, sonda nasogástrica ou gastrostomia), durante os primeiros cinco anos do início dos sintomas da doença;
4. Disfunção respiratória caracterizada por dificuldades na inspiração, como estridor inspiratório diurno, noturno, ou suspiros inspiratórios frequentes;
5. Disautonomia grave nos primeiros cinco anos de doença, evidenciada por:
 - a) Hipotensão ortostática - diminuição da pressão arterial (PA) dentro de três minutos após ficar em pé, de pelo menos 30 mm Hg de PA sistólica ou 15 mm Hg de PA diastólica, na ausência de desidratação, medicação ou outras doenças que possam explicar plausivelmente essa alteração;
 - b) Retenção urinária grave ou incontinência urinária nos primeiros cinco anos de doença (excluindo incontinência de urgência crônica de pequena quantidade em mulheres). Nos homens, a retenção urinária não deve ser atribuída a doença da próstata e deve estar associada a disfunção erétil.
6. Quedas recorrentes, numa frequência maior de que uma vez ao ano, em decorrência de prejuízo do equilíbrio, dentro de três anos do início dos sintomas;
7. Presença de anterocólis distônico ou contraturas das mãos ou pés nos primeiros 10 anos de doença;

8. Ausência de qualquer característica não motora comum da doença nos primeiros cinco anos de sintomas. Isso inclui disfunção do sono (insônia, sonolência diurna excessiva ou transtorno comportamental do sono REM - TCSR), disfunção autonômica (constipação intestinal, urgência urinária diurna), hiposmia ou alterações psiquiátricas (depressão, ansiedade ou alucinações);
9. Fraqueza de natureza piramidal ou clara hiperreflexia patológica (excluindo assimetria reflexa leve e resposta plantar extensora isolada) sem causa definida;
10. Parkinsonismo simétrico bilateral, em que o paciente ou cuidador relata início bilateral dos sintomas, sem predomínio lateral e tal predomínio não é observado no exame clínico objetivo.

1.3. DP pré-motora e não motora

Ainda que a disfunção dopaminérgica seja o marco neuropatológico que define a DP, reconhece-se nela a capacidade de afetar diversos outros sistemas, provocando uma ampla gama de sintomas, tanto motores quanto não motores (Costa *et al.*, 2023). Ao longo do curso da doença, observa-se o envolvimento não só do sistema dopaminérgico nigroestriatal, mas também dos sistemas noradrenérgico, colinérgico e outros (Barone, 2010). Portanto, muitos, se não todos, os pacientes portadores de DP apresentam sintomas não motores (Munhoz *et al.*, 2015).

Ao redor da década de 2000, estudos observacionais e longitudinais começaram a identificar sinais sem relação ao quadro motor que antecederiam por vários anos o aparecimento dos sinais de bradicinesia, rigidez e tremor, como os distúrbios na olfação (Gelber; Launer; White, 2012; Ross *et al.*, 2008), depressão (Leentjens *et al.*, 2003), ansiedade (Weisskopf *et al.*, 2003) e constipação intestinal (Gelber; Launer; White, 2012; Savica *et al.*, 2009). No entanto, a presença desses sinais não permite suspeitar do diagnóstico clínico da doença antes dos sinais motores, vista a sua alta inespecificidade (Gonera *et al.*, 1997).

Os transtornos do sono também podem preceder ou coexistir com o quadro motor da DP, merecendo um destaque especial. Dentre eles, de forma mais específica, há o distúrbio comportamental do sono REM (DCSREM), definida como uma parassonia, ou seja, um comportamento episódico não desejável ou desagradável, que ocorre no início do sono, durante o sono ou no despertar (Mahowald; Bornemann; Schenck, 2004). Neurofisiologicamente, o DCSREM se define como a perda da atonia muscular que

normalmente acontece durante o estágio do sono REM (Munhoz *et al.*, 2015). Clinicamente, é caracterizado por comportamentos aberrantes que acontecem durante o sono, com encenação de sonhos que envolvem movimentos complexos e não estereotipados, sendo esses gestos leves ou até mesmo movimentos violentos, como socos e chutes, podendo causar lesões no paciente e no seu parceiro ou parceira na cama (Oliveira; Cardoso, 2021). Em um estudo reconhecido, os portadores dessa condição evoluíram para parkinsonismo em 38% dos casos, após 13 anos do aparecimento dos problemas de sono (Schenck; Boeve; Mahowald, 2013). Dados da literatura apontam para essa condição como um marcador de sinucleinopatias, que envolvem doenças como a DP, atrofia de múltiplos sistemas, demência por corpos de Lewy, Doença de Alzheimer e Falência autonômica pura (*Pure Autonomic Failure*) (Barone; Henchcliffe, 2018).

Com a evolução da doença e o surgimento dos sinais motores, aparecem concomitantemente mais sinais não motores, que impactam diretamente na qualidade de vida dos portadores de DP (Antonini *et al.*, 2012), que não são somente decorrentes da progressão da neurodegeneração, mas, por vezes, associados a efeitos colaterais indesejáveis do tratamento (Zhang *et al.*, 2021).

A seguir, apresenta-se uma tabela detalhando os sinais não motores mais comuns (Zesiewicz, 2019).

Tabela 4 - Sinais não motores (Zesiewicz, 2019)

| Sinais Não Motores | |
|--------------------|---|
| Neuropsiquiátricos | Depressão. Ansiedade (transtornos do humor). Apatia. Transtorno do controle do impulso. Psicose. Anedonia. Alucinações. Abulia. Transtorno de déficit de atenção. Ataques de pânico. |
| Cognitivos | Disfunção executiva Perda de memória |

| | |
|-------------|--|
| | Demência |
| Autonômicos | Hipotensão ortostática Constipação Incontinência fecal Náusea Vômito Salivação excessiva Incontinência urinária e urgência Disfunção sexual Reflexos cardíacos alterados Disfunção olfativa Disfunção gastrointestinal Sudorese aumentada Disfagia |
| De sono | Insônia Letargia Sonolência excessiva diurna Síndrome das pernas inquietas Ataques de sono Movimentos periódicos dos membros durante o sono Transtorno comportamental do sono REM Sonhos vívidos |
| Sensitivos | Anosmia Dor Ageusia Dormência Parestesia. |

1.4. Histórico

Há descrições de quadros clínicos de parkinsonismo encontradas em textos antigos da cultura indiana e chinesa, assim como fenômenos de tremor de repouso e transtornos de marcha foram previamente descritos no século XVII e XVIII (Goetz, 2011). Entretanto, antes do século XIX, a percepção da DP como uma condição distinta era inexistente. Foi apenas em 1817 que o médico inglês James Parkinson fez a primeira descrição da doença como uma síndrome neurológica no seu trabalho intitulado “Ensaio sobre a Paralisia Agitante” (“*An Essay on Shaking Palsy*”) (Parkinson, 1817).

Nessa publicação, ele identificou a doença e a nomeou com base em dois dos seus sinais mais característicos: o clássico tremor “*Shaking*”, e a bradicinesia, que ele alcunhou como “*Palsy*” ou paralisia (Bologna *et al.*, 2020).

Na segunda metade do século XIX, começa a surgir um grande interesse na DP e contribuições de vários neurologistas levam a uma melhor definição do quadro clínico da doença. Dentre esses, certamente o maior contribuidor foi o prof. Jean-Martin Charcot, que propôs a mudança do termo Paralisia agitante para a DP, em homenagem a James Parkinson, além de contribuir para a melhor descrição do quadro clínico, caracterizando o tremor de repouso nas mãos, a rigidez muscular, a instabilidade postural e a bradicinesia. Charcot também fez uma série de detalhamentos clínicos no diagnóstico da DP, como a demonstração da ausência de fraqueza muscular, a caracterização da fâcies e postura, a descrição da presença de disartria, disfagia, micrografia e alterações autonômicas. Por fim, ele apresentou critérios para o diagnóstico diferencial e sugeriu o primeiro tratamento para a doença (Teive, 1998).

A descoberta da SN, estrutura-chave na gênese da doença, foi realizada por Félix Vicq d'Azyr em 1786 (Parent, 2007), mas somente no final dos anos 1800, Paul Blocq e Georges Marinesco, alunos do Prof. Charcot, identificaram uma possível ligação entre esta estrutura e a DP, ao estudar um homem com tuberculose internado na ala neurológica do hospital de *La Salpêtrière*. Esse indivíduo sofria de um tremor parkinsoniano unilateral e na autópsia, Blocq e Marinesco descobriram um tumor encapsulado confinado à SN, contralateral ao lado afetado. Os autores concluíram, assim, que o tremor, nesse caso específico, era decorrente de uma lesão nessa estrutura (Fénelon; Walusinski, 2021). Este trabalho pioneiro, publicado em 1893, levou Edouard Brissaud a formular, em 1895, a hipótese de que a SN é o principal sítio patológico da DP (Brissaud, 1899). A hipótese de Brissaud foi validada em 1919 por Constantin Trétiakoff (Tretiakoff, 1919) numa tese

notável que resumia um estudo da SN, em pacientes *post-mortem* realizado no laboratório de Marinesco. Os resultados de Trétiakoff foram confirmados por estudos neuropatológicos detalhados realizados na década de 1930 e pela descoberta, na década de 1960, da natureza dopaminérgica dos neurônios nigroestriatais que se degeneram na DP (Parent; Parent, 2010).

1.5. Neuropatologia da DP

As principais características patológicas da DP são a degeneração de neurônios dopaminérgicos na *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc), com a sua subsequente despigmentação, assim como a presença de Corpúsculos de Lewy (CL) (Balestrino; Schapira, 2020). Esses últimos são inclusões intraneuronais, redondas, eosinofílicas, com um núcleo hialino e um halo periférico pálido, compostos por mais de 90 proteínas, sendo os seus principais componentes a α -sinucleína e a ubiquitina. A α -sinucleína tem a propensão de desdobrar-se, tornando-se insolúvel, o que leva à formação de agregados amiloides ricos em folhas beta, que se acumulam e formam inclusões intracelulares. Os intermediários neste processo de agregação são as formas tóxicas oligoméricas e protofibrilares que prejudicam a função mitocondrial, lisossomal e proteasomal, danificam as membranas biológicas e o citoesqueleto, alteram a função sináptica e causam degeneração neuronal (Xu; Pu, 2016).

1.6. Etiologia da DP

Do ponto de vista molecular, apesar de grandes esforços e extensivos estudos, a etiologia da DP permanece ainda incerta. O maior volume de conhecimento sobre os mecanismos patológicos da doença deriva de protocolos experimentais nos modelos animais de primatas não-humanos e de roedores, ao receberem 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Jackson-Lewis *et al.*, 2015) ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Hernandez-Baltazar; Zavala-Flores; Villanueva-Olivo, 2017). Entretanto, o espectro clínico e neuropatológico da DP é muito mais complexo do que as condições mimetizadas nos modelos farmacológicos (El-Gamal *et al.*, 2021), pois não há modelo pré-clínico da DP que consiga reproduzir por inteiro todas as faces neuropatológicas e clínicas da doença (Cenci; Björklund, 2020).

Há evidência de que disfunções mitocondriais, o estresse oxidativo e a depuração anormal de resíduos celulares (autofagia), dentre outros fenômenos em nível celular, teriam um papel central tanto no envelhecimento biológico assim como na gênese de doenças neurodegenerativas, dentre elas a DP (Lin; Beal, 2006). Essa afirmação pode ser especialmente relevante nos neurônios, vista a natureza pós-mitótica e a limitada capacidade de regeneração dessas células, o que as levaria a acumular resíduos metabólicos e defeitos moleculares à medida que envelhecem (González-Casacuberta *et al.*, 2019).

Em uma revisão publicada por Salamon e colaboradores em 2020 (Salamon *et al.*, 2020), elencam-se os mais importantes processos patológicos associados à DP, detalhados a seguir:

- a) Atividade alterada da monoamino oxidase B (MAO-B): evidências experimentais mostram que níveis elevados de MAO-B em astrócitos podem induzir patologias similares à DP, exacerbando o processo degenerativo na doença e sugerindo que inibidores da MAO-B (IMAO-B) reduziriam essa ativação astrogliar, supostamente prejudicial, assim como a neurodegeneração decorrente desse processo (Tong *et al.*, 2017);
- b) Estresse oxidativo: a neurodegeneração na DP é um fenômeno ainda não inteiramente conhecido, mas ao que parece, é decorrente da interação de vários mecanismos que funcionam em retroalimentação, em que os insultos primários levam a um estresse oxidativo que danifica proteínas patogênicas celulares, chave desse processo, assim como desorganiza as membranas lipídicas que, por sua vez, causam mais produção de espécies reativas de oxigênio ou ROS (*reactive oxygen species*) (Dias; Junn; Mouradian, 2013). No encéfalo de uma pessoa portadora de DP, as ROS seriam originadas, principalmente, do metabolismo da dopamina, da disfunção mitocondrial e da neuroinflamação (Dias; Junn; Mouradian, 2013);
- c) Níveis elevados de Ferro: foi previamente estabelecido que a concentração de ferro do sistema extrapiramidal é anormal no parkinsonismo, porém o papel dessa alteração na fisiopatologia da DP não é bem definido (Foley; Hare; Double, 2022). As vias degenerativas associadas ao ferro podem desempenhar um papel no processo progressivo de neurodegeneração na DP (Gerlach *et al.*, 2006);
- d) Excitotoxicidade glutamatérgica: é um processo patológico no qual a estimulação excessiva dos receptores de glutamato no encéfalo leva à morte de células nervosas (Kirdajova *et al.*, 2020). O glutamato é um neurotransmissor

excitatório crucial que desempenha um papel importante na comunicação entre neurônios (Pinky *et al.*, 2018), mas quando em excesso, como pode ocorrer em várias condições neurológicas e lesões cerebrais, os neurônios podem se tornar superexcitados, desencadear um influxo de íons de cálcio nas células nervosas e levar a uma série de eventos tóxicos intracelulares, que podem resultar na sua morte (Mattson, 2019). O fenômeno pode também estar associado à disfunção das células da glia. Além disso, a recaptção inadequada de glutamato é considerado um marco comum em diferentes doenças neurodegenerativas, dentre elas, a DP (Iovino; Tremblay; Civiero, 2020);

e) Agregação e desdobramento anormal de proteínas: ainda que a DP seja uma doença esporádica, há casos da doença decorrentes de mutações monogênicas (Jia; Fellner; Kumar, 2022). Uma delas é a DP associada às mutações no gene SNCA, que induz a um parkinsonismo de herança autossômico dominante, que apresentam agregações de α -sinucleína que interferem no sistema proteosomo-ubiquitina, acelerando a produção de CL (Kon *et al.*, 2023);

f) Redução de fatores tróficos: os fatores neurotróficos são um conjunto de proteínas amplamente investigadas no contexto de doenças neurodegenerativas, pois estão envolvidas no desenvolvimento, sobrevivência e manutenção do sistema nervoso (Bondarenko; Saarma, 2021). Na DP, há mudanças na regulação de fatores neurotróficos específicos, assim como nos seus receptores, que parecem ser relevantes na degeneração neuronal (Sampaio *et al.*, 2017);

g) Homeostase alterada do cálcio: diferentemente dos neurônios dopaminérgicos da Área Tegmental Ventral, ou VTA (*Ventral Tegmental Area*), que possuem uma alta capacidade de equilibrar o desbalanço de cargas decorrentes do fluxo de íons cálcio, os neurônios dopaminérgicos da SN, por causa da maior quantidade de canais de cálcio tipo L, lidam com um maior influxo de cálcio intracelular, o que parece desencadear morte neuronal (Verma; Ravindranath, 2020). Por isso, foi proposto que o desbalanço na homeostase do cálcio pode ser a causa da degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos na SN (Zhang *et al.*, 2022);

h) Neuroinflamação: há evidências do aumento da atividade da ciclooxigenase – 2 (COX-2) em pacientes parkinsonianos (Teismann, 2012). Além disso, as micróglias poderiam contribuir para a morte celular, produzindo moléculas pró-inflamatórias, como prostaglandinas, interleucinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Allain; Bentué-Ferrer; Akwa, 2008);

- i) Apoptose: há evidências de aumento da expressão de proteínas associadas a vias apoptóticas, como a p53 e a caspase-3, tanto em modelos animais como em seres humanos (Allain; Bentué-Ferrer; Akwa, 2008);
- j) Defeitos no retículo endoplasmático: a agregação de α -sinucleína interfere no funcionamento adequado do transporte vesicular pelo retículo endoplasmático e pelo aparelho de Golgi (Cooper *et al.*, 2006).

O modelo neuropatológico proposto por Braak e colaboradores (2003) explicaria a progressão da DP, inicialmente com sinais não motores, progredindo para o aparecimento dos sinais cardinais da doença, até evoluir para um quadro demencial (Braak *et al.*, 2003). É um modelo sequencial de formação de CLs e de deposição de α -sinucleína, começando no núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeos, vago e núcleo olfatório anterior, com posterior propagação para o tronco cerebral, mesocórtex e allocórtex, até finalmente atingir o neocórtex. Essa hipótese encontra suporte em evidências que identifica-se que a α -sinucleína tende a espalhar-se através dos neurônios, de uma forma semelhante à dos príons, em um mecanismo de transmissão compatível com a progressão das alterações patológicas descritas por Braak e colaboradores (Brundin; Ma; Kordower, 2016) e há também evidências que sugerem que a agregação de α -sinucleína pode começar nos plexos autonômicos intestinais com posterior propagação rostral, parcialmente influenciada pela microbiota intestinal (Balestrino; Schapira, 2020).

Entretanto, é importante salientar que a proposta de Braak e colaboradores sofre várias críticas por vários motivos. Dentre elas, a de não possuir perfeita correlação anátomo-clínica com a progressão da doença (Halliday *et al.*, 2008). Outra crítica é a de basear-se somente no estudo neuropatológico da presença de α -sinucleína, sem considerar outras alterações neuropatológicas, como a denervação dopaminérgica, que pode anteceder a formação de CL (Milber *et al.*, 2012). Outra deriva do fato de que a presença de CL não necessariamente levará ao indivíduo a desenvolver demência (Halliday; Mccann; Shepherd, 2012). A teoria de Braak e colaboradores também não consegue explicar diferentes características neuropatológicas que os portadores de DP apresentam, associadas às diferenças nas suas manifestações clínicas (Jellinger, 2019).

1.7. Epidemiologia da DP

O estudo da epidemiologia da DP é muito complexo, envolvendo fatores próprios do indivíduo, como o sexo biológico e a idade, além de fatores genéticos que se relacionam entre eles, assim como se interrelacionam com o meio ambiente (Periñán *et al.*, 2022).

Dentre os fatores próprios do indivíduo, a idade é o principal fator de risco para desenvolver DP, sendo que os seus sinais motores aparecem numa idade média de 60 anos, com aumento da incidência da doença com o tempo, visto que em populações entre 50 e 59 anos de idade, a incidência da doença é de 17,4 em 100.000, mas entre os 70 e 79 anos, alcança valores de 93,1 em 100,000 pessoas por ano (Lees; Hardy; Revesz, 2009).

Com o envelhecimento e o aumento da expectativa de vida da população global, doenças mais prevalentes em idosos, dentre elas a DP, recebem crescente atenção por parte da comunidade científica. Em junho de 2022, a Organização Mundial da Saúde publicou uma nota técnica intitulada “Doença de Parkinson: Uma abordagem de Saúde Pública”, apontando que o impacto global da PD vem aumentando de forma mais acelerada do que qualquer outra doença neurológica (World Health Organization, 2022).

Tsalenchuk e colaboradores (2023) fizeram referência à prevalência estimada na DP, que se encontra entre 1 e 3% das pessoas acima de 65 anos e ao redor de 5% das pessoas acima de 85 (Tsalenchuk; Gentleman; Marzi, 2023). As taxas de incidência da DP oscilam entre 8 e 18 por 100.000 pessoas/ano, calculadas em estudos prospectivos populacionais (LEE; Gilbert, 2016).

O sexo biológico também é um fator importante no desenvolvimento e na expressão fenotípica da DP, visto que o risco de desenvolver a doença é 1.5 (Moisan *et al.*, 2016) a duas vezes (Baldereschi *et al.*, 2000) maior nos homens do que nas mulheres. Entretanto, as mulheres possuem uma taxa de mortalidade mais elevada, assim como uma progressão mais rápida da doença (Cerri; Mus; Blandini, 2019). Essas diferenças podem estar associadas a mecanismos genéticos associados ao sexo, a diferenças específicas à exposição a algum fator ambiental ou em decorrência da desigualdade ao acesso a cuidados de saúde (Kalia; Lang, 2015).

É provável que a maioria dos casos de DP tenham uma origem multifatorial, resultante dos efeitos combinados de fatores ambientais e genéticos (Jankovic; Tan, 2020), sumariamente abordados a seguir.

1.7.1. Fatores genéticos

Os últimos anos presenciaram um grande avanço no que é relacionado à identificação de genes diretamente ligados à DP, auxiliando no diagnóstico e propondo novos alvos terapêuticos para a doença (Simon; Tanner; Brundin, 2020).

Na década de 90, identificou-se nas famílias portadoras de DP, com um padrão de herança mendeliana autossômico dominante, uma mutação ligada ao gene da α -sinucleína (*SNCA*) (Polymeropoulos *et al.*, 1996). Essa descoberta ajudou a estabelecer a associação entre a α -sinucleína e a formação dos CL (Singleton *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 1998).

Alguns anos depois, foi descrita outra forma de DP com o mesmo padrão de herança, associada a mutações no gene *LRRK2* (Zimprich *et al.*, 2004). Essa mutação induz uma DP clinicamente muito similar à forma idiopática, com início geralmente após os 50 anos, presente ao redor de 5% em pacientes portadores de DP, além de estar presente em 1 a 2% de todos os casos da doença (Paisán-Ruiz; Lewis; Singleton, 2013). O gene *LRRK2* está envolvido na síntese de uma quinase e, ainda que as evidências mais robustas apontem para uma associação entre uma atividade aumentada dessa enzima e seus efeitos deletérios, os esforços de bloquear os seus efeitos tenham mostrado alguns resultados positivos, comprovar essa atividade em modelos *in vivo* tem sido desafiador (Dächsel; Farrer, 2010).

Foram também identificadas outras mutações associadas à DP que seguem uma herança mendeliana autossômico recessiva. Ainda na década de 90, foram identificados genes associados a DP de início precoce, abaixo dos 50 anos (Mehanna *et al.*, 2022), como o gene *PARKIN* (Kitada *et al.*, 1998). Posteriormente, foi descrito o gene *PINK1* (Valente *et al.*, 2004). As mutações nesses genes induzem a uma disfunção mitocondrial, também presente em formas de DP não associadas a esse mecanismo genético (Zheng *et al.*, 2010), o que levou também a considerar a mitocôndria como envolvida na gênese da doença assim como possível alvo terapêutico.

Apareceram também outras descrições de DP que seguem um padrão de herança autossômica recessiva, decorrentes de mutações no gene DJ-1 (Bonifati *et al.*, 2003), relacionado a fatores antioxidantes (Raninga; Di Trapani; Tonissen, 2017).

Um relevante fator genético que aumenta o risco de desenvolver DP está relacionado à mutações no gene *GBA*, ligado à doença de Gaucher, uma síndrome genética de herança autossômico recessiva e provocada por um metabolismo lisosomal defeituoso, com amplo espectro clínico, que envolve hepatomegalia, esplenomegalia,

anemia, trombocitopenia, distúrbios ósseos, dentre outros (Clark *et al.*, 2005). Riboldi e Di Fonzo, em uma revisão publicada em 2019, evidenciam que a mutação do gene *GBA* é considerada o fator de risco genético mais relevante para desenvolver DP, sendo que aproximadamente 9,1% dos portadores da mutação desenvolverão a doença. Além disso, os indivíduos que carregam a mutação em heterozigose possuem um risco aumentado de cinco vezes de desenvolver DP. Se, por outro lado, o indivíduo carregar a mutação em homozigose, o risco aumenta para dez a vinte vezes. Estima-se que de 2 a 30% de todos os portadores de DP carreguem mutações no gene *GBA* (Riboldi; Di Fonzo, 2019).

Fatores envolvidos na genética da DP interagem de uma forma complexa. Mutações comuns podem contribuir para aumentar o risco de desenvolver DP, interagindo com outros fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Van Heesbeen; Smidt, 2019). Em 2019, publicou-se um estudo robusto utilizando associações de genes presentes em bancos de dados genéticos populacionais (GWAS, *Genome-Wide Association Study*), que identificou 70 *loci* que conferem um risco aumentado de desenvolver DP, que respondem por um risco indireto de 16 a 36% de desenvolver a doença (Nalls *et al.*, 2019).

Em suma, entre 3 e 5 % dos casos da DP tem uma ligação direta a mutações genéticas bem estabelecidas (Bloem; Okun; Klein, 2021). Entretanto, as mutações genéticas mais comuns associadas à DP têm uma penetrância incompleta, indicando que outros fatores ambientais ou genéticos estão envolvidos. Um estudo que comparou as taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos estimou a hereditariedade da DP em 30%, sugerindo que a maioria do risco de DP está relacionada com fatores ambientais e comportamentais (Simon; Tanner; Brundin, 2020).

1.7.2. Fatores ambientais

Identificou-se que a exposição às substâncias químicas tóxicas e que os traumatismos cranianos podem aumentar o risco de DP, mas fatores relacionados com o estilo de vida, assim como os de suscetibilidade genética podem diminuir esse risco (Simon; Tanner; Brundin, 2020).

Identifica-se também variações geográficas, sendo que a prevalência da DP reportada na Europa, América do Norte e América do Sul é maior do que a referida na África, Ásia e países árabes (Kalia; Lang, 2015).

Muitas exposições ambientais associadas ao risco de desenvolver DP têm sido exploradas, mas ainda é muito difícil identificar aquelas que são críticas e causais na etiologia da doença (Figura 1).

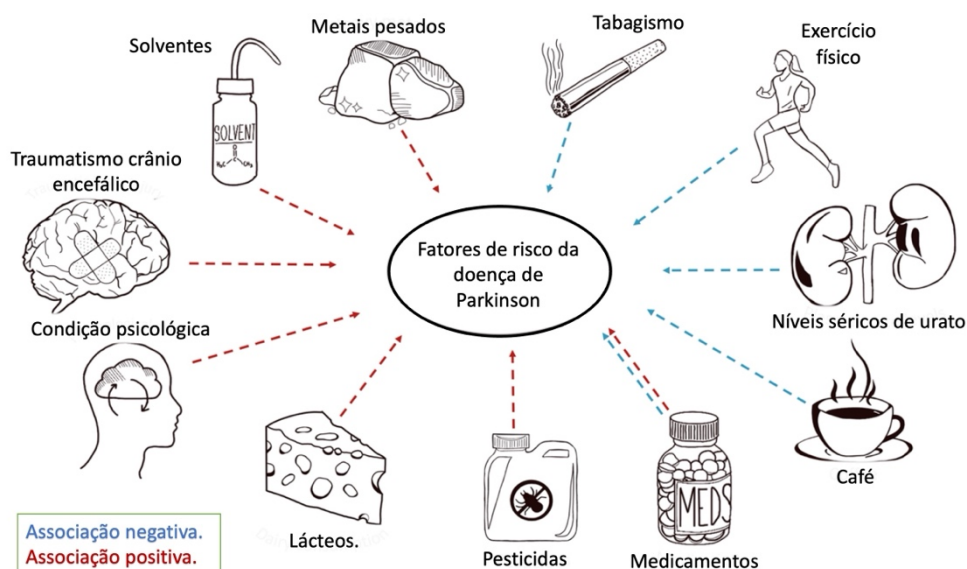


Figura 1 - Fatores de risco associados à DP. Modificado de Tsalenchuk; Gentleman; Marzi (2023)

Curiosamente, existem inúmeros fatores que se mostram negativamente associados ao risco de DP. O consumo de cigarros é um desses, que mostra uma forte relação dose-resposta negativa com o risco de DP: quanto maior for o tempo ou a quantidade de cigarros que os participantes fumavam, menor era a probabilidade de desenvolverem DP (Galanaud *et al.*, 2005; Wirdefeldt *et al.*, 2011). A causa dessa associação ainda é desconhecida. O cigarro possui mais de 8000 compostos, sendo os principais candidatos para o efeito protetor contra a DP, a nicotina, assim como vários outros alcaloides presentes em doses mais baixas, provavelmente pelos seus efeitos dopaminérgicos e de inibição do monoamino oxidase (HONG *et al.*, 2022), bem como por mecanismos epigenéticos (Angelopoulou *et al.*, 2022).

O consumo de café está também associado a um menor risco tanto do aparecimento como da progressão da DP (Hong; Chan; Bai, 2020). Tanto a cafeína como a eicosanoil-5-hidroxitriptamida (EHT), presentes no café, poderiam explicar esse fenômeno, visto que elas conseguem aumentar a atividade da Proteína Fosfatase 2A (PP2A), responsável pela desfosforilação da α -sinucleína, e a sua consequente menor agregação (Yan *et al.*, 2018). Outra possibilidade seria que indivíduos nas fases

prodromicas da DP, com níveis encefálicos mais baixos de dopamina, apresentariam um padrão de comportamento mais avesso ao risco e consumiriam menos tabaco e café (Dagher; Robbins, 2009), mas essa hipótese dificilmente poderá ser solidamente testada, visto que os dados da literatura sobre a chamada “personalidade parkinsoniana” apresentam dificuldades metodológicas que impactam na sua qualidade (Ishihara; Brayne, 2006). Mais recentemente se aventou uma teoria inspirada na descrição da origem da DP por Braak e colaboradores (Hawkes; Del Tredici; Braak, 2007), na qual se sugere que a cafeína e o tabaco alterariam a microbiota intestinal de forma a atenuar o desdobramento da α -sinucleína nos neurônios entéricos, reduzindo, assim, a progressão da doença (Derkinderen; Shannon; Brundin, 2014).

Outros fatores negativamente correlacionados incluem o uso de ibuprofeno, exercício físico e níveis plasmáticos de urato, embora com resultados contraditórios (Tsalenchuk; Gentleman; Marzi, 2023).

Outros fatores ambientais também estão associados a um aumento do risco de DP. Há evidências sugerindo que a exposição a produtos químicos como pesticidas, herbicidas e solventes está implicada na gênese da DP. Pesquisas que abordam a exposição a pesticidas e herbicidas são mais abundantes na literatura, em decorrência da similaridade estrutural molecular do herbicida Paraquat (Di Monte *et al.*, 1986) e do pesticida Rotenona (Mcnaught *et al.*, 1996) com o MPTP. O MPTP é um subproduto obtido da síntese inadequada do potente derivado opioide 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), que induziu sintomas de DP em usuários de heroína na década de 1970, quando inadvertidamente injetaram a neurotoxina via endovenosa acreditando tratar-se de MPPP, produzida em laboratórios clandestinos (Davis *et al.*, 1979; Langston *et al.*, 1983).

Assim, a atividade agrícola e a moradia em ambiente rural são consideradas como fatores de risco de desenvolver DP, provavelmente, em decorrência do contato com pesticidas e herbicidas (Pouchieu *et al.*, 2018). Paralelamente, viver em áreas urbanas com elevados níveis de poluição atmosférica também têm sido associado a um risco acrescido de desenvolver DP (Jo *et al.*, 2021).

Em relação aos riscos ocupacionais associados à DP, soldados e trabalhadores da mineração estão também expostos a um risco aumentado de desenvolver a doença (Racette *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2021). Acredita-se que o risco esteja relacionado à exposição desses indivíduos a metais pesados (Coon *et al.*, 2006; Gorell *et al.*, 1997), porém, outros relatos não corroboraram esses achados (Frigerio *et al.*, 2005).

Trabalhadores expostos a solventes como o tricloroetileno teriam também um risco aumentado de desenvolver DP (Goldman *et al.*, 2012), mas novamente outras publicações mostraram dados contraditórios (Miranda; Greenamyre, 2020).

Dentre outras associações positivas com o risco de desenvolver DP, foi estudado o traumatismo cranioencefálico com perda de consciência (Jafari *et al.*, 2013) ou mesmo leve (Gardner *et al.*, 2018), o consumo de produtos lácteos (Domenighetti *et al.*, 2022), o uso de β - bloqueadores (Gronich *et al.*, 2018), ainda que com resultados conflitantes provenientes de outros autores (Nielsen *et al.*, 2018), e o diagnóstico de depressão e ansiedade (Jacob *et al.*, 2010).

Os esforços para reconhecer fatores de risco associados à DP são de grande importância para a implementação de medidas preventivas com o objetivo de reduzir a prevalência e incidência da doença (Miranda *et al.*, 2022).

1.8. Tratamento

O professor Charcot, em 1877, propôs que alcaloides derivados da *Atropa belladonna*, conhecida pelo nome comum de beladona, poderiam ser usados para o tratamento da doença (Teive, 1998). Essas substâncias apresentam uma ação antiparkinsoniana moderada e foi a única opção terapêutica medicamentosa por 100 anos, até o desenvolvimento de agentes anticolinérgicos sintéticos com ação antiparkinsoniana mais específica (Kopin, 1993).

Perante os resultados pouco animadores com as opções terapêuticas medicamentosas disponíveis à época, iniciaram-se experiências de tratamentos cirúrgicos. O primeiro tratamento cirúrgico para a redução de sinais motores da DP foi realizado em 1912 por Leriche, na França, ao fazer uma rizotomia posterior que apresentou resultados pouco consistentes (Leriche, 1912 apud Walter; Abosch; Vitek, 2005). Posteriormente, outros tratamentos cirúrgicos foram inseridos, como a cordotomia cervical, simpatectomias, ganglionectomias, tireoidectomias e dentatectomia cerebelar, porém, foram abandonados ao apresentar resultados variáveis na rigidez e frequente piora do tremor (Speelman; Bosch, 1998).

James Parkinson previamente relatou uma melhoria temporária do tremor após um infarto cerebral, observação confirmada um século mais tarde (Patrick, 1922). Baseado nessas observações, assim como em experiências prévias em modelos animais, Bucy e Case extirparam as áreas quatro e seis de Brodmann, tratando com sucesso um

paciente com “tremor pós-traumático intencional e de repouso”, que apresentou como efeito colateral uma leve hemiparesia (Bucy, 1939). Assim, outros cirurgiões começaram a realizar lesões corticais para tratar as hipercinesias e o tremor parkinsoniano (Reid, 1948).

Por volta de 1950, os procedimentos corticais foram abandonados por causa dos resultados decepcionantes, as dificuldades técnicas para a realização do procedimento e o alto índice de complicações (Walter; Abosch; Vitek, 2005).

Foram exploradas no seu lugar, as transecções do trato córtico-espinhal, como a cordotomia cervical lateral (Oliver, 1950) e a pedunculotomia mesencefálica (Walker, 1952).

Em 1939, Meyers obteve sucesso ao fazer uma ressecção transventricular de dois terços do núcleo caudado direito para tratar um paciente com parkinsonismo pós-encefalítico e grave tremor de repouso em hemicorpo esquerdo (Meyers, 1951). Após essa abordagem revolucionária, os tratamentos neurofuncionais para o manejo dos sinais motores da DP focaram-se, principalmente, no Globo pálido e na *ansa lenticularis*, porém com altíssima mortalidade, atingindo até 41% em algumas séries (Guridi; Lozano, 1997).

As técnicas estereotáxicas que tiveram os seus primórdios no final de 1800 e início de 1900, disseminaram-se na década de 1950. Inicialmente, os alvos eram os mesmos do que os utilizados na via aberta, mas após os resultados de Hassler em 1955, o tálamo começa a ser o alvo mais utilizado para o tratamento neurofuncional da DP (Bosch, 1986).

Nesse período, apareceram evidências das funções neurais da dopamina e do seu precursor, Levodopa (L-DOPA), em modelos animais (Carlsson *et al.*, 1958; Weil-Malherbe; Bone, 1957) e logo após, nos encéfalos humanos (Montagu, 1957; Sano *et al.*, 1959). Nos primeiros anos da década de 1960, iniciaram-se os primeiros estudos com o uso clínico da L-DOPA (Hornykiewicz, 2010) e em 1967, foi definido o seu papel como o fármaco isolado mais potente e eficaz contra os sinais motores da DP (Cotzias; Van Woert; Schiffer, 1967).

Porém, alguns anos após o início do uso da L-DOPA, ficou aparente que o seu uso não impedia a evolução da doença, assim como induzia importantes efeitos adversos (Agid; Chase; Marsden, 1998). Nesse contexto, os tratamentos cirúrgicos, deixados parcialmente de lado, reemergiram (Walter; Abosch; Vitek, 2005).

Na década de 1970, as talamotomias guiadas por estereotaxia ganharam novamente força, principalmente no tratamento de tremores fármaco-resistentes (Speelman; BOSCH, 1998). Com a evolução do conhecimento fisiopatológico dos

núcleos da base, na década de 1990, as palidotomias voltam a aparecer no cenário terapêutico cirúrgico da DP, focando-se na área sensório motora no Globo pálido interno (GPi) (Guridi; Lozano, 1997)

Ao identificar que estímulos elétricos de alta frequência, acima de 100 Hz, induzem os mesmos sinais que as lesões ablativas em estruturas subcorticais encefálicas (Benabid *et al.*, 1991), Benabid e colaboradores (1987), de forma pioneira, conseguem tratar um paciente portador de tremor parkinsoniano por estimulação cerebral profunda de alta frequência no tálamo (Benabid *et al.*, 1987). Aparece, assim, a neuromodulação invasiva pela estimulação cerebral profunda, ou DBS na sua sigla em inglês (*Deep Brain Stimulation*), o ponto de inflexão na história do tratamento neurocirúrgico da DP.

Atualmente, os dois alvos anatômicos para o tratamento dos sinais motores da DP são o GPi e o Núcleo subtalâmico (NST), sendo o último, o mais utilizado (Zrinzo, 2024).

1.9. Estimulação cerebral profunda (DBS)

A DBS é um tratamento pelo qual é possível modular a atividade de estruturas encefálicas profundas por uma corrente elétrica. Isso é feito após a implantação de eletrodos intracerebrais, utilizando técnicas de estereotaxia, enquanto o segmento extracraniano do dispositivo é conectado a um gerador de impulsos implantado na região infraclavicular do paciente (Pycroft; Stein; Aziz, 2018).

Os eletrodos geralmente usados hoje na prática clínica são constituídos por quatro contatos eletricamente ativos, que permitem estimulação quadripolar catódica e anódica (Krauss *et al.*, 2021).

Os parâmetros de estimulação entregues pelo gerador de impulsos aos eletrodos cerebrais são definidos pelo neurologista assistente, por um dispositivo externo de programação, sendo que há uma grande variabilidade de parâmetros de estimulação a serem ajustados, como a quantidade de corrente, a frequência da estimulação, a duração do pulso e a conformação espacial do campo elétrico, o que permite uma ampla gama de combinações possíveis (para revisão, ver Merino Ruiz; Guimarães; Mortari, 2022). Os seus efeitos são muito relacionados à correta escolha desses parâmetros, assim como a distribuição geométrica e espacial tanto da onda elétrica quanto do campo elétrico gerados, as propriedades do tecido cerebral alvo, a orientação e distribuição dos corpos celulares e das redes neurais presentes na região de implantação, assim como a topografia das redes neurais próximas ao contato ativo (Perlmutter; Mink, 2006).

1.10. Conceitos básicos de eletricidade, DBS e modulação cerebral

Quando um pulso elétrico num eletrodo de DBS é gerado, os elétrons fluem através dos circuitos entre o gerador de impulso e o eletrodo. Na interface eletrodo-tecido cerebral, ocorre uma transição de um fluxo de elétrons para um fluxo de íons, que é mediada por processos tanto reversíveis, que envolvem um equilíbrio dinâmico entre os elétrons ao redor do eletrodo e os íons, sejam positivos ou negativos, próximos da superfície metálica do eletrodo (acoplamento capacitivo não-farádico reversível) como irreversíveis, de transferência direta de elétrons entre o eletrodo e moléculas presentes no tecido que reagem a eles (reações de óxido-redução farádicas) (Kumsa *et al.*, 2016).

A corrente, medida em amperes (A), é a taxa de fluxo de partículas eletricamente carregadas, como elétrons ou íons, que atravessa o tecido neural, criando um campo elétrico gerado entre um ânodo e um cátodo do eletrodo (Aum; Tierney, 2018). Esse campo elétrico age em um volume de tecido cerebral povoado por estruturas neurais, sejam eles corpos celulares, axônios e dendritos. Neles, estimula-se a abertura de canais iônicos voltagem dependentes e, se o estímulo for forte o suficiente, um potencial de ação é propagado, causando a liberação de neurotransmissores capazes de interagir em receptores excitatórios ou inibitórios (Ng *et al.*, 2024).

A membrana celular em repouso permanece discretamente polarizada, com um potencial elétrico transmembrana de aproximadamente -70mV, sendo assim, mais sensível a estímulos extracelulares de carga negativa (catódica) para gerar uma despolarização com conseqüente geração do potencial de ação (Brocker; Grill, 2013). É assim que os protocolos de neuromodulação profunda utilizam corrente catódica, ainda que com relatos de algumas experiências de estimulação anódica (Anderson *et al.*, 2019; Kirsch *et al.*, 2018). A estimulação extracelular afeta de igual forma as células locais, as aferências neuronais e fibras neuronais circunjacentes (Mcintyre; Foutz, 2013).

Em uma membrana celular neuronal, a corrente elétrica mínima necessária para causar uma resposta excitável em uma célula, quando a duração do estímulo é muito longa, é definida pela reobase (Brocker; Grill, 2013). Após definir a reobase, podemos definir cronaxia como sendo o menor tempo de duração de um estímulo elétrico necessário para excitar uma célula, por uma corrente elétrica de intensidade igual ao dobro da reobase (Geddes, 2004).

Temos que valores típicos para a cronaxia são cerca de 30-200 microssegundos para axônios mielinizados e cerca de 1-10 milissegundos para corpos celulares e

dendritos, pelo que se deduz que, após uma corrente elétrica provocada pela DBS, é muito mais fácil despolarizar axônios mielinizados do que outros elementos neurais (Kringelbach *et al.*, 2010), sem deixar de agir nos neurônios do núcleo alvejado pelo eletrodo, exercendo efeitos inibitórios (Filali *et al.*, 2004).

Assim, ainda que inicialmente concebida como uma forma de tratamento com funções análogas às técnicas ablativas, visto que a alta frequência elétrica induz uma inibição das funções neuronais das estruturas alvos (Chiken; Nambu, 2016), como previamente relatado no NST (Meissner *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2003), hoje se sabe que as suas funções extrapolam esse efeito inibitório.

Há evidências de que áreas encefálicas diretamente atingidas pelo eletrodo de estimulação são inativadas pela coestimulação dos terminais GABAérgicos pré-sinápticos e a subsequente liberação do neurotransmissor inibitório GABA (Lozano *et al.*, 2002), assim como pelo bloqueio da despolarização neuronal. O bloqueio leva à redução da atividade celular nos corpos neuronais, induzindo uma despolarização inicial, com a posterior cessação dos potenciais de ação neuronais (Vitek, 2002). Há também a ativação de vias neuronais próximas aos eletrodos de estimulação que modifica o padrão de disparo neuronal nas estruturas aferentes dessas vias, modificando a liberação de neurotransmissores, mudando a atividade metabólica e gerando mudanças plásticas cerebrais, tanto no local quanto à distância (Hamani; Temel, 2012).

1.11. O modelo animal de DP e a DBS

O estudo dos fenômenos neuropatológicos da DP pode utilizar diferentes modelos animais, tanto *in vivo* como *in vitro*, com o objetivo de ampliar a compreensão dos diferentes aspectos da doença, que estariam restritos se somente abordados nos seres humanos (Chia; Tan; Chao, 2020).

Os modelos de DP em animais, tanto em primatas não humanos induzido por MPTP, quanto em roedores, induzido 6-OHDA, forneceram as bases para a evolução do conhecimento da fisiopatologia das alterações na atividade funcional dos núcleos da base que acontecem na DP (Breit; Schulz; Benabid, 2004).

No mesmo ano em que Benabid realizou o primeiro procedimento de estimulação cerebral profunda, Miller e DeLong, após registros eletrofisiológicos realizados em primatas não humanos nos quais foi induzido parkinsonismo por uma infusão de MPTP,

demonstraram que o NST apresentava uma excessiva atividade neuronal de disparo (Miller; DeLong, 1987).

Em 1989, Albin e colaboradores compilaram todo o conhecimento disponível sobre a neuropatologia da DP, principalmente baseados em estudos realizados em modelos animais. A partir dessas informações, desenvolveram uma hipótese sobre a origem dos distúrbios de movimento, tanto hiperkinéticos quanto hipocinéticos. Eles sugeriram que esses movimentos anormais resultavam de uma desregulação do funcionamento cortical, induzida por alterações nas suas aferências talâmicas. Essas alterações seriam consequência de um desequilíbrio nos circuitos córtico-subcorticiais, ocasionado por mudanças na atividade neuronal nos núcleos da base, como o NST, o GPi e a *Substantia Nigra pars reticulata* (SNpr). O cerne desse desequilíbrio estaria nas aferências disfuncionais da SNpc, ocasionadas pela degeneração dos seus neurônios dopaminérgicos (Albin; Young; Penney, 1989).

Essa publicação encorajou a abordagem neurocirúrgica dessas estruturas subcorticiais. Assim, no início da década de 90, outros autores descreveram a melhoria da bradicinesia, da rigidez e do tremor no modelo animal de DP em primatas não-humanos após lesões no NST (Aziz *et al.*, 1991; Bergman; Wichmann; DeLong, 1990). Esses resultados apoiaram a hipótese de atividade excessiva no NST na DP e tanto a sua ablação como uma eventual redução na sua atividade neuronal resultariam numa melhoria dos sinais motores da doença.

Em 1993, motivados pelos resultados obtidos por procedimentos ablativos assim como os de DBS em primatas não-humanos (Benazzouz *et al.*, 1993), foi realizada a primeira DBS no NST em um paciente portador de DP (Pollak *et al.*, 1993).

Foi assim que importantes avanços na pesquisa em DP foram alcançados com o uso do modelo de parkinsonismo em primatas não-humanos. Porém, a sua manipulação envolve complexas considerações éticas, além de altos custos, visto o tamanho corporal animal, o seu longo tempo de vida e os cuidados que eles demandam. Identifica-se então que, desde a década de 1990, mais de 80% da pesquisa pré-clínica em DP utiliza o modelo de parkinsonismo em roedores (Konnova; Swanberg, 2018), que ofereceram uma plataforma sólida de pesquisa para a evolução do conhecimento da DP.

Os dados derivados das experiências no uso da DBS na DP, em que os roedores ocupam um papel preponderante, revelaram fenômenos cerebrais fisiopatológicos até então desconhecidos que contribuíram para um novo marco no conhecimento etiopatogênico da doença (Lozano *et al.*, 2019). Por exemplo, foi identificado um

aumento na flutuação nas frequências de disparo neuronal na banda beta nos núcleos da base, tálamo e córtex, tanto em humanos como em animais (Salvadè *et al.*, 2016), inicialmente consideradas como fenômenos irrelevantes. Baseados nesses fenômenos, desenvolveram-se novas teorias para explicar a etiopatogênese da DP, ainda longe de serem definitivas, relegando a hipótese de Albin e colaboradores a um modelo muito simples e impreciso (Montgomery; Gale, 2008). Atualmente, acredita-se que a “causa” dos movimentos anormais estaria em anomalias na orquestração nas funções das unidades motoras que aconteceriam em diferentes marcos físicos e temporais (Montgomery, 2020). Outros fenômenos envolvidos na gênese da DP, como a plasticidade sináptica e o papel do cerebelo e de outros núcleos do tronco cerebral ainda são questões por desvendar (Wichmann, 2019).

1.12. O modelo de DP em roedores

Os modelos animais de DP em roedores podem ser classificados em três categorias: os induzidos por toxinas ou neurofármacos, que possuem o sistema dopaminérgico do animal como alvo, os baseados na manipulação genética de genes associados à DP e outros, como os desenvolvidos após a injeção intracerebral de compostos derivados de α -sinucleína ou por transinfecção por vetores virais portadores de α -sinucleína (Merino Ruiz; Guimarães; Mortari, 2022). As toxinas mais comumente utilizadas em roedores para induzir DP são a MPTP e a 6-OHDA (Iancu *et al.*, 2005), porém, outras substâncias neurotóxicas, como a rotenona, o paraquat e o maneb, também têm sido utilizadas em pesquisa pré-clínica (Bové *et al.*, 2005). Quando os animais são expostos a elas, desenvolvem manifestações clínicas exuberantes associadas a uma extensa lesão dos neurônios dopaminérgicos na SN, mas nem todos os modelos neurotóxicos exibem agregações de α -sinucleína de forma consistente (Jackson-Lewis; Przedborski, 2007). Em contrapartida, vários modelos animais transgênicos que expressam α -sinucleína não apresentam manifestações clínicas de forma clara ou evidente neurodegeneração (Fleming; Fernagut; Chesselet, 2005).

1.12.1. O modelo de DP em roedores induzido pela infusão intracerebral de 6-OHDA

Atualmente, o modelo de DP em roedor induzido pela infusão intracerebral de 6-OHDA é a plataforma mais amplamente utilizada na pesquisa pré-clínica da DBS (Merino

Ruiz; Guimarães; Mortari, 2022). A 6-OHDA é uma substância neurotóxica que não atravessa a barreira hematoencefálica e que induz uma ampla degeneração do sistema nigroestriatal, ao ser absorvida por neurônios dopaminérgicos, logo após a sua injeção intracerebral. Ela gera extensa morte neuronal dopaminérgica pela produção de radicais livres, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ativação microglial (Tronci; Francardo, 2018).

O local da injeção intracerebral de 6-OHDA tem relevância no grau da degeneração dopaminérgica no animal. Lesões no feixe prosencefálico medial, ou MFB nas suas siglas em inglês (*Median Forebrain Bundle*), induzem uma morte neuronal dopaminérgica rápida na SN de 90-100% (Boix; Padel; Paul, 2015), mas injeções intraestriatais induzem uma morte neuronal progressiva, ao redor de 70% (Branchi *et al.*, 2010), permitindo, assim, o estudo também de abordagens neuroprotetoras.

Como todo modelo experimental, ele não é capaz de replicar todas os marcos característicos da doença, tanto clínicos como neuropatológicos, sendo os seus maiores limitantes, dentre outros, a não reprodução dos acúmulos de α -sinucleína e dos CL (Dauer; Przedborski, 2003). Entretanto, a sua validade como modelo experimental é reforçada ao identificar que resultados eletrofisiológicos obtidos em paciente portadores de DP, assim como em modelos de DP em NHP também foram reproduzidos em ratos que receberam uma infusão intracerebral de 6-OHDA. Dentre essas alterações encontram-se o aumento da atividade neuronal do NST, observada tanto em macacos que receberam MPTP por via intravenosa (Bergman *et al.*, 1994) como em ratos que receberam uma infusão intracerebral de 6-OHDA (Hollerman; Grace, 1992). Também foi identificada uma abundante atividade neuronal de disparo na banda β , inicialmente registada nos núcleos da base de portadores de DP (Brown, 2006) e replicada em modelos de DP em roedores induzidos por neurotoxinas (Delaville *et al.*, 2014). Outras publicações documentaram uma diminuição na atividade neuronal induzida pela DBS, tanto em modelos de DP em ratos induzidos por 6-OHDA (Benazzouz *et al.*, 2000), quanto em primatas que receberam MPTP (Meissner *et al.*, 2005), além de pacientes parkinsonianos (Filali *et al.*, 2004).

1.13. DBS nos roedores

Os parâmetros de estimulação de DBS oscilam em uma amplitude ao redor de 3 volts (V), ou correntes de 3 miliamperes (mA), frequências de 130 Hz e comprimentos

de pulso de 60 μ s por pulso (Moro *et al.*, 2002). Esses parâmetros são amplamente utilizados em estudos de DBS em roedores (Knorr *et al.*, 2022; Merino Ruiz; Guimarães; Mortari, 2022), com exceção da amplitude, que é o principal fator que define a quantidade de energia disponibilizada pelo circuito (Koss *et al.*, 2005).

As amplitudes de estimulação cerebral profunda em roedores, expressadas em dezenas a centenas de microamperes (μ A) (Knorr *et al.*, 2022; Merino Ruiz; Guimarães; Mortari, 2022), são, aproximadamente, dez vezes menores do que as utilizadas em humanos, expressadas em mA (Lozano *et al.*, 2002). Porém, em decorrência da grande diferença nas dimensões dos eletrodos de estimulação cerebral utilizados em humanos (com diâmetros de 6 mm²) e em roedores (com diâmetros de 1-100 μ m²), as densidades de corrente cedidas pelos circuitos menores são dez vezes maiores (Lozano *et al.*, 2002). Portanto, além das óbvias diferenças de tamanho e estrutura do encéfalo, é possível que as estruturas do sistema nervoso central de roedores moduladas pela DBS não sejam as mesmas que em humanos, pois os eletrodos menores usados nos primeiros geram alta densidade de corrente, com consequente maior capacidade de ativar fibras nervosas do que corpos celulares (Ashby, 2000).

Microeletrodos cônicos com pontas afiadas, com um raio da ponta de 1,5 micrômetros (μ m), concentram alta densidade de corrente elétrica não uniforme. Em contrapartida, eletrodos com uma área de superfície na ponta que seja maior do que 30 μ m de diâmetro podem alcançar uma distribuição quase uniforme de densidade de corrente ao longo da superfície do eletrodo (Mcintyre; Grill, 2001).

Ao selecionar cuidadosamente o material metálico do eletrodo a ser utilizado em modelos animais de roedores, priorizando o uso de materiais nobres, e controlando a amplitude da corrente, é possível obter um protocolo de estimulação seguro e de longo prazo em roedores, mantendo a densidade de carga elétrica abaixo de 30 μ C/cm²/fase, sem induzir lesões teciduais (Harnack *et al.*, 2004). Esse valor de densidade de corrente elétrica é o mesmo que o utilizado em humanos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) (FDA, 2017).

Portanto, é viável utilizar modelos de roedores de DP para estudar os efeitos induzidos pela DBS no tecido nervoso. Diversas experiências de neuromodulação invasiva em modelos de DP em roedores têm demonstrado respostas motoras semelhantes às observadas em seres humanos (Chang *et al.*, 2003; Darbaky *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004; Temel *et al.*, 2005).

1.14. A Neuroproteção como terapia para a DP

A neuroproteção é definida como a capacidade de retardar ou prevenir disfunções e morte neuronal, o que pode resultar em um atraso no início dos sinais da doença ou em uma progressão clínica mais lenta (Voss; Ravina, 2010). Os tratamentos atualmente disponíveis para a DP, sejam medicamentosos ou de outra natureza, conseguem proporcionar melhoria motora evidente nos pacientes. Entretanto, ao longo dos anos, os efeitos adversos decorrentes desses tratamentos começam a ser aparentes, com consequente queda na qualidade de vida (Lewitt; Fahn, 2016). Até o momento, não há evidências de que algum tratamento medicamentoso seja efetivamente neuroprotetor, apesar dos esforços significativos na busca por substâncias que possam interferir favoravelmente no processo patológico da doença (Mcfarthing *et al.*, 2023). Em contraste, nos modelos pré-clínicos, alguns protocolos experimentais conseguiram mostrar atividade neuroprotetora (Salamon *et al.*, 2020).

Tratamentos cirúrgicos ablativos e, de forma mais consistente, de neuromodulação invasiva, mostraram evidências de neuroproteção em modelos animais (Ashkan; Velicu; Furlanetti, 2022). Há evidências derivadas de estudos pré-clínicos em roedores de que a DBS estimula a liberação de fatores neurotróficos, remodela sinapses, inibe a apoptose, reduz a neuroinflamação e a excitotoxicidade glutamatérgica, além de aumentar a depuração de proteínas tóxicas mal enoveladas, proporcionando a neuroproteção (Mckinnon *et al.*, 2019).

No entanto, identificar evidências de neuroproteção decorrentes da DBS em seres humanos é um desafio diferente. A quase totalidade dos estudos focados em DBS não define a neuroproteção ou os efeitos modificadores da evolução natural da doença como objetivos principais de estudo (Ashkan; Velicu; Furlanetti, 2022). Além do mais, considerando o estágio da doença em que os pacientes são submetidos ao procedimento, geralmente entre 14 e 15 anos após o início dos sinais motores (Desouza *et al.*, 2013) e, após, pelo menos três anos de flutuações motoras (Merola *et al.*, 2015), pode ser mais difícil identificar a neuroproteção.

Nesse contexto, em que a significativa morte de neurônios nigrais no momento do diagnóstico clínico da DP (Fearnley; Lees, 1991; Marsden, 1990) pode limitar a identificação de uma eventual capacidade neuroprotetora em seres humanos, propôs-se realizar abordagens cirúrgicas mais precoces, instalando eletrodos de DBS em pacientes com menos tempo de evolução dos sinais parkinsonianos. Isso poderia preservar um

número maior de neurônios dopaminérgicos nigrais, reduzindo, conseqüentemente, a velocidade de progressão da doença (Desouza *et al.*, 2013).

Nessa linha, foram publicados alguns estudos que randomizaram pacientes com um menor tempo de início dos sinais motores e do início de flutuações motoras (Schuepbach *et al.*, 2013) ou até mesmo sem flutuações (Hacker *et al.*, 2020). Esses estudos, não isentos de críticas (Hariz, 2015), identificaram respostas motoras favoráveis, mas não sinais claros de neuroproteção. Algumas razões foram apontadas para justificar esses resultados, como discretas diferenças entre os grupos durante o período de seguimento, tamanho reduzido da amostra e, principalmente, limitações das ferramentas clínica utilizadas para identificar neuroproteção associada ao tratamento neuromodulador (Davidson *et al.*, 2024).

A ausência de neuroproteção induzida por DBS em seres humanos também é sugerida em outros dados da literatura, visto que o quadro clínico de pacientes com DP submetidos a DBS tende a piorar com o tempo, manifestando sinais resistentes à reposição dopaminérgica e à neuromodulação invasiva, o que resulta em uma conseqüente queda na qualidade de vida (Fasano *et al.*, 2010). Além disso, há relatos de piora motora rápida, por vezes dramática, e não controlável com ajustes medicamentosos após interrupção da DBS (Reuter *et al.*, 2015).

Foram feitas outras tentativas de identificar sinais de neuroproteção que possam não ser detectados por testes clínicos. Hilker e colaboradores (2005) avaliaram mudanças na função dopaminérgica estriatal pré-sináptica, utilizada como biomarcador da DP, em pacientes submetidos a DBS antes, seis meses após, e entre 12 e 36 após o procedimento cirúrgico. Eles observaram um declínio na função estriatal desses indivíduos ao longo do tempo, apesar de uma resposta motora favorável (Hilker *et al.*, 2005).

Embora não tenha sido identificada clara capacidade neuroprotetora associada à DBS, é importante notar que os pacientes tratados com neuromodulação invasiva apresentam, ao longo dos anos, menos psicose, menos quedas, menos institucionalização e uma maior sobrevivência em comparação aos pacientes que receberam tratamento clínico otimizado (Mahlknecht *et al.*, 2022), o que continua a motivar a busca por outras metodologias que possam identificar potenciais efeitos neuroprotetores associados ao tratamento de neuromodulação invasiva, com desenhos de estudos focados em identificar mudanças detectáveis (Davidson *et al.*, 2024).

1.15. O diagnóstico “biológico” da DP e a sua relação com a neuroproteção

Atualmente, há grandes esforços para deslocar temporalmente o diagnóstico da DP para as fases prévias ao aparecimento dos sinais motores. O reconhecimento dos sinais pré-motores e a sua sistemática abordagem (Molsberry *et al.*, 2022), juntamente com crescente arcabouço de ferramentas diagnósticas, que progressivamente ganham maior acurácia, focadas na disfunção dopaminérgica (Ikeda *et al.*, 2019) e no acúmulo de α -sinucleína (Bellomo *et al.*, 2022), tem levado a esforços para tentar identificar indivíduos em risco de desenvolver DP no futuro.

Um novo horizonte terapêutico para as estratégias neuroprotetoras foi aberto ao considerar a DP como um fenômeno neuropatológico contínuo, que engloba tanto indivíduos com sinais motores que definem a doença clinicamente quanto aqueles assintomáticos, mas que carregam mutações genéticas que aumentam o risco de desenvolver DP ou que apresentam discretos sinais pré-motores e alterações de biomarcadores da doença (Chahine *et al.*, 2023).

Ainda que esse horizonte seja distante, há, atualmente, um intenso debate sobre o caminho para alcançá-lo, considerando não apenas o diagnóstico da DP, mas também o desenvolvimento de métodos de classificação e de estadiamento com a estrutura necessária para detectar a doença nos estágios iniciais, abrindo a possibilidade de intervir na progressão ou mesmo no aparecimento dos sinais motores da doença (Cardoso *et al.*, 2024).

Esse caminho, que não será percorrido sem dificuldades, impactará radicalmente a sociedade, vista a relevância epidemiológica da DP no mundo. Dentre as dificuldades, podem ser citadas a necessidade de rigor técnico, de bases sólidas de evidência científica que sustentem os avanços e de questões éticas que envolvem dar um diagnóstico de uma doença degenerativa em um estágio no qual o indivíduo não identifica claros sinais motores e, provavelmente, não associa eventuais sinais não motores a uma queda na sua qualidade de vida, assim como impactos nos custos de saúde, sejam públicos ou privados (Cardoso *et al.*, 2024; Whitehouse, 2019). O estigma derivado do diagnóstico de doenças crônicas é relevante e não deve ser deixado de lado (O’donnell; Habenicht, 2022).

A oncologia foi a primeira a abordar uma doença em base a um sistema de estadiamento (Dukes, 1932). Assim como ocorre com o câncer, o avanço clínico da maioria das doenças é caracterizado por uma progressão em estágios, cada um exibindo complicações cada vez maiores, maior envolvimento sistêmico e pior prognóstico

(Conklin *et al.*, 1984). Desse modo, cada estágio deve receber um tratamento adequado (Berry, 2014).

À luz dos novos avanços, pode-se imaginar um cenário no qual exista a possibilidade de intervir na evolução natural da DP, antes mesmo do aparecimento dos sinais motores.

Ao considerar a possibilidade de identificar estágios pré-motores da DP, abre-se a oportunidade de adotar uma abordagem adequada para cada estágio, com o objetivo de evitar a evolução da doença ou retardar sua progressão para o estágio seguinte. Para isso, será necessário desenvolver protocolos de abordagem. Nos estágios iniciais, as intervenções certamente deverão ser menos invasivas. No entanto, diante de situações nas quais estratégias mais conservadoras não atinjam os objetivos desejados de conter ou mesmo reduzir a velocidade de progressão da doença, parece natural pensar em estratégias cada vez mais invasivas.

Considerando as ponderações acima, a neuromodulação invasiva poderia, em um contexto adequado, ter um papel em estratégias de neuroproteção em pacientes com diagnóstico “biológico” da DP, antes do aparecimento dos sinais motores. Nessa fase, os efeitos GABAérgicos, anti-inflamatórios e de plasticidade neuronal da DBS, entre outros, poderiam preservar neurônios dopaminérgicos da SN, alterando o curso da doença.

Desenvolveu-se este estudo para testar a hipótese de que uma neuromodulação cerebral profunda precoce, realizada de forma concomitante à indução do parkinsonismo, possa também exercer um efeito motor favorável, assim como induzir neuroproteção nos indivíduos submetidos ao procedimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo investiga o efeito preventivo do tratamento com DBS em modelo da DP induzido por 6-OHDA em camundongos, numa fase em que a degeneração do sistema nigroestriatal do indivíduo não esteja massivamente comprometida. O objetivo geral deste trabalho é interferir nos processos neurodegenerativos da DP, utilizando neuromodulação invasiva.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um dispositivo de DBS com as características adequadas para ser utilizado em camundongos após indução de hemiparkinsonismo pela injeção de 6-OHDA;
- b) Mensurar as mudanças de resistência elétrica do sistema encéfalo – eletrodo dos animais submetidos a DBS;
- c) Analisar a resposta motora em diferentes ensaios comportamentais (teste de desempenho motor pelo Rotarod e de assimetria pelo uso do teste do cilindro), após o uso da DBS no modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA;
- d) Avaliar o impacto da DBS nas alterações de massa corporal em camundongos hemiparkinsonianos.
- e) Avaliar o potencial neuroprotetor da DBS no modelo de DP desenvolvido pela injeção de 6 -OHDA em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. O dispositivo de estimulação cerebral profunda

Com o objetivo de realizar a estimulação cerebral profunda para avaliar os efeitos da neuromodulação invasiva em camundongos, foi desenvolvido um dispositivo de estimulação cerebral profunda em escala reduzida para adequar-se às dimensões do encéfalo do animal de experimentação (Figura 2).

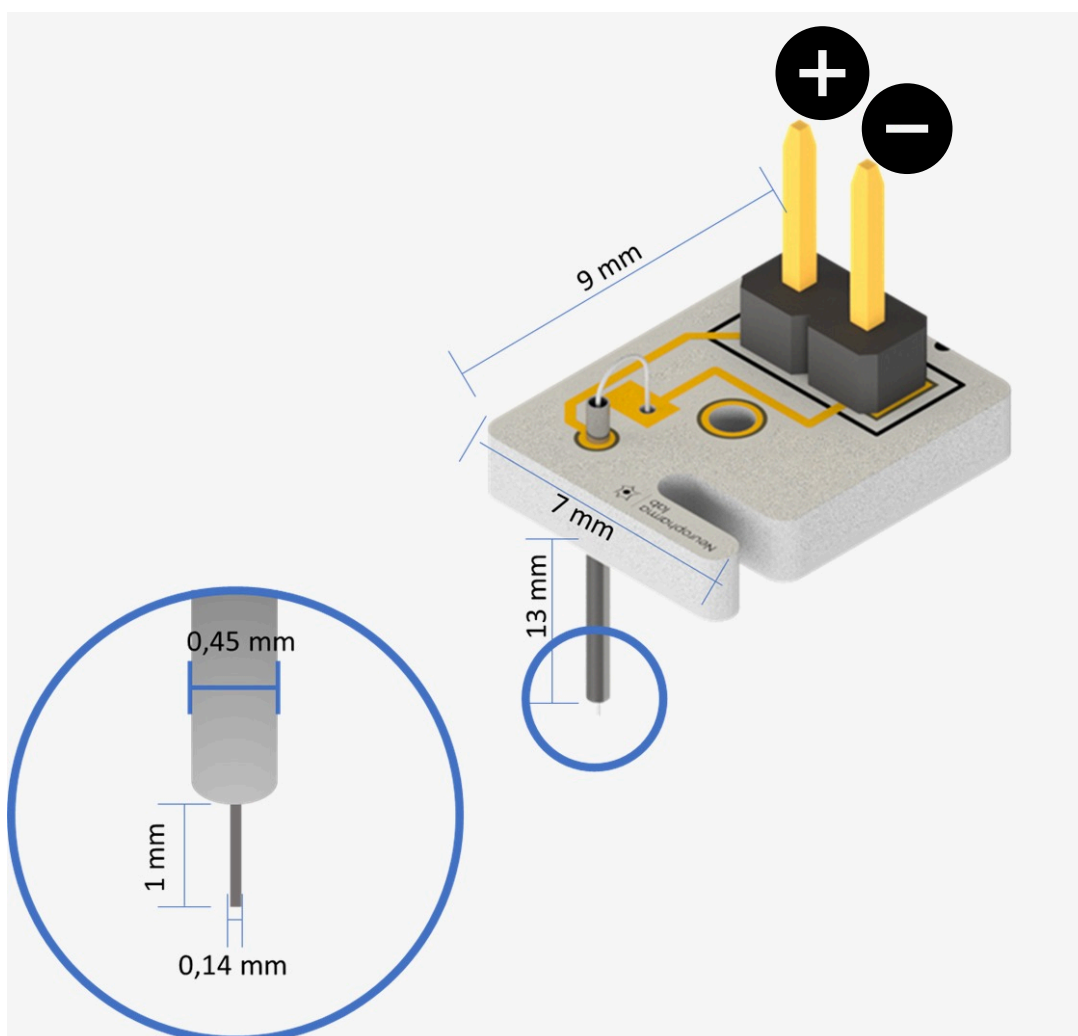


Figura 2 - Esquema do dispositivo de estimulação cerebral, com uma visão aumentada do eletrodo desenvolvido com agulha 26G e, dentro dele, fio de platina/irídio isolado

A confecção do eletrodo intracerebral do dispositivo de estimulação baseou-se em protocolos previamente publicados na literatura (Chang *et al.*, 2016; Spieles-Engemann; Collier; Sortwell, 2010; Tibar *et al.*, 2020). Utilizando como base esses estudos, desenvolveu-se um eletrodo bipolar concêntrico. Para tal, utilizou um fio elétrico de

platina e irídio encapado com material isolante, de 140 μm de diâmetro total e com 75 μm de diâmetro do material condutor. O fio foi colocado no interior de uma agulha hipodérmica romba de 13x0,45 mm (26G). O fio de platina e irídio encapado projetou-se 1 mm para além da borda da agulha romba (Spieles-Engemann *et al.*, 2010; Tobar *et al.*, 2020).

Experiências prévias demonstraram que esse tipo de eletrodo intracerebral permite a aplicação de protocolos de estimulação cerebral de alta frequência de maneira prolongada, sem causar lesões intracerebrais nos animais (Harnack *et al.*, 2004; Pol; Temel; Jahanshahi, 2021; Spieles-Engemann; Collier; Sortwell, 2010; Tobar *et al.*, 2020). A agulha romba, ao possuir uma configuração cilíndrica, aumenta a área da ponta do eletrodo e possibilita uma distribuição uniforme da densidade de corrente (Mcintyre; Grill, 2001). Definiu-se que a agulha seria o ânodo do eletrodo cerebral bipolar, e o fio de platina e irídio, o cátodo. Além de proporcionar a capacidade bipolar ao eletrodo, a agulha também serve como guia para evitar que o fio se dobre durante sua inserção através do encéfalo do animal durante o procedimento cirúrgico.

A seguinte parte do dispositivo de estimulação cerebral profunda era o circuito impresso desenvolvido para receber o eletrodo intracerebral na face ventral de um dos seus extremos. Na face dorsal do outro extremo, a placa recebeu dois conectores com distância de 2 mm entre eles. Esses conectores permitiram o acoplamento do circuito impresso ao estimulador elétrico.

Com o objetivo de estimular eletricamente o NST dos animais de experimentação e evitar o fator confundidor de respostas motoras favoráveis em decorrência de um efeito pós insercional (Lange *et al.*, 2023) ou de uma subtalantomia (Carvalho; Nikkhah, 2001; Paul *et al.*, 2004; Piallat; Benazzouz; Benabid, 1996; Rizelio *et al.*, 2010), definiu-se que o eletrodo intracerebral deveria ser locado em posição dorsal do NST, seja à altura dele, seja anterior ou posteriormente, a uma distância de no máximo 250 μm , sem atingi-lo diretamente. Foi previamente demonstrado que, nos parâmetros de estimulação definidos no protocolo, essa distância permite que o campo elétrico gerado pelo eletrodo de estimulação neuromodule o NST (Spieles-Engemann; Collier; Sortwell, 2010).

3.2. Animais

A manipulação dos animais experimentais seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei n. 11.794/2008). O projeto foi submetido ao CEUA-UnB e teve a sua aprovação sob o protocolo nº 035/2020 e o nº SEI: 23106.001886/2022-40.

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (20 a 35g), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os animais experimentais foram acondicionados dois por gaiola e mantidos em biotério com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura (22 °C) e umidade (55%) controladas. Durante todo o período experimental, foram oferecidas água e alimentação *ad libitum* (Guaraldo *et al.*, 2023).

Os animais foram alocados em três grupos experimentais por randomização simples (Figura 3).

- a) Grupo 1: Implantes de DBS, ativados, e lesão nigroestriatal à esquerda (6-OHDA + DBS), n = 20. Oito animais morreram durante o procedimento cirúrgico ou durante o protocolo, n=12. Após confirmação histológica da correta implantação do eletrodo, n = 6;
- b) Grupo 2: Implantes de DBS, inativos, e lesão nigroestriatal à esquerda (6-OHDA), n = 19. Cinco animais morreram durante o procedimento cirúrgico ou durante o protocolo, n=14. Após confirmação histológica da correta implantação do eletrodo, n = 8;
- c) Grupo 3: Sem implante de DBS e sem lesão nigroestriatal (Naive), n = 5.

Recorreu-se ao método da equação de recursos para determinar o tamanho da amostra no estudo (Campos *et al*, 2013). Esse cálculo considera que o erro residual deve estar dentro de uma faixa aceitável de graus de liberdade para garantir a validade estatística dos resultados (Charan; Kantharia, 2013). O intervalo aceitável de graus de liberdade para a variação do erro em uma análise de variância (ANOVA), denominada *E*, deve encontrar-se entre 10 e 20 (Arifin; Zahiruddin, 2017).

E é calculada com a seguinte equação:

E: Número total de animais - número total de grupos.

Com os animais utilizados nos três grupos do estudo (6 + 8 + 5 = 19), obteve-se um valor de *E* de 19 – 3 = 16, que atendeu o grau de análise de liberdade para a ANOVA

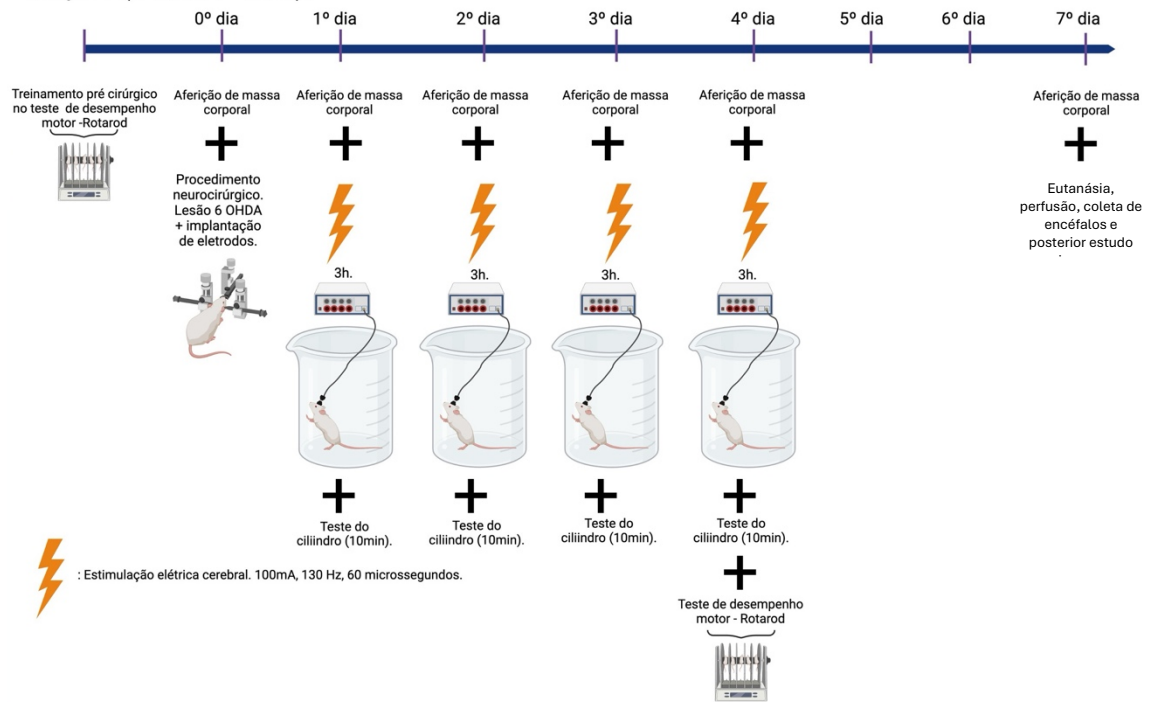
ao encontrar-se dentro do intervalo de 10 a 20 (Arifin; Zahiruddin, 2017; Charan; Kantharia, 2013).

Padronizou-se a nomenclatura dos dias nos quais os procedimentos contemplados no protocolo experimental aconteciam, detalhados a seguir (Figura 3):

- a) D0: dia zero. Dia de aferição de massa corporal e do procedimento cirúrgico para os grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA. Para o grupo Naive, o protocolo incluiu aferição de massa corporal;
- b) D1: primeiro dia do início do protocolo experimental, que incluiu aferição de massa corporal, DBS, teste do cilindro (detalhado posteriormente, no item 3.6.2) e registro em vídeo para os animais dos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA. Para os animais do grupo Naive, o protocolo incluiu aferição de massa corporal e registro de desempenho motor em vídeo no cilindro;
- c) D2: segundo dia do protocolo experimental, com os mesmos procedimentos realizados no D1;
- d) D3: terceiro dia do protocolo experimental, com os mesmos procedimentos realizados no D1;
- e) D4: quarto dia do protocolo experimental, com os mesmos procedimentos realizados no D1. Na sequência, os três grupos foram submetidos ao teste do Rotarod (detalhado no item 3.7.1);
- f) D7: sétimo dia após o início do protocolo experimental, quando era realizada novamente aferição de massa corporal, seguida da eutanásia, perfusão e coleta de encéfalos (detalhados em 3.8).

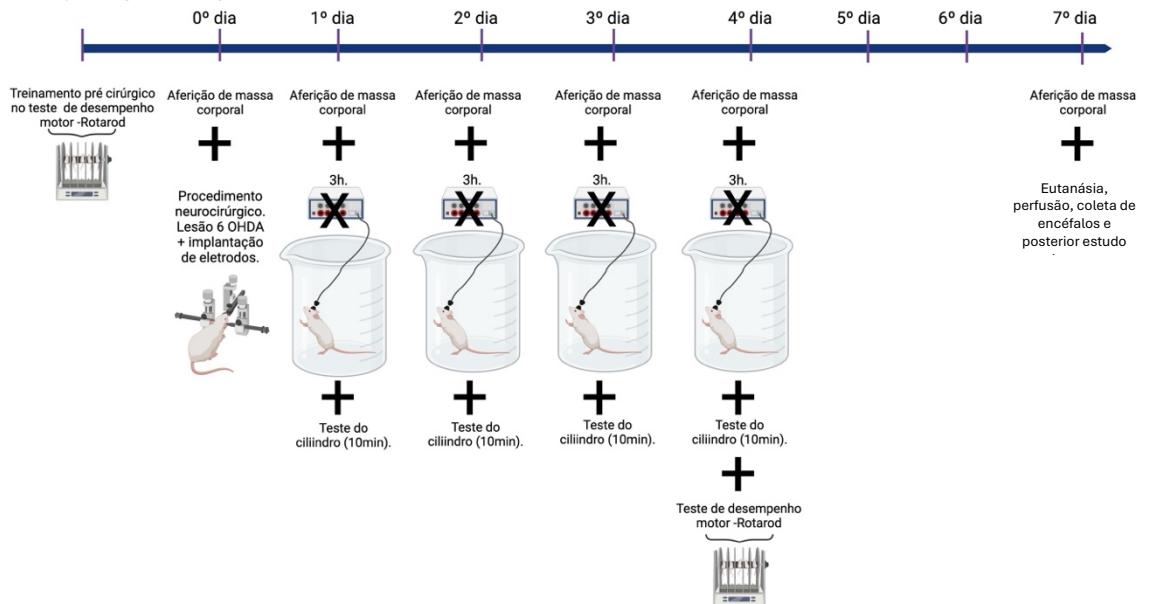
a)

Grupo 1 (6-OHDA + DBS).



b)

Grupo 2 (6-OHDA).



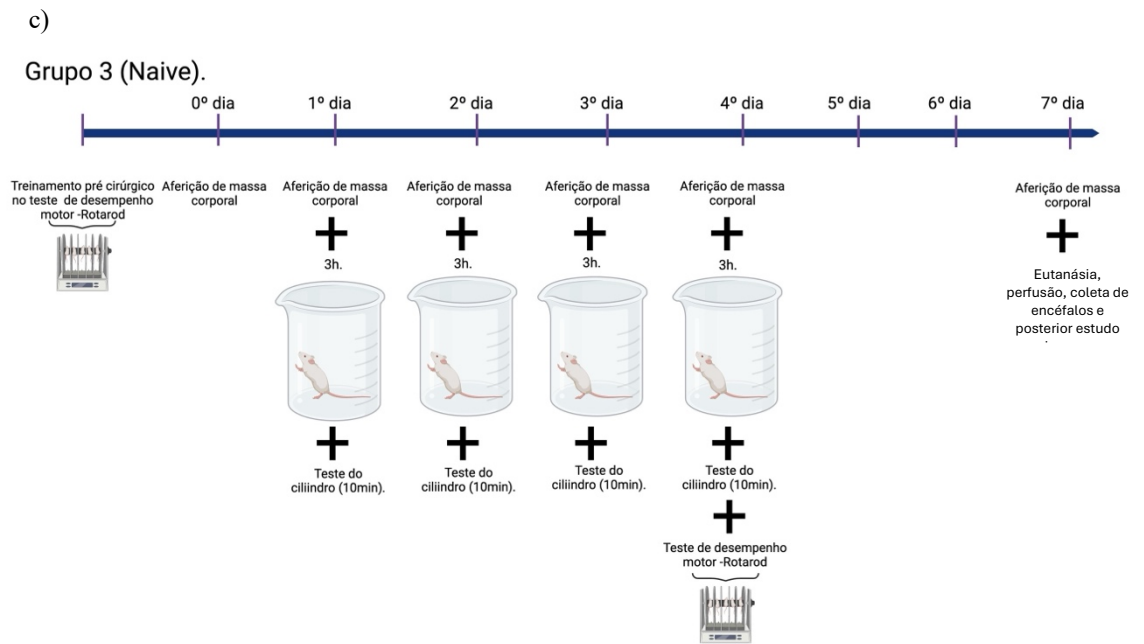


Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais utilizados na pesquisa - a) Grupo 6-OHDA + DBS, b) Grupo 6-OHDA e c) Naive.

3.3. Indução do modelo de hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA

Para a indução de parkinsonismo, a lesão nigroestriatal dopaminérgica foi gerada pelo protocolo previamente descrito (Conceição *et al.*, 2010), detalhado a seguir:

3.3.1. Anestesia e fixação no aparelho estereotáxico

Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 10% (Dopalen, Ceva®, Brasil, 90 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (Anasedan, Ceva®, Brasil, 10 mg/kg). Após verificar a insensibilidade aos estímulos nociceptivos, os animais foram fixados no aparelho estereotáxico (Bonther®, Brasil). Colocou-se solução fisiológica nas córneas dos animais para protegê-las do ressecamento.

3.3.2. Antissepsia e tricotomia

Foi realizada a antissepsia do dorso da cabeça dos animais com álcool iodado 0,1% e a tricotomia dos pelos utilizando uma tesoura cirúrgica.

3.3.3. Anestesia local

Uma solução de cloridrato de lidocaína 10 mg/mL com hemitartarato de norepinefrina 9,1 µg/mL (Lidostesim, Densply®, Brasil) foi aplicada por via subcutânea. Após a difusão do anestésico local, procedeu-se à exposição do crânio.

3.3.4. Assepsia do crânio

Uma solução de peróxido de hidrogênio 3% foi aplicada sobre a região exposta do crânio para reforçar a assepsia e expor as suturas cranianas, utilizadas como referência no procedimento estereotáxico.

3.3.5. Cálculo das coordenadas estereotáxicas

Utilizando como referência o atlas de Franklin e Paxinos (Paxinos; Franklin, 2019), foi definido o local correspondente à região dorsal do estriado esquerdo, onde foi inserida a agulha que infundirá a neurotoxina, assim como o local de perfuração do crânio para permitir a passagem da agulha. As coordenadas correspondentes à região dorsal do estriado esquerdo foram: +0,5 mm (antero-posterior), -2,0 mm (latero-lateral) e -3,0 mm (dorso-ventral), em relação à linha do bregma, que é o ponto de interseção da sutura sagital com a sutura coronal (Cecyn; Abrahao, 2023).

3.3.6. Infusão da solução de 6-OHDA

Em seguida, foi realizada a perfuração no crânio do animal no ponto de inserção da agulha que conduzirá a 6-OHDA ao seu alvo, utilizando uma broca (Dremel®, Brasil) previamente submersa em solução de álcool 70%.

Para infundir em cada animal 4 μL de uma solução de 6-OHDA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de base livre, Sigma®, Brasil), em um veículo de solução salina NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%, totalizando uma dose de 40 μg de base livre por animal (Biolchi *et al.*, 2020), utilizou-se uma seringa de alta precisão acoplada a um sistema de infusão. Esse sistema era composto por um fio de polietileno do diâmetro adequado para acoplar-se, em uma extremidade, a uma agulha 26G a ser inserida no encéfalo do animal, e na outra extremidade, à seringa de precisão de 10 μL de volume (Hamilton®, Estados Unidos da América). A agulha 26G, parte do sistema de infusão, foi acoplada a um braço do aparelho estereotáxico e locada no alvo. Para controlar a velocidade de infusão da droga a uma taxa de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$, a seringa Hamilton® foi por sua vez acoplada a uma bomba de infusão (AVS®, modelo BI-2008, Brasil). Após o término da infusão, a agulha 26G foi mantida no local por cinco minutos para evitar o refluxo fora do alvo definido (Amaral; Mortari, 2018).

3.4. Implantação do eletrodo de DBS

Imediatamente após a indução da lesão nigroestriatal, foram realizadas mais duas perfurações no crânio da camundongo com o uso de uma broca (Dremel®, Estados Unidos da América), uma à direita e outra à esquerda. A perfuração da direita recebeu um

parafuso com um diâmetro da cabeça de 1,4 mm, diâmetro da rosca de 1,0 mm e comprimento total de 2,6 mm, para funcionar como âncora para o dispositivo de estimulação profunda, visando reduzir os riscos de deslocamento. A perfuração à esquerda abriu caminho ao eletrodo cerebral, cuja ponta foi implantada dorsalmente ao NST, nas seguintes coordenadas estereotáxicas em relação à linha do bregma: -2,0 mm (antero-posterior), -1,5 mm (latero-lateral) e -4,5 mm (dorso-ventral) (Paxinos; Franklin, 2019) (Figura 4). Essas coordenadas foram adaptadas do protocolo utilizado por Spieles-Engelman (Spieles-Engemann *et al.*, 2010). Esses autores utilizaram um eletrodo bipolar com o segmento intracraniano igual ao desenvolvido nesta tese, com um fio de platina e irídio encapado com um material isolante dentro de uma agulha de aço inoxidável 26G, visando a região dorsal do NST de ratos para evitar que os efeitos aferidos nos animais não sejam em decorrência de uma lesão no NST (Carvalho; Nikkhah, 2001; Paul *et al.*, 2004; Piallat; Benazzouz; Benabid, 1996), mas na sua neuromodulação.

Após o procedimento cirúrgico, o eletrodo foi fixado no crânio com o acrílico dental autopolimerizante. Na sequência, os animais eram retirados do aparelho estereotáxico e mantidos em observação por duas horas, com temperatura corporal estável por uma placa de aquecimento regulada a 34 °C, desenhada para roedores pequenos (Guaraldo *et al.*, 2023) .

Ao término do procedimento, os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB sob as condições anteriormente relatadas. Após a recuperação da anestesia e durante todo o protocolo experimental, os animais receberam água e ração pastosa por via oral.

Para contornar a desidratação e desnutrição dos animais decorrentes da piora clínica grave após a indução do parkinsonismo, os animais receberam 0,3 ml de solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% via intraperitoneal após os ensaios diários e até a dia da eutanásia. Além disso, foi oferecido suplemento alimentar de aminoácidos e vitamínico, conteúdo colágeno hidrolisado, pantotenato de cálcio, cloreto de colina, vitamina B6, frutose, dextrose, L-triptofano, L-carnitina, L- lisina, vitamina B1, vitamina B12, levedura inativada, DL-metionina, cisteína, betaína, vitamina C, ácido nicotínico, taurina, L-glutamina, extrato de alcachofra, inositol, maltodextrina, benzoato de sódio, metilparabeno, goma xantana, aroma de baunilha e água (Glicopan Gold®, Vetnil, Brasil).



Figura 4 - Cirurgia estereotáxica para a infusão de 6-OHDA e fixação de parafuso no lado contralateral

3.5. O procedimento da DBS precoce

Os protocolos de estimulação cerebral profunda em roedores variam significativamente nos estudos, tanto no intervalo de tempo entre a indução do parkinsonismo e o início da estimulação cerebral. Na literatura, identificam-se protocolos que iniciam a estimulação dias ou até semanas após a lesão cerebral (Knorr *et al.*, 2022). A duração da estimulação também apresenta variações, com períodos que vão de três a cinco dias (Huotarinen *et al.*, 2019; Visanji *et al.*, 2015) até quatro a oito semanas (Knorr *et al.*, 2022).

Nesse estudo, propôs-se uma abordagem precoce, com a implantação do eletrodo de DBS logo após a indução da lesão nigroestriatal por 6-OHDA e com o início da neuromodulação invasiva 24 horas após a intervenção cirúrgica.

Para a DBS, adotaram-se parâmetros descritos na literatura para o modelo animal utilizando camundongo (Halpern *et al.*, 2014) e previamente descritos em estudos pré-clínicos (Campos *et al.*, 2020; Maesawa *et al.*, 2004; Spieles-Engemann *et al.*, 2010; Spieles-Engemann; Collier; Sortwell, 2010). Esses parâmetros são similares aos usados em seres humanos (Montgomery Júnior, 2016), exceto pela amperagem, que nos humanos é cerca de dez vezes maior (Lozano *et al.*, 2002).

Foram aplicados pulsos elétricos de alta frequência por ondas monofásicas quadradas de corrente constante, com uma frequência de 130 Hz, uma duração de pulso de 60 μ s e uma corrente de 100 μ A. O estimulador utilizado foi o modelo S88, Grass Telefactor®, Warwick, RI, EUA. O protocolo de estimulação consistiu em três horas diárias durante quatro dias, sempre no mesmo horário, entre as 14h e as 17h, iniciados no D1. Utilizou-se fios calibre 30G para conectar o estimulador aos eletrodos fixados no crânio dos animais. Os fios foram mantidos numa altura de 30 cm e foram segurados por um pedestal, sem restringir o movimento dos animais.

O estimulador emite voltagem constante e para verificar a quantidade de corrente entregue intracerebralmente, confeccionou-se um circuito conectado a um osciloscópio Fnirsi DSO-TC3, acoplado a uma sonda P6100. Esse arranjo permitiu calcular a resistência do sistema encéfalo – eletrodo, composto pela região dorsal do NST do camundongo e o eletrodo intracerebral, medida em ohms (R_2). Utilizando a lei de Ohm (Corrente: Voltagem/Resistência), definiu-se os valores de voltagem necessária em milivolts (mV) para entregar a corrente desejada ao sistema. Esse procedimento também assegurou que o estímulo cerebral estava efetivamente atingindo o alvo desejado (Figura 5).

A metodologia utilizada no estudo para a avaliação da resistência elétrica não foi previamente publicada nos modelos animais.

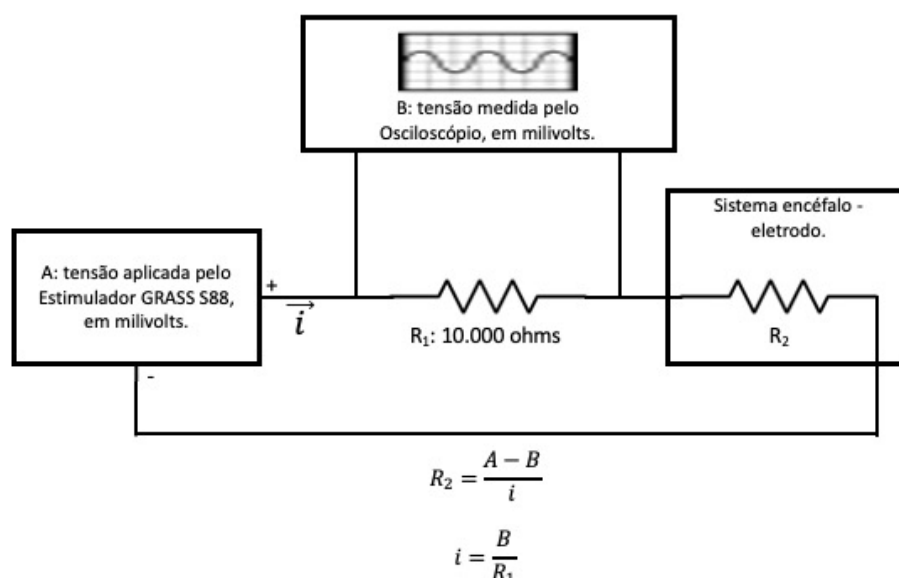


Figura 5 - Esquema do circuito de verificação da resistência (R_2) do sistema, assim como a definição da voltagem (i) necessária para entregar a amperagem definida

3.6. Massa corporal

Para quantificar as mudanças na massa corporal dos animais decorrentes das intervenções realizadas, foi aferida a massa corporal, em gramas, de todos os animais que foram pré-selecionados para serem inseridos no protocolo. Utilizou-se uma balança digital de alta precisão Kern 440-53 para todas as medições.

Nos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA, as aferições aconteceram no momento pré-cirúrgico (D0), antes da conexão ao estimulador elétrico, no D1, D2, D3 e D4 e antes da eutanásia, no D7. No grupo Naive, as aferições aconteceram no momento da seleção do animal para participar do protocolo, antes do teste do cilindro, no D1, D2, D3 e D4, bem como antes da eutanásia, no D7.

3.7. Ensaio comportamentais

Para quantificar o efeito da neuromodulação nas alterações motoras causadas pela lesão com 6-OHDA, foram realizados dois ensaios comportamentais, detalhados a seguir. No primeiro ensaio, avaliou-se a performance motora pelo teste do Rotarod. No segundo ensaio, avaliou-se a assimetria na movimentação dos animais utilizando o teste do cilindro.

3.7.1. Teste de Desempenho motor - Rotarod

Para o teste de desempenho motor, foi utilizado o aparelho Rotarod (Bonther®, Brasil), que consiste em uma barra cilíndrica giratória de 5 cm de diâmetro, distante 20 cm da base do aparelho. A barra gira a uma velocidade constante de 20 revoluções por minuto (rpm). O aparelho possui raias de 8 cm para a separação dos animais e conta com um sistema automatizado para medir o tempo de permanência na barra.

Para garantir que os animais apresentavam um desempenho motor adequado no Rotarod antes do início do protocolo experimental, e que a diferença no seu desempenho no teste foi decorrente da intervenção realizada, todos os camundongos foram pré-treinados na barra giratória antes da infusão de 6-OHDA. O pré-treino foi realizado por até dois dias consecutivos, nos quais os animais eram colocados no Rotarod até permanecer 300s na barra giratória. Se não atingissem esse tempo, descansavam por 5 minutos e, novamente, eram colocados na barra giratória até atingir o tempo alvo.

Somente os animais que permaneceram por 300 s foram pré-selecionados para o protocolo experimental.

No D4, os animais foram novamente colocados no Rotarod, imediatamente após a estimulação, por três vezes consecutivas. O tempo de permanência na barra foi registrado para cada tentativa, permitindo a avaliação de desempenho motor dos animais em resposta à neuromodulação.

3.7.2. Teste do cilindro

O teste do cilindro, ou teste de assimetria, foi desenvolvido para identificar assimetria no desempenho motor dos animais, considerando que as lesões em um hemisfério cerebral induzem um menor uso do membro contralateral. Para esse teste, utilizou-se um Becker de vidro com capacidade de 2 l, com uma base de 131 mm de diâmetro e uma altura de 180 mm. Os animais eram colocados no Becker, imediatamente após o período de 3 horas de duração do protocolo. Os seus movimentos foram registrados em vídeo durante por 10 min. Em cada um dos quatro dias de DBS, o número de contatos dos membros superiores dos animais com a parede do cilindro foi contabilizado, diferenciando o uso do membro ipsilateral (ilesos), contralateral (deficiente) e ambos (Figuras 3 e 6).

Para calcular a assimetria na exploração do ambiente, utilizou-se o coeficiente de assimetria proposto por Woodley e colaboradores. Esse coeficiente é calculado somando o número de contatos feitos pelo membro ipsilateral mais a metade do número de contatos com ambos os membros, dividido pelo número total de contatos tanto com o membro ipsilateral, contralateral e com ambos, multiplicado por 100.

Quadro 1 - Coeficiente de assimetria (Woodley *et al.*, 2008).

| | |
|-------------------------------|--|
| Coeficiente de assimetria: | $\frac{\text{Número de contatos com o membro ipsilateral à lesão} + \frac{1}{2} \text{ dos contatos com os dois membros.}}{\text{Número de contatos com o membro ipsilateral à lesão} + \text{contralateral} + \text{com os dois membros.}} \times 100.$ |
|-------------------------------|--|

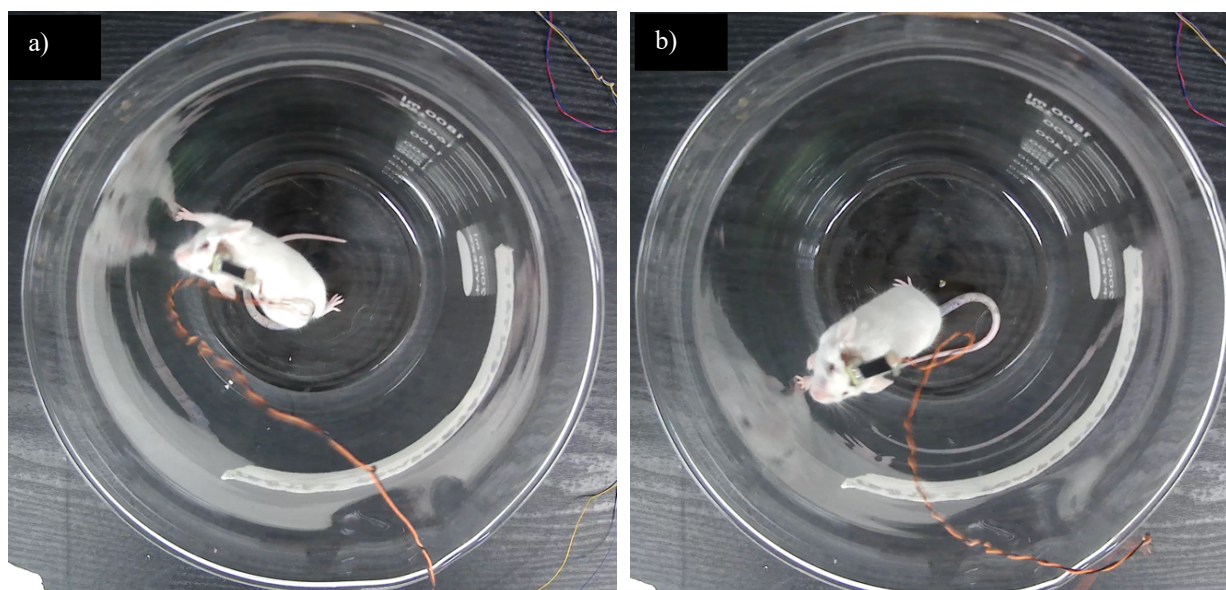
Um valor de 50% indica que o animal explora simetricamente o ambiente com ambos os membros. Pontuações mais altas (acima de 50%) indicam maior uso no membro ipsilateral (sadio) e pontuações mais baixas (abaixo de 50%) apontam um maior uso do membro contralateral (doente) (Woodlee *et al.*, 2008).

Além do coeficiente de assimetria, foi desenvolvido um novo índice para esse estudo: o Índice de Preservação da Motricidade (IPM). O IPM foi criado para quantificar o volume de movimento dos animais com o membro contralateral à lesão. O coeficiente é composto pelo número de vezes nas quais os animais fizeram contato na parede do cilindro com os dois membros, dividido por dois, somado ao número de contatos do membro superior contralateral à lesão.

Quadro 2 - Índice de Preservação da Motricidade (IPM)

| | |
|------|--|
| IPM: | $\frac{1}{2}$ do número de contatos com os dois membros + número de contatos com o membro contralateral à lesão. |
|------|--|

Essas medidas permitem uma avaliação detalhada da capacidade motora dos animais, proporcionando uma visão abrangente dos efeitos da neuromodulação na recuperação motora pós-lesão.



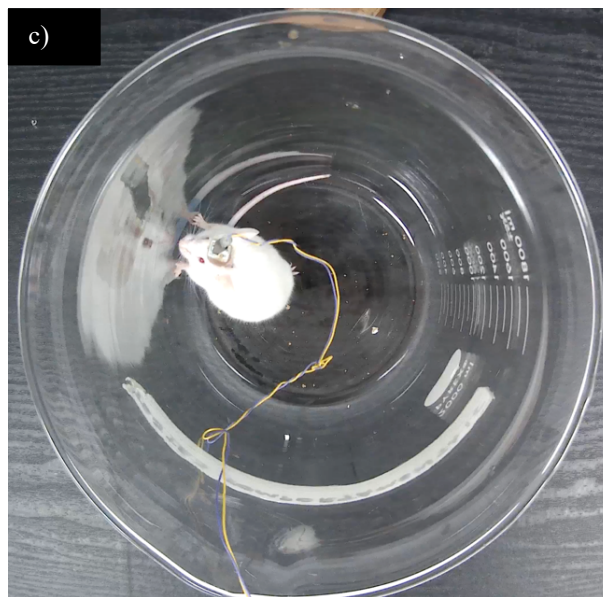


Figura 6 - a) Camundongo fazendo contato na parede do cilindro com a pata esquerda. b) com a pata direita e c) com as duas patas

3.8. Eutanásia

Após a finalização do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com overdose de fenobarbital administrada por via intraperitoneal. Os encéfalos foram extraídos e fixados solução de formaldeído 4% após perfusão com 10 ml de solução fisiológica 0,9% e mais 10 ml de uma solução de formaldeído 4% (Gage; Kipke; Shain, 2012). Posteriormente, os encéfalos foram armazenados para a realização de estudos histológicos e imuno-histoquímicos.

3.9. Processamento histológico

Os encéfalos dos animais eutanasiados foram retirados da solução de formaldeído 4% e colocados em solução de sacarose 30% (tampão fosfato 0.1M) por 24 horas. Em seguida, foram realizados cortes de uma espessura de 50 μ m por um vibrátomo (KD-400 Vibration Microtome, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental®). Os cortes foram feitos à altura da região do estriado, do NST e da SN. Após a obtenção, os cortes foram armazenados até o momento do processamento em um congelador a -20 °C, submersos em uma solução anticongelante, composta por tampão salino tamponado com fosfato (PBS), glicerol 30% e etilenoglicol 30% (Olmos; Hardy; Heimer, 1978).

3.9.1. Coloração de Nissl

Para a confirmação histológica da localização do eletrodo cerebral, os cortes correspondentes ao NST de cada animal foram submetidos à coloração de Nissl. A coloração de Nissl é uma técnica usada para destacar características estruturais dos neurônios sob microscopia óptica, comumente aplicado em estudos que envolvem morfologia e patologia de neurônios (Yurt *et al.*, 2018). O protocolo usado está descrito a seguir (Carneiro, 2017):

Os cortes histológicos correspondentes ao NST foram retirados da solução anticongelante e postos em um recipiente transparente de vidro contendo PBS. Em seguida, foram colocados em lâminas de microscopia previamente gelatinizadas. Cada lâmina continha até três cortes histológicos. Na sequência, foram alocados na estufa a 58 °C, por 30 minutos, para secagem.

Após, todo o procedimento da coloração de Nissl ocorreu em uma capela de fluxo laminar. Foram colocadas 12 lâminas de cada vez em um suporte de plástico e imersas em uma cuba contendo água destilada, por três vezes. Em seguida, foram submersas em uma cuba com a solução do corante de Nissl (Acetato de cresil violeta; Sigma-Aldrich®, Brasil), por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram imersas cinco vezes em água destilada e o excesso de corante foi retirado. Na sequência, foram submersas cinco vezes em solução de álcool etílico (Vetec®, Brasil) a 50 e a 70%.

Logo depois, os cortes foram rapidamente imersos em uma solução diferenciadora composta de 1 mL de ácido acético diluído em 100 mL de álcool etílico absoluto. Em seguida, foram submersos em soluções de etanol a 70, 96 e 100%. As lâminas permaneceram submersas em cada solução por um minuto.

Por último, as lâminas foram submersas em solução de xilol (Dinâmica®, Brasil) por um minuto. Finalmente, foram cobertas com lamínula de vidro. Para tal, cada corte recebeu uma gota do meio de montagem Entellan® (Merck®, Alemanha).

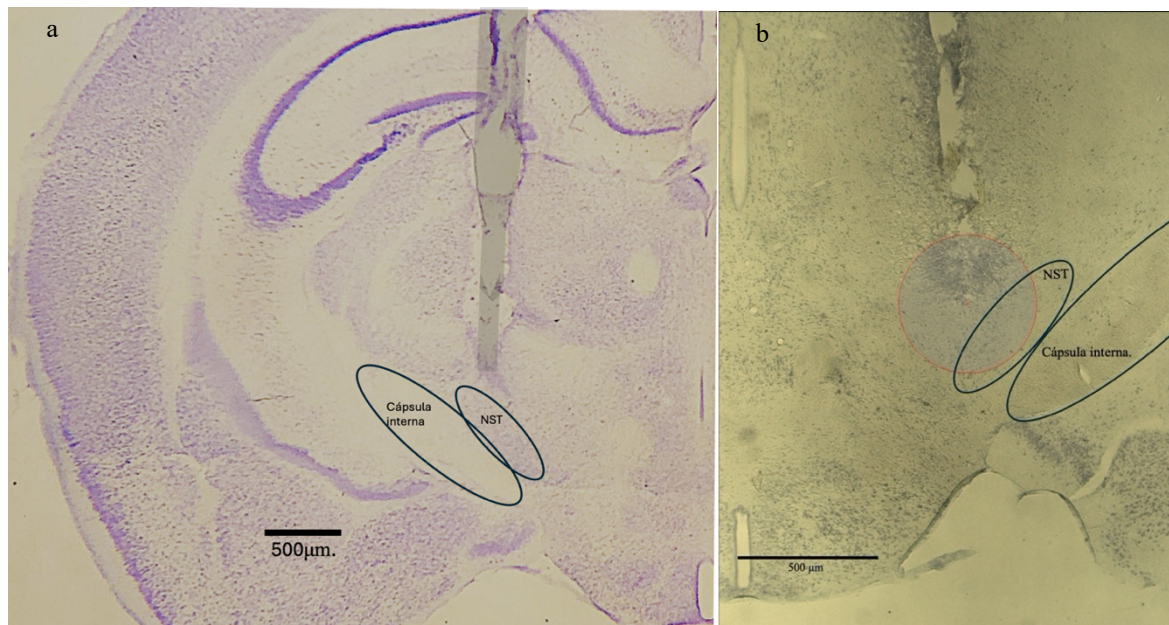


Figura 7 - Coloração de Nissl mostrando posição do eletrodo: a) no aumento 4X e b) no aumento 10X.

Nota: NST: Núcleo subtalâmico. O círculo vermelho representa o campo elétrico induzido pelo eletrodo, de 250 mm de rádio

3.9.2. Verificação histológica do local de implantação do eletrodo

Os cortes histológicos, corados pela técnica de Nissl, permitiram definir a localização real do eletrodo (Figura 7). Para tal, utilizou-se o atlas anatômico do encéfalo de camundongo (Paxinos; Franklin, 2019).

Para analisar as lâminas previamente coradas pela técnica de Nissl, foram realizadas microfotografias com aumento de 4x e 10x, pelo uso de um microscópio Zeiss® Axioskop 40 acoplado a uma câmera Axiocam 506 Color, que adquiriu imagens com o uso do software Zen - Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemanha).

3.9.3. Processamento imuno-histoquímico

Com o objetivo de quantificar a densidade das fibras neuronais dopaminérgicas estriatais assim como o número de neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc dos camundongos, os cortes histológicos correspondentes a essas regiões cerebrais foram submetidos a um processamento imuno-histoquímico com marcação da presença da enzima Tirosina Hidroxilase (TH). A TH é a enzima limitadora da taxa de síntese de

dopamina, amplamente utilizada como um marcador de neurônios, axônios e terminais dopaminérgicos (Daubner; Le; Wang, 2011; Morigaki; Goto, 2016; Moss; Bolam, 2008).

Para tal, modificou-se um protocolo previamente utilizado para marcação de outros antígenos no laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília (NOLLI et al., 2020). O protocolo utiliza uma técnica de marcação imuno-histoquímica denominada Peroxidase- Anti Peroxidase, na qual são utilizadas três fases: o anticorpo primário, dirigido contra o antígeno a ser marcado, no caso, a TH; o anticorpo secundário, dirigido contra a imunoglobulina da espécie animal em que foi produzido o anticorpo anterior, que serve como ponte, e o Complexo Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP), que evidencia a presença de TH com uma coloração marrom, após expor esse conjunto a um peróxido de hidrogênio (Ferro, 2014) (Figura 8).

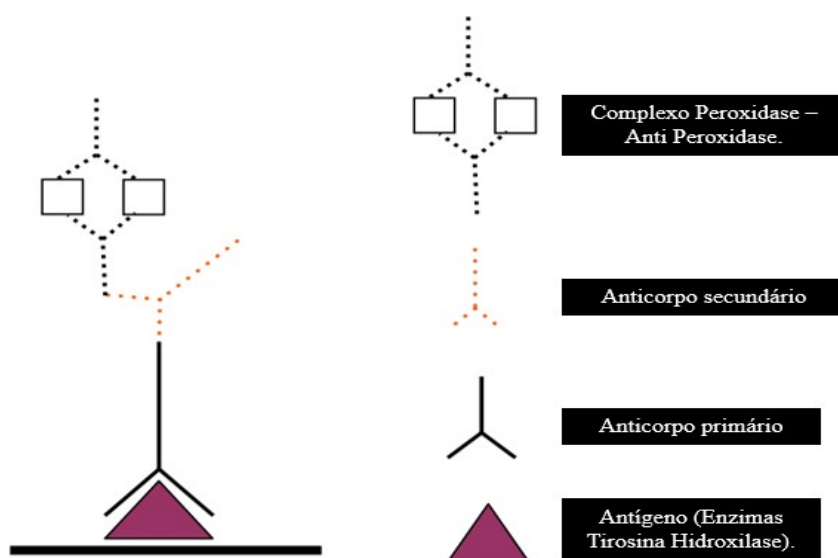


Figura 8 - Representação esquemática da reação imuno-histoquímica - Complexo Peroxidase – Anti Peroxidase para a detecção de TH. Adaptada de Katikireddy e O’Sullivan (2011)

O processamento dos cortes correspondentes aos estriados e à SN dos animais foi iniciado colocando três cortes de cada região cerebral de cada animal, tanto do lado direito como do lado esquerdo, numa poça, com 500 μ L de tampão salino tamponado com fosfato (PBS), por cinco minutos, por três vezes.

Após finalizar essa fase e com o objetivo de facilitar a exposição antigênica, as poças receberam uma solução de citrato de sódio numa concentração de 10 nM e, após serem seladas hermeticamente, foram colocadas em banho maria a 80 °C por 20 minutos.

Em seguida, foram retiradas para esfriarem em temperatura ambiente. Concluída essa fase, os cortes foram novamente submersos por cinco minutos em PBS, por três vezes.

Na sequência, os cortes foram colocados em solução de bloqueio de peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio a 3%), por 30 minutos, com o objetivo de excluir o efeito de peroxidases endógenas na marcação imuno-histoquímica.

Para solubilizar proteínas de membranas no seu estado nativo, permitindo uma maior exposição dos antígenos, os cortes foram colocados por trinta minutos em solução de PBS associado ao detergente Triton X-100, numa concentração de 0,8% (PBST 0,8%), por duas vezes.

A seguir, para induzir o bloqueio de ligações inespecíficas, os cortes permaneceram em incubação por 30 minutos numa solução de albumina de soro bovino a 1%, leite em pó Molico ao 10%, glicina 0,3M e detergente Triton X-100 a 0,3%.

Logo após, procedeu-se à marcação do anticorpo primário que marcará a TH, deixando os cortes por 48 horas em agitação constante, a 4°C, numa solução de albumina de soro bovino a 1%, detergente Triton X-100 ao 0,3%, PBS e o anticorpo primário policlonal contra TH produzidos em coelho (Abcam®, Reino Unido), em uma diluição de 1:1000 (10 µL para 10ml de solução).

Terminado esse processo, os cortes foram submersos por 15 minutos em solução de PBS, por duas vezes.

Na sequência, foram incubados numa solução contendo 10 µL de anticorpo secundário (Anti-Rabbit IgG; Sigma-Aldrich® B8895, Brasil) e 10 mL de PBST ao 0,3% por 2h, em temperatura ambiente e agitação constante, para marcar o anticorpo primário.

Após, os cortes foram submersos por 15 minutos em solução de PBS, por duas vezes, e incubados em solução de Complexo Peroxidase – Anti Peroxidase (PAP; Sigma-Aldrich®, P3039, Brasil) por uma hora e 30 minutos, em temperatura ambiente e sob agitação constante.

Concluída essa fase, os cortes foram novamente submersos por 15 minutos em PBS, por duas vezes. Em seguida, foram submersos em uma solução de 3,3'-diaminobenzidina tetro hidrocloreto (DAB) a 0,06%, por dez minutos. Logo após, a solução anterior foi desprezada e substituída por uma solução de DAB e água oxigenada (H₂O₂) a 0,03%, por dez minutos.

Na sequência, os cortes foram submersos por cinco minutos em PBS, três vezes.

Terminada essa fase, procedeu-se à montagem das lâminas de microscopia. Foram colocados até três cortes histológicos por lâmina, previamente gelatinizada. Após

secarem, as lâminas foram rapidamente mergulhadas, cinco vezes, numa solução de álcool etílico (Vetec©, Brasil) 70%. Continuando o processo de desidratação dos cortes previamente colocados nas lâminas de microscopia, eles foram submersos por 60 segundos na seguinte sequência de soluções: álcool 92%, álcool 100%, álcool 100% novamente e em duas soluções de Xilol 90% (Dinâmica®, Brasil), cada uma por um minuto. Finalizada essa fase, foi colocada em cada corte histológico uma gota do meio de montagem Entellan® (Merck©) e, após, fixou-se a lamínula.

As lâminas de microscopia foram então armazenadas em local fresco, longe da luz solar, para secagem e posterior análise.

3.10. Processamento das imagens

3.10.1. Contagem de células com marcação positiva para enzima TH

As microfotografias das lâminas de imuno-histoquímica também foram realizadas utilizando o microscópio Zeiss® Axioskop 40 acoplado a uma câmera Axiocam 506 Color, que adquiriu imagens com o uso do software Zen- Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH). As imagens foram obtidas utilizando os mesmos parâmetros e condições de luminosidade.

Para quantificar o número de neurônios dopaminérgicos nigrais, contabilizaram-se as células que apresentaram uma marcação positiva para a enzima TH (TH+) na SNpc. Para tal, foram obtidas microfotografias em pares, com aumento 40x da região medial, central e lateral dessa região, tanto do lado direito como do lado esquerdo do encéfalo dos animais. Para identificar a SNpc, procurou-se uma estrutura ovoide com o maior eixo no plano horizontal, dorsal ao pedúnculo cerebral, entre os cortes nas coordenadas do Bregma -2,9 e -3,7 no eixo antero-posterior (Paxinos; Franklin, 2019). Essa estrutura ovoide, correspondente à SN, é composta principalmente pela SNpr. Na região dorsal da SN, há um grupamento de neurônios que assumem um formato de uma gota alongada, com o maior diâmetro na região ventro-medial, que se alonga e se estreita em direção dorso lateral, correspondente à SNpc (Jackson-Lewis *et al.*, 2000).

Há outra região que contém um importante grupo de células TH+ nessa região, localizado medialmente à SNpc, denominada Área Tegmental Ventral, ou VTA nas suas iniciais em inglês (*Ventral Tegmental Area*). Para diferenciá-la da SNpc, identificou-se o Núcleo Medial Terminal do Trato Óptico Acessório (NMT). O NMT foi usado como um

divisor entre o SNpc, localizado lateralmente a ele, e a VTA, localizado medialmente a ele (Krashia *et al.*, 2017) (Figura 9a).

Quando o NMT não era identificado, delimitava-se uma linha no sentido vertical a partir da borda medial do pedúnculo cerebral e se assumiu que o grupamento de neurônios laterais a essa linha, em formato de gota alongada, correspondia à SNpc (Muthane *et al.*, 1994) (Figura 9b).

Esse método permitiu uma análise precisa da localização e contagem dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, fundamental para a quantificação dos efeitos da neuromodulação no modelo experimental de lesão dopaminérgica.

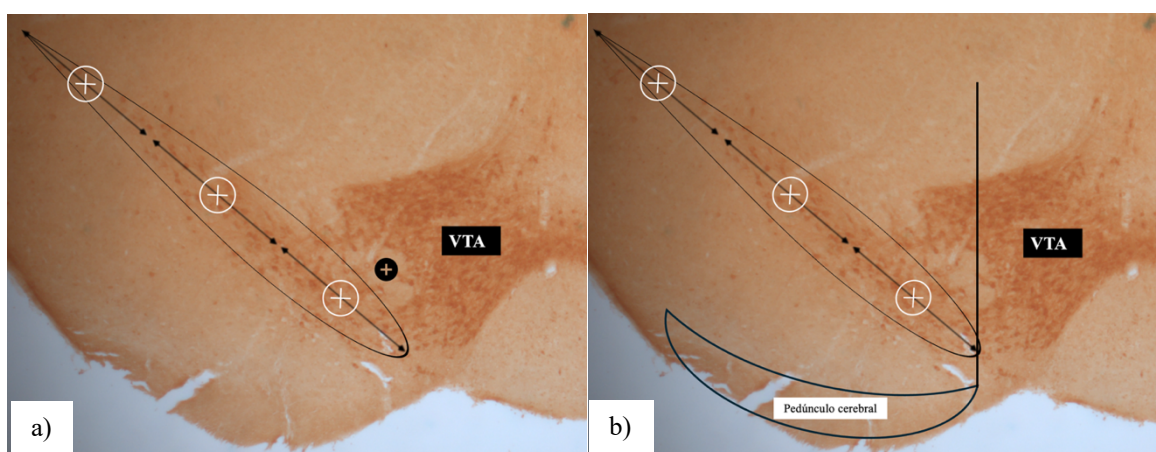


Figura 9 - Identificação e divisão da SNpc: a) quando o NMT é identificado e b), quando não foi identificado, recorreu-se à identificação do pedúnculo cerebral

Nota: ●: NMT. VTA: Área Tegmental Ventral. ⊕ : Local onde foi feita a microfotografia

Cada par de microfotografias foi obtido exatamente da mesma região, porém com uma discreta diferença alcançada pelo botão micrométrico do microscópio, procurando identificar o maior número de células no corte. As imagens foram processadas pelo software FIJI/ImageJ (versão 2.14.01, National Institute of Health) (Schindelin *et al.*, 2012). O software permitiu colocar cada par de imagens uma ao lado da outra no eixo horizontal, transformá-las de um formato RGB (*Red, Green and Blue*) de 32-bits para uma imagem em branco e preto de 8-bits, assim como para modificar o contraste com o objetivo de poder identificar de forma mais eficaz as células TH⁺. O software também permitiu aplicar de forma automatizada uma grade para dividir cada imagem em 7 segmentos no eixo horizontal e 5 no vertical (Figura 10).

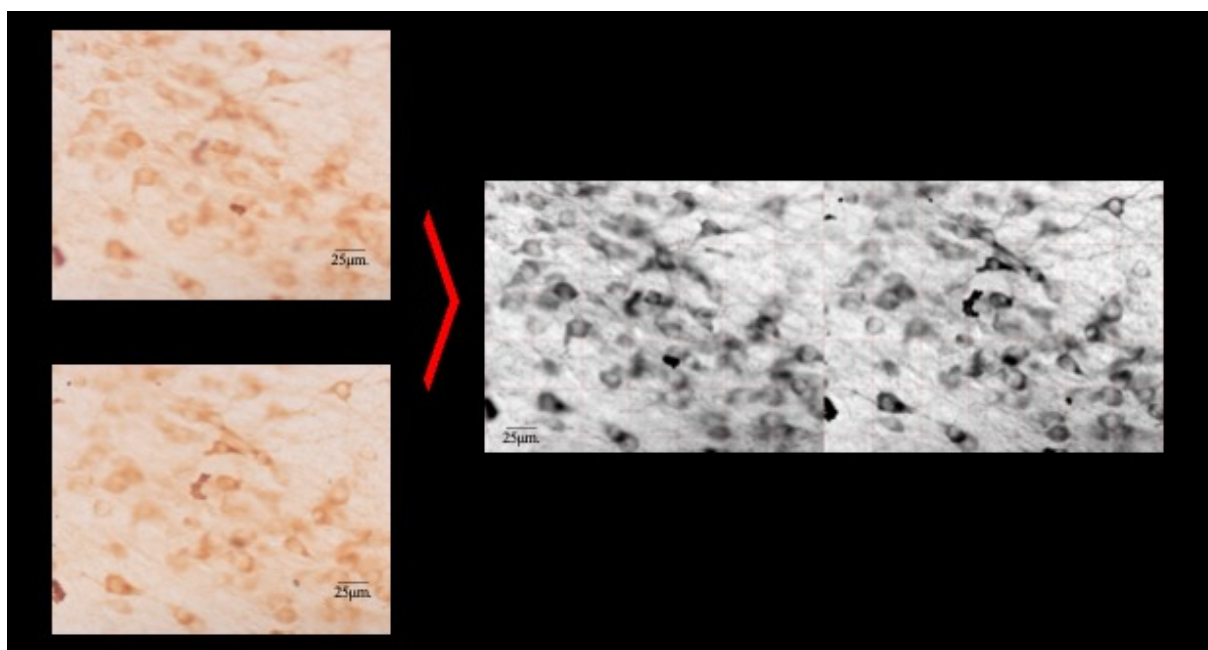


Figura 10 - Processamento de imagens. À esquerda, duas imagens do mesmo setor da SNpc, com foco discretamente diferente. À direita, o processamento das imagens, sendo colocadas uma ao lado da outra, transformada numa escala de cinzas e colocada uma grade para facilitar o processo de contagem de neurônios

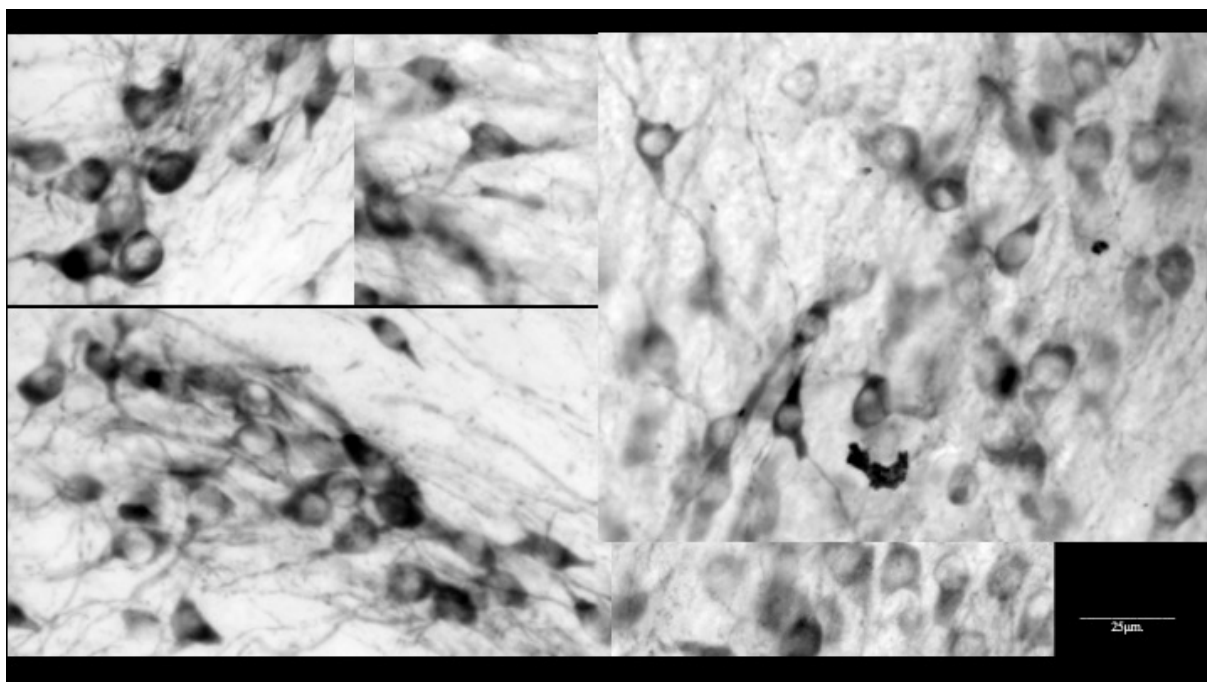


Figura 11 - Células TH+, compatíveis com neurônios dopaminérgicos

O software também permitiu calibrar as imagens para obter as dimensões reais das microfotografias (Ferreira; Rasband, 2012), possibilitando a seleção de células TH+

com pelo menos de 10 μm de diâmetro, compatíveis com neurônios dopaminérgicos (Nelson *et al.*, 1996). Considerou-se, para a seleção dos neurônios, a presença de prolongações a partir do corpo celular que sejam compatíveis com dendritos ou axônios (Figura 11).

A identificação dos neurônios devia poder ser confirmada nas duas imagens para descartar que sejam decorrentes de artefatos durante a realização do processo imunohistoquímico (Figura 12).

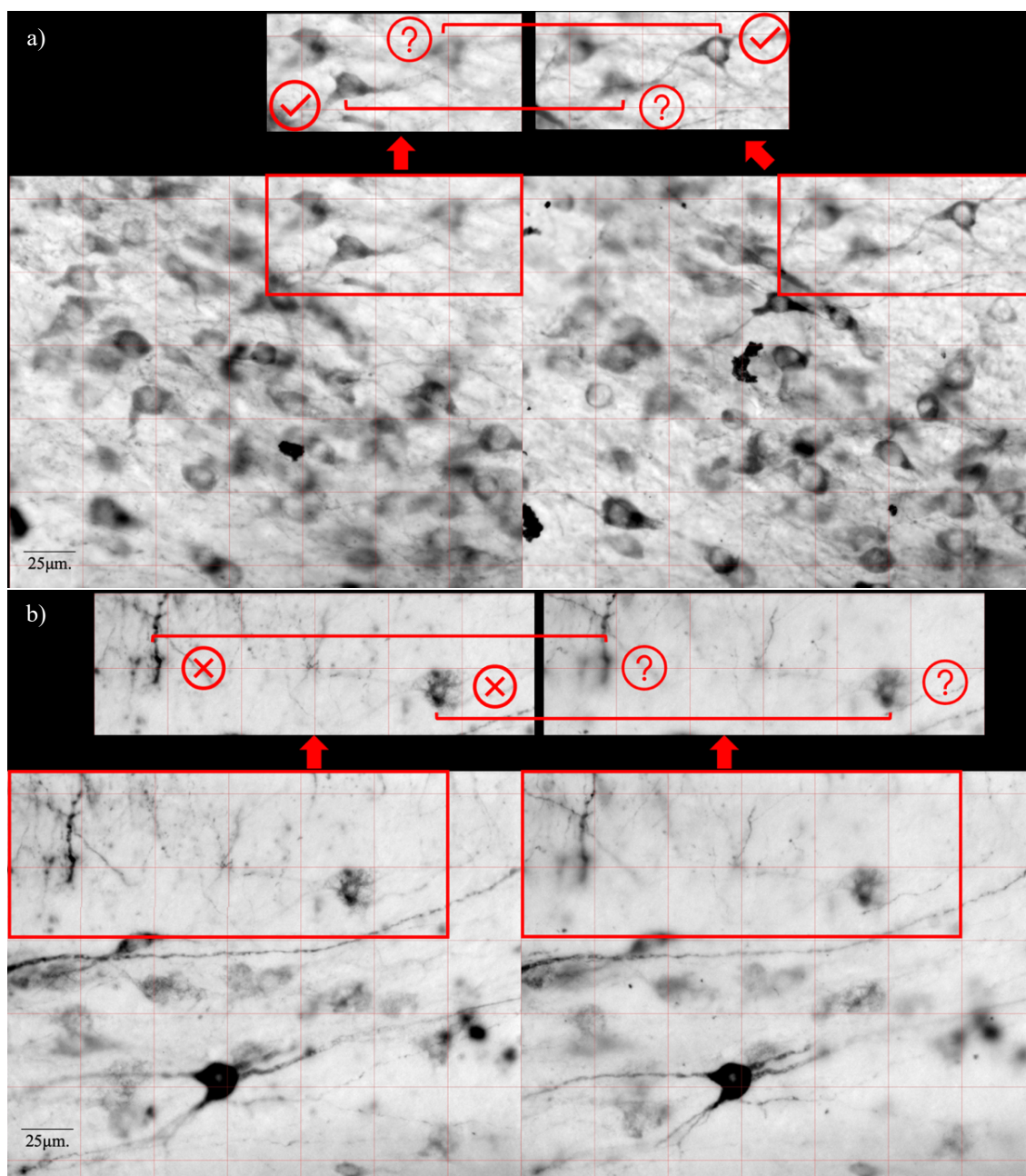


Figura 12 - Processo de reconhecimento neuronal: a) Reconhecimento positivo; b) Reconhecimento negativo

que o preto mais escuro é representado por 0 e o branco mais claro é representado pelo 255 (Gonzalez; Woods, 2008).

Pela lei de Beer-Lambert, que estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução, ou a sua capacidade de absorver luz, e a sua concentração (Lima, 2013), é possível aferir a concentração de uma substância num tecido após ser fotografado e processado como uma imagem em branco e preto. Isso é particularmente verdadeiro na imunofluorescência, em que durante a exposição dos cortes histológicos processados a comprimentos de onda específicos, as microfotografias originalmente capturadas em cores são convertidas para imagens em preto e branco. A escala média de cinzas resultante, variando de 0 a 255, reflete a intensidade da fluorescência, sendo valores mais altos correlacionados com uma maior concentração de fluoróforos na amostra aferida (Hartig, 2013).

Na técnica imuno-histoquímica com cromóforos como o DAB, o processo é diferente. O DAB dispersa energia em vez de absorvê-la, o que teoricamente implicaria que esse cromóforo não segue estritamente a Lei de Beer-Lambert (Hartig, 2013). No entanto, experimentalmente, a concentração dos antígenos marcados por DAB mostra correlação com a densidade óptica (DO) calculada nas microfotografias após o processamento de imagens (Helps *et al.*, 2012). Nessa situação, maiores concentrações do DAB serão paradoxalmente mostradas na escala de cinzas por valores mais baixos da escala de 0 a 255. Para transformar essa relação inversa em uma relação direta, há a necessidade de estabelecer uma relação entre a DO e a escala de cinzas (Durnyak *et al.*, 2023).

Assim, utilizou-se o software FIJI/ImageJ para aferir a escala média de cinzas nas microfotografias digitais obtidas e, após calibração (Ferreira; Rasband, 2012), esses valores foram convertidos em valores de densidade óptica (DO), que se correlacionam diretamente com a densidade da marcação TH+ nas imagens.

Para avaliar a assimetria na marcação TH+ nos estriados, foi realizada uma comparação *intragrupo* dos valores de DO entre os estriados esquerdo e direito, tanto do grupo 6-OHDA + DBS como do grupo 6-OHDA.

Com o objetivo de aferir o grau de assimetria na marcação de TH+ *intergrupo*, porém de uma forma que eventuais artefatos de aquisição das imagens não interfiram nessa comparação, foi proposto o cálculo de um coeficiente denominado “DO E/D”. Esse coeficiente é derivado da relação matemática entre a DO aferida no estriado esquerdo

(lesionado) e no estriado direito (sadio) de cada animal em ambos os grupos. A equação utilizada para calcular o coeficiente DO E/D é a seguinte:

Quadro 3 - DO dos valores aferidos no estriado esquerdo e divididos pelos do estriado direito (DO E/D)

| | |
|---------|--|
| DO E/D: | $\frac{\text{DO estriado esquerdo (lesionado)}}{\text{DO estriado direito (sadio)}}$ |
|---------|--|

3.11. Análises estatísticas

Todos os dados foram apresentados como média \pm SEM, exceto pelos valores de resistência elétrica, expressos em um gráfico de caixa, mostrando todos os valores.

O teste de Shapiro – Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados.

Para quantificar o tamanho do efeito de uma intervenção, avaliando o tamanho da diferença entre duas médias, foi utilizado o g de Hedges (Goulet-Pelletier; Cousineau, 2018).

3.11.1. Análise de dados paramétricos

Para comparar as diferenças entre três ou mais grupos, utilizou-se o teste de ANOVA de uma via. As variâncias foram comparadas pelo teste de Bartlett e se fossem estatisticamente diferentes, foi utilizado o teste de ANOVA, com a correção de Welch.

Para as comparações entre dois grupos com dados não pareados, as variâncias foram comparadas pelo teste F. Na ausência de diferença significativa entre as variâncias, seria utilizado o teste t de Student. Caso contrário, seria aplicado o teste t com correção de Welch.

Para as comparações entre dois grupos com dados pareados, utilizou-se o teste t de Student pareado.

Também foi utilizado teste de ANOVA de Duas Vias para analisar diferenças dentro dos grupos. Quando a esfericidade dos dados não fosse atendida, com um ϵ menor que 1, foi utilizada a correção de Geisser Greenhouse.

3.11.2. Análise de dados não paramétricos

Para as comparações entre dois grupos que não seguiram distribuição normal, utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

O comportamento da resistência em função do tempo do sistema encéfalo-eletrodo foi analisado por uma regressão linear simples.

As análises estatísticas, assim como a confecção de gráficos, foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 10.0 (Massachusetts Institute of Technology - MIT, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento do dispositivo de estimulação cerebral profunda

O dispositivo de estimulação cerebral profunda foi produzido integrando três partes, um eletrodo intracerebral (a), os conectores (b) e o circuito impresso (c) (Figuras 2, 14 e 15).

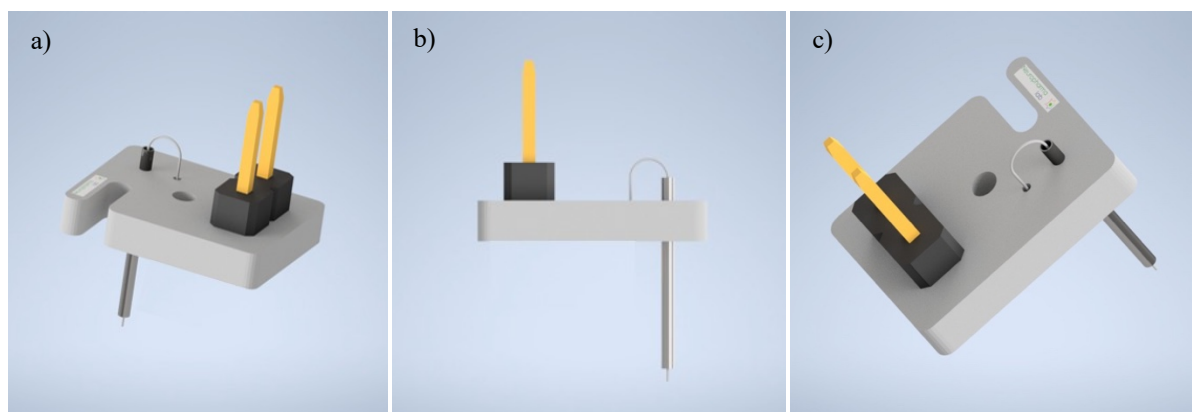


Figura 14 - Eletrodo em 3D: a) na perspectiva supero lateral direita (b) lateral esquerda e c) e supero lateral esquerda

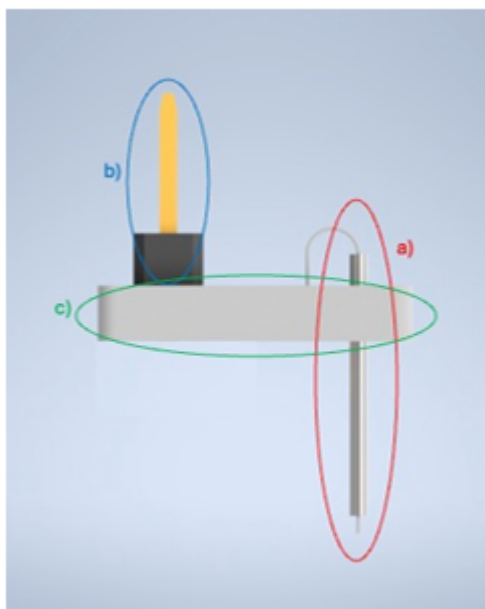


Figura 15 - Vista lateral do dispositivo de estimulação cerebral profunda, mostrando a) o eletrodo, b) o conector e c) o circuito impresso

4.1.1. Primeira fase: confecção do eletrodo intracerebral

O eletrodo intracerebral foi confeccionado utilizando um produto pré-manufaturado pela A-M Systems®, empresa sediada nos Estados Unidos da América. O produto específico utilizado, identificado no catálogo da empresa com o código 777000, é um fio de platina e irídio encapsado com material isolante. Este fio possui um diâmetro total de 140 μm (material condutor e o isolante) com o diâmetro do material condutor de medindo 75 μm .

Para confeccionar um eletrodo bipolar concêntrico a partir desse fio, uma seção de aproximadamente 2 cm dele foi inserida no interior de uma agulha hipodérmica descartável 13x0,45 mm (26G). A ponta da agulha foi cuidadosamente cortada com uma mini serra, deixando-a com a ponta romba para simular um cilindro.

4.1.2. Segunda fase: conectores

Para que o dispositivo de DBS pudesse modular estruturas cerebrais profundas do encéfalo de um camundongo por eletricidade, foi necessário desenvolver uma forma de conectar o dispositivo a uma unidade de estimulação elétrica externa.

4.1.2.1. Adaptação ao estimulador elétrico

O estimulador elétrico utilizado foi o modelo S88, manufaturado pela empresa Grass Telefactor®, localizada em Warwick, RI, Estados Unidos da América. A saída do estimulador foi adaptada para uma saída fêmea que acomoda dois pinos metálicos condutores, espaçados 2mm entre si.

4.1.2.2. Instalação dos conectores

Para conectar o dispositivo de DBS ao estimulador, foram instalados dois pinos metálicos condutores, também afastados 2 mm um do outro, em um local previamente definido na face dorsal do dispositivo de DBS, no extremo oposto ao local em que o eletrodo foi soldado. Essa configuração assegurou que os pinos se alinhem corretamente com a saída fêmea adaptada do estimulador S88.

4.1.2.3. *Fixação dos conectores*

A conexão dos pinos metálicos ao dispositivo foi realizada por soldagem com estanho e ácido fosfórico 85%. Essa técnica de soldagem garantiu uma conexão firme e segura, permitindo que a corrente elétrica fluísse adequadamente do estimulador externo para o eletrodo intracerebral.

4.1.3. Terceira fase: confecção da placa de circuito impressa

Os arquivos contendo o desenho da placa do circuito foram enviados para a empresa JLCPCB®, localizada em Shenzhen, China, para a sua produção. Esse segmento do dispositivo foi fabricado utilizando folhas de cobre laminado impressas numa placa de fibra de vidro FR-4 de 7x9x1,5 mm. Essa placa recebeu os componentes do eletrodo e os pinos conectores, conectando o dispositivo ao estimulador elétrico.

4.1.3.1. *Divisão da placa*

A placa foi dividida em dois segmentos e duas faces (Figuras 16 e 17):

- a) Segmento A: contém os componentes do eletrodo (Figura 16);
- b) Segmento B: contém os pinos conectores que receberão os impulsos do estimulador elétrico (Figura 16);
- c) Face ventral: voltada ao crânio do animal, recebeu a agulha 26G romba (Figura 17);
- d) Face dorsal: voltada para o conector fêmea proveniente do estimulador elétrico, recebeu o ponto de fixação do fio de platina e irídio e os pinos conectores positivo e negativo (Figura 17).

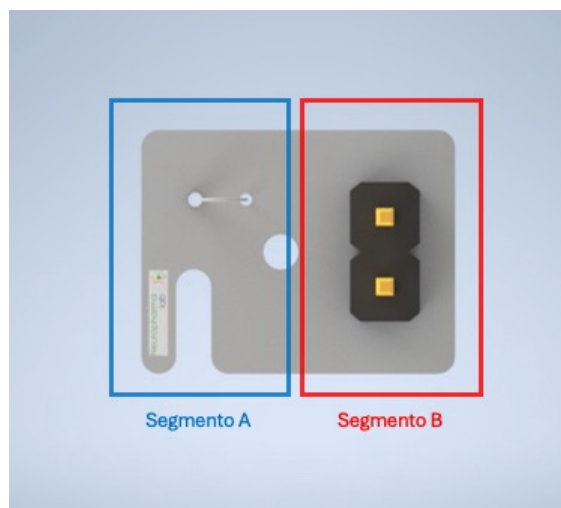


Figura 16 - Vista superior do dispositivo de estimulação cerebral profunda, mostrando o segmento A (azul) contendo os componentes do eletrodo e o segmento B (vermelho), contendo os pinos conectores que receberão os conectores provenientes do estimulador elétrico

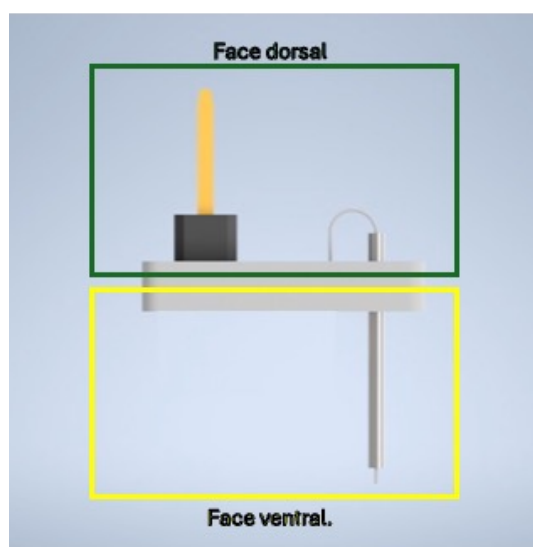


Figura 17 -Vista lateral do dispositivo de estimulação cerebral profunda, mostrando a face ventral (amarela), voltada ao crânio do animal, que recebeu a agulha 26G romba e a face dorsal (verde), voltada para o conector fêmea proveniente do estimulador elétrico, que recebeu o local de fixação do fio de platina e irídio, assim como os pinos conectores positivo e negativo

4.1.3.2. Estrutura da placa

Para adequada fixação do dispositivo ao crânio do animal, a placa de circuito impresso foi criada com uma concavidade de dimensões de 3x1mm no segmento A da placa, lateralmente ao ponto do circuito onde a agulha 26G foi soldada. Essa concavidade permitiu que o acrílico dental autopolimerizante utilizado para fixar o dispositivo ao

crânio do animal se aderisse à placa de forma mais eficaz, permitindo o ancoramento do dispositivo ao parafuso instalado no crânio do camundongo.

Há também dois orifícios que transpassam a placa completamente: um no meio, com 1 mm de diâmetro, e outro no local que receberá a agulha 26G romba, com 0,5mm de diâmetro.

4.1.3.3. Interconexão dos componentes na placa

O circuito impresso interconectou eletricamente a agulha 26G modificada para ser romba, soldada na face ventral do segmento A, com o pino negativo soldado na face dorsal do segmento B da placa.

O fio de platina e irídio, soldado no segmento A, é interconectado com o pino positivo, soldado na face dorsal do segmento B da placa, a 2mm lateralmente ao pino negativo. O fio atravessa a agulha modificada 26G e a placa de material isolante, alcançando a face dorsal da extremidade A.

Essas configurações garantem que o circuito impresso na placa de material isolante conecte corretamente o eletrodo intracerebral aos pinos conectores, permitindo a transmissão eficiente dos impulsos elétricos do estimulador para as estruturas cerebrais profundas do camundongo.

4.2. Local de implantação dos eletrodos intracerebrais

Verificou-se que os eletrodos intracerebrais foram adequadamente locados em oito dos doze animais do grupo 6OHDA + DBS. Deles, um animal apresentou sinais de infecção intracerebral no local da ponta do eletrodo, e outro uma hemorragia intracerebral extensa, tanto intraparenquimatosa quanto subaracnóidea. Assim, dos doze animais do grupo, seis foram incluídos nas análises tanto comportamentais como histológicas (Figuras 18 e 19).

No grupo 6-OHDA, os eletrodos intracerebrais foram adequadamente posicionados em oito dos quatorze animais (Figuras 20 e 21). Os outros seis animais foram excluídos das análises comportamentais e histológicas.

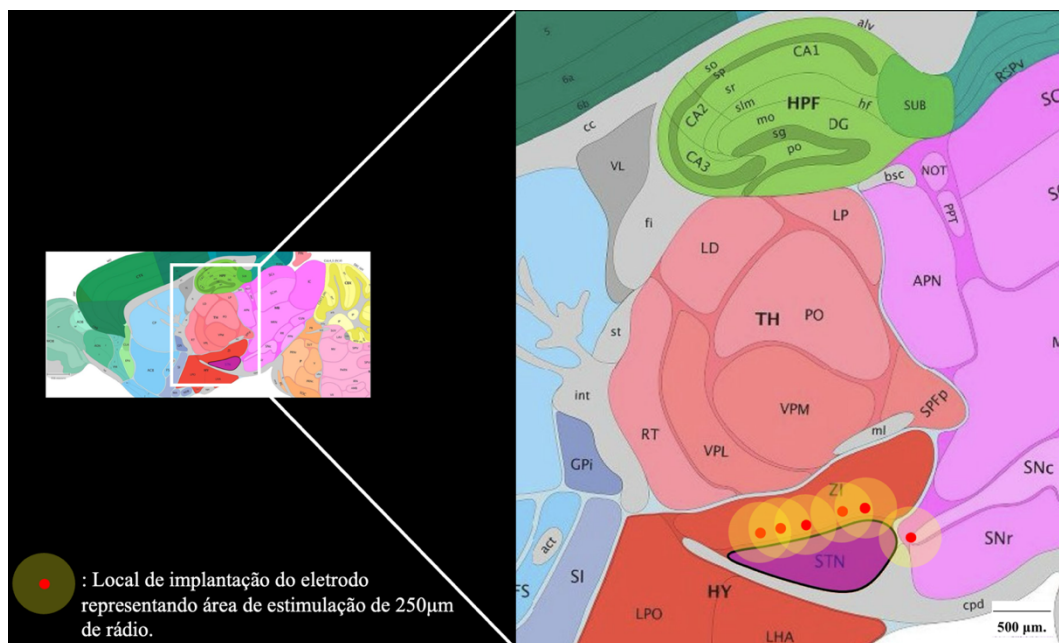
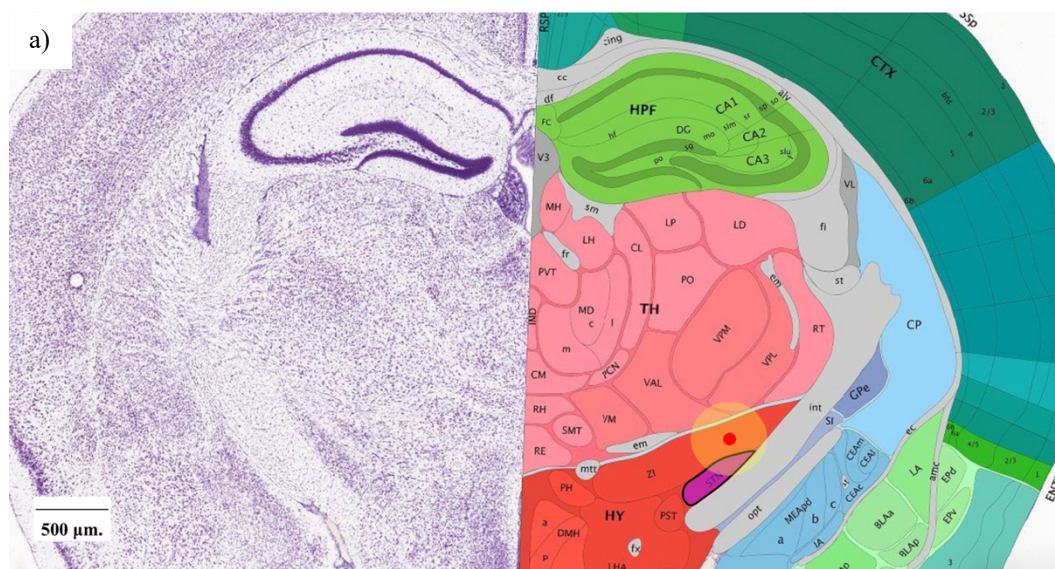
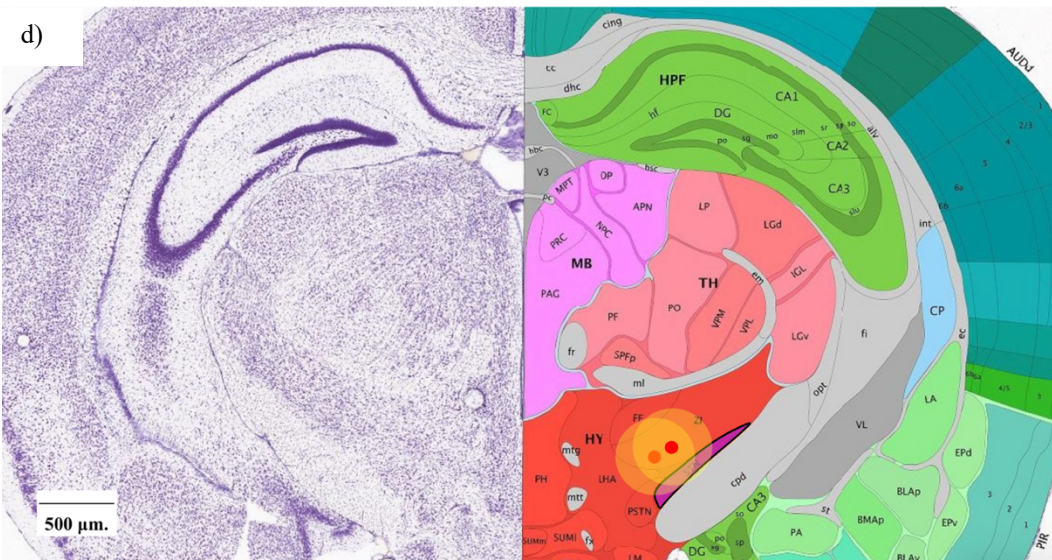
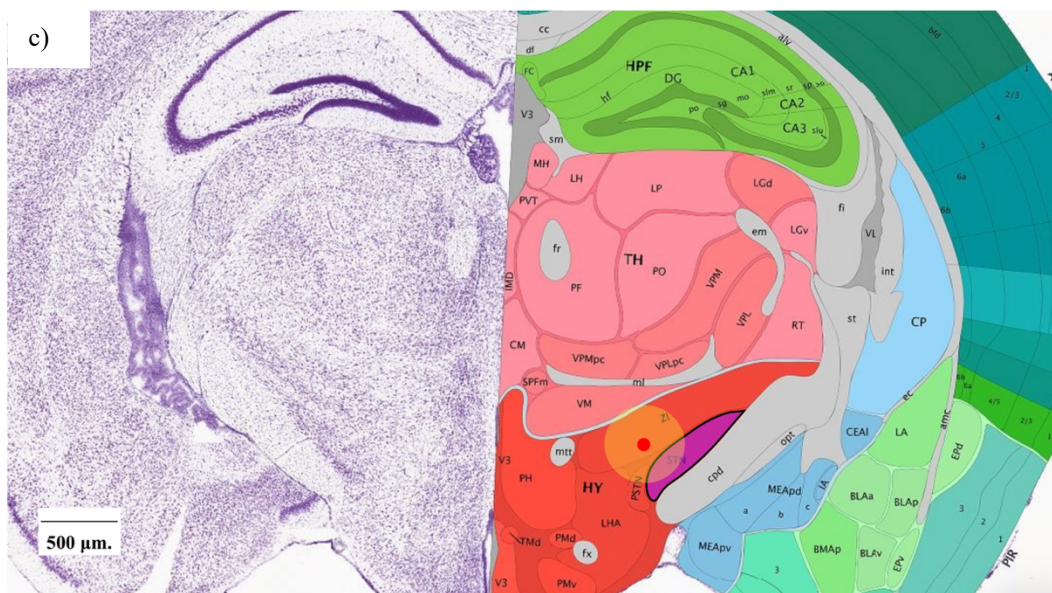
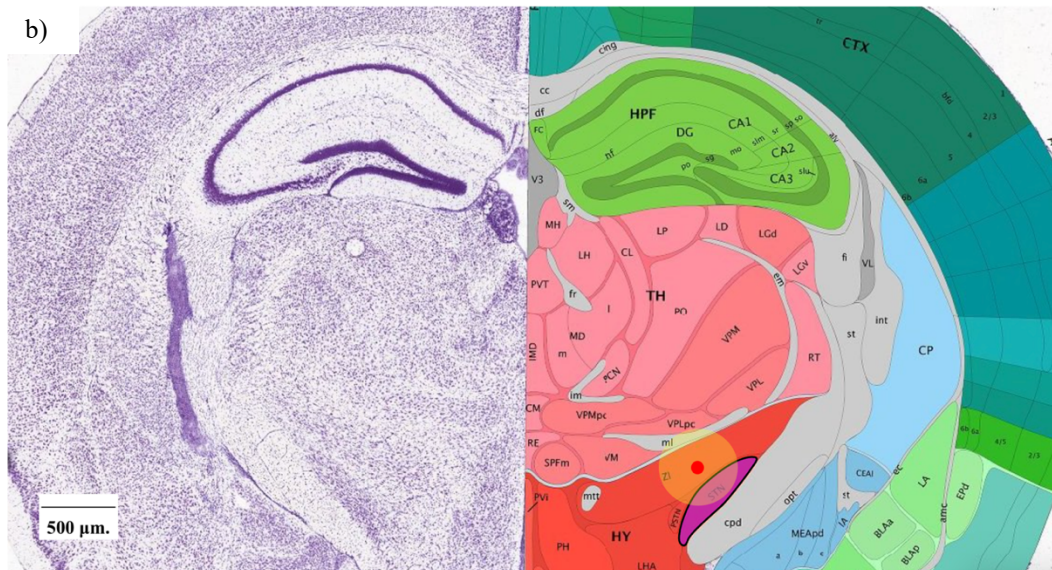


Figura 18 - Esquema sagital mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos foram locadas, com o campo elétrico provocado por elas, nos animais do grupo 6-OHDA + DBS. Modificado de Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b)

Nota: Cpd: Pedúnculo cerebral. CTX: Córtex. HY: Hipotálamo. STN: Núcleo subtalâmico. TH: Tálamo. ZI: Zona Incerta. SNc: Substância Nigra pars compacta. SNr: Susbtancia Nigra pars reticulata.





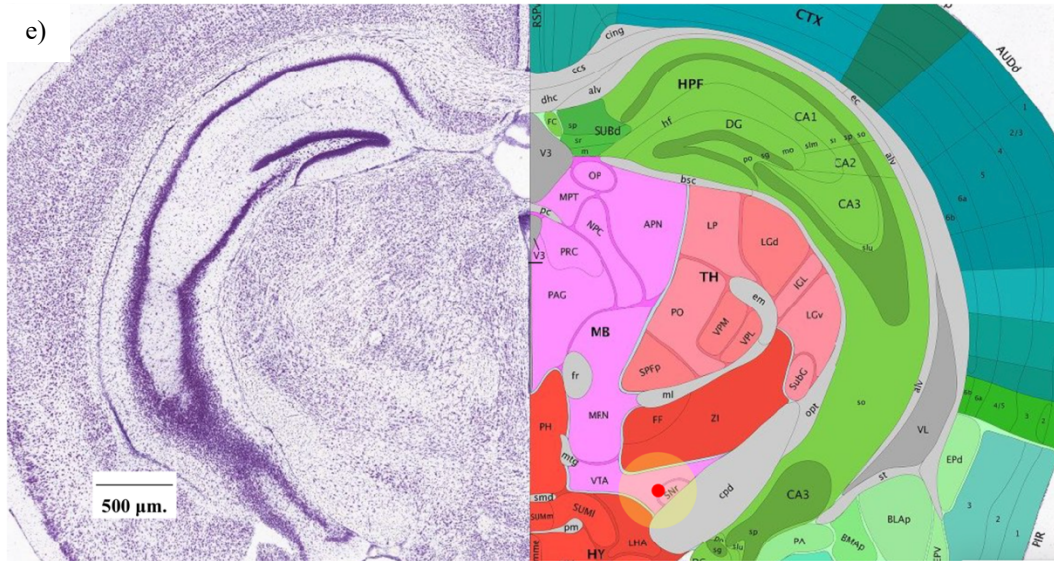


Figura 19 - Cortes coronais mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos foram localizadas, com o campo elétrico provocado por elas, nos animais do grupo 6-OHDA + DBS. O corte a) corresponde à coordenada anteroposterior -1,94 mm em relação à linha do bregma, o b), à coordenada -2,06 mm, o c), à coordenada -2,18 mm, o d), à coordenada -2,3 mm e o e) à coordenada -2,46 mm. Modificado de Paxinos e Franklin (2019) e Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b).

Nota: Cpd: Pedúnculo cerebral. CTX: Córtex. HY: Hipotálamo. STN: Núcleo subtalâmico. TH: Tálamo.

ZI: Zona Incerta. SNc: Substância Nigra pars compacta. SNr: Substância Nigra pars reticulata.

● : Ponta do eletrodo (vermelho) com o campo elétrico de 250 µm de rádio induzido por ele (amarelo).

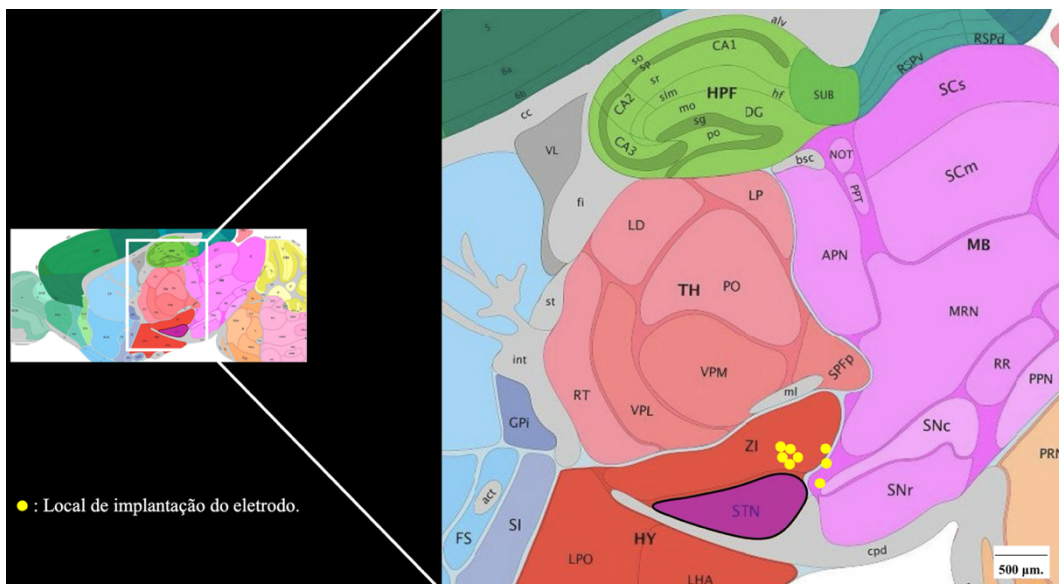


Figura 20 - Esquema sagital mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos, representadas pela cor amarela, foram localizadas nos animais do grupo 6-OHDA. Modificado de Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b)

Nota: CPD: Pedúnculo cerebral. CTX: Córtex. HY: Hipotálamo. STN: Núcleo subtalâmico. TH: Tálamo.

ZI: Zona Incerta. SNc: Substância Nigra pars compacta. SNr: Substância Nigra pars reticulata.

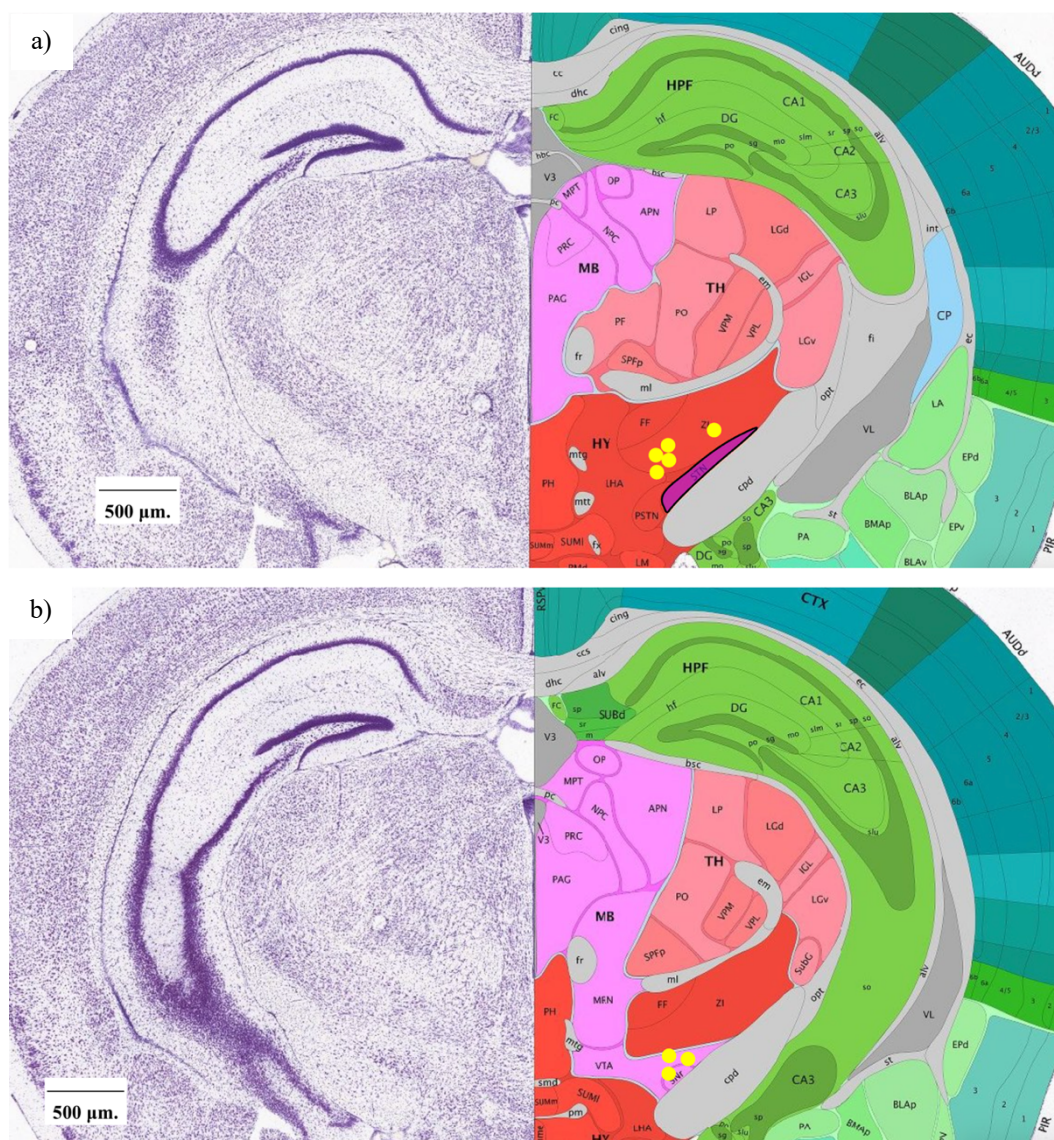


Figura 21 - Cortes coronais mostrando os locais onde as pontas dos eletrodos, representadas pela cor amarela, foram locadas nos animais do grupo 6-OHDA. O corte a) corresponde à coordenada anteroposterior -2,3 mm em relação à linha do bregma e o b) à coordenada -2,46mm. Modificado de Paxinos e Franklin (2019) e Allen Institute For Brain Science (2011a; 2011b)

Nota: CPD: Pedúnculo cerebral. CTX: Córtex. HY: Hipotálamo. STN: Núcleo subtalâmico. TH: Tálamo. ZI: Zona Incerta. SNc: Substância Nigra pars compacta. SNr: Substância Nigra pars reticulata.

4.3. Comportamento da resistência elétrica

A resistência do sistema encéfalo-eletrodo não mudou durante os quatro dias de protocolo.

Para analisar o comportamento da resistência do sistema em função do tempo, utilizou-se uma regressão linear simples. Não houve mudanças na resistência do sistema cérebro-eletródo com o tempo [$F(1, 22) = 0,5170, p = 0,48$] (Figura 22).

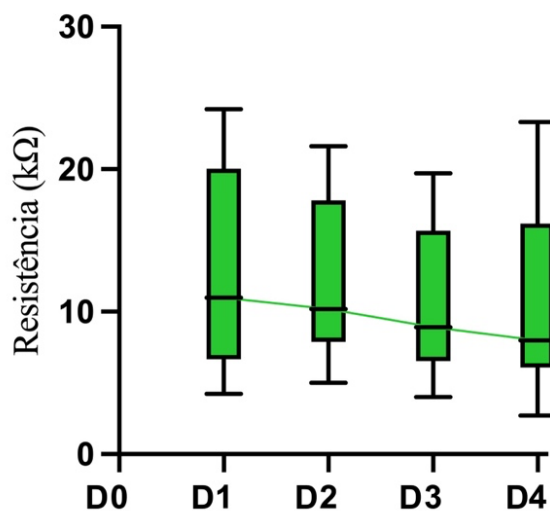


Figura 22 - Comportamento da resistência em kOhms ($k\Omega$), em função do tempo

4.4. Impacto da DBS na massa corporal dos animais

Os animais do grupo 6-OHDA, após a intervenção, perderam massa corporal de forma progressiva até o D4, quando a curva de perda de massa se estabilizou. Em contrapartida, os animais do grupo 6-OHDA+DBS começaram a apresentar uma recuperação na massa corporal após o D3. Os animais do grupo 6-OHDA + DBS mantiveram uma massa corporal igual à do grupo Naive, enquanto os animais do grupo 6-OHDA mostraram uma massa corporal menor do que a do grupo Naive após o D3 (Tabela 5) (Figura 23).

Após uma primeira análise estatística dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, identificou-se que os dados seguiram uma distribuição normal, com valores de P de 0,3, 0,08 e 0,96 para os grupos 6-OHDA + DBS, 6-OHDA e Naive, respectivamente.

O teste de ANOVA de duas vias foi aplicado. Ao identificar um ϵ de 0,3025 foi aplicada a correção de Geisser – Greenhouse. Identificou-se que houve uma mudança de massa corporal em função do tempo nos animais [$F(1,513, 24,2) = 6,044, p=0,01$].

Houve também uma mudança de massa corporal associada à interação entre o tratamento e o tempo [$F(10, 80) = 4,723, p < 0,001$].

Observou-se que houve uma diferença na massa corporal dos animais em função dos indivíduos [$F(16, 80) = 40,91, p < 0,001$].

Não houve uma diferença de massa corporal em função da intervenção realizada nos animais lesionados [$F(2, 16) = 1,883, p = 0,18$].

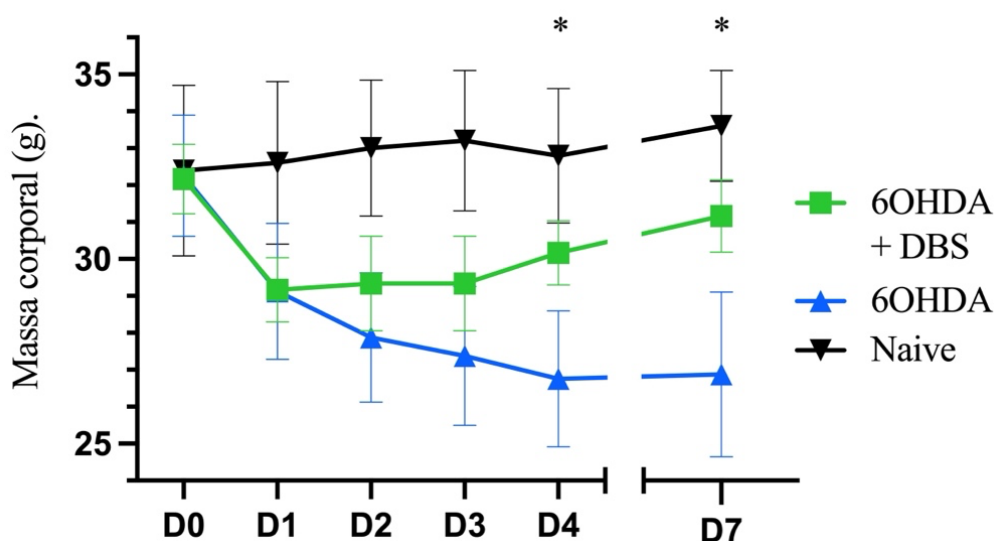


Figura 23 - Mudança da massa corporal, medida em gramas, no decorrer do tempo - ANOVA de Duas Vias
Nota: * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos 6OHDA e Naive com $p < 0,05$

A massa corporal dos animais do grupo 6-OHDA + DBS se manteve igual ao do grupo Naive durante todo o protocolo. Os animais do grupo 6-OHDA foram diferentes do grupo Naive, tanto no D4 ($p = 0,04$) quanto no D7 ($p = 0,03$) (Figura 23).

No D4, a perda de massa corporal para o grupo 6-OHDA, quando comparado ao D0, foi de 17,05%, enquanto para o grupo 6-OHDA + DBS foi de 6,21%. No D7, a perda de massa corporal para o grupo 6-OHDA, em comparação ao D0, foi de 14,34%, enquanto para o grupo 6-OHDA + DBS foi de 3,1%. Os animais do grupo Naive tiveram um ganho discreto de massa corporal durante a realização do protocolo, quando comparado ao D0, de 1,24% no D4 e de 4,17% no D7.

Numa análise dentro dos grupos se observou que a redução na massa corporal dos animais parkinsonianos que receberam estimulação cerebral foi seguida por uma recuperação ao longo do protocolo experimental. A massa corporal medida nos animais do grupo 6-OHDA + DBS no D0 foi maior do que nos dias D1, D2, D3 e D4, com valores de $p < 0,001, 0,003, 0,01$ e $0,003$, respectivamente (Tabela 5). No entanto, não houve diferença no D7, indicando que as massas corporais aferidas nesse dia não diferiram ($p = 0,28$). No grupo 6-OHDA, a massa dos animais no D0 foi maior do que no D1 ($p < 0,001$), D2 ($p < 0,001$), D3 ($p < 0,001$), D4 ($p < 0,001$) e D7 ($p = 0,02$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Diferença percentual na massa corporal em relação ao tempo dos grupos 6-OHDA + DBS, 6-OHDA e Naive

| | Massa corporal D1-D0 (%) | Massa corporal D2-D1 (%) | Massa corporal D3-D2 (%) | Massa corporal D4-D3 (%) | Massa corporal D7-D4 (%) |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Naive | +0,62 | +0,85 | +2,47 | +1,23 | +3,7 |
| 6OHDA + DBS | -9,38 | 0,0 | +1,72 | +1,69 | +6,66 |
| 6OHDA | -9,86 | -6,25 | 0,0 | -5,0 | +1,75 |

4.5. Impacto da DBS no teste de Rotarod

Ao comparar a performance motora utilizando o teste do Rotarod, observou-se que tanto o grupo 6-OHDA + DBS quanto o 6-OHDA apresentaram desempenho motor significativamente inferior ao do grupo Naive. Além disso, o grupo 6-OHDA + DBS mostrou um desempenho motor 74,12% superior ao do grupo 6-OHDA (Figuras 24 e 25).

Os dados do grupo 6-OHDA + DBS e do grupo Naive seguiram uma distribuição normal, conforme indicado pelo teste de Shapiro-Wilk, com valores de p de 0,06 e 0,57, respectivamente. O teste F não mostrou diferença nas variâncias, permitindo a aplicação do teste t de Student para comparar os grupos. Como esperado, houve uma diferença estatisticamente significativa entre eles ($t = 6,186$, $df = 9$, $p < 0,001$) (Figura 24a).

Por outro lado, o grupo 6-OHDA não seguiu uma distribuição normal, conforme indicado pelo teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,03$). Portanto, a comparação entre os grupos 6-OHDA e Naive foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney, que mostrou uma estatística U de 0 e um valor de p de 0,003, indicando uma diferença estatística significativa entre eles (Figura 24b).

Adicionalmente, a comparação entre os grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA também foi feita utilizando o teste de Mann-Whitney. Nessa análise, a estatística U de 5 e um valor de $p = 0,02$ indicaram que o grupo 6-OHDA + DBS teve um desempenho no Rotarod superior ao grupo 6-OHDA (Figura 25).

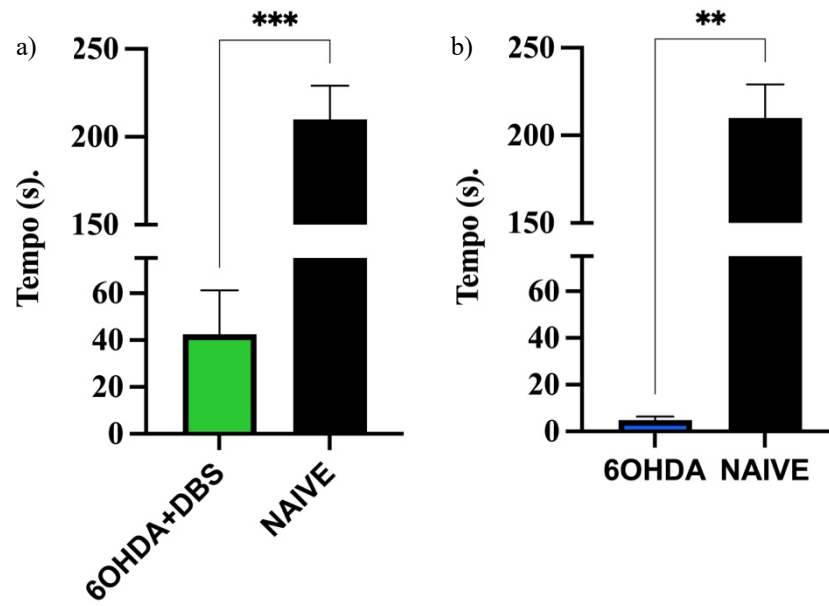


Figura 24 - a) Tempo de permanência no Rotarod dos grupos 6-OHDA + DBS e Naive. Teste t de student. *** $p < 0.001$. b) Tempo de permanência no Rotarod dos grupos 6-OHDAe Naive. Teste de Mann - Withney. ** $p < 0.01$

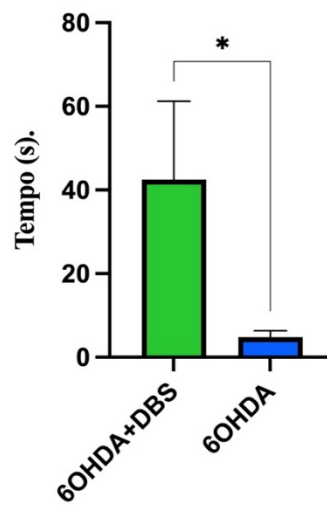


Figura 25 - Tempo de permanência no Rotarod dos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA. Teste de Mann - Withney

Nota: * $p < 0.05$

4.6. Impacto da DBS no teste de cilindro

4.6.1. Coeficiente de assimetria

Os animais do grupo 6-OHDA, ao contrário dos do grupo 6-OHDA + DBS, mostraram coeficientes de assimetria elevados e diferentes dos do grupo Naive nos dias D2 e D4 (Figura 26).

Os dados seguiram uma distribuição normal, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, com valores de p de 0,92, 0,97 e de 0,43 para os grupos 6-OHDA + DBS, 6-OHDA e Naive, respectivamente. Portanto, utilizou-se o teste estatístico de ANOVA de Duas Vias, com correção de Geisser Greenhouse, ao calcular um ϵ de 0,4892. Houve uma diferença estatisticamente significativa no coeficiente de assimetria, em função da intervenção realizada nos animais dos três grupos [$F(2, 16) = 4,295, p = 0,03$]. No entanto, em relação ao tempo, não houve diferença significativa no coeficiente de assimetria entre os três grupos [$F(1,467, 16,63) = 0,074, p = 0,88$]. Além disso, ao avaliar a interação entre o tratamento e o tempo, também não houve uma mudança significativa no coeficiente de assimetria nos três grupos [$F(6, 34) = 0,7686, p = 0,6$].

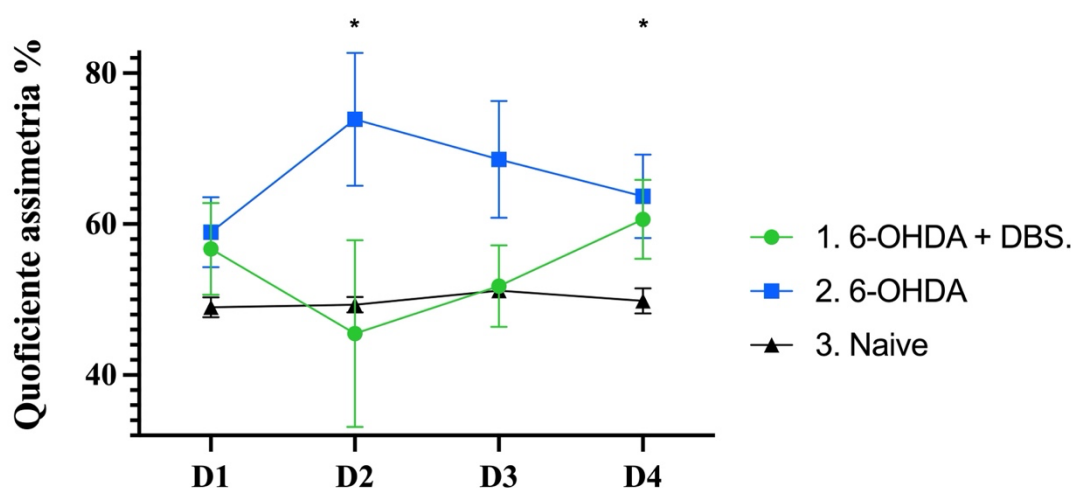


Figura 26 - Coeficiente de assimetria dos três grupos - ANOVA de duas vias

Nota: * Diferença estatisticamente significativa entre o grupo 6-OHDA e Naive, $p < 0,05$

Nas comparações múltiplas dos grupos, foi identificado que os animais do grupo 6-OHDA apresentaram um coeficiente de assimetria estatisticamente diferente do grupo Naive no D2 ($p = 0,03$) e D4 ($p = 0,02$). Por outro lado, os animais do grupo 6-OHDA + DBS não mostraram diferenças relevantes em relação ao do grupo Naive (Figura 25).

4.6.2. Índice de Preservação da Motricidade (IPM)

Para avaliar a atividade motora dos animais, propôs-se o Índice de Preservação da Motricidade (IPM). Na análise por dias, o IPM não foi diferente entre o grupo 6-OHDA + DBS e o 6-OHDA (Figura 27).

Em contrapartida, ao fazer uma análise dos valores totais, o grupo 6-OHDA + DBS apresentou um valor do IPM que foi 55,72% maior do que o grupo 6-OHDA (Figura 28). O efeito da neuromodulação invasiva foi altamente relevante na preservação motora do hemisfério comprometido nos animais parkinsonianos.

Os dados de IPM seguiram uma distribuição normal, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, com valores de p de 0,83, 0,12 e de 0,75 para os grupos 6-OHDA + DBS, 6-OHDA e Naive respectivamente.

Portanto, foi aplicado teste de ANOVA de Duas Vias com correção de Geiser – Greenhouse, ao identificar um ϵ de 0,5617. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa em função da intervenção [$F(2, 14) = 65,9, p < 0,001$]. No entanto, não houve diferença significativa na exploração do ambiente em função do tempo [$F(1,685, 23,03) = 1,575, p < 0,23$] nem na interação tempo/intervenção [$F(6, 41) = 1,205, p < 0,32$].

Nas comparações múltiplas dos grupos, verificou-se que os grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA não foram diferentes entre si, mas ambos foram diferentes do grupo Naive.

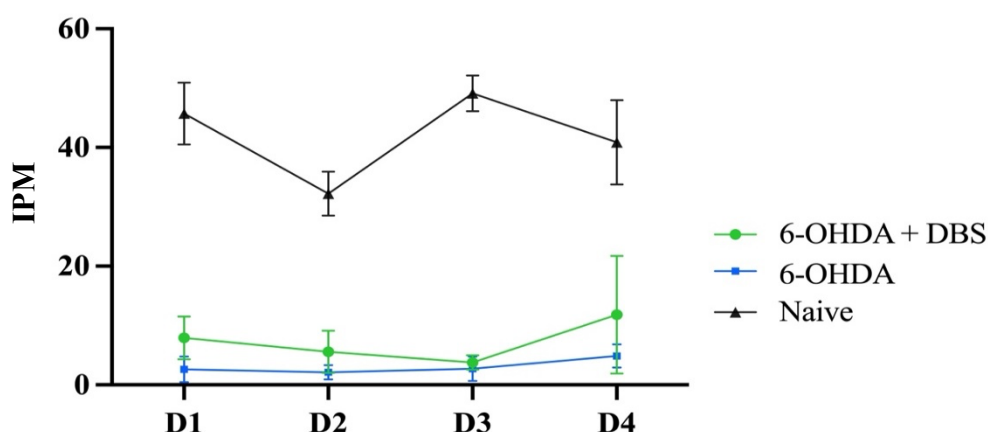


Figura 27 - Análise por dias do IPM. ANOVA de Duas Vias.

Procedeu-se, então, a uma comparação os valores totais de IPM dos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA. Pelo teste F, não houve diferença entre as variâncias dos grupos. Utilizou-se, assim, o teste t de student, que mostrou que o IPM do grupo 6-OHDA + DBS foi superior aos grupos 6-OHDA [$t= 3,483$. $dF= 10$. $p= 0,006$] (Figura 28).

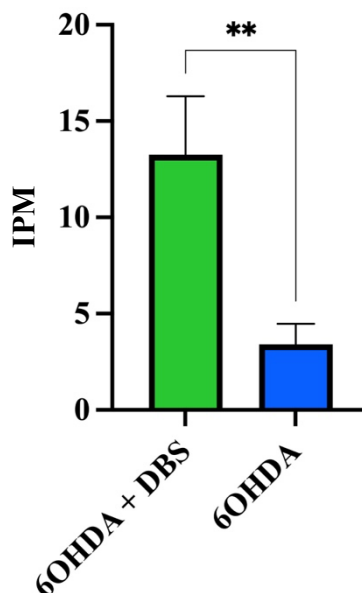


Figura 28 - Valores totais de IPM dos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA. Teste t, $**p<0.01$

Com o objetivo de quantificar o tamanho do efeito da DBS na preservação motora em animais parkinsonianos, calculou-se o g de Hedges. Obteve-se um valor de 1,24, indicando um efeito altamente relevante.

4.7. Imuno-histoquímica

4.7.1. Contagem de células TH+ na SNpc

Somente os animais do grupo 6-OHDA apresentaram um menor número de células TH+ na SNpc ipsilateral à lesão nigroestriatal, quando comparada ao lado contralateral (Figura 29).

Na análise das sub-regiões da SNpc, os animais do grupo 6-OHDA apresentaram uma contagem de células TH+ menor no lado lesionado, tanto na região medial como na central e na lateral. Por outro lado, os animais do grupo 6-OHDA+DBS apresentaram uma contagem de células TH+ menor apenas na região medial, mantendo-se igual nas regiões central e lateral (Figura 33).

Para essa avaliação, foram criados dois subgrupos, a partir do grupo 6-OHDA+DBS, assim como do grupo 6-OHDA, totalizando quatro subgrupos:

- número de células TH+ na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN D);
- número de células TH+ na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN E);
- número de células TH+ na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D);
- número de células TH+ na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E).

A normalidade dos dados da contagem de células TH+ nos grupos foi confirmada pelo teste de Shapiro - Wilk, com valores de p de 0,23, 0,22, 0,98 e 0,09, respectivamente.

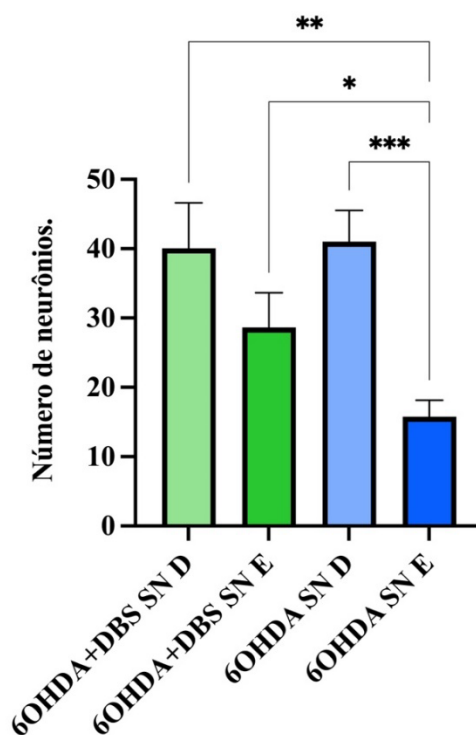


Figura 29 - Número de células TH+ contabilizadas nas microfotografias na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN D), na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN E), na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Uma Via com correção de Welch
Nota: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

As variâncias foram avaliadas pelo teste de Bartlett, que mostrou diferenças estatisticamente significativas entre elas ($p = 0,006$). Assim, utilizou-se o teste de

ANOVA de Uma Via com correção de Welch, que revelou diferença significativa entre os grupos [F (3, 33,82) = 10,51, $p < 0,001$] (Figura 29).

Na comparação das diferenças entre os quatro subgrupos (6OHDA + DBS SN D, 6OHDA + DBS SN E, 6OHDA SN D e 6OHDA SN E), observou-se que a contagem de células TH+ do lado esquerdo do grupo de animais parkinsonianos que não receberam neuromodulação (6OHDA SN E) correspondeu a:

- Um valor de 27,32% da contagem de células TH+ na SN esquerda dos animais parkinsonianos que receberam neuromodulação (6OHDA + DBS SN E)

- Um valor de 51,68% da contagem de células TH+ na SN direita dos animais parkinsonianos que receberam neuromodulação (6OHDA + DBS SN D)

- Um valor de 53,94% da contagem de células TH+ na SN direita dos animais parkinsonianos que não receberam neuromodulação (6OHDA + SN D) (Tabela 6) (Figura 29).

Tabela 6 - Diferenças entre os números de células TH+ contabilizados nas microfotografias na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN D), na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN E), na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Uma Via com correção de Welch

| Welch – ANOVA | 6OHDA + DBS SN D | 6OHDA + DBS SN E | 6OHDA SN D | 6OHDA SN E |
|------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 6OHDA + DBS SN D | — | Não diferente (p=0,18) | Não diferente (p=0,91) | Diferente (p=0,002) |
| 6OHDA + DBS SN E | Não Diferente (p=0,18) | — | Não diferente (p=0,08) | Diferente (p=0,03) |
| 6OHDA SN D | Não diferente (p=0,91) | Não diferente (p=0,08) | — | Diferente (p<0,001) |
| 6OHDA SN E | Diferente (p=0,002) | Diferente (p=0,03) | Diferente (p<0,001) | — |

Os dados da contagem de células TH+ do lado direito e o lado esquerdo da SNpc dos subgrupos derivados dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6-OHDA + DBS SN D

e 6OHDA + DBS SN E) foram analisados. A contagem de células TH+ no lado esquerdo foi 29,61% menor do que a contagem do lado direito. Os dados seguiram uma distribuição normal e foram comparados pelo teste t de Student pareado, que mostrou que essa diferença não foi estatisticamente significativa [$t = 1,823$, $df = 15$, $p = 0,09$] (Figura 30).

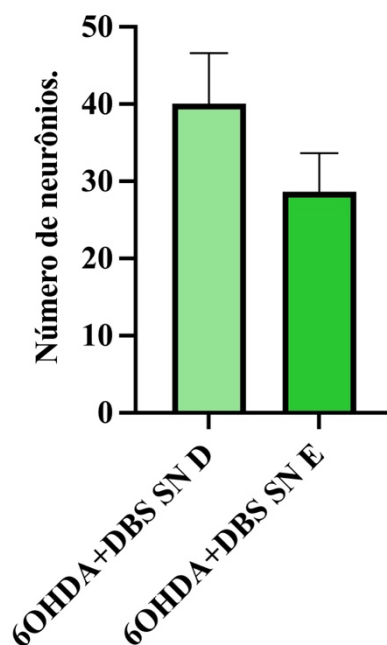


Figura 30 - Número de células TH+ contabilizadas no grupo 6-OHDA + DBS, tanto à direita (6OHDA + DBS SN D) como à esquerda (6OHDA+DBS SN E) - Teste t de student pareado

Em seguida, foram analisados os dados dos subgrupos derivados dos animais do grupo 6-OHDA. Identificou-se que contagem de células TH+ no lado esquerdo foi 58,53% menor no lado direito da SNpc em comparação com o lado esquerdo. Os dados seguiram uma distribuição normal e foram comparados pelo teste t de Student pareado, que mostrou que essa diferença foi estatisticamente significativa [$t = 6,829$, $df = 20$, $p < 0,001$] (Figura 31).

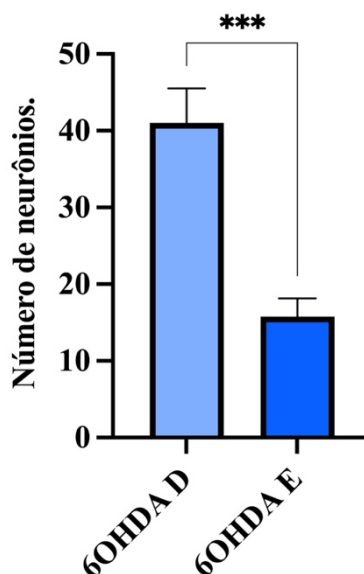


Figura 31 - Número de células TH+ contabilizadas no grupo 6-OHDA, tanto à direita (6OHDA SN D) como à esquerda (6OHDA SN E) - Teste t de student pareado

Nota: *** $p < 0,001$.

Posteriormente, analisaram-se os subgrupos derivados dos dados de contagem de células nigrais TH+ no lado lesionado, tanto do grupo 6-OHDA+DBS como do 6-OHDA. A contagem de células TH+ nos animais não neuromodulados foi 41,62% menor do que a contagem dos animais submetidos a DBS. Os dados seguiram uma distribuição normal e o teste F mostrou diferença estatística nas variâncias. Assim, aplicou-se o teste t de Student com correção de Welch, que mostrou que essa diferença foi estatisticamente significativa [$t = 2,489$, $df = 35$, $p = 0,02$] (Figura 32).

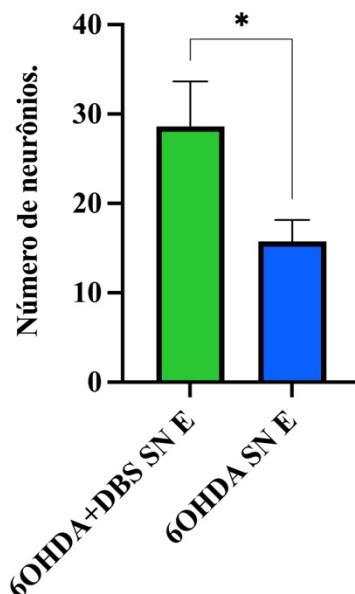


Figura 32 - Número de células TH⁺ contabilizadas na SNpc do grupo 6OHDA + DBS, à esquerda (6OHDA+DBS SN), e as contabilizadas na SNpc do grupo 6-OHDA à esquerda (6OHDA SN E) - Teste t de student com correção de Welch

Nota: * $p < 0,05$

Procedeu-se à avaliação os dados do número de células TH⁺ nas microfotografias das regiões medial, central e lateral da SNpc, tanto do lado direito e esquerdo, do grupo 6-OHDA+DBS e 6-OHDA. A normalidade dos dados das SNpc, tanto do lado direito como do lado esquerdo, dos animais do grupo 6-OHDA+DBS, assim como do grupo 6-OHDA foi confirmada pelo teste de Shapiro – Wilk, com valores de p de 0,28, 0,49, 0,12 e 0,33, respectivamente.

Aplicou-se o teste de ANOVA de Duas Vias com correção de Geisser-Greenhouse, ao calcular-se um épsilon de 0,7888. O teste mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tratamento [$F(3, 20) = 7,174$, $p = 0,002$]. Em relação às sub-regiões da SNpc, houve também uma diferença significativa entre os grupos [$F(1,578, 31,55) = 19,95$, $p < 0,001$]. Além disso, a interação entre o tratamento e as sub-regiões da SNpc também mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(6, 40) = 2,736$, $p = 0,03$] (Figura 33).

Nas comparações múltiplas dos grupos, ao avaliar a região medial isoladamente, observou-se diferenças significativas em todas as comparações entre os lados sadios e lesionados. Nessa região, os valores da contagem de células nigrais TH⁺ à esquerda foram 47,53% menores do que os do lado direito no grupo 6-OHDA ($p < 0,001$), e 42,57% menor no grupo 6-OHDA+DBS ($p < 0,001$). Além disso, os valores da contagem à esquerda do

grupo 6-OHDA+DBS foram 52,69% menores do que os do lado direito do grupo 6-OHDA+DBS ($p=0,04$) e 59,62% menores dos que os do lado direito do grupo 6-OHDA ($p=0,05$) (Tabela 7) (Figura 33).

Tabela 7 - Diferenças entre os números de células TH+ contabilizados nas microfotografias da região medial da SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN D), na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA + DBS (6OHDA + DBS SN E), na SNpc direita dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e na SNpc esquerda dos animais do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Duas Via com correção de Geisser-Greenhouse

| ANOVA de Duas Vias/Geisser - Greenhouse. | Região Medial 6OHDA + DBS SN D | Região Medial 6OHDA SN D | Região Medial 6OHDA + DBS SN E | Região Medial 6OHDA SN E |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Região Medial 6OHDA + DBS SN D | — | Não diferente ($p=0,77$) | Diferente ($p<0,001$) | Diferente ($p<0,001$) |
| Região Medial 6OHDA SN D | Não diferente ($p=0,77$) | — | Diferente ($p=0,05$) | Diferente ($p<0,001$) |
| Região Medial 6OHDA SN E | Diferente ($p<0,001$) | Diferente ($p=0,05$) | — | Não diferente ($p=0,47$) |
| Região Medial 6OHDA SN E | Diferente ($p<0,001$) | Diferente ($p<0,001$) | Não diferente ($p=0,47$) | — |

Em contrapartida, na análise da contagem de células TH+ nas regiões central e lateral, observou-se uma diferença estatisticamente significativa no número de células TH+ entre os lados esquerdo e direito somente no grupo 6-OHDA. Verificou-se que os valores da contagem de células nigrais TH+ à esquerda foram 56,89% menores do que os do lado direito na região central ($p = 0,008$) e 59,95% menores na região lateral ($p = 0,04$) (Figura 33).

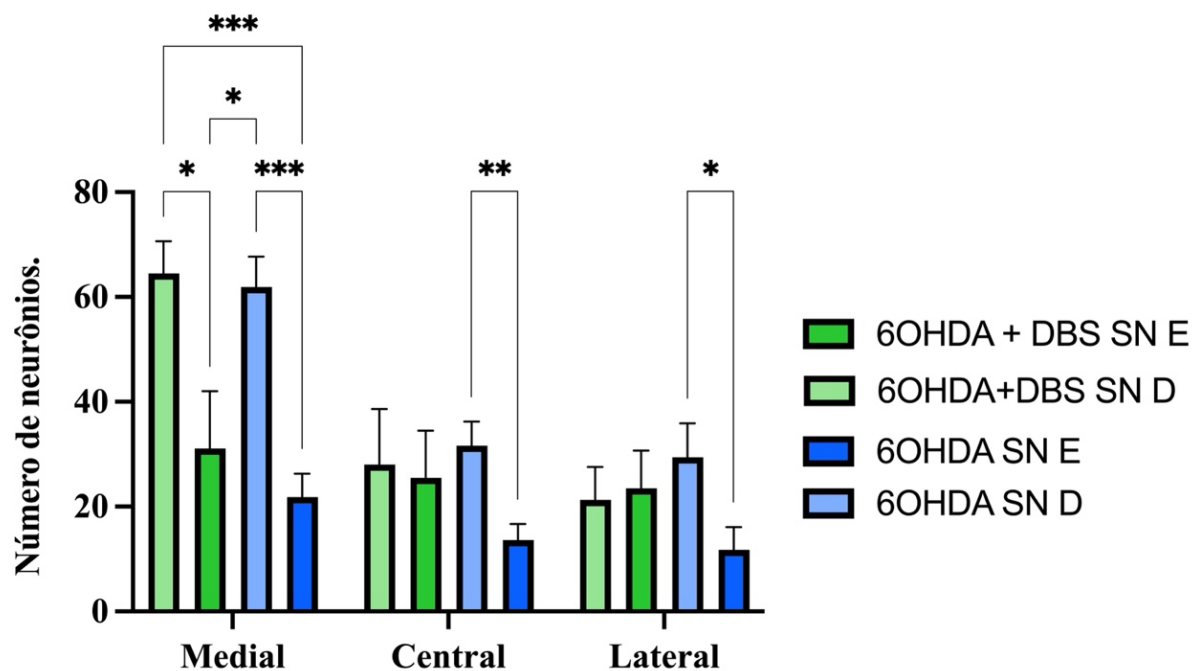


Figura 33 - Número de neurônios da região medial, central e lateral, da SNpc direita do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA+DBS SN D), da SNpc esquerda do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA+DBS SN E), da SNpc direita do grupo 6-OHDA (6OHDA SN D) e da SNpc esquerda do grupo 6-OHDA (6OHDA SN E) - ANOVA de Duas Vias

Nota: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.7.2. DO das fibras neuronais dopaminérgicas estriatais

Ao comparar os valores de DO da marcação TH+ nas microfotografias dos cortes histológicos do estriado dos animais dos grupos 6-OHDA+DBS e 6-OHDA, observou-se uma diferença significativa entre os lados esquerdo e direito. Nos animais do grupo 6-OHDA+DBS, a DO no hemisfério esquerdo foi 1% menor do que no hemisfério direito, sem significância estatística ($p = 0,39$). Já no grupo 6-OHDA, a DO no lado esquerdo foi 27% menor do que no direito, uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,009$).

O cálculo da relação dos valores de DO E/D dos grupos mostrou que a relação no grupo 6-OHDA foi 16% menor do que a calculada no grupo 6-OHDA+DBS ($p = 0,02$).

O teste de Shapiro-Wilk confirmou a normalidade dos dados de DO do estriado esquerdo ($p=0,21$) e direito ($p=0,07$) do grupo 6-OHDA+DBS, assim como os do estriado esquerdo ($p=0,57$) e direito ($p=0,55$) do grupo 6-OHDA. O teste de Bartlett não mostrou diferenças estatísticas nas variâncias ($p=0,97$). Assim, procedeu-se ao teste de ANOVA de Uma Via que não mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(3, 24) = 0,6787$, $p = 0,57$] (Figura 34).

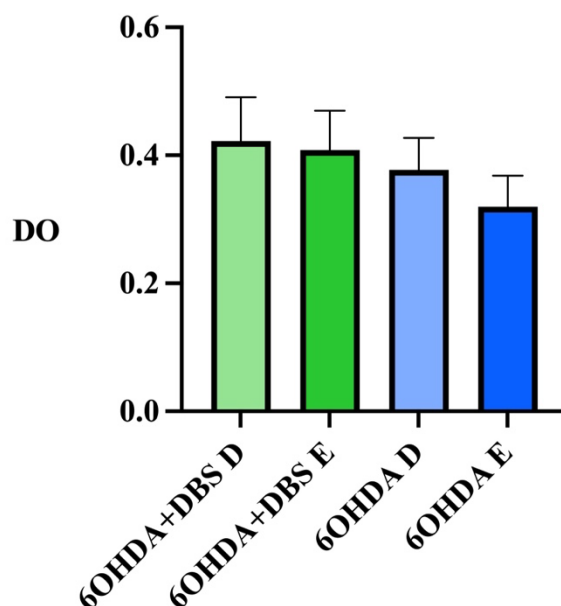


Figura 34 - DO do estriado direito do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS D), do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS E), do estriado direito do grupo 6-OHDA (6OHDA D) e do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA (6OHDA E) - ANOVA de Uma Via

Ao avaliar os tamanhos de efeito entre os diferentes grupos experimentais, foi calculado o g de Hedges para comparar os grupos 6OHDA+DBS D, 6OHDA+DBS E, 6OHDA D e 6OHDA E. Os resultados indicaram que as diferenças entre os grupos são relativamente pequenas, visto que nenhum dos valores foi acima de 0,8 (Goulet-Pelletier; Cousineau, 2018).

Tabela 8 - Valores dos Tamanhos de Efeito calculados para comparações entre os DO dos estriados direito e esquerdo dos Grupos 6-OHDA+DBS e 6-OHDA - g de Hedges

| g de Hedges | 6OHDA+DBS D | 6OHDA+DBS E | 6OHDA D | 6OHDA E |
|---------------|-------------|-------------|---------|---------|
| 6OHDA+DBS D | - | 0,08 | 0,28 | 0,64 |
| 6OHDA+DBS E | 0,08 | - | 0,20 | 0,58 |
| 6OHDA D | 0,28 | 0,20 | - | 0,39 |
| 6OHDA E | 0,64 | 0,58 | 0,39 | - |

Em seguida, foram analisados os dados de DO das microfotografias dos estriados direito e esquerdo do grupo 6-OHDA+DBS. Após confirmar a distribuição normal dos dados, compararam-se os grupos pelo teste t de Student pareado, que não mostrou diferença entre eles ($t = 0,9394$, $df = 5$, $p = 0,39$) (Figura 35).

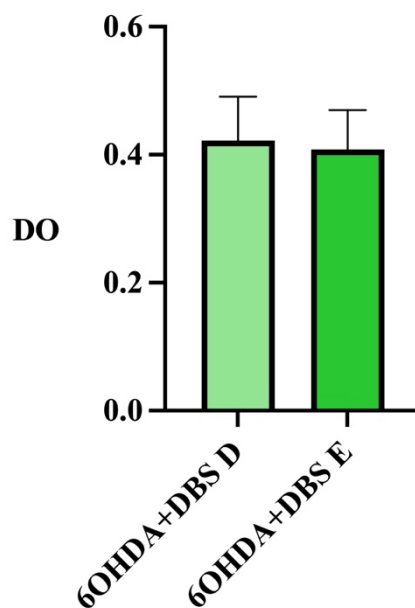


Figura 35 - DO do estriado direito do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS D) e do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA+DBS (6OHDA + DBS E) - Teste t de Student pareado

Na sequência, procedeu-se a analisar os dados da DO das microfotografias correspondentes aos estriados direito e esquerdo do grupo 6-OHDA. Após confirmar a distribuição normal dos dados, compararam-se os grupos pelo teste t de Student pareado e se identificou uma diferença significativa entre eles ($t = 3,601$, $df = 7$, $p = 0,009$) (Figura 36)

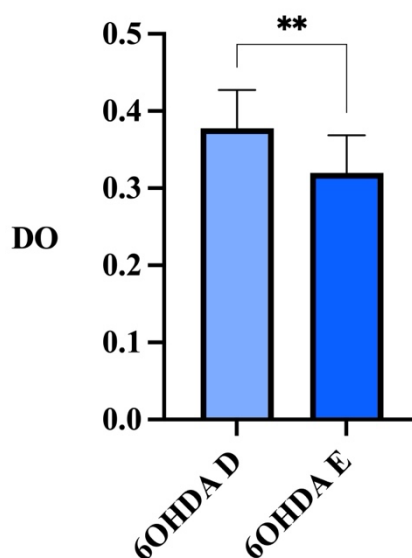


Figura 36 - DO do estriado direito do grupo 6-OHDA (6OHDA D) e do estriado esquerdo do grupo 6-OHDA (6OHDA E) - Teste t de Student pareado

Nota: ** $p < 0.01$

Procedeu-se ao cálculo da equação DO E/D (Tabela 3). Os valores obtidos da equação estriado esquerdo/estriado direito do grupo 6-OHDA+DBS e do grupo 6-OHDA seguiram uma distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, com valores de p de 0,97 e 0,67 respectivamente. Aplicou-se, então, o teste F, que não mostrou diferença nas variâncias. Assim, compararam-se os grupos por teste t de Student, que identificou diferença significativa entre eles ($t=2.657$, $df=12$, $p= 0,02$) (Figura 37).

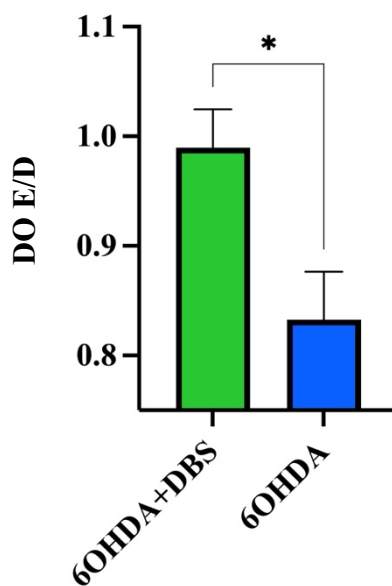


Figura 37 - DO E/D - Teste t de student

Nota: * $p<0.05$

5. DISCUSSÃO

Os estudos sobre estimulação cerebral profunda em roedores iniciam o protocolo de estimulação dias ou até semanas após a indução de parkinsonismo, diferentemente da proposta da presente pesquisa (Knorr *et al.*, 2022). Isso pode limitar tanto a avaliação da capacidade neuroprotetora quanto do efeito na redução de alterações motoras da intervenção proposta. Tal abordagem é justificada pela necessidade de excluir um efeito sobre a absorção ou o metabolismo da 6-OHDA nos indivíduos estudados (Harnack *et al.*, 2008; Mckinnon *et al.*, 2019). No entanto, ao desenvolver um grupo controle adequado, é possível contornar um eventual efeito confundidor decorrente do metabolismo da 6-OHDA no encéfalo dos roedores.

A proposta desta tese é original e não apresenta estudos similares que permitam uma comparação direta. Pode-se identificar na literatura alguns estudos similares em alguns aspectos, porém com diferenças estruturais importantes.

Um estudo investigou a neuroproteção em ratos implantando um eletrodo de DBS no NST anteriormente à lesão por 6-OHDA, com um protocolo de estimulação cerebral constante por duas semanas, não tendo sido replicado até o momento (Maesawa *et al.*, 2004). A presente tese se difere substancialmente deste estudo, tanto no animal de experimentação utilizado (camundongo) quanto nas análises realizadas. Esta tese inclui avaliações comportamentais e de mudanças de massa corporal, o que ainda não foi abordado na literatura.

Outro estudo que também se assemelha em alguns aspectos a esta tese utilizou o modelo de camundongo hemiparkinsoniano pela infusão de 6-OHDA e implementou um protocolo de estimulação elétrica composto por pulsos elétricos de 130 Hz de frequência, 90 μ s de duração de pulso e 100 μ A de corrente, com duração de 5 dias, 4 horas por dia. No entanto, o estudo foi realizado em animais manipulados geneticamente para expressar receptores de dopamina D1 e D2. A lesão foi realizada no MFB e o início da DBS ocorreu 14 dias após a lesão. Não houve avaliação de variáveis comportamentais, sendo o objetivo avaliar o efeito da DBS no núcleo estriado desses animais (Visanji *et al.*, 2015).

Duas revisões em 2022 avaliaram estudos de neuromodulação invasiva em roedores parkinsonianos (Knorr *et al.*, 2022; Merino Ruiz, Guimarães & Mortari, 2022). Conjuntamente, essas revisões identificaram sessenta e cinco artigos que abordam a pesquisa pré-clínica de DBS em DP utilizando roedores. Desses, apenas quatro utilizaram o camundongo como plataforma experimental. Considerando que os camundongos são

menores e têm custos de manutenção mais baixos, a pesquisa pré-clínica em diversas áreas tem optado por utilizá-los em vez de ratos (Bryda, 2013). Isso destaca uma oportunidade para avançar na pesquisa nessa área, utilizando camundongos, um modelo que ainda não foi explorado de forma abrangente.

Ao expandir o universo das experiências pré-clínicas para além da DP, a literatura mostra protocolos de neuromodulação invasiva em camundongos que foram realizados tanto com eletrodos desenvolvidos de forma artesanal (Schor & Nelson, 2019; Melo-Thomas *et al.*, 2018; Arsenault *et al.*, 2015) quanto com dispositivos manufaturados pela indústria (de Haas *et al.*, 2012; Schmuckermair *et al.*, 2013; Halpern *et al.*, 2014). Não há referência clara às características do dispositivo que permitam a conexão do eletrodo à fonte de energia, nem às características que reduzam o risco de deslocamento do eletrodo do alvo após fixação (Knorr *et al.*, 2022). Algumas empresas que disponibilizam dispositivos de estimulação cerebral para pesquisa pré-clínica mostram detalhes dos dispositivos em seus sites, focando-se principalmente no diâmetro, nas características (monopolares, bipolares ou bipolares concêntricos) e no material do eletrodo (FHC, 2020). Neste estudo, desenvolveu-se um eletrodo intracerebral com um diâmetro distal total de 140 μm . Esse valor é intermediário entre os diâmetros dos eletrodos utilizados até o momento em pesquisas pré-clínicas com modelos de roedores, que variam entre 50 e 300 μm , tanto em ratos quanto em camundongos (Knorr *et al.*, 2022). Para sua confecção, utilizaram-se materiais e especificações previamente descritos na literatura, incluindo um cátodo de platina e irídio, envolvido em um material não condutor e protegido por uma agulha romba 26G, que funciona como ânodo (Spieles-Engemann; Collier; Sortwell, 2010; Tobar *et al.*, 2020). O eletrodo está acoplado a uma placa de circuito impresso projetada com convexidades que facilitam a fixação do dispositivo ao crânio e ajudam a prevenir deslocamentos do eletrodo do alvo cerebral, características ainda não descritas na literatura.

Em relação aos custos, os eletrodos intracerebrais comercializados atualmente têm preços que oscilam entre 30 e 50 dólares (PROTECHINTERNATIONAL, 2024a; PROTECHINTERNATIONAL, 2024b), enquanto o dispositivo de neuromodulação produzido para esta tese teve um custo estimado de menos de seis dólares por unidade. Assim, o uso de materiais de baixo custo na fabricação deste dispositivo facilita a replicação do protocolo com um investimento reduzido, tornando a tecnologia mais acessível.

A perda de massa corporal nos primeiros dias após a indução do hemiparkinsonismo em camundongos é um fenômeno esperado e bem documentado (Heuer *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2015). Alguns protocolos de pesquisa excluem os animais das análises experimentais na ausência dessa perda de massa, pois nessa situação a indução da lesão por 6-OHDA pode não ter sido bem-sucedida (Valverde *et al.*, 2020). No entanto, na literatura atual, não existem dados sobre o efeito da DBS na massa corporal no modelo de DP em roedores, provavelmente devido à aplicação de protocolos de neuromodulação invasiva iniciados dias a semanas após a indução de parkinsonismo, nos quais os animais que sobrevivem à infusão intracerebral de 6-OHDA tendem a recuperar a sua massa corporal.

No presente estudo, apesar do comprometimento significativo do estado clínico dos animais na fase aguda após a indução de parkinsonismo, a DBS resultou em uma recuperação da massa corporal nos animais parkinsonianos (Figura 23). Embora não seja possível afirmar as causas exatas desse ganho de massa, é provável que esteja relacionado a uma melhoria motora que permitiu aos animais alimentar-se. Evidências derivadas de estudos em seres humanos também sugerem que a DBS pode ter efeitos no ganho de peso não apenas pelos efeitos favoráveis no desempenho físico, reduzindo o gasto energético decorrente de flutuações motoras e rigidez, mas também por induzir alterações metabólicas que aumentam a massa gorda (Steinhardt *et al.*, 2023).

É importante considerar que avaliar a saúde metabólica e o nível de estresse em animais de experimentação é complexo e envolve a análise de múltiplas variáveis, como os níveis séricos de cortisol, corticoides endógenos, glicemia, massa das glândulas adrenais, comportamento, ingestão alimentar e volume de líquido ingerido, além da perda de massa corporal, que devem ser considerados de forma integrada (Moberg; Mench, 2000). Portanto, este estudo, ao aferir apenas uma variável de bem-estar animal, sugere, mas não confirma, possíveis mudanças no estresse animal e na saúde metabólica decorrentes da DBS.

Outro aspecto importante observado é que os animais do grupo 6-OHDA + DBS seguiram a curva de ganho de massa corporal dos animais Naive até o dia da eutanásia no D7, mais de 48 horas após a cessação da DBS (Figura 23).

Vista a ausência de dados na literatura sobre efeitos da DBS após a suspensão da neuromodulação em roedores parkinsonianos (Zhang *et al.*, 2024), foi necessário recorrer a estudos em seres humanos. Evidências clínicas sugerem que pacientes com DP submetidos à DBS experimentam benefícios duradouros no tremor, bradicinesia e rigidez,

avaliados sem o uso de medicamentos antiparkinsonianos e estimulação cerebral em até 1 e 5 anos após o início do tratamento (Castrियोto *et al.*, 2011), sem que haja evidências consistentes de neuroproteção até o momento. Entretanto, a capacidade da DBS de manter o desempenho motor dos pacientes por vários anos após o procedimento cirúrgico, aferido na ausência da neuromodulação, tem sido questionada, pois as avaliações motoras ocorreram pouco tempo após a suspensão da neuromodulação profunda (Limousin; Foltynie, 2019), com intervalos entre a suspensão da DBS e as avaliações motoras oscilando entre 30 (Gervais-Bernard *et al.*, 2009) e 60 minutos (Castrियोto *et al.*, 2011).

Portanto, no modelo experimental de DP em roedores, ainda não há evidências na literatura de respostas motoras favoráveis após a cessação da DBS. Ainda assim, os dados do presente estudo sugerem que os animais parkinsonianos que receberam DBS mantiveram uma curva de recuperação da massa corporal perdida durante a fase aguda de estresse após a indução do parkinsonismo, provavelmente em decorrência de uma melhoria motora que permaneceu após a suspensão da estimulação.

No teste de performance motora por Rotarod, um dos testes mais sensíveis para detectar resposta relativa em relação à morte neuronal na SN em decorrência da lesão cerebral por 6-OHDA em camundongos (Iancu *et al.*, 2005), optou-se pelo uso de um protocolo com velocidade fixa, com o objetivo de obter dados mais sensíveis na detecção de pequenas mudanças no desempenho motor (Monville; Torres; Dunnett, 2006). Considerando a frequente perda de massa corporal, a morte prematura dos animais submetidos à infusão intracerebral de 6-OHDA e as suas dificuldades para alimentar-se e manter a temperatura corporal (Guillaumin; Vlcek; Wallén-Mackenzie, 2022), o desempenho motor dos animais do grupo 6-OHDA + DBS e os do grupo 6-OHDA ao ser comparado com os do grupo Naive mostrou uma diferença clara e esperada (Figura 24).

Porém, ao comparar somente os animais dos grupos 6-OHDA + DBS e 6-OHDA, identificou-se que o primeiro mostrou valores superiores de desempenho motor, aferido no Rotarod no D4, logo após as três horas de estimulação, mostrando o efeito favorável da DBS nessa avaliação (Figura 25).

Em 2020, Chen e colaboradores utilizaram o modelo de hemiparkinsonismo em rato, injetando 6-OHDA no estriado esquerdo, e após três semanas da lesão, estimularam eletricamente o NST ipsilateral com pulsos de 130 Hz de frequência, 90 μ s de duração de pulso e 100 μ A de corrente, constantemente por uma semana. Foram identificados no grupo que recebeu DBS efeitos favoráveis nos marcadores de neuroinflamação, assim

como no teste de performance motora no Rotarod, utilizando um protocolo com aumento progressivo no número de rotações por minuto (Chen *et al.*, 2020).

Fang e colaboradores, em 2006, avaliaram a melhora no desempenho motor de ratos hemiparkinsonianos submetidos a DBS no NST ipsilateral à lesão por 6-OHDA no MFB. Os autores criaram dois grupos de animais lesionados, injetando volumes diferentes de 6-OHDA. A DBS foi realizada após 4 semanas da lesão cerebral nos dois grupos, com pulsos de 130 Hz de frequência, 60 μ s de duração de pulso e 200 μ A de corrente, de até 1 hora por dia. A estimulação foi realizada somente durante as avaliações comportamentais, mostrando uma melhora no desempenho motor no Rotarod que foi significativa apenas no grupo submetido à lesão menor no MFB (Fang *et al.*, 2006).

Mottaghi e colaboradores, em 2021, estudaram o efeito na atividade de ondas beta intracranianas, relacionadas a bradicinesia e rigidez na DP, em animais hemiparkinsonianos. Para tal, eles induziram hemiparkinsonismo injetando 6-OHDA no MFB e, após 2 semanas, instalaram eletrodos de DBS no NST ipsilateral à lesão. Os autores instituíram um protocolo de estimulação com pulsos retangulares bifásicos de 130 Hz de frequência e 65 μ s de comprimento de pulso, sem clara referência à corrente utilizada, após duas semanas da lesão por 6-OHDA. A estimulação foi realizada somente durante os testes comportamentais (teste de campo aberto, de assimetria com o cilindro e de performance motora no Rotarod), identificando uma melhora no desempenho motor e na frequência da onda beta cortical nos animais estimulados eletricamente quando comparados aos hemiparkinsonianos que não receberam estimulação (Mottaghi *et al.*, 2021).

Tibar e colaboradores, em 2020, publicaram um estudo no qual procuraram validar um dispositivo de DBS portátil em ratos hemiparkinsonianos. Eles iniciaram o protocolo de estimulação 38 dias após a indução do hemiparkinsonismo. Os parâmetros de estimulação utilizados foram de pulsos de 130 Hz de frequência, 60 μ s de duração de pulso e 300 μ A de corrente, de forma contínua, por 1 semana. O desempenho motor dos animais hemiparkinsonianos no Rotarod, avaliados sem estimulação cerebral entre o 34º e o 37º dia, foi inferior quando comparado ao desempenho motor dos mesmos animais entre o 39º e o 44º dia, sob o efeito da DBS (Tibar *et al.*, 2020).

Os protocolos dos artigos mencionados anteriormente diferem significativamente do utilizado neste estudo. O rato é o modelo animal mais amplamente empregado, o teste de desempenho motor com o Rotarod segue um protocolo de velocidade crescente e o tempo de estimulação cerebral varia amplamente, de semanas até somente uma hora.

Apesar das variações nos protocolos, todos os estudos, incluindo esta tese, mostraram uma resposta motora favorável no teste de performance motora com o uso do Rotarod.

Neste estudo, a melhora na performance observada no Rotarod foi aferida após a suspensão da estimulação cerebral, o que poderia sugerir uma persistência dos benefícios induzidos pela DBS. Não há na literatura evidências claras de um efeito motor prolongado em roedores parkinsonianos neuromodulados fora da estimulação cerebral, avaliado pelo teste de Rotarod. Além disso, nem todos os estudos que utilizaram o Rotarod especificaram a fase do protocolo na qual o teste foi realizado. Tibar e colaboradores (2020), Fang e colaboradores (2006) e Mottagui e colaboradores (2021) indicaram que o teste foi conduzido durante a estimulação cerebral profunda, enquanto Chen e colaboradores (2020) não mencionaram se o teste foi realizado durante a neuromodulação. Nesta tese, considerando que o teste foi realizado imediatamente após a suspensão da estimulação, não é possível afirmar com certeza a existência de um efeito motor prolongado da neuromodulação invasiva, visto que o efeito motor pode não ser persistente.

O teste do cilindro foi desenvolvido para avaliar o volume de movimento do animal no relacionado ao uso do membro superior deficitário em decorrência da lesão encefálica, no caso, induzida por 6-OHDA. O coeficiente de assimetria (Woodlee *et al.*, 2008) obtido e derivado dele foi utilizado no estudo. Os animais saudáveis exploram o ambiente com os membros superiores direito e esquerdo de forma simétrica, obtendo valores do coeficiente de assimetria de aproximadamente 50%, como observado no grupo Naive. Valores acima de 50% indicam o uso preferencial do membro ipsilateral à lesão, ou não-deficitário, e valores abaixo de 50% indicariam o uso preferencial do membro contralateral à lesão, ou seja, o deficitário, em decorrência da lesão.

Os animais submetidos a DBS apresentaram um coeficiente de assimetria não diferente ao do grupo Naive (Figura 26), o que indicaria que os animais desse grupo exploraram o ambiente utilizando o membro contralateral à lesão de forma equivalente aos animais não lesionados. Somente os animais do grupo 6-OHDA apresentaram um coeficiente de assimetria maior em comparação com o grupo Naive, no D2 e no D4, mostrando o uso preferencial do membro sadio durante a exploração do ambiente (Figura 26).

Huotarinen e colaboradores (2019) publicaram um estudo com o objetivo de descrever os efeitos discinéticos da DBS, assim como o desempenho no cilindro em ratos hemiparkinsonianos, após infusão de 6-OHDA no MFB. O eletrodo de estimulação

cerebral foi implantado seis semanas após a indução da lesão. Os autores definiram como parâmetros de estimulação pulsos elétricos de 130 Hz de frequência e de 60 μ s de duração, por três dias. Foram definidos dois protocolos de corrente, em função do aparecimento de discinesias induzidas pela estimulação elétrica, um sendo de alta e outro de baixa corrente, cada um não superior a 400 μ A. O primeiro fez a contagem total dos contatos tanto com o membro superior direito, esquerdo e com os dois membros. O segundo considerou os contatos com os dois membros como um contato com o membro superior direito ou esquerdo a depender de qual membro tocou primeiro no cilindro, exceto quando o contato com os dois membros ocorreu muito próximo. O desempenho motor no teste do cilindro se mostrou favorável nos grupos estimulados, tanto nos animais que receberam corrente alta como nos que receberam corrente baixa (Huotarinen *et al.*, 2019).

Spieles-Engelmann e colaboradores (2011) estudaram o efeito da DBS no Fator Neurotrófico derivado do cérebro, ou BDNF (*Derived Neurotrophic Factor*) no modelo de rato hemiparkinsoniano, por uma injeção de 6-OHDA intraestriatal, recebendo pulsos de estimulação cerebral bipolar numa frequência de 130 Hz, 60 μ s de duração de pulso e de 30–50 μ A de corrente, iniciadas duas semanas após a lesão, que se manteve constante por duas semanas. As avaliações de desempenho motor incluíram o teste de assimetria, que mostrou melhoria na exploração do meio usando o membro contralateral à lesão no grupo de animais hemiparkinsonianos quando expostos à DBS, mas que se perdeu após 24 horas da suspensão do estímulo (Spieles-Engemann *et al.*, 2011).

Outra publicação (Valverde *et al.*, 2020) utilizou a optogenética para estudar os fenômenos intracerebrais associados à DBS, utilizando camundongos transgênicos que expressavam canalrodopsinas em dois tipos de interneurônios GABAérgicos corticais (parvalbumínicos e somatostatínicos). Foi induzido hemiparkinsonismo nesses camundongos transgênicos, assim como em camundongos selvagens, pela infusão de 6-OHDA no MFB. Os parâmetros de estimulação estipularam pulsos de 60 μ s de comprimento, 120 μ A de corrente de 130 Hz de frequência, por dois minutos, durante as avaliações nos testes comportamentais. Uma das análises realizadas foi o teste do cilindro, utilizando um coeficiente de assimetria que calculava a porcentagem de contatos na parede do cilindro com o membro ipsilateral à lesão e subtraindo desse valor a porcentagem de contatos na parede do cilindro realizados com o membro contralateral à lesão. Os animais que receberam optoativação de neurônios GABAérgicos somatostatínicos corticais mostraram resposta motora favorável à DBS no teste do

cilindro. No entanto, os animais com neurônios GABAérgicos parvabulínicos optoativados e os animais selvagens não mostraram essa resposta.

Vários fatores impedem estabelecer comparações diretas entre os resultados obtidos em estudos anteriores e os deste estudo. Dentre eles estão: o protocolo de indução de parkinsonismo, com lesões no MFB ou no estriado; o tempo de início da neuromodulação após a lesão nigroestriatal; o tempo de duração e os parâmetros de estimulação; e os diferentes métodos para calcular e expressar os valores de assimetria. Apesar disso, tanto neste estudo como nos previamente publicados, foram observadas respostas motoras favoráveis no teste de assimetria realizado a partir do uso do cilindro em roedores hemiparkinsonianos submetidos a DBS.

Procurando aferir a exploração do ambiente por parte dos animais utilizando o membro contralateral à lesão, foi calculado o número de vezes que eles fizeram contato com a parede do cilindro utilizando o membro superior contralateral à lesão, somado à metade do número de contatos com os dois membros superiores. Esse cálculo foi denominado Índice de Preservação da Motricidade (IPM). O objetivo dessa aferição é quantificar a exploração do ambiente utilizando o membro com movimentação diminuída devido à lesão intracerebral com 6-OHDA. Não há na literatura registros de tentativas de aferir o volume de movimento por essa avaliação, o que impossibilita comparações.

Ao analisar os dados de cada dia de estimulação de forma isolada, o IPM não mostrou diferenças entre os grupos grupo 6-OHDA + DBS 6-OHDA (Figura 27). No entanto, ao avaliar a média dos valores do IPM durante os quatro dias de protocolo, o grupo 6-OHDA + DBS apresentou um número maior de contatos do que o grupo 6-OHDA (Figura 28), sugerindo que a estimulação cerebral resultou em um maior volume de movimentos do membro contralateral à lesão. O cálculo do tamanho do efeito reforça essa afirmação.

Na literatura, há relatos de aumento da resistência elétrica logo após o procedimento de colocação do eletrodo cerebral, em encéfalos de rato e de primata não-humano (Badstübner *et al.*, 2012; Lempka *et al.*, 2009), atribuídos à formação de um processo de encapsulamento do dispositivo intracerebral. Por sua vez, em seres humanos, há dados consistentes da diminuição da resistência com o passar do tempo, porém as aferições realizadas foram predominantemente após 1 mês do procedimento cirúrgico (Cheung *et al.*, 2013), até um ano (Hartmann *et al.*, 2015).

Deve-se considerar também que a avaliação da resistência do circuito desenvolvido para este estudo foi realizada por um osciloscópio e foi numa onda

monofásica, quadrada, de 100 μ A de corrente, 130 Hz de frequência e 60 μ s de duração de pulso, similares às utilizadas nos seres humanos (Shi; Zhang, 2021). No entanto, os dados aferidos em estudos prévios em animais que mostraram um aumento de resistência elétrica logo após a instalação de eletrodos cerebrais avaliaram ondas sinusoidais aferidas por um espectrômetro, o que não permite uma extrapolação correta desses dados para o processo real de DBS cerebral em humanos, realizado por ondas não sinusoidais (Lempka *et al.*, 2009), nem permite uma comparação adequada com dados de resistência apresentados neste estudo (Figura 22).

A capacidade de preservação dos neurônios nigrais associada à DBS da NST em roedores parkinsonianos induzidos pela infusão intracerebral de 6-OHDA, identificada nesse estudo (Figuras 29, 30 e 31), tem sido previamente descrita em outras publicações.

Há na literatura, quatro estudos desenvolvidos em roedores, frequentemente citados (Knorr *et al.*, 2022; Mckinnon *et al.*, 2019), que mostraram neuroproteção de neurônios nigrais.

O primeiro, previamente citado nesta tese, é o de Maesawa e colaboradores, que em 2004, de forma pioneira, identificaram neuroproteção nos ratos submetidos, precocemente a DBS (Maesawa *et al.*, 2004). Os autores propuseram um protocolo no qual a implantação do eletrodo precedeu a indução experimental de parkinsonismo e mantiveram a estimulação cerebral do NST por duas semanas, de forma constante. Após esse período, eles realizaram o teste comportamental rotacional de apomorfina. Foram estudados três grupos de ratos. O primeiro grupo de animais recebeu um eletrodo intracerebral bipolar concêntrico no NST e, após dois dias, uma infusão intraestriatal de 40 μ g de 6-OHDA. O segundo recebeu o mesmo procedimento, mas o eletrodo não foi ativado. O terceiro recebeu somente a infusão de 6-OHDA. Utilizaram parâmetros de estimulação similares aos do protocolo desta tese (130Hz de frequência de pulso, 60 μ s de comprimento de pulso e 80-100 μ A de corrente). Os autores identificaram que nos animais do primeiro grupo houve uma preservação de neurônios dopaminérgicos de ao redor de 84%. No segundo, de 43% e no terceiro, de 21%. Não houve diferença estatística entre a porcentagem de neurônios preservados no segundo e terceiro grupos.

O segundo é o publicado por Temel e colaboradores (2006). Os autores utilizam também ratos como modelo experimental de DP induzida pela infusão de 6-OHDA intraestriatal. Os autores estudaram três grupos de animais. O primeiro recebeu uma infusão bilateral de solução fisiológica intraestriatal. O segundo, uma infusão bilateral de 10 μ g de 6-OHDA em cada estriado. O terceiro, o mesmo procedimento lesional, além da

implantação de dois eletrodos bipolares concêntricos, alvejando bilateralmente o NST. O protocolo de estimulação, iniciado após uma semana da indução do parkinsonismo, se estendeu por três meses, por uma hora ao dia. Os parâmetros de estimulação foram de 130 Hz de frequência de pulso, 60 μ s de duração de pulso e 30 μ A de corrente. Ao induzir lesões e implantar DBS bilateralmente, os dois lados dos animais evoluíram praticamente idênticos. Os autores observaram que os animais parkinsonianos que receberam neuromodulação apresentaram uma contagem de neurônios com um valor que correspondeu de 72 a 74% do obtido nos animais que receberam solução fisiológica intraestriatal. Em contrapartida, os animais parkinsonianos que não receberam neuromodulação apresentaram uma contagem de neurônios correspondente ao 53 a 55% do número de neurônios contabilizados no grupo que recebeu solução fisiológica intraestriatal. Os animais parkinsonianos que receberam neuromodulação tiveram uma contagem de neurônios ao redor de 30% maior do que os que não a receberam. Não houve análises comportamentais.

O terceiro foi o de Harnack e colaboradores (2008). Esses autores estudaram três grupos de ratos. O primeiro grupo recebeu uma infusão intraestriatal de 20 μ g de 6-OHDA e a implantação de um eletrodo cerebral no NST, ativado. O segundo, o mesmo procedimento, porém com o eletrodo inativo. O terceiro, somente a infusão de 6-OHDA. A DBS se iniciou cinco dias após a indução da lesão, e manteve-se constante por duas semanas. Os parâmetros de estimulação utilizados foram de 130 Hz de frequência de pulso, 52 μ s de comprimento de pulso e 50 μ A de corrente. Ao comparar o lado lesionado com o lado sadio, os autores identificaram uma preservação de 44,5% dos neurônios dopaminérgicos nigrais TH⁺ nos animais parkinsonianos que receberam neuroestimulação. Em contraste, os animais parkinsonianos com eletrodo cerebral inativo preservaram apenas 30% desses neurônios e os animais parkinsonianos sem eletrodos instalados preservaram 27%.

O quarto é o estudo de Spieles-Engelman e colaboradores (2010). Esses autores estudaram a capacidade neuroprotetora da neuromodulação do NST utilizando dois grupos de ratos. Os dois grupos de animais receberam uma infusão intraestriatal de 20 μ g de 6-OHDA e a implantação de um eletrodo bipolar concêntrico de estimulação cerebral no dorso do NST, sendo que no primeiro o eletrodo foi ativado e no segundo, o eletrodo se manteve inativo. O protocolo de estimulação, que consistiu em um estímulo elétrico de 130 Hz de frequência de pulso, 60 μ s de duração de pulso e 100 μ A de corrente, foi iniciado duas semanas após a indução do parkinsonismo e se manteve constante por mais

duas semanas. Foi identificada uma preservação dos neurônios TH+ nigrais nos animais submetidos a estimulação cerebral de ao redor de 46%, em comparação com os animais parkinsonianos não neuromodulados, nos quais houve uma preservação de 25%.

É interessante identificar que o modelo utilizado em todos os estudos acima referidos foi o de 6-OHDA em infusão intraestriatal. Esse protocolo de indução de parkinsonismo é considerado um modelo que de DP crônica, pois apresenta uma evolução na degeneração do sistema nigroestriatal dos animais de experimentação, que evolui com o passar do tempo (Sauer; Oertel, 1994), diferentemente do modelo de parkinsonismo agudo, com infusões de 6-OHDA no MFB, que induzem um parkinsonismo grave e degeneração rápida do sistema nigroestriatal do animal (Boix; Padel; Paul, 2015). Ao estudar a eventual capacidade neuroprotetora de um tratamento, certamente é indicado o uso de um modelo que evolui em piora com o tempo, com o objetivo de que a intervenção a ser testada modifique essa evolução.

Deve-se considerar que não há como estabelecer uma relação direta entre o modelo animal usado nas pesquisas acima, nas quais foram utilizados ratos como animal experimental, com o desta tese, que usa o camundongo. Além disso, o modelo utilizado neste trabalho recebeu uma dose de 40 µg de 6-OHDA no estriado, que é uma dose consideravelmente superior à maioria das doses utilizadas na literatura (Smith; Heuer, 2011), mas que induz claro comprometimento motor além de inequívocos sinais de degeneração nigroestriatal, com ao redor de 70% de morte neuronal dopaminérgica (Biolchi *et al.*, 2020; Oliveira Amaral; Mortari, 2018). Em modelos experimentais de roedores que receberam doses proporcionalmente menores, por vezes, não são claramente identificadas quedas no desempenho motor nos testes comportamentais (Yuan *et al.*, 2005), assim como as alterações histopatológicas induzidas pela neurotoxina na SN (Homolak *et al.*, 2024).

Deixando de lado as diferenças metodológicas, no que é relacionado à capacidade de preservação neuronal, os dados apresentados nesta tese, em que se obteve uma preservação média dos neurônios dopaminérgicos de 88% nos animais parkinsonianos submetidos a DBS, são similares aos encontrados por Maesawa e colaboradores (2004), que obtiveram uma taxa de preservação de neurônios de 84% nos animais parkinsonianos tratados com DBS, e por Temel e colaboradores (2006), que identificaram preservação de 72 a 74%. Por outro lado, tanto Harnack e colaboradores (2008) como Spieles-Engelman e colaboradores (2010) obtiveram porcentagens de preservação de neurônios nigrais dopaminérgicos menores, mas ainda relevantes, de 44 e 46%, respectivamente.

Sobre os dados apresentados que sugerem uma compartimentalização na capacidade neuroprotetora dos neurônios nigrais em decorrência do uso da DBS, não há na literatura dados que mostrem uma abordagem similar à desenvolvida nesta tese. Os dados apresentados mostraram que não houve diferença na preservação de neurônios TH⁺ na região medial da SNpc, mas ao observar as regiões central e lateral, observou-se clara na preservação neuronal nos animais parkinsonianos que receberam DBS (Figura 33).

Sauer e Oertel (1994) descreveram uma concentração maior de um marcador neuronal fluorescente (FluoroGold), na região medial da SN de rato após a sua infusão no estriado ipsilateral (Sauer; Oertel, 1994) e justificaram esse achado por causa de uma conexão íntima entre a região medial da SN e o dorso do estriado descrita em estudos sobre a conformação da rede nigroestriatal de roedores (Björklund; Dunnett, 2007). Há relatos na literatura de uma maior morte neuronal na região medial da SN em ratos após infusão de 6-OHDA no MFP (Zuch *et al.*, 2000).

Pode-se hipotetizar que a causa da compartimentalização da SNpc na capacidade de preservar neurônios TH⁺ mediada pela DBS no NST pode estar relacionada à conformação do sistema nigroestriatal de roedores. A 6-OHDA foi infundida no estriado dorsal no animal, que possui uma rede rica de interconexões neuronais com a SNpc, de forma mais significativa na região medial. Assim, a região nigral que sofreu inicialmente e em maior volume as agressões metabólicas decorrentes da infusão da neurotoxina terá sido provavelmente essa região. Por consequência, provavelmente os efeitos neuroprotetores da DBS não foram capazes de agir de forma clara nesse processo de morte neuronal na SNpc medial. Entretanto, nas regiões nigrais em que a agressão por 6-OHDA não foi tão intensa, provavelmente em decorrência de uma interconexão neuronal menos rica com o dorso do estriado, os efeitos neuroprotetores da DBS puderam ser mais facilmente observáveis.

Não há estudos que tenham avaliado a neuroproteção das fibras estriatais dopaminérgicas por meio de DBS em modelos de DP induzidos por neurotoxinas em um protocolo de estimulação cerebral precoce. Estudos que abordem essa variável, permitindo comparar os dados apresentados nesta tese são escassos. O estudo previamente comentado de Spieles-Engelman (Spieles-Engemann *et al.*, 2010) é um deles. Os autores compararam a densidade de fibras TH⁺ no estriado de dois grupos de ratos, após receberem infusão intraestriatal de 6-OHDA: um grupo que recebeu neuromodulação após duas semanas da indução do parkinsonismo e outro que não recebeu neuromodulação. Em contraste com os achados compatíveis com neuro proteção

de neurônios nigrais, eles não relataram sinais de neuroproteção das fibras dopaminérgicas estriatais associados à DBS. Em uma análise intragrupo, eles relataram valores de DO média nos estriados do lado lesionado de ao redor de 76% menor do que o sadio nos animais que receberam DBS, e de 93% menor nos que não receberam. É importante considerar que esses autores utilizaram uma técnica para aferir a densidade estriatal dopaminérgica que foi diferente à aplicada nesta tese, pois fizeram uso da sonda Space Ball, desenvolvida para estudar o comprimento de axônios, dendritos e capilares (West, 2018).

Um estudo que aferiu a DO dos cortes de estriado pelo software ImageJ, ainda que com um protocolo de aquisição e análise de imagens diferente ao utilizado nesta tese, foi o de Du e colaboradores em 2018 (DU *et al.*, 2018). Os autores estudaram quatro grupos de ratos. O primeiro recebeu uma infusão intraestriatal de solução fisiológica e os outros três receberam 10 µg de 6-OHDA somente em um dos estriados. O segundo grupo não foi submetido à implantação de eletrodos intracerebrais. O terceiro e o quarto grupos receberam eletrodos intracerebrais no NST, mas somente o último grupo recebeu neuromodulação efetivamente. O protocolo foi iniciado após três semanas da indução da lesão cerebral e consistiu em um estímulo elétrico de 130 Hz de frequência de pulso, 90 µs de duração de pulso e 100 µA de corrente, mantido por sete dias, de forma contínua. Os autores analisaram os valores intragrupo da DO aferida nos estriados dos animais parkinsonianos. O quarto grupo, que recebeu neuromodulação, apresentou um valor de DO aferida nos estriados lesionados que foi 74% menor quando comparado ao lado sadio. Por outro lado, nos animais parkinsonianos tanto do segundo quanto do terceiro grupo, que não receberam neuroestimulação, os dados foram praticamente idênticos e mostraram um valor de DO aferida nos estriados lesionados que foi 84% menor quando comparado ao lado sadio.

Observou-se que os protocolos experimentais aplicados nos estudos acima referidos para a aferição da densidade de fibras dopaminérgicas estriatais foram muito diferentes dos aplicados nesta tese. Há também diferenças importantes no modelo animal utilizado, na dose proporcional em µg/Kg de 6-OHDA empregada, no tempo transcorrido entre a indução do parkinsonismo e o início da DBS, assim como o número de dias que os animais foram submetidos a neuromodulação. Todas essas diferenças podem ter influenciado na disparidade entre os dados de literatura, que afirmaram não ter identificado sinais de neuroproteção das fibras estriatais dopaminérgicas, e os propostos nesta tese, em que foi possível identificar esse efeito (Figuras 35 e 36).

Uma revisão publicada em 2022 (Knorr *et al.*, 2022) hipotetizou que as dificuldades em identificar uma capacidade neuroprotetora da DBS nas fibras dopaminérgicas estriatais pode se dever à possibilidade da DP se comportar como uma axonopatia (Cheng; Ulane; Burke, 2010), com o início do quadro motor e a sua progressão em decorrência de uma disfunção fora o corpo neuronal, além de achados de uma maior degeneração estriatal de fibras dopaminérgicas (Kish; Shannak; Hornykiewicz, 1988; Scherman *et al.*, 1989) do que de neurônios nigrais em estudos pós morte de pacientes portadores de DP.

Ademais, chama a atenção os altos valores de DO obtidos nesta tese, não somente no grupo 6-OHDA + DBS senão também no grupo 6-OHDA (Figuras 35 e 36), muito diferentes de dados publicados em outros estudos. A 6-OHDA, após ser injetada no estriado dos animais de experimentação, só pode ter atingido a SNpc pelas fibras dopaminérgicas nigroestriatais. Os dados na tese não apontaram para uma franca degeneração nessas fibras. Ainda, não é possível afirmar que a presença da marcação por TH corresponda às fibras neuronais com função preservada. Há que se considerar a possibilidade de que a enzima TH identificada corresponda a axônios não mais viáveis, ainda presente nos cortes e que, pelo curto tempo entre a indução da lesão e a eutanásia, ainda não tenha sido possível identificar uma diminuição na sua concentração. Na tese aqui apresentada, o tempo entre a indução da lesão e a eutanásia foi de sete dias, mas nos estudos da literatura previamente citados foram de quatro semanas, um tempo no qual o tecido cerebral pode ter conseguido depurar a TH de fibras neuronais não mais viáveis.

Entretanto, tanto no estudo de Spieles-Engelman e colaboradores (2010) como no de Du e colaboradores (2008), cujos autores identificaram clara diferença ao comparar os dados intragrupo da DO aferida nos estriados lesionados e os sadios dos animais parkinsonianos, tanto os que receberam neuromodulação como os que não a receberam, não se procurou identificar se houve uma diferença intergrupo entre as densidades de fibras dopaminérgicas estriatais aferidas neles. Optou-se, então, por utilizar os dados de DO publicados nos estudos acima citados para calcular uma diferença *intergrupos*, pelo cálculo do coeficiente DO E/D. Obteve-se diferença em favor dos animais parkinsonianos que receberam neuromodulação, que foi de 72% no primeiro estudo e de 61% no segundo. Entretanto, ao não dispor dos dados completos, não é possível avaliar se esses dados são estatisticamente relevantes. Nesta tese, a comparação intergrupos calculada pelo coeficiente DO E/D foi de 84%, sendo estatisticamente relevante (Figura 37).

Conferimos então que, ao comparar os coeficientes DO E/D calculados a partir dos dados das duas pesquisas previamente publicadas e acima discutidas, os valores dos dados publicados por Spieles-Engelman e colaboradores (2010) foram superiores aos de Du e colaboradores (2008). Devemos observar que os primeiros autores iniciaram o protocolo de neuromodulação duas semanas após a indução do parkinsonismo, e o mantiveram por duas semanas, enquanto os outros iniciaram o protocolo de DBS após três semanas da indução da lesão, e o mantiveram por uma semana.

Em suma, na mesma linha dos dados que indicam neuroproteção nos neurônios da SNpc nos animais parkinsonianos que receberam DBS, neste estudo se observou uma maior densidade das fibras dopaminérgicas TH⁺ do grupo 6-OHDA + DBS quando comparado ao grupo 6-OHDA. Esses achados foram identificados tanto nas comparações intragrupos (comparando as diferenças entre os lados sadio e lesionado dentro de um grupo) quanto intergrupos (comparando as diferenças da relação na DO aferidas no estriado do lado doente/sadio de um grupo, com o outro). A literatura consultada focou nas diferenças intragrupo, sem identificar sinais de neuroproteção. Utilizando os dados publicados, calcularam-se comparações intergrupos, que mostraram uma diferença a favor dos animais parkinsonianos que foram submetidos à DBS. Essa diferença foi maior nos animais que receberam neuromodulação com um menor intervalo de tempo após a lesão nigroestriatal, assim como nos que receberam um maior tempo de estimulação.

Finalmente, é importante considerar que todos os resultados favoráveis, tanto motores como de neuroproteção, identificados nos camundongos parkinsonianos que receberam neuromodulação invasiva, podem não ser somente decorrentes dos efeitos elétricos no NST. O protocolo contemplou eletrodos colocados na região dorsal desse núcleo que, tanto no encéfalo dos camundongos assim como nos seres humanos, corresponde à *Zona Incerta* (ZI) (Watson; Lind; Thomas, 2014). Essa região está composta por grupamentos neuronais de diferentes naturezas, assim como por projeções pálido, nigro e cerebelo talâmicas envolvidas na geração de bradicinesia, rigidez e tremor (Ossowska, 2020). Estudos com roedores mostraram que intervenções lesionais farmacológicas ou elétricas nessa região modificam a expressão dos sinais motores parkinsonianos (Milner; Mogenson, 1988; Ossowska *et al.*, 1993).

Estudos de DBS na ZI nos roedores são escassos. Benazzouz e colaboradores (2004) estudaram os efeitos metabólicos no NST em decorrência da estimulação cerebral profunda de forma conjunta do NST e da ZI, em ratos parkinsonianos (Benazzouz *et al.*, 2004). Os autores não avaliaram mudanças comportamentais ou sinais de neuroproteção

nos animais experimentais. Em contrapartida, há evidência de que nos pacientes portadores de DP, a neuromodulação da ZI traz efeitos motores favoráveis (Garcia-Garcia *et al.*, 2016), porém talvez não na mesma intensidade do que os induzidos pela neuromodulação da NST (Welter *et al.*, 2014).

Os resultados são de difícil interpretação, considerando as diferenças citoarquiteturais dessa região, com populações neuronais muito diferentes dependendo da subregião da ZI (Ossowska, 2020), assim como pelas dificuldades de restringir o campo elétrico neuromodulatório a essa região, visto o espriamento de corrente fornecida pelos eletrodos localizados na região dorsal da NST, que atingirão grupamentos neuronais, assim como axônios presentes na ZI (Yokoyama *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÃO

O dispositivo de estimulação cerebral profunda desenvolvido para este estudo mostrou-se eficaz, de baixo custo, com uma estrutura favorável ao ancoramento no crânio e com dimensões adequadas ao encéfalo de camundongos.

Os dados apresentados no estudo mostram um ganho de massa corporal, um efeito motor favorável, uma redução da perda de terminações dopaminérgicas estriatais e um efeito neuroprotetor nos neurônios nigrais, tanto globalmente quanto compartimentalizado, mais evidente nas regiões centrais e laterais da SNpc de camundongos parkinsonianos que receberam quatro dias de DBS, três horas por dia, iniciada um dia após a indução do parkinsonismo por 6-OHDA, em comparação com aqueles que não a receberam.

Assim, obteve-se uma sólida plataforma de pesquisa em neuromodulação invasiva em camundongos parkinsonianos.

Outros estudos são necessários para confirmar os achados identificados nesta tese. Porém, ainda que muito preliminares, encoraja-se a pesquisa das capacidades de neuroproteção da neuromodulação invasiva em estágios precoces da doença, provavelmente antes mesmo do aparecimento dos sinais motores.

Possivelmente, futuramente, será possível diagnosticar e estadiar a DP antes mesmo do início dos sinais motores. Nesse momento, estratégias neuroprotetoras sabidamente eficazes terão um lugar preponderante no arsenal terapêutico para o tratamento da doença.

Indicar procedimentos neurocirúrgicos invasivos numa doença diagnosticada seguindo critérios biológicos e não clínicos, em uma fase na qual ainda não se identifiquem claramente sinais compatíveis com a doença, envolve questões éticas relevantes. Entretanto, em um cenário em que terapias neuroprotetoras conservadoras instituídas em estágios precoces da DP não obtenham sucesso em frear ou mesmo retardar o avanço da doença, poderá ser viável discutir a progressão na invasibilidade das estratégias terapêuticas para atingir neuroproteção.

7. DIFICULDADES VENCIDAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O protocolo de neuromodulação invasiva desenvolvido para esta tese se iniciou no início do ano de 2020. Naquela época, o surto de COVID-19, causado pelo novo Coronavírus SARS-CoV-2, teve um impacto devastador em todo o mundo. Surgido no final de 2019, rapidamente se espalhou globalmente, resultando em milhões de mortes e causando uma crise sem precedentes nos sistemas de saúde. A pandemia também gerou uma profunda crise econômica, com o fechamento de negócios, aumento do desemprego e a interrupção de atividades educativas e científicas (Furtado *et al.*, 2023).

A Universidade de Brasília, não indiferente à situação epidemiológica, procedeu à suspensão das atividades didáticas presenciais. Os laboratórios foram fechados. A Etapa 1 do Plano Geral de Retomada das Atividades na Universidade de Brasília (Rossi, 2021) contemplou o início da retomada gradual presencial de atividades administrativas essenciais que deviam ser realizadas presencialmente e a manutenção das demais atividades administrativas de forma remota a partir de outubro de 2021, um ano e dez meses após o início do doutorado.

As restrições impostas pela pandemia afetaram diretamente a elaboração do protocolo desta tese, exigindo resiliência, criatividade e soluções inovadoras para dar continuidade ao processo.

Atualmente, o protocolo desenvolvido abre um caminho para o desenvolvimento de futuros estudos pré-clínicos em neuromodulação invasiva, área de grande impacto e interesse científico (Krauss *et al.*, 2021).

Hoje, com a técnica neurocirúrgica e os cuidados pós-operatórios dos animais aprimorados, há a possibilidade de estudar os efeitos motores e neuroprotetores decorrentes de períodos mais longos de neuromodulação. Nesse contexto, o dispositivo de neuromodulação desenvolvido e testado nesta pesquisa pode ser utilizado em futuros estudos e servir de base para ser adaptado a outros modelos animais.

Protocolos futuros poderão incluir outras avaliações comportamentais, dentre elas, o uso do teste de apomorfina. Essa substância é um agonista dopaminérgico que, quando injetado subcutaneamente em animais hemiparkinsonianos, induz rotações no animal no sentido contralateral à lesão, devido à hipersensibilidade dos seus receptores dopaminérgicos (Von Voigtlander; Moore, 1973). O número de rotações que os animais apresentam se correlaciona ao grau da lesão do sistema nigroestriatal (Boix; Padel; Paul, 2015).

Visto que o protocolo experimental definiu que a neuroestimulação seria realizada em corrente constante, mas o estimulador elétrico utilizado funciona a voltagem constante, aferiu-se a resistência do sistema encéfalo-eletrodo. Esse procedimento permitiu calcular a voltagem necessária para fornecer a corrente a ser entregue ao encéfalo do animal. Essa estratégia se revelou um recurso interessante para o estudo do comportamento da resistência elétrica ao longo do tempo, abrindo o caminho para estudar as mudanças na condutividade e resistência elétrica no cérebro de animais neuromodulados e não neuromodulados, investigando as interações entre o tempo e a corrente na resistência elétrica do sistema encéfalo-eletrodo.

Para o aprimoramento das análises histológicas, introduziu-se um protocolo novo de quantificação da marcação TH+. Esse novo método se mostrou bastante eficaz, podendo substituir ou complementar métodos atuais de contagem celular.

Com base no protocolo desta tese, futuros estudos poderão focar-se em abordar estratégias neuroprotetoras combinadas, associando a neuromodulação invasiva ao uso de fármacos com eficácia neuroprotetora comprovada em camundongos (Mayer *et al.*, 2024).

REFERÊNCIAS

AAMODT, W. W. *et al.* Caregiver Burden in Parkinson Disease: A Scoping Review of the Literature from 2017-2022. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 96-113, mar. 2024.

AGID, Y.; CHASE, T.; MARSDEN, D. Adverse reactions to levodopa: drug toxicity or progression of disease? **The Lancet**, [s. l.], v. 351, n. 9106, p. 851-852, mar. 1998.

ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 366-375, jan. 1989.

ALLAIN, H.; BENTUÉ-FERRER, D.; AKWA, Y. Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 25-39, 2008.

ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE. **Allen Reference Atlas**. Disponível em: www.atlas.brain-map.org. Acesso em: 12 maio. 2024a.

ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE. **Allen Mouse Brain Atlas**. Disponível em: www.mouse.brain-map.org. Acesso em: 12 maio. 2024b.

AMARAL, H. de Oliveira; MORTARI, M. R. **Avaliação neuroprotetora do peptídeo Occidentalina-1202 em modelo murino da doença de Parkinson**. [Brasília, DF]: Universidade de Brasília, 2018.

ANDERSON, D. N. *et al.* Anodic stimulation misunderstood: Preferential activation of fiber orientations with anodic waveforms in deep brain stimulation. **Journal of Neural Engineering**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 01626, fev. 2019.

ANGELOPOULOU, E. *et al.* Environmental Impact on the Epigenetic Mechanisms Underlying Parkinson's Disease Pathogenesis: A Narrative Review. **Brain Sciences**. [s. l.], v. 12, n. 2, p. 175, fev. 2022.

ANTONINI, A. *et al.* The progression of non-motor symptoms in Parkinson's disease and their contribution to motor disability and quality of life. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 259, n. 12, p. 2621-2631, dez. 2012.

ARIFIN, W. N.; ZAHIRUDDIN, W. M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 101-105, set. 2017.

ARSENAULT, D. *et al.* A novel combinational approach of microstimulation and bioluminescence imaging to study the mechanisms of action of cerebral electrical stimulation in mice. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 593, n. 10, p. 2257-2278, 2015.

ASHBY, P. What Does Stimulation in the Brain Actually Do? *In: Movement Disorder Surgery*. Basel: KARGER, 2000. p. 236-245

ASHKAN, K.; VELICU, M. A.; FURLANETTI, L. Deep brain stimulation-induced neuroprotection: A critical appraisal. **European Journal of Paediatric Neurology**, [s.l.], v. 37, p. 114-122, mar. 2022.

AUM, D. J.; TIERNEY, T. S. Deep brain stimulation: foundations and future trends. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s.l.], v. 23, p. 162-182, 2018.

AZIZ, T. Z. *et al.* Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. **Movement Disorder Society**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 288-292, 1991.

BADSTÜBNER, K. *et al.* Characterization of the encapsulation process of deep brain stimulation electrodes using impedance spectroscopy in a rodent model. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIO-INSPIRED SYSTEMS AND SIGNAL PROCESSING*, 2012, Lisboa. **Proceedings** [...]. Lisboa: SciTePress, 2012. p. 125-130. Disponível em: <http://www.scitepress.org/DigitalLibrary/Link.aspx?doi=10.5220/0003790301250130>. Acesso em: 01 jun. 2024.

BALDERESCHI, M. *et al.* Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study. **Neurology**, [s.l.], v. 55, n. 9, p. 1358-1363, nov. 2000.

BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 27-42, 2020.

BARBEAU, A. Dopamine and Basal Ganglia Diseases. **Archives of Neurology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 97-102, jan. 1961.

BARONE, D. A.; HENCHCLIFFE, C. Rapid eye movement sleep behavior disorder and the link to alpha-synucleinopathies. **Clinical Neurophysiology**. [s.l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2018.

BARONE, P. Neurotransmission in Parkinson's disease: Beyond dopamine. **European Journal of Neurology**, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 364-376, mar. 2010.

BELLOMO, G. *et al.* α -Synuclein Seed Amplification Assays for Diagnosing Synucleinopathies. **Neurology**, [s.l.], v. 99, n. 5, p. 195-205, ago. 2022.

BELOV KIRDAJOVA, D. *et al.* Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 14, n. 51, [s.p.], mar. 2020.

BENABID, A. L. *et al.* Combined (Thalamotomy and Stimulation) Stereotactic Surgery of the VIM Thalamic Nucleus for Bilateral Parkinson Disease. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, [s.l.], v. 50, n. 1-6, p. 344-346, 1987.

BENABID, A. L. *et al.* Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. **The Lancet**, [s.l.], v. 337, n. 8738, p. 403-406, fev. 1991.

BENAZZOUZ, A. *et al.* Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. **Neuroscience**, [s.l.], v. 99, n. 2, p. 289-295, set. 2000.

BENAZZOUZ, A. *et al.* High-frequency stimulation of both zona incerta and subthalamic nucleus induces a normalization of basal ganglia metabolic activity in experimental parkinsonism. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 528-530, mar. 2004.

BENAZZOUZ, A. *et al.* Reversal of Rigidity and Improvement in Motor Performance by Subthalamic High-frequency Stimulation in MPTP-treated Monkeys. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 382-389, abr. 1993.

BERGMAN, H. *et al.* The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. **Journal of Neurophysiology**, [s.l.], v. 72, n. 2, p. 507-520, 1994.

BERGMAN, H.; WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Reversal of Experimental Parkinsonism by Lesions of the Subthalamic Nucleus. **Science**, [s.l.], v. 249, n. 4975, p. 1436-1438, set. 1990.

BERRY, M. F. Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment. **Journal of Thoracic Disease**, [s.l.], v. 6, n. 3, p. S289-297, 2014.

BIOLCHI, A. M. *et al.* Fraternine, a novel wasp peptide, protects against motor impairments in 6-OHDA model of Parkinsonism. **Toxins**, [s.l.], v. 12, n. 9, n. p., set. 2020.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, [s.l.], v. 30, n. 5, p. 194-202, maio 2007.

BLOEM, B. R. Postural instability in Parkinson's disease. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, [s.l.], v. 94, supl, p. S41-45, 1992.

BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 397, n. 10291, p. 2284-2303, abr. 2021.

BOIX, J.; PADEL, T.; PAUL, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice - Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 284, p. 196-206, maio 2015.

BOLOGNA, M.; PAPARELLA, G.; FASANO, A.; HALLETT, M.; BERARDELLI, A. Evolving concepts on bradykinesia. **Brain**, [s.l.], v. 143, n. 3, p. 727-750, mar. 2020.

BONDARENKO, O.; SAARMA, M. Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: Clinical Trials, Open Challenges and Nanoparticle-Mediated Delivery to the Brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 15, n. p. 2, jun. 2021.

BONIFATI, V. *et al.* Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, [s.l.], v. 299, n. 5604, p. 256-259, jan. 2003.

BORGES FERRO, A. **Imunohistoquímica**. Lisboa: [s.n.], out. 2014. 147 p.

BOSCH, D. A. **Stereotactic Techniques in Clinical Neurosurgery**. Vienna: Springer Vienna, 1986. 278 p.

BOVÉ, J. *et al.* Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRX**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 484-494, jul. 2005.

BRAAK, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 197-211, mar. 2003.

BRANCHI, I. *et al.* Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 208, n. 1, p. 137-143, mar. 2010.

BRASIL. Portaria nº 206, de 4 de setembro de 2018. Dispõe sobre obrigatoriedade de citação da CAPES. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 set. 2018. p. 22.

BREIT, S.; SCHULZ, J. B.; BENABID, A. L. Deep brain stimulation. **Cell and Tissue Research**, [s.l.], v. 318, n. 1, p. 275-288, ago. 2004.

BRISSAUD, E. **Leçons sur les maladies nerveuses**. 2. ed. Paris: Masson, 1899.

BROCKER, D. T.; GRILL, W. M. Principles of electrical stimulation of neural tissue. *In*: LOZANO, Andres M.; HALLETT, Mark (eds.). **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.], p. 3-18, 2013.

BROUSSOLLE, E. *et al.* Contribution of Jules Froment to the study of parkinsonian rigidity. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 22, n. 7, p. 909-914, maio 2007.

BROWN, P. Bad oscillations in Parkinson's disease. **Journal of neural transmission. Supplementum**, [s.l.], n. 70, p. 27-30, 2006.

BRUNDIN, P.; MA, J.; KORDOWER, J. H. How strong is the evidence that Parkinson's disease is a prion disorder? **Current Opinion in Neurology**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 456-466, ago. 2016.

BRYDA, E. C. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. **Missouri medicine**. [s.l.], v. 110, n. 3, p. 207-211, jun. 2013.

BUCY, P. C. Tremor. **Archives of Neurology & Psychiatry**, [s.l.], v. 41, n. 4, p. 721, abr. 1939.

CAMPOS, A. C. P. *et al.* Unraveling the Role of Astrocytes in Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation in a Parkinson's Disease Rat Model. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 939-954, jan. 2020.

CAMPOS, A.S. *et al.* Capítulo 1 – Introdução Geral. *In*: BRAGA, L.M.G.M. *et al.* **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica/Concea**. Brasília, DF: [s.n.], 2023. p. 14-67.

CARDOSO, F. *et al.* A Statement of the MDS on Biological Definition, Staging, and Classification of Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 259-266, fev. 2024.

CARLSSON, A. *et al.* On the Presence of 3-Hydroxytyramine in Brain. **Science**, [s.l.], v. 127, n. 3296, p. 471-471, fev. 1958.

CARNEIRO, L. DOS A. **Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos Swiss**. [Brasília, DF]: Universidade de Brasília, 2017.

CARVALHO, G. A.; NIKKHAH, G. Subthalamic nucleus lesions are neuroprotective against terminal 6-OHDA-induced striatal lesions and restore postural balancing reactions. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 171, n. 2, p. 405-417, ago. 2001.

CASTRIOTO, A. *et al.* Ten-year outcome of subthalamic stimulation in Parkinson disease: A blinded evaluation. **Archives of Neurology**, [s.l.], v. 68, n. 12, p. 1550-1556, dez. 2011.

CECYN, M. N.; ABRAHAO, K. P. **Where do you measure the Bregma for rodent stereotaxic surgery?** IBRO Neuroscience Reports. [s.l.]: Elsevier B.V., 2023.

CENCI, M. A.; BJÖRKLUND, A. Animal models for preclinical Parkinson's research: An update and critical appraisal. *In*: **Progress in Brain Research**. [s.l.]: Elsevier B.V., 2020. p. 27-59

CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? **Journal of Parkinson's Disease**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 501-505, 2019.

CHAHINE, L. M. *et al.* Proposal for a Biologic Staging System of Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's disease NLM (Medline)**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 297-309, maio 2023.

CHANG, A. D. *et al.* High-frequency stimulation at the subthalamic nucleus suppresses excessive self-grooming in autism-like mouse models. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1813–1821, 2016.

CHANG, J. Y. *et al.* High frequency stimulation of the subthalamic nucleus improves treadmill locomotion in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 983, n. 1-2, p. 174-184, set. 2003.

CHARAN, J.; KANTHARIA, N. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 303-306, out. 2013.

CHEN, Y. *et al.* Subthalamic nucleus deep brain stimulation suppresses neuroinflammation by Fractalkine pathway in Parkinson's disease rat model. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s.l.], v. 90, p. 16-25, nov. 2020.

CHENG, H. C.; ULANE, C. M.; BURKE, R. E. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 6, p. 715-725, jun. 2010.

CHEUNG, T. *et al.* Longitudinal impedance variability in patients with chronically implanted DBS devices. **Brain Stimulation**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 746-751, set. 2013.

CHIA, S. J.; TAN, E. K.; CHAO, Y. X. Historical perspective: models of parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 7, p. 2464, abr. 2020.

CHIKEN, S.; NAMBU, A. Mechanism of Deep Brain Stimulation. **The Neuroscientist**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 313-322, jun. 2016.

CLARK, L. N. *et al.* Pilot association study of the β -glucocerebrosidase N370S allele and Parkinson's disease in subjects of Jewish ethnicity. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 100-103, jan. 2005.

CONKLIN, J. E. *et al.* Disease staging: implications for hospital reimbursement and management. **Health care financing review**, [s.l.], v. 1984, p. 13-22, nov. 1984.

COON, S. *et al.* Whole-body lifetime occupational lead exposure and risk of Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 114, n. 12, p. 1872-1876, dez. 2006.

COOPER, A. A. *et al.* α -synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. **Science**, [s.l.], v. 313, n. 5785, p. 324-328, jul. 2006.

COSTA, H. N.; ESTEVES, A. R.; EMPADINHAS, N.; CARDOSO, S. M. Parkinson's disease: a multisystem disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 39, n. 1, n. p., jan. 2023.

COTZIAS, G. C.; VAN WOERT, M. H.; SCHIFFER, L. M. Aromatic Amino Acids and Modification of Parkinsonism. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 276, n. 7, p. 374-379, fev. 1967.

DA CONCEIÇÃO, F. S. L. *et al.* Murine model for Parkinson's disease: From 6-OH dopamine lesion to behavioral test. **Journal of Visualized Experiments**, [s.l.], n. 35, p. 9-11, 2010.

DÄCHSEL, J. C.; FARRER, M. J. LRRK2 and Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 5, p. 542-547, maio 2010.

DAGHER, A.; ROBBINS, T. W. Personality, Addiction, Dopamine: Insights from Parkinson's Disease. **Neuron**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 502-510, fev. 2009.

DARBAKY, Y. *et al.* High frequency stimulation of the subthalamic nucleus has beneficial antiparkinsonian effects on motor functions in rats, but less efficiency in a choice reaction time task. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 951-956, 2003.

DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 508, n. 1, p. 1-2, 2011.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. **Neuron**, [s.l.], v. 39, n. 6, p. 889-909, set. 2003.

DAVIDSON, B. *et al.* Neuroscience fundamentals relevant to neuromodulation: Neurobiology of deep brain stimulation in Parkinson's disease. **Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 45-68, abr. 2024.

DAVIS, G. C. *et al.* Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Research**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 249-254, out. 1979.

DE HAAS, R. *et al.* Wireless implantable micro-stimulation device for high frequency bilateral deep brain stimulation in freely moving mice. **Journal of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 209, n. 1, p. 113-119, mai. 2012.

DELAVILLE, C. *et al.* Oscillatory activity in basal ganglia and motor cortex in an awake behaving rodent model of Parkinson's disease. **Basal Ganglia**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 221-227, abr. 2014.

DERKINDEREN, P.; SHANNON, K. M.; BRUNDIN, P. Gut feelings about smoking and coffee in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 29, n. 8, p. 976-979, abr. 2014.

DESOUZA, R. M. *et al.* Timing of deep brain stimulation in Parkinson disease: A need for reappraisal? **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 73, n. 5, p. 565-575, maio 2013.

DI MONTE, D. *et al.* Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 137, n. 1, p. 303-309, maio 1986.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 461-491, 2013.

DIRKX, M. F. *et al.* The nature of postural tremor in Parkinson disease. **Neurology**, [s.l.], v. 90, n. 13, p. e1095-e1102, mar. 2018.

DOMENIGHETTI, C. *et al.* Dairy Intake and Parkinson's Disease: A Mendelian Randomization Study. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 857-864, abr. 2022.

DU, T. T. *et al.* Subthalamic nucleus deep brain stimulation protects neurons by activating autophagy via PP2A inactivation in a rat model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 306, p. 232-242, ago. 2018.

DUKES, C. E. The classification of cancer of the rectum. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 323-332, jan. 1932.

DURNYAK, B. *et al.* Definition of Optical Density of Digital Images for Print Equipment Control Systems. *In: CEUR Workshop Proceedings, 2023. Ucrânia. Anais...* Ucrânia: Kyiv-Uzhhorod, 2023. Disponível em: https://ceur-ws.org/Vol-3538/Short_4.pdf. Acesso em: 14 jun. 2024

EL-GAMAL, M. *et al.* Neurotoxin-induced rodent models of parkinson's disease: benefits and drawbacks. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n. 3, p. 897-923 jun. 2021.

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 research**, [s.l.], v. 1120, n. 1, p. 202-210, nov. 2006.

FASANO, A. *et al.* Motor and cognitive outcome in patients with Parkinson's disease 8 years after subthalamic implants. **Brain**, [s.l.], v. 133, n. 9, p. 2664-2676, 2010.

FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. Ageing and parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**, [s.l.], v. 114, n. 5, p. 2283-2301, 1991.

FÉNELON, G.; WALUSINSKI, O. The landmark contributions of Paul Blocq, Georges Marinesco, and Édouard Brissaud in parkinson's disease. **Revue Neurologique**, v. 177, n. 10, p. 1214-1220, dez. 2021.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **ImageJ 1.46 The ImageJ User Guide**, 2012. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2024.

FILALI, M. *et al.* Stimulation-induced inhibition of neuronal firing in human subthalamic nucleus. **Experimental Brain Research**, [s.l.], v. 156, n. 3, p. 274-281, 2004.

FHC. **Concentric Bipolar Microelectrode For Cell Group Recording and Stimulating**. [s.l.]: [s.n.], 2020. Disponível em: <https://www.fh-co.com/wp-content/uploads/2019/06/L022-20-10.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2024.

FLEMING, S. M.; FERNAGUT, P. O.; CHESSELET, M. F. Genetic mouse models of Parkinsonism: Strengths and limitations. **NeuroRx**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 495-503, 2005.

FOLEY, P. B.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. A brief history of brain iron accumulation in Parkinson disease and related disorders. **Journal of Neural Transmission**, [s.l.], v. 129, n. 5-6, p. 505-520, jun. 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Summary of Safety and Effectiveness Data (SSED) - Vercise™ Deep Brain Stimulation (DBS) System**. [s.l.]: [s.n.], 2017. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf15/p150031b.pdf. Acesso em: 8 jun. 2024.

FRIGERIO, R. *et al.* Education and occupations preceding Parkinson disease. **Neurology**, [s.l.], v. 65, n. 10, p. 1575-1583, 2005.

FUNG, V. S. C.; THOMPSON, P. D. Rigidity and Spasticity. *In: Parkinson's Disease and Movement Disorders*. 5. ed. [s.l.]: [s.n.], 2007. p. 504-513

FURTADO, M. J. *et al.* A pandemia da Covid-19: revisão da literatura. **Brazilian Journal of Development**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 5810-5826, jan. 2023.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **Journal of visualized experiments: JoVE**, [s.l.], n. 65, p. 3564, 2012.

GALANAUD, J. P. *et al.* Cigarette smoking and Parkinson's disease: A case-control study in a population characterized by a high prevalence of pesticide exposure. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 181-189, out. 2005.

GARCIA-GARCIA, D. *et al.* Stimulation sites in the subthalamic nucleus and clinical improvement in Parkinson's disease: A new approach for active contact localization. **Journal of Neurosurgery**, [s.l.], v. 125, n. 5, p. 1068-1079, nov. 2016.

GARDNER, R. C. *et al.* Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study. **Neurology**, [s.l.], v. 90, n. 20, p. E1771–E1779, 2018.

GEDDES, L. A. Accuracy Limitations of Chronaxie Values. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 176-181, jan. 2004.

GELBER, R. P.; LAUNER, L. J.; WHITE, L. R. The honolulu-asia aging study: epidemiologic and neuropathologic research on cognitive impairment current alzheimer research. **Current Alzheimer research**, v. 9, n. 6, p. 664-672, jul. 2012.

GERLACH, M. *et al.* Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients. **Journal of Neural Transmission Supplementum**, n. 70, p. 133-142, 2006.

GERVAIS-BERNARD, H. *et al.* Bilateral subthalamic nucleus stimulation in advanced Parkinson's disease: Five year follow-up. **Journal of Neurology**, [s.l.], v. 256, n. 2, p. 225-233, 2009.

GIBB, G.; LEES, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 51, n. 6, p. 745-752, jun. 1988.

GOETZ, C. G. *et al.* Movement Disorder Society-Sponsored Revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Scale presentation and clinimetric testing results. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 23, n. 15, p. 2129-2170, nov. 2008.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 1, n. p., set. 2011.

GOLDMAN, S. M. *et al.* Solvent exposures and Parkinson disease risk in twins. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 71, n. 6, p. 776-784, jun. 2012.

GONERA, E. G. *et al.* Symptoms and duration of the prodromal phase in parkinson's disease. **Movement Disorder**, v. 12, n. 6, p. 871-876, nov. 1997.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E.; RICHARD E. **Digital image processing**. [s.l.]: Prentice Hall, 2008.

GONZÁLEZ-CASACUBERTA, I. *et al.* Bioenergetics and Autophagic Imbalance in Patients-Derived Cell Models of Parkinson Disease Supports Systemic Dysfunction in Neurodegeneration. **Frontiers in Neuroscience**, [s.l.], v. 13, p. 894, set. 2019.

GORELL, J. M. *et al.* Occupational exposures to metals as risk factors for parkinson's disease. **Neurology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p. 650-658, mar. 1997.

GOULET-PELLETIER, J; COUSINEAU, D. A review of effect sizes and their confidence intervals, Part I: The Cohen's d Family. **The Quantitative Methods for Psychology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 242-265, dez. 2018.

GRONICH, N. *et al.* β 2-adrenoceptor agonists and antagonists and risk of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 33, n. 9, p. 1465-1471, set. 2018.

GRUNKIN, M.; RAUNDAHL, J.; FOGED, N. T. Practical Considerations of Image Analysis and Quantification of Signal Transduction IHC Staining. *In: Methods in Molecular Biology*. [s.l.] Humana Press Inc., 2011. p. 143-154

GUARALDO, A. M. *et al.* Capítulo 2 - Roedores e lagomorfos. *In: BRAGA, L.M.G.M. et al. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica/Concea*. Brasília, DF: [s.n.], 2023. p. 68-167.

GUILLAUMIN, A.; VLCEK, B.; WALLÉN-MACKENZIE, Å. Improving well-being and survival in the 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in mice: Literature review and step-by-step protocol. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 1-21, 2022.

GURIDI, J.; LOZANO, A. M. A Brief History of Pallidotomy. **Neurosurgery**, [s.l.], v. 41, n. 5, p. 1169-1183, nov. 1997.

HACKER, M. L. *et al.* Deep brain stimulation in early-stage Parkinson disease: Five-year outcomes. **Neurology**, [s.l.], v. 95, n. 4, p. E393-E401, jul. 2020.

HALLIDAY, G. *et al.* The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**, [s.l.], v. 115, n. 4, p. 409-415, abr. 2008.

HALLIDAY, G.; MCCANN, H.; SHEPHERD, C. Evaluation of the Braak hypothesis: How far can it explain the pathogenesis of Parkinson's disease? **Expert Review of Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 673-686, jun. 2012.

HALPERN, C. H. *et al.* A step-wise approach to deep brain stimulation in mice. **Acta Neurochirurgica**, [s.l.], v. 156, n. 8, p. 1515-1521, 2014.

HAMANI, C.; TEMEL, Y. Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disease: Contributions and Validity of Animal Models. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 142, jul. 2012.

HARIZ, M. There is no credible rationale for deep brain stimulation in very early Parkinson's disease! **Parkinsonism and Related Disorders**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 345-346, mar. 2015.

HARNACK, D. *et al.* Placebo-controlled chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus preserves dopaminergic nigral neurons in a rat model of progressive Parkinsonism. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 210, n. 1, p. 257-260, mar. 2008.

HARNACK, D. *et al.* The effects of electrode material, charge density and stimulation duration on the safety of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 138, n. 1-2, p. 207-216, 30 set. 2004.

HARTIG, S. M. Basic image analysis and manipulation in image. **J. Current Protocols in Molecular Biology**, [s.l.], n. 102, [s.p.], abr. 2013.

HARTMANN, C. J. *et al.* Long-term evaluation of impedance levels and clinical development in subthalamic deep brain stimulation for Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s.l.], v. 21, n. 10, p. 1247-1250, out. 2015.

HASLER, R. Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. **J. Psychol. Neurol.**, [s.l.], v. 48, p. 387-455, 1938.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Parkinson's disease: A dual-hit hypothesis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 599-614, dez. 2007.

HELPS, S. C. *et al.* Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 82-90, jan. 2012.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: novel findings in an older model. **Neurologia**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 533-539, out. 2017

HEUER, A. *et al.* Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 228, n. 1, p. 30-43, mar. 2012.

HILKER, R. *et al.* Disease progression continues in patients with advanced Parkinson's disease and effective subthalamic nucleus stimulation. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, [s.l.], v. 76, n. 9, p. 1217-1221, set. 2005.

HOLLERMAN, J. R.; GRACE, A. A. Subthalamic nucleus cell firing in the 6-OHDA-treated rat: basal activity and response to haloperidol. **Brain Research**, [s.l.], v. 590, n. 1-2, p. 291-299, set. 1992.

HOMOLAK, J. *et al.* The absence of gastrointestinal redox dyshomeostasis in the brain-first rat model of parkinson's disease induced by bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], jan. 2024

HONG, C. T.; CHAN, L.; BAI, C. H. The effect of caffeine on the risk and progression of parkinson's disease: A meta-analysis. **Nutrients**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 1-12, jun. 2020.

HONG, S. W. *et al.* Biologically active compounds present in tobacco smoke: potential interactions between smoking and mental health. **Frontiers in Neuroscience**, [s.l.] v. 16, [10] p., abr. 2022.

HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. **Journal of Neurology**, [s.l.], v. 257, n. 2, p. 249-252, 2010.

HUGHES, A. J. *et al.* Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, [s.l.], v. 55, n. 3, p. 181-184, mar. 1992.

HUOTARINEN, A. *et al.* Rat subthalamic stimulation: Evaluating stimulation-induced dyskinesias, choosing stimulation currents and evaluating the anti-akinetic effect in the cylinder test. **MethodsX**, [s.l.], v. 6, p. 2384-2395, mar. 2019.

IANCU, R. *et al.* Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 162, n. 1, p. 1-10, jul. 2005.

IKEDA, K. *et al.* Dopamine transporter imaging in parkinson disease: progressive changes and therapeutic modification after anti-parkinsonian medications. **Internal Medicine**, [s.l.], v. 58, n. 12, p. 1665-1672, 15 jun. 2019.

INTERNATIONAL PARKINSON AND MOVEMENT DISORDER SOCIETY (MDS). **Movement Disorders Society**. [s.l.]: [s.n.], 2024. Disponível em: https://www.movementdisorders.org/MDS/About.htm?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwpZWzBhC0ARIsACvjWRP4L_GF-BCPudumM1O84OhfJJwz1jByouF51SqLjbIHZlG8iJrtj3IaAnesEALw_wcB. Acesso em: 8 jun. 2024.

IOVINO, L.; TREMBLAY, M. E.; CIVIERO, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: the role of glial cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 144, n. 3, p. 151-164, nov. 2020.

ISHIHARA, L. S.; BRAYNE, C. What is the evidence for a premorbid parkinsonian personality: a systematic review. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 21, n. 8, p. 1066-1072, ago. 2006.

JACKSON-LEWIS, V. *et al.* Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice. **Journal of Comparative Neurology**, [s.l.], v. 424, n. 3, p. 476-488, ago. 2000.

JACKSON-LEWIS, V. *et al.* From Man to Mouse: The MPTP Model of Parkinson Disease. *In: Movement Disorders: Genetics and Models*. 2. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 287-306

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 141-151, 2007.

JACOB, E. L. *et al.* Occurrence of depression and anxiety prior to Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s.l.], v. 16, n. 9, p. 576-581, nov. 2010.

JAFARI, S. *et al.* Head injury and risk of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 28, n. 9, p. 1222-1229, ago. 2013.

JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, [s.l.], v. 91, n. 8, p. 795-808, 2020.

JELLINGER, K. A. Is Braak staging valid for all types of Parkinson's disease? **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, [s.l.], v. 126, n. 4, p. 423-431, abr. 2019.

JIA, F.; FELLNER, A.; KUMAR, K. R. Monogenic Parkinson's Disease: Genotype, Phenotype, Pathophysiology, and Genetic Testing. **Genes (Basel)**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 471, mar. 2022.

JO, S. *et al.* Association of NO₂ and Other Air Pollution Exposures With the Risk of Parkinson Disease. **JAMA Neurology**, [s.l.], v. 78, n. 7, p. 800, jul. 2021.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**. [s.l.], v. 386, n. 9996, v. 386, p. 896-912, abr. 2015.

KATIKIREDDY, K. R.; O'SULLIVAN, F. Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedures for Protein Analysis. **Methods in Molecular Biology**, [s.l.], v. 784, p. 155-167, 2011.

KIM, S. D. *et al.* Postural instability in patients with Parkinson's disease. Epidemiology, pathophysiology and management. **CNS Drugs**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 97-112, fev. 2013.

KIRSCH, A. D. *et al.* Anodic versus cathodic neurostimulation of the subthalamic nucleus: A randomized-controlled study of acute clinical effects. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s.l.], v. 55, p. 61-67, out. 2018.

KISH, S. J.; SHANNAK, K.; HORNYKIEWICZ, O. Uneven Pattern of Dopamine Loss in the Striatum of Patients with Idiopathic Parkinson's Disease. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 318, n. 14, p. 876-880, abr. 1988.

KITADA, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, [s.l.], v. 392, n. 6676, p. 605-608, abr. 1998.

KNORR, S. *et al.* Experimental deep brain stimulation in rodent models of movement disorders. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 348, p. 17, fev. 2022.

KÖLLENSPERGER, M. *et al.* Red flags for multiple system atrophy. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 23, n. 8, p. 1093-1099, jun. 2008.

KON, T. *et al.* Neuronal SNCA transcription during Lewy body formation. **Acta neuropathologica communications**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 185, nov. 2023.

KONNOVA, E. A.; SWANBERG, M. Animal Models of Parkinson's Disease. *In: Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects.* [s.l.]: Codon Publications, 2018. p. 83-106

KOPIN, I. J. The Pharmacology of Parkinson's Disease Therapy: An Update. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 467-495, abr. 1993.

KOSS, A. M. *et al.* Calculating total electrical energy delivered by deep brain stimulation systems (multiple letters). **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 58, n. 1, p. 168-169, 2005.

KRASHIA, P. *et al.* On the properties of identified dopaminergic neurons in the mouse substantia nigra and ventral tegmental area. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 92-105, jan. 2017.

KRAUSS, J. K. *et al.* Technology of deep brain stimulation: current status and future directions. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 75-87, fev. 2021.

KRINGELBACH, M. L. *et al.* Sing the mind electric - principles of deep brain stimulation. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 32, n. 7, p. 1070-1079, out. 2010.

KUMSA, D. W. *et al.* Electron transfer processes occurring on platinum neural stimulating electrodes: A tutorial on the $i(V_e)$ profile. **Journal of Neural Engineering**, [s.l.], v. 13, n. 5, p. 15, ago. 2016.

LANGE, S. F. *et al.* The Intraoperative Microlesion Effect Positively Correlates With the Short-Term Clinical Effect of Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease. **Neuromodulation**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 459-465, fev. 2023.

LANGSTON, J. *et al.* Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, [s.l.], v. 219, n. 4587, p. 979-980, 1983.

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, [s.l.], v. 34, n. 4, p. 955-965, nov. 2016.

LEENTJENS, A. F. G. *et al.* Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: A register study. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 414-418, abr. 2003.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 373, n. 9680, p. 2055-2066, jun. 2009.

LEMPKA, S. F. *et al.* In vivo impedance spectroscopy of deep brain stimulation electrodes. **Journal of Neural Engineering**, [s.l.], v. 6, n. 4, [s.p.], 2009.

LERICHE, R. Ueber chirurgischen Eingriff bei Parkinson'scher Krankheit. **Neurologische Zeitlaetter**, [s.l.], v. 13, p. 1093-1096, 1912.

LEWITT, P. A.; FAHN, S. Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and

forward. **Neurology**, [s.l.], v. 86, n. 14, p. S3-S12, maio 2016.

LEWY, F. H. Paralysis agitans. I. Pathologische anatomie. **Handbuch der neurologie**, [s.l.], v. 3, p. 920-958, 1912.

LIMOUSIN, P.; FOLTYNIE, T. Long-term outcomes of deep brain stimulation in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 234-242, abr. 2019.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, [s.l.], v. 443, n. 7113, p. 787-795, out. 2006.

LOZANO, A. M. *et al.* Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 1, n. 4, p. 225-231, ago. 2002.

LOZANO, A. M. *et al.* Deep brain stimulation: current challenges and future directions. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 148-160, mar 2019,

MAESAWA, S. *et al.* Long-term stimulation of the subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats: neuroprotection of dopaminergic neurons. **Journal of neurosurgery**, [s.l.], v. 100, n. 4, p. 679-687, abr. 2004.

MAHLKNECHT, P. *et al.* How Does Deep Brain Stimulation Change the Course of Parkinson's Disease? **Movement Disorders**, [s.l.], v. 37, n. 8, p. 1581-1592, 2022.

MAHOWALD, M. W.; BORNEMANN, M. C.; SCHENCK, C. H. Parasomnias. **Seminars in Neurology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 283-292, 2004.

MARSDEN, C. D. Parkinson's disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 335, n. 8695, p. 948-952, abr. 1990.

MATTSON, M. P. Excitotoxicity. *In: Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology Handbook of Stress Series.* [s.l.]: Elsevier, 2019. p. 125-134

MAYER, A. B. *et al.* New fraternine analogues: Evaluation of the antiparkinsonian effect in the model of Parkinson's disease. **Neuropeptides**, [s.l.], v. 103, [s.p.], fev. 2024.

MCFARTHING, K. *et al.* Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2023 Update. **Journal of Parkinson's disease**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 427-439, 2023.

MCINTYRE, C. C.; FOUTZ, T. J. Computational modeling of deep brain stimulation. **Handbook of Clinical Neurology**, [s.l.], v. 116, p. 55-61, 2013.

MCINTYRE, C. C.; GRILL, W. M. Finite element analysis of the current-density and electric field generated by metal microelectrodes. **Annals of Biomedical Engineering**, [s.l.], v. 29, n. 3, p. 227-235, 2001.

MCKINNON, C. *et al.* Deep brain stimulation: potential for neuroprotection. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 174-185, 2019.

MCNAUGHT, K. ST. P. *et al.* Effects of isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on mitochondrial respiration. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 51, n. 11, p. 1503-1511, jun. 1996.

MEHANNA, R. *et al.* Age Cutoff for Early-Onset Parkinson's Disease: Recommendations from the International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force on Early Onset Parkinson's Disease. **Movement Disorders Clinical Practice**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 869-978, out. 2022.

MEISSNER, W. *et al.* Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. **Brain**, [s.l.], v. 128, n. 10, p. 2372-2382, out. 2005.

MELO-THOMAS, I. *et al.* Electrical stimulation or MK-801 in the inferior colliculus improve motor deficits in MPTP-treated mice. **NeuroToxicology**, [s.l.], v. 65, p. 38-43, jan. 2018.

MERINO RUIZ, M. C.; GUIMARÃES, R. P.; MORTARI, M. R. Parkinson's disease rodent models: Are they suitable for DBS research? **Journal of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 380, [s.p.], out. 2022.

MEROLA, A. *et al.* Earlier versus later subthalamic deep brain stimulation in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s.l.], v. 21, n. 8, p. 972-975, ago. 2015.

MEYERS, R. Surgical experiments in the therapy of certain "extrapyramidal" diseases: a current evaluation. **Acta psychiatrica et neurologica Supplementum**, [s.l.], v. 67, p. 1-42, 1951.

MILBER, J. M. *et al.* Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in parkinson disease. **Neurology**, [s.l.], v. 79, n. 24, p. 2307-2314, dez. 2012.

MILLER, W. C.; DELONG, M. R. Altered tonic activity of neurons in the globus pallidus and subthalamic nucleus in the primate MPTP model of parkinsonism. *In*: CARPENTER, M. B.; JAYARAMAN, A (ed.). **The basal ganglia II**. New York: Plenum Press, 1983. p. 415-427.

MIRANDA, B. R. de *et al.* Preventing Parkinson's Disease: An Environmental Agenda. **Journal of Parkinson's Disease**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 45-68, 2022.

MIRANDA, B. R. de; GREENAMYRE, J. T. Trichloroethylene, a ubiquitous environmental contaminant in the risk for Parkinson's disease. *Environmental Science: Processes and Impacts*. Royal Society of Chemistry, [s.l.], v. 22 n. 3, p. 543-554, mar. 2020.

MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The biology of animal stress**: basic principles and implications for animal welfare. UK: CABI Publishing, 2000.

MOISAN, F. *et al.* Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, [s.l.], v. 87, n. 9, p. 952-957, set. 2016.

MOLSBERRY, S. A. *et al.* Who to Enroll in Parkinson Disease Prevention Trials?: The Case for Composite Prodromal Cohorts. **Neurology**, [s.l.], v. 99, n. 7, p. S26-S33, ago. 2022.

MONTAGU, K. A. Catechol Compounds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals. **Nature**, [s.l.], v. 180, n. 4579, p. 244-245, ago. 1957.

MONTGOMERY, E. B. Starting from Scratch - Basal Ganglia Pathophysiology. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 196-197, jan. 2020.

MONTGOMERY, E. B.; GALE, J. T. Mechanisms of action of deep brain stimulation (DBS). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 3, p. 388-347, 2008.

MONTGOMERY, JR, E. B. **Deep Brain Stimulation Programming**. 2. ed. [s.l.]: Oxford University Press, 2016. v. 1

MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. **Journal of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 158, n. 2, p. 219-223, dez. 2006.

MORIGAKI, R.; GOTO, S. Putaminal mosaic visualized by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in the human neostriatum. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s.l.], v. 10, n. p., abr. 2016.

MORO, E. *et al.* The impact on Parkinson's disease of electrical parameter settings in STN stimulation. **Neurology**, [s.l.], v. 59, n. 5, p. 706-713, 2002.

MOSS, J.; BOLAM, J. P. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 28, n. 44, p. 11221-11230, out. 2008.

MOTTAGHI, S. *et al.* Bilateral Intracranial Beta Activity During Forced and Spontaneous Movements in a 6-OHDA Hemi-PD Rat Model. **Frontiers in Neuroscience**, [s.l.], v. 15, n. p., ago. 2021.

MUNHOZ, R. P. *et al.* Non-motor signs in Parkinson's disease: A review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria. Associacao Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s.l.], v. 73, n. 5, p. 452-462, 2015.

MUTHANE, U. *et al.* Differences in Nigral Neuron Number and Sensitivity to 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 Mice. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 126, n. 2, p. 195-204, abr. 1994.

NALLS, M. A. *et al.* Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 18, n. 12, p. 1091-1102, dez. 2019.

NELSON, E. L. *et al.* Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: Computer-assisted mapping. **Journal of Comparative Neurology**, [s.l.], v. 369, n. 3, p. 361-371, 1996.

NG, P. R. *et al.* Biophysical Principles and Computational Modeling of Deep Brain Stimulation. **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 422-439, abr. 2024.

NOLLI, L. M. *et al.* Effects of the hallucinogenic beverage ayahuasca on voluntary ethanol intake by rats and on cFos expression in brain areas relevant to drug addiction. **Alcohol**, [s.l.], v. 84, p. 67-75, maio 2020.

O'DONNELL, A. T.; HABENICHT, A. E. Stigma is associated with illness self-concept in individuals with concealable chronic illnesses. **British Journal of Health Psychology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 136-158, fev. 2022.

OLIVEIRA, P. DE; CARDOSO, F. Impact of rapid eye movement sleep behavior disorder and autonomic disorders on Parkinson's disease: A review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s.l.], v. 79, n. 2, p. 156-166, fev. 2021.

OLIVER, Leslic. Surgery in parkinson's disease complete section of the lateral column of the spinal cord for tremor. **The Lancet**, [s.l.], v. 255, n. 6610, p. 847-848, maio 1950.

OLMOS, J. de; HARDY, H.; HEIMER, L. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. **Journal of Comparative Neurology**, [s.l.], v. 181, n. 2, p. 213-244, set. 1978.

OSSOWSKA, K. *et al.* Zona incerta-lateral hypothalamus as an output structure for impulses involved in neuroleptic drug-induced catalepsy. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 347, p. 415-420, 1993.

OSSOWSKA, K. Zona incerta as a therapeutic target in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, [s.l.], v. 267, n. 3, p. 591-606, mar. 2020.

PAISÁN-RUIZ, C.; LEWIS, P. A.; SINGLETON, A. B. LRRK2: Cause, risk, and mechanism. **Journal of Parkinson's Disease**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 85-103, 2013.

PARENT, A. Félix Vicq d'Azyr: Anatomy, medicine and revolution. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 30-37, fev. 2007.

PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: A brief history of their long and intimate relationship. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 313-319, 2010.

PARK, S. E. *et al.* A time-course study of behavioral and electrophysiological characteristics in a mouse model of different stages of Parkinson's disease using 6-hydroxydopamine. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 284, p. 153-157, maio 2015.

PARKINSON, J. **An essay on the shaking palsy**. Londres: Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones, 1817.

PATRICK, H. T. Parkinson's Disease. **Archives of Neurology & Psychiatry**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 711, jun. 1922.

PAUL, G. *et al.* Ablation of the subthalamic nucleus protects dopaminergic phenotype but not cell survival in a rat model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 185, n. 2, p. 272-280, 2004.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5. ed. San Diego: [s.n.], 2019.

PERIÑÁN, M. T. *et al.* Effect Modification between Genes and Environment and Parkinson's Disease Risk. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 92, n. 5, p. 715-724, nov. 2022.

PERLMUTTER, J. S.; MINK, J. W. Deep brain stimulation. **Annual Review of Neuroscience**, [s.l.], v. 29, p. 229-257, 2006.

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. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 8, n. 7, p. 1408-1414, jul. 1996.

PINKY, N. F. *et al.* Region-and activity-dependent regulation of extracellular glutamate. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 38, n. 23, p. 5351–5366, jun. 2018.

PITÁGORAS, J.; MATTOS, D. E. Diagnóstico Diferencial Dos Tremores. **Arq Neuropsiquiatr.**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 320-333, jun. 1998.

POL, S.; TEMEL, Y.; JAHANSHAHI, A. A Custom Made Electrode Construct and Reliable Implantation Method That Allows for Long-Term Bilateral Deep Brain Stimulation in Mice. **Neuromodulation**, [s.l.], v. 24, n. 2, p. 212-219, fev. 2021.

POLLAK, P. *et al.* Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease. **Revue neurologique**, [s.l.], v. 149, n. 3, p. 175-176, 1993.

POLYMEROPOULOS, M. H. *et al.* Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23. **Science**, [s.l.], v. 274, n. 5290, p. 1197-1199, nov. 1996.

POSTUMA, R. B. *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 30, n. 12, p. 1591-1601, out. 2015.

POUCHIEU, C. *et al.* Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. **International Journal of Epidemiology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 299-310, fev. 2018.

PROTECHINTERNATIONAL, 2024a. **2 Channel Electrode (MS303/9-B/SPC) Twisted Platinum**. [s.l.]: [s.n.], 2024. Disponível em: <https://protechinternational.com/products/2-channel-electrode-ms303-9-b-spc-twisted-platinum>. Acesso em: 29 jul. 2024.

PROTECHINTERNATIONAL, 2024b. **3 Channel Electrode - (MS333/6-A/SPC) Platinum Iridium**. [s.l.]: [s.n.], 2024. Disponível em: <https://protechinternational.com/products/3-channel-electrode-ms333-6-a-spc-platinum-iridium>. Acesso em: 29 jul. 2024.

PYCROFT, L.; STEIN, J.; AZIZ, T. Deep brain stimulation: An overview of history, methods, and future developments. **Brain and Neuroscience Advances**, [s.l.], v. 2, p. 239821281881601, jan. 2018.

RACETTE, B. A. *et al.* Dose-dependent progression of parkinsonism in manganese-exposed welders. **Neurology**, [s.l.], v. 88, n. 4, p. 344-351, jan. 2017.

RANINGA, P. V.; DI TRAPANI, G.; TONISSEN, K. F. The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Nova York, v. 1037. p. 67-87, 2017.

REID, W. L. Studies on the tremor-rigidity syndrome: i. surgical treatment of human subjects. **Medical Journal of Australia**, [s.l.], v. 2, n. 17, p. 481-492, out. 1948.

REUTER, S. *et al.* Uncoupling of dopaminergic and subthalamic stimulation: Life-threatening DBS withdrawal syndrome. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 30, n. 10, p. 1407-1413, set. 2015.

RIBOLDI, G. M.; DI FONZO, A. B. GBA, Gaucher disease, and parkinson's disease: From genetic to clinic to new therapeutic approaches. **Cells MDPI**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 364, abr. 2019.

RIZELIO, V. *et al.* Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 85-95, jan. 2010.

ROSS, G. W. *et al.* Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 63, n. 2, p. 167-173, fev. 2008.

ROSSI, A. H.; IMBROISI, D.; HUELVA UNTERBÄUMEN, E.; PASSOS DE MELO, G. M.; IZÍDIO DA COSTA, I.; DA SILVA, K. M.; TORRES CAETANO, L. F.; DE SOUZA, R. I.; ALVES DE ALMEIDA, R. Plano geral da retomada das atividades na Universidade de Brasília. Brasília: Comitê de Coordenação das Ações de Recuperação, 2021. Disponível em: <https://www.unb.br/images/Documentos/Retomada/v3-2021.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2024.

SALAMON, A. *et al.* Neuroprotection in Parkinson's disease: facts and hopes. **Journal of Neural Transmission**, [s.l.], v. 127, n. 5, p. 821-829, maio 2020.

SALVADÈ, A. *et al.* Distinct roles of cortical and pallidal β and γ frequencies in hemiparkinsonian and dyskinetic rats. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 275, p. 199-208, jan 2016.

SAMPAIO, T. B. *et al.* Neurotrophic factors in Alzheimer's and parkinson's diseases: Implications for pathogenesis and therapy. **Neural Regeneration Research**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 549-557, abr. 2017.

SANO, I. *et al.* Distribution of catechol compounds in human brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 32, p. 586-587, jan. 1959.

SAUER, H.; OERTEL, W. H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 401-415, mar. 1994.

SAVICA, R. *et al.* Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease. **Neurology**, [s.l.], v. 73, n. 21, p. 1752-1758, nov. 2009.

SCHENCK, C. H.; BOEVE, B. F.; MAHOWALD, M. W. Delayed emergence of a parkinsonian disorder or dementia in 81% of older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: A 16-year update on a previously reported series. **Sleep Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 8, p. 744-748, ago. 2013.

SCHERMAN, D. *et al.* Striatal dopamine deficiency in parkinson's disease: Role of aging. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 551-557, out. 1989.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 676-682, jul. 2012.

SCHOR, J S.; NELSON, A B. Multiple stimulation parameters influence efficacy of deep brain stimulation in parkinsonian mice. **J Clin Invest.** [s.l.], v. 129, n. 9, p. 3833-3838, set. 2019.

SCHUCKERMAIR, C. *et al.* Behavioral and Neurobiological Effects of Deep Brain Stimulation in a Mouse Model of High Anxiety- and Depression-Like Behavior. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 38, n. 7, p. 1234-1244, jan. 2013.

SCHUEPBACH, W. M. M. *et al.* Neurostimulation for Parkinson's Disease with Early Motor Complications. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 368, n. 7, p. 610-622, fev. 2013.

SEARLES NIELSEN, S. *et al.* β 2-adrenoreceptor medications and risk of Parkinson disease. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 84, n. 5, p. 683-693, nov. 2018.

SETHI, K. D. Clinical aspects of Parkinson disease. **Current Opinion in Neurology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 457-460, ago. 2002.

SHI, L. H. *et al.* High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. **Brain Research**, [s.l.], v. 1013, n. 1, p. 98-106, jul. 2004.

SHI, X.; ZHANG, Z. Multiple-Site Deep Brain Stimulation With Delayed Rectangular Waveforms For Parkinson's Disease. **Electronic Research Archive**, [s.l.], v. 29, n. 5, p. 3471-3487, nov. 2021.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 1-12, fev. 2020.

SINGLETON, A. B. *et al.* α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. **Science**, [s.l.], v. 302, n. 5646, p. 841-841, out. 2003.

SMITH, G. A.; HEUER, A. 6-OHDA toxin model in mouse. **Neuromethods**, [s.l.], v. 61, p. 281-297, 2011.

SPEELMAN, J. D.; BOSCH, D. A. Resurgence of functional neurosurgery for Parkinson's disease: A historical perspective. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 582-588, maio 1998.

SPENCER LIMA, L. Lei de Lambert–Beer. **Revista de Ciência Elementar**, [s.l.], v. 1, n. 1, dez. 2013.

SPIELES-ENGEMANN, A. L. *et al.* Stimulation of the rat subthalamic nucleus is neuroprotective following significant nigral dopamine neuron loss. **Neurobiology of Disease**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 105-115, 2010.

SPIELES-ENGEMANN, A. L. *et al.* Subthalamic nucleus stimulation increases brain derived neurotrophic factor in the nigrostriatal system and primary motor cortex. **Journal of Parkinson's Disease**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 123-136, 2011.

SPIELES-ENGEMANN, A. L.; COLLIER, T. J.; SORTWELL, C. E. A functionally relevant and long-term model of deep brain stimulation of the rat subthalamic nucleus: Advantages and considerations. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 32, n. 7, p. 1092-1099, 2010.

STEINHARDT, J. *et al.* Mechanisms and consequences of weight gain after deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in patients with Parkinson's disease. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 13, n. 1, n. p., dez. 2023.

TAI, C. H. *et al.* Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic

nucleus and the substantia nigra reticulata. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 17, n. 13, p. 1820-1830, out. 2003.

TEISMANN, P. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. **BioFactors**, [s.l.], v. 38, n. 6, p. 395-397, nov. 2012.

TEIVE, H. A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 141-145, 1998.

TEMEL, Y. *et al.* Acute and separate modulation of motor and cognitive performance in parkinsonian rats by bilateral stimulation of the subthalamic nucleus. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 193, n. 1, p. 43-52, 2005.

TEMEL, Y. *et al.* Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation. **Brain Research**, [s.l.], v. 1120, n. 1, p. 100-105, 2006.

TIBAR, H. *et al.* In vivo validation of a new portable stimulator for chronic deep brain stimulation in freely moving rats. **Journal of neuroscience methods**, [s.l.], v. 333, n. p., 2020.

TONG, J. *et al.* Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders. **Brain**, [s.l.], v. 140, n. 9, p. 2460-2474, set. 2017.

TRETIAKOFF, C. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Sommering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. **Thèse méd. Paris.**, Paris, n. 293, n. p., 1919.

TRONCI, E.; FRANCARDO, V. Animal models of l-DOPA-induced dyskinesia: the 6-OHDA-lesioned rat and mouse. **Journal of Neural Transmission**, [s.l.], v. 125, n. 8, p. 1137-1144, ago. 2018.

TSALENCHUK, M.; GENTLEMAN, S. M.; MARZI, S. J. Linking environmental risk factors with epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. **NPJ Parkinson's Disease**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 123, ago. 2023.

TU, P. *et al.* Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble α -synuclein. **Annals of Neurology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p. 415-422, set. 1998.

VALENTE, E. M. *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**, [s.l.], v. 304, n. 5674, p. 1158-1160, maio 2004.

VALVERDE, S. *et al.* Deep brain stimulation-guided optogenetic rescue of parkinsonian symptoms. **Nature Communications**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 2388, dez. 2020.

VAN HEESBEEN, H. J.; SMIDT, M. P. Entanglement of Genetics and Epigenetics in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, [s.l.], v. 13, [s.p.], mar. 2019.

VERMA, A.; RAVINDRANATH, V. CaV1.3 L-Type Calcium Channels Increase the Vulnerability of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s.l.], v. 11, n. p., jan. 2020.

VISANJI, N. P. *et al.* Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus preferentially alters the translational profile of striatopallidal neurons in an animal model of parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 9, p. 1-11, jun. 2015.

VITEK, J. L. Mechanisms of deep brain stimulation: Excitation or inhibition. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 17, supl. 3, p. S69-S72, 2002.

VON VOIGTLANDER, P. F.; MOORE, K. E. Turning behavior of mice with unilateral 6-hydroxydopamine lesions in the striatum: Effects of apomorphine, l-DOPA, amantadine, amphetamine and other psychomotor stimulants. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 451-462, maio 1973.

VOSS, T. S.; RAVINA, B. Neuroprotection in Movement Disorders. Em: **Encyclopedia of Movement Disorders**. [s.l.]: Elsevier, 2010. p. 295-299

WALKER, A. E. Cerebral pedunculotomy for the relief of involuntary movements. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, [s.l.], v. 116, n. 6, p. 766-775, dez. 1952.

WALTER, B. L.; ABOSCH, A.; VITEK, J. L. Current Neurosurgical Treatments for Parkinson's Disease: Where Did They Come From? *In: From Neuroscience To Neurology*. [s.l.]: Elsevier, 2005. p. 159-173

WATSON, C.; LIND, C. R. P.; THOMAS, M. G. The anatomy of the caudal zona incerta in rodents and primates. **Journal of Anatomy**, [s.l.], v. 224, n. 2, p. 95-107, fev. 2014.

WEIL-MALHERBE, H.; BONE, A. D. Intracellular Distribution of Catecholamines in the Brain. **Nature**, [s.l.], v. 180, n. 4594, p. 1050-1051, nov. 1957.

WEISSKOPF, M. G. *et al.* Prospective Study of Phobic Anxiety and Risk of Parkinson's Disease Subjects and Methods Study Population. **Movement Disorders**. [s.l.], v. 18, n. 6, p. 646-651, 2003.

WELTER, M.-L. *et al.* Optimal target localization for subthalamic stimulation in patients with Parkinson disease. **Neurology**, [s.l.], v. 82, n. 15, p. 1352-1361, abr. 2014.

WEST, M. J. Space balls revisited: Stereological estimates of length with virtual isotropic surface probes. **Frontiers in Neuroanatomy**, [s.l.], v. 12, n. p., jun. 2018.

WHITEHOUSE, P. J. Ethical issues in early diagnosis and prevention of Alzheimer disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 101-108, 2019.

WICHMANN, T. Changing views of the pathophysiology of Parkinsonism. **Movement Disorders**, [s.l.], v. 34, n. 8, p. 1130-1143, ago. 2019.

WIRDEFELDT, K. *et al.* Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: A review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, [s.l.], v. 26, supl. 1, p. S1-S58, jun. 2011.

WOODLEE, M. T. *et al.* Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: Compensatory adaptation for contralateral postural instability? **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 211, n. 2, p. 511-517, jun. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Parkinson disease: a public health approach: technical brief**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/355973/9789240050983-eng.pdf?sequence=1>. Acesso em: 01. jun. 2024.

XU, L.; PU, J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. **Parkinson's Disease**. [s.l.]: v. 2016, n. p., 2016.

YAN, R. *et al.* Synergistic neuroprotection by coffee components eicosanoyl-5-hydroxytryptamide and caffeine in models of Parkinson's disease and DLB. **Proceedings**

of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 115, n. 51, p. E12053-E12062, dez. 2018.

YOKOYAMA, T. *et al.* The optimal stimulation site for chronic stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, [s.l.], v. 77, p. 61-67, 2002.

YUAN, H. *et al.* Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, [s.l.], v. 144, n. 1, p. 35-45, maio 2005.

YURT, K. K. *et al.* A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods in neuroscience. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, [s.l.], v. 93, p. 16-29, nov. 2018.

ZENG, X. *et al.* Neurodegenerative diseases among miners in Ontario, Canada, using a linked cohort. **Occupational and Environmental Medicine**, [s.l.], v. 78, n. 6, p. 385-392, jun. 2021.

ZESIEWICZ, T. A. Parkinson Disease. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 896-918, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Calcium Homeostasis in Parkinson's Disease: From Pathology to Treatment. **Neuroscience Bulletin**, [s.l.], v. 38, n. 10, [s.p.], out. 2022.

ZHANG, J. F. *et al.* Impulse Control Disorders in Parkinson's Disease: Epidemiology, Pathogenesis and Therapeutic Strategies. **Frontiers in Psychiatry** [s.l.], v. 12, n. p., fev. 2021.

ZHANG, K. K. *et al.* Systematic review of rodent studies of deep brain stimulation for the treatment of neurological, developmental and neuropsychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, [s.l.], v. 14, n. 1, n. p., dez. 2024.

ZHENG, B. *et al.* PGC-1 α , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 52, [s.p.], out. 2010.

ZIMPRICH, A. *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. **Neuron**, [s.l.], v. 44, n. 4, p. 601-607, 2004.

ZRINZO, L. Deep brain stimulation: a tale of two targets ... and closing the loop. **Brain**, [s.l.], v. 147, n. 3, p. 749-751, fev. 2024.

ZUCH, C. L. *et al.* Time Course of Degenerative Alterations in Nigral Dopaminergic Neurons Following a 6-Hydroxydopamine Lesion. **J. Comp. Neurol.**, [s.l.], v. 427, n. 3, p. 440-454, nov. 2020.

ANEXOS

Parecer consubstanciado do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 26 de junho de 2020.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**NEUROPROTEÇÃO E NEURORESTAURAÇÃO POR MEIO DE ESTIMULAÇÃO CEREBRAL DE ALTA FREQUÊNCIA ASSOCIADA AO USO DE PEPTÍDEOS BIOINSPIRADOS DA PEÇONHA DE VESPAS NO MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON**”, Protocolo n.º 035/2020, sob responsabilidade da Professora Dra. Márcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* (linhagem Swiss, 36 machos e 36 fêmeas). A presente declaração é válida pelo período de: 26/06/2020 a 18/03/2024.


Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB





*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.