



Bruno Braz Garcia

Avaliação da estimulação elétrica para tratamento da Doença de Parkinson em saguis

Macaíba

2017



Bruno Braz Garcia

Avaliação da estimulação elétrica para tratamento da Doença de Parkinson em saguis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia do Instituto Internacional de Neurociências - Edmond e Lily Safra como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Neuroengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Hougelle Simplício Gomes Pereira

Co-orientador Prof. Dra. Mariana Ferreira Pereira de Araújo

Macaíba

2017

Bruno Braz Garcia

Avaliação da estimulação elétrica para tratamento da Doença de Parkinson em saguis/ Bruno Braz Garcia. – Macaíba, 2017-
100 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Hougelle Simplício Gomes Pereira

Dissertação (Mestrado) – INSTITUTO INTERNACIONAL DE NEUROCIÊNCIAS EDMOND E LILY SAFRA
Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia, 2017.

1. Doença de Parkinson. 2. Neuromodulação. I. Prof. Dr. Hougelle Gomes Pereira Simplício. II. Instituto Santos Dumont. III. Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra. IV. Avaliação da estimulação elétrica para tratamento da Doença de Parkinson em saguis

CDU 02:141:005.7

Bruno Braz Garcia

Avaliação da estimulação elétrica para tratamento da Doença de Parkinson em saguis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuroengenharia do Instituto Internacional de Neurociências - Edmond e Lily Safra como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Neuroengenharia.

Trabalho aprovado. Macaíba, 01 de Março de 2015:

**Prof. Dr. Hougelle Simplício Gomes
Pereira**
Orientador

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Convidado 1

Prof. Dr. Edgard Morya
Convidado 2

Macaíba
2017

Resumo

Introdução: A doença de Parkinson (DP) apresenta-se como uma condição neurodegenerativa comum, com importante comprometimento motor e na qualidade de vida. A sua fisiopatologia se relaciona a degeneração de neurônios dopaminérgicos, principalmente na substância nigra. Além disso, foi verificado a presença de sincronizações patológicas nas atividades neuronais no eixo córtex-núcleos da base-tálamo, especialmente na faixa de frequência beta. Apresenta tratamento farmacológico com aplicabilidade restrita, por apresentar efeitos colaterais significativos e devido ao caráter crônico da doença. Fomentou-se a necessidade de um tratamento mais adequado, aplicando-se a estimulação elétrica para tal. A estimulação cerebral profunda (ECP) já é um tratamento bem-documentado com bons resultados, porém requer um procedimento cirúrgico altamente invasivo. Com isso, a estimulação da medula espinal (EME), procedimento menos invasivo, foi testada recentemente para tratamento da DP em roedores e primatas não-humanos com resultados promissores. Almejamos realizar a ECP, em primatas não-humanos, sob o mesmo desenho experimental realizado para testar a EME no mesmo modelo animal, permitindo-se comparações entre os mesmos. Metodologia: Induzimos a ECP em dois ciclos de 4 dias consecutivos: ECP do tipo tônica e ECP do tipo em burst. Cada dia de ciclo foi composto por 4 períodos de estimulação (ON) com intensidade progressiva, intercalados com períodos OFF. Entre os ciclos, houve um período de washout de 2 dias. Realizamos a análise eletrofisiológica de Potencial de Campo Local (PCLs) enquanto o animal se encontrava dentro de uma caixa experimental (0,45m x 0,45m x 0,45 m), realizando atividade motora. A análise motora do animal foi realizada enquanto o animal se encontrava na caixa, através da análise de Vídeo (análise de movimentação espontânea) e teste de recuperação de objetos. Em cada ciclo, fizemos uma seleção sistemática de 3 períodos de 50 segundos: 1) pré-estimulatório; 2) estimulatório; 3) pós-estimulatório. Foi realizada a avaliação eletrofisiológica e comportamental nesses períodos, sendo o período ON da ECP tônica de 1600uA e da ECP em burst de 1200uA. Resultado: Observamos que a variável estimulação do DBS (tônica ou em burst) exerce influência importante no poder espectral presente em algumas frequências. As oscilações na faixa de frequência entre 8-20Hz foram as mais susceptíveis a tal variação. Tais oscilações apresentavam magnitude considerável durante os períodos sem estimulação (período OFF), com consequente redução do poder espectral com a estimulação. ($p < 0.05$). Quando correlacionarmos o espectrograma das ECP (tônica e em burst), chegamos às seguintes conclusões: 1) a diminuição do poder espectral em baixas frequências promovido pela estimulação ECP (tônica ou em burst) aumentou o número de episódios de locomoção e a duração total dos episódios; 2) a alteração na oscilação promovida pela estimulação tônica 1200 uA foi o único período que aumentou de forma estatisticamente significativa a duração total ($t = 26,64$; $p = 0,024$. $r = 0,99$) à algum período OFF; 3) nenhum período ON indu-

ziu uma melhora estatisticamente significativa na frequência dos episódios. Análises de mais ciclos de estimulação são necessários para se chegar em conclusões mais robustas.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson; Neuromodulação; Estimulação Elétrica.

Abstract

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease, with significative motor impairment and reduction in quality of life. The pathophysiology of PD is related to dopaminergic neurons degeneration, primarily in the substantia nigra. Moreover, pathological synchronizations in the cortex-thalamus-basal ganglia loop were recently seen, specially in the beta frequency band. The pharmacological treatment has a restricted applicability due to significative drug-related side effects and the chronic nature of the disease. It promoted the need for others therapies, including the use of electrical stimulation. Deep brain stimulation (DBS) is a well-established treatment with good results, however requires a highly-invasive surgical procedure. Thus, a less invasive procedure (spinal cord stimulation, SCS) was recently tested for the treatment of PD in rodents and non-human primates with promising results. We aimed to perform an DBS, in non-human primates, under the same experimental design performed to test scs in the same animal model, allowing comparisons between them.

Methodology: We induced a DBS in two cycles of 4 consecutive days: DBS of the tonic type and DBS of the type in burst. Each day of stimulation was composed of 4 stimulation periods (ON), with progressive current intesity values, interspersed with OFF periods. Between the cycles, there was a 2-day wash period. We performed an electrophysiological analysis of Local Field Potential (PCLs) while the animal was inside an plexiglass box (0.45m x0.45m x0.45m), performing motor activity. The animal's motor analysis was performed while the animal was in the box, through video analysis (spontaneous movement analysis) and object retrieval test. In each cycle, we made a systematic selection of 3 periods of 50 seconds: 1) prestimulatory; 2) stimulatory; 3) post-stimulatory. An electrophysiological and behavioral evaluation was carried out in these periods, considering that the ON period of tonic dbs was 1600uA and burst DBS was 1200uA.

Results: We observed that stimulation period induced an important influence in the spectral power present in some frequencies. The oscillations in the frequency range between 8-20Hz were more susceptible to such variation. These oscillations presented considerable magnitude during the periods without estimation, with consequent reduction of the spectral power with both estimulatio. (<0.05). When correlating the electrophysiological signals with motor activity, the following finding were detected:

1) the decrease in spectral power at low frequencies promoted by ECP (tonic or burst) stimulation increased the number of locomotion episodes and total episodes duration; 2) the oscillations alterations promoted by tonic DBS of 1200 μ A was the only period that increased statistically significantly the total duration of locomotion ($t = 26.64$; $p = 0.024$); 3) no ON period induced a statistically significant improvement in the frequency of locomotion episodes. Analysis of more stimulation cycles are needed to establish safer conclusions.

Keywords: Parkinson Disease; Neuromodulation; Electrical Stimulation.

Sumário

Introdução	1
1 A doença de Parkinson (DP)	3
1.1 Histórico	3
1.2 Prevalência	3
1.3 História Natural da Doença de Parkinson	4
1.4 Vias de controle do movimento	5
1.4.1 Côrtez e tronco cerebral	5
1.4.2 Cerebelo	6
1.4.3 Núcleos da Base	6
1.4.4 Substância cinzenta da medula espinal	9
1.5 Fisiopatologia da Doença de Parkinson	10
1.5.1 Achados neuroanatômico-patológicos	10
1.5.2 Achados eletrofisiológicos na DP	10
1.6 Tratamento da DP	12
1.6.1 Tratamento farmacológico	12
1.6.2 Tratamento cirúrgico	14
2 Estimulação elétrica na Doença de Parkinson	15
2.1 Conceitos básicos em eletricidade	15
2.2 A Eletricidade fisiológica no Sistema Nervoso	16
2.3 Estimulação e registro elétrico do Sistema Nervoso	18
2.4 Características da corrente na estimulação elétrica do Sistema Nervoso	19
2.4.1 Corrente flutuante	19
2.4.2 Corrente uniforme	20
2.5 Estimulação cerebral profunda para Doença de Parkinson	21
2.5.1 Cinética e Mecanismos	21
2.5.2 Roedores	24
2.5.3 Primatas não-humanos	26
2.5.4 Humanos	28
2.6 Estimulação da medula espinal para Doença de Parkinson	29
2.6.1 Roedores	29
2.6.2 Primatas não-humanos	32
2.6.3 Humanos	34
3 Justificativa	37

4 Objetivos	39
5 Métodos	41
5.1 Animais	41
5.2 Desenho experimental	41
5.3 Matrizes de Eletrodos	43
5.3.1 Estimulação Cerebral Profunda e Registro	43
5.4 Procedimentos cirúrgicos	45
5.4.1 Cirurgia de Indução da DP	45
5.4.2 Cirurgia para implantes de microeletrodos cerebrais	45
5.5 Avaliação Motora	46
5.5.1 Teste de Recuperação de Objetos	47
5.5.2 Atividade Locomotora espontânea	48
5.5.3 Escala de impedimento motor	49
5.6 Administração de AMPT	49
5.7 Estimulação elétrica	49
5.7.1 Estimulação cerebral profunda	49
5.8 Registro	50
5.8.1 Registro de vídeos	51
5.8.2 Registro e análise eletrofisiológica	51
5.9 Análise Histológica	52
6 Resultados	55
6.1 Resultados eletrofisiológicos:	55
6.1.1 Estimulação ECP - tônica:	55
6.1.2 Estimulação ECP - burst:	56
6.1.3 Resultados comportamentais:	56
6.2 Imunohistoquímica:	57
6.2.1 Reação de Tirosina-Hidroxilase:	57
7 Discussão	65
Referências	69
Anexos	77
ANEXO A Manuscript Garcia et al.	79

Dedico esta dissertação a Deus, pais, irmãos, familiares e amigos.

Lista de ilustrações

Figura 1.1 – Conexões neuronais nos Núcleos da Base(NB)	7
Figura 2.1 – Estimulação elétrica e movimentação dos íons. A: movimentação de íons previamente formados; B: indução de reações de óxido-redução e movimentação dos íons recém-formados.	18
Figura 2.2 – Reatância indutiva.	20
Figura 2.3 – Influências da amplitude no raio de estimulação. Rheonase e chroxanie. .	23
Figura 2.4 – Implante epidural do eletrodo de EME.	29
Figura 5.1 – Cronograma de experimentos	42
Figura 5.2 – Fio de tungstênio com diâmetro de 100 μm , usado para a estimulação. Verifica-se a presença de extremidade pontiaguda	43
Figura 5.3 – Colagem dos feixes de fios.	43
Figura 5.4 – Conector acoplado a placa de circuito impresso.	44
Figura 5.5 – Passagem dos fios nos canais específicos da Placa de circuito impresso. .	44
Figura 5.6 – Os fios de estimulação (100 μm de diâmetro) estão posicionados na região do Núcleo Subtalâmico (STN), com comprimento de 13,5mm . Para as demais áreas, fios de registro (50 μm) foram utilizados com os seguintes comprimentos: Área motora primária (M1) - 6,4mm, Putâmen (Put) - 9,3mm, Globo pálido Interno (GPi) - 12,15mm, Globo pálido externo (GPe) - 13,2mm, Núcleo ventrolateral do Tálamo (VL) - 10,5mm e Núcleo ventroposterior lateral do Tálamo (VPL) - 11,8mm.	46
Figura 5.7 – Seringa Hamilton posicionada, através do uso de um braço estereotáxico, após trepanações.	47
Figura 5.8 – Visualização da craniotomia e posicionamento da matriz para o implante.	48
Figura 5.9 – Visão superior do implante da matriz de microeletrodos.	48
Figura 5.10–Coerência entre o canal 1 do Globo Pálido Interno (GPi) com os 4 canais restantes da mesma área. Verifica-se altas coerencias com canais 2, 3 e 4 e baixa coerência com o canal 5, o qual foi excluído da análise.	52
Figura 6.1 – Espectrograma das áreas cerebrais registradas no hemisfério esquerdo durante 3 períodos: 1) 50 segundos de período pré-estimulação; 2) 50 segundos de estimulação tônica 1600uA; 3) 50 segundos de período pós-estimulação. Redução do poder espectral em baixas freqüências durante estimulação (ON).	58

Figura 6.2 – Fast Fourrier Transform (FFT) das área motora primária (M1) e putâmen (Put) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação tônica 1600uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz.	59
Figura 6.3 – Fast Fourrier Transform (FFT) dos núcleos do tálamo (VLL e VLm) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação tônica 1600uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz.	59
Figura 6.4 – Coerência entre o núcleo ventralposterior (VPL) do tálamo em relação às demais áreas. Azul: período OFF; Vermelho: período ON (1600uA). Houve redução da coerência, durante a estimulação, entre as frequências de 8-20 Hz.	60
Figura 6.5 – Espectograma das áreas cerebrais registradas no hemisfério esquerdo durante 3 períodos: 1) 50 segundos de período pré-estimulação; 2) 50 segundos de estimulação em burst a 1200uA; 3) 50 segundos de período pós-estimulação. É possível observar que houve uma redução do poder espectral em baixas freqüências durante estimulação (ON).	61
Figura 6.6 – Fast Fourrier Transform (FFT) das área motora primária (M1) e putâmen (Put) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação em burst 1200uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz.	62
Figura 6.7 – Fast Fourrier Transform (FFT) dos núcleos do tálamo (VLL e VLm) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação em burst 1200uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz. Entretanto, demonstrou menor redução do poder espectral em putâmen quando comparada à ECP tônica.	62
Figura 6.8 – Tirosina-Hidroxilase em cérebro do sagui do estudo em questão. Percebe-se a morte neuronal em região do estriado, mais proeminente no lado esquerdo.	63
Figura 6.9 – Tirosina-Hidroxilase em cérebro do sagui usado como animal-controle.	63

Lista de tabelas

Tabela 1.1 – Sintomas motores e não-motores da DP.	4
Tabela 2.1 – Mecanismo de ação da Estimulação Cerebral Profunda(ECP).	22
Tabela 5.1 – Coordenadas dos locais de implante das matrizes.	45
Tabela 5.2 – Volume de 6-OHDA a ser injetado em cada coordenada (em relação a linha interaural).	47
Tabela 5.3 – Parâmetros de estimulação da estimulação cerebral profunda, do tipo tônica. .	50
Tabela 5.4 – Parâmetros de estimulação da estimulação cerebral profunda, do tipo em burst.	50

Lista de abreviaturas e siglas

AP	Ântero-posterior
AMPT	<i>am</i> -metil-p-tirosina
COMT	Catecol-O-Metil-Transferase
DV	Dorso-ventral
DP	Doença de Parkinson
ECP	Estimulação Cerebral Profunda
EME	Estimulação da Medula Espinal
EAF	Estimulação em Altas Frequências
GPe	Globo Pálido Externo
GPi	Globo Pálido Interno
M1	CôrTEX motor primário
ML	Médio-lateral
MPTP	1-methyl4phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine
NB	Núcleos da Base
NMI	Neurônios Motores Inferiores
NMS	Neurônios Motores Superiores
NPP	Núcleo Pedúnculo-pontino
NS	Núcleo Subtalâmico
RLD	Região de Comando Locomotor Diencefálico
RLM	Região de Comando Locomotor Mesencefálico
SN	Sistema Nervoso
SNpc	SubstânciA Nigra pars compacta

SNpr	Substânci a Nigra pars reticulada
TH	Tirosina-Hidroxilase
VL	Núcleo ventrolateral do Tálamo
VPL	Núcleo ventroposterior lateral do Tálamo

Introdução

A eletricidade desperta fascínio e curiosidade nos seres humanos há muitos séculos. Diversos fenômenos na natureza apresentam componentes da eletricidade, os quais eram envoltos por interpretações místicas das mais diversas possíveis. Tamanha complexidade atraiu a atenção de estudiosos de diversos campos de estudo, seja filosofia, matemática, ou física. Porém, antes mesmo que o conhecimento fundamental da eletricidade fosse estabelecido, a influência da eletricidade no corpo humano já era estudada experimentalmente.

O primeiro relato do uso da eletricidade em humanos remonta período antes de Cristo (15 a.C). Um homem, detentor de Gota, accidentalmente pisou sobre um peixe torpedo, uma espécie de peixe elétrico. A dor relatada pelo indivíduo diminuiu de forma importante, fazendo com que estudiosos da época, como Scribonous, sugerissem o tratamento do peixe torpedo para dor (GILDENBERG, 2005).

Existiram diversos exemplos do uso da eletricidade em humanos anteriormente, porém foi durante o período do Iluminismo que ocorreu um grande avanço nessa área. Benjamin Franklin, além de estabelecer os conceitos fundamentais da eletricidade, também foi capaz de mostrar a contração muscular para eletricidade estática em 1774. Galvani, por sua vez, demonstrou em 1780 a contração de um músculo de sapo com corrente contínua e reconheceu a eletricidade embutida no estado natural, chamada por ele de eletricidade animal (GILDENBERG, 2005).

Porém, apenas no final do século XIX, estudos voltados à ação da eletricidade no sistema nervoso demonstraram a presença da excitabilidade elétrica no cérebro. Isto foi possível através de experimentos de Fritsch e Hitzig demonstrando a movimentação de membros com a estimulação do córtex motor de um cachorro. Este foi o primeiro relato de estimulação elétrica em um córtex cerebral, ocorrendo em 1870. Já em 1874, Bartholow realizou a primeira estimulação elétrica direta em um cérebro humano (GILDENBERG, 2005).

A estimulação elétrica passou por um grande impulso com a criação de aparelhos estereotáxicos para uso em humanos por Spiegel em 1947. De início, a estimulação elétrica foi usada nas cirurgias estereotáxicas apenas para verificar se o eletrodo não estava em uma localização indevida. Porém, posteriormente, foi utilizada para se fazer a localização de áreas-alvo durante a cirurgia. Uma conclusão importante foi feita durante o uso dessa nova aplicação: a estimulação elétrica pode mimetizar os mesmos efeitos de uma lesão direta. Tal achado ocorreu ao se verificar diminuição intraoperatória do tremor com a estimulação de um núcleo do tálamo (HASSLER et al., 1960). No entanto, o foco inicial da estimulação cerebral profunda

(ECP) foi para tratamento de doenças neuropsiquiátricas e para dor crônica.

Em 1965, Melzack e Wall estudaram como a percepção da dor poderia ser alterada com a estimulação elétrica. Eles chegaram a conclusão de que a dor é percebida quando estímulos eram aplicados em nervos estreitos (relacionados a dor) e inibida com estímulos a nervos largos (relacionados ao toque e propriocepção). Foi a chamada teoria do portão (MELZACK; WALL, 1965). Em 1967, o mesmo Wall, em colaboração com Sweed, aplicaram neles mesmos estímulos elétricos no nervo orbital inferior e verificaram analgesia no território respectivo (WALL; SWEED, 1967).

Influenciado pela teoria do portão, Shealey teve a idéia de estimular as fibras largas presentes na coluna dorsal da medula espinal, almejando inibir a percepção cortical da dor. Em 1967, foi desenvolvido e implantado, por Shealey e Mortimer, o primeiro estimulador de coluna dorsal em humanos. Ele foi utilizado para alívio da dor em um paciente terminal. Da mesma forma que a estimulação cerebral profunda, a estimulação da medula espinal (EME) foi usada, nos primeiros anos, para tratamento da dor (GILDENBERG, 2005).

Os primeiros estudos que focaram no uso da ECP e EME exclusivamente para distúrbios do movimento (pacientes sem dor associada) só foram realizados alguns anos posteriormente. Apenas em 1980, Brice and McLellan usaram a ECP para tratar disordem motora (tremor essencial) em pacientes com esclerose múltipla através da estimulação do tálamo. Já a EME foi usada por Cook, em 1976, para tratar a espasticidade em paciente com esclerose múltipla (GILDENBERG, 2005).

A primeira aplicação de ECP para Doença de Parkinson (DP) ocorreu em 1987, quando Benabid registrou o uso da estimulação no tálamo. O mesmo aplicou estimulação bilateral nos núcleos subtalâmicos em 1994, sendo a região mais estimulada para o tratamento da DP até os dias atuais (KRINGELBACH et al., 2007). Já a aplicação da EME permanece, majoritariamente, voltada para o tratamento da dor crônica. Porém, nos últimos anos, ela foi aplicada em roedores e primatas não-humanos para DP com resultados promissores. Há estudos em humanos, porém sem resultados conclusivos.

O trabalho em questão propõe a comparação entre o método padrão-ouro (ECP) com um método elétrico menos invasivo (EME) no tratamento da Doença de Parkinson (DP). Visando isto, a introdução se inicia abordando os aspectos clínicos, eletrofisiológicos (após uma revisão sobre núcleos da base) e neuroanatômicos-patológicos da DP. Posteriormente, é feita uma visão geral de eletricidade, de como esta se apresenta no corpo humano (“eletricidade fisiológica”) e como uma corrente elétrica modifica a fisiologia do sistema nervoso. Por último, é feita uma revisão da literatura sobre o uso da estimulação cerebral profunda e da estimulação da medula espinal para o tratamento da DP, seja em modelos animais ou humanos.

1 A doença de Parkinson (DP)

1.1 Histórico

A doença de Parkinson (DP) foi descrita inicialmente por James Parkinson em 1817, que a caracterizou como uma “paralisia agitante”, pela apresentação de tremores involuntários concomitantes à perda da força muscular. No mesmo século, o neurologista francês Jean Charcot enriqueceu o conhecimento clínico, detalhando a presença de outros sintomas clínicos, como a rigidez, bradicinesia e alteração postural (TEIVE et al., 2001).

Ainda no século XIX, o médico russo Tretiakoff realizou estudos *post mortem* em indivíduos previamente acometidos pela DP. Tais estudos foram fundamentais para a determinação do que hoje é conhecido como o padrão anatomo-patológico da doença: degeneração dos neurônios da substância nigra pars compacta, com presença de corpúsculos intracitoplasmáticos de Lewy (LEES et al., 2008).

Mardsen, por sua vez, esboçou, no século XX, os primeiros conhecimentos sobre a conectividade presente nos núcleos da base (TEIVE et al., 2001). Já Carlsson, demonstrou a participação do neurotransmissor dopamina na fisiopatologia da DP (FAHN, 2008).

Com o uso da estimulação cerebral profunda (ECP) para DP, em meados do século XX, o conhecimento sobre a fisiopatologia da doença têm avançado de forma importante, por permitir um registro de estruturas cerebrais profundas concomitante à indução de estímulo. Nas últimas décadas, um outro importante avanço ocorreu: a descoberta do componente principal dos corpúsculos de Lewy: a alfasinucleína.

1.2 Prevalência

A prevalência da DP é estimada em 329 casos por 100.000 indivíduos, com uma incidência de 16 novos casos por 100.000 indivíduos/ano (PAWYA; LYONS, 2010). A doença acomete predominantemente a população idosa, atingindo 2% e 4% das pessoas com 60 e 80 anos, respectivamente (SOH; MORRIS; MCGINLEY, 2011).

Hoje, o impacto socioeconômico causado por essa doença é importante, com gastos estimados em 10,8 bilhões por ano nos Estados Unidos (CHEN, 2010). Com a tendência de envelhecimento da população mundial, as projeções são de crescimento alarmante nos gastos para o futuro próximo.

1.3 História Natural da Doença de Parkinson

A progressão natural da doença caracteriza-se pelo aparecimento inicial de sinais motores clássicos unilateralmente, com progressão para ambos os lados do corpo após 5 anos. Porém, há estudos evidenciando que antes dos sintomas motores aparecerem, os pacientes podem apresentar alterações do tipo não-motoras (BRAAK et al., 2003).

Nesse sentido, afirma-se que cerca de 20 anos antes dos sintomas motores clássicos, o paciente pode apresentar disfunção do sistema nervoso entérico e do nervo vago, apresentando constipação, disfunções na bexiga e hiposmia. Cerca de 10 anos antes dos sintomas motores, os pacientes podem apresentar distúrbios do sono, obesidade e depressão (BRAAK et al., 2003).

A DP apresenta, portanto, sintomas motores e não-motores (Tabela 1.1). Os sintomas característicos da doença são os motores: tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural. Não necessariamente todos devem estar presentes para ser diagnosticado a DP. Idealmente, devem-se ter ao menos três desses sintomas, estando a bradicinesia entre os sintomas presentes.

Tabela 1.1 – Sintomas motores e não-motores da DP.

Sintomas motores	Sintomas não-motores
Bradicinesia	Distúrbios neuropsiquiátricas (depressão, ansiedade, psicose e halucinação)
Instabilidade postural	Disfunção cognitiva (confusão, demência, problemas de memória, função executiva e habilidade visoespacial)
Rigidez	Distúrbios autonômicas (disfagia, constipação, náusea, disfunção urinária, hipotensão ortostática e disfunção sexual)
Tremor de repouso	Distúrbios do sono (insônia, sonolência excessiva e sono fragmentado)

Fonte: Adaptado de LYONS; PAHWA, 2011.

O tremor de repouso apresenta melhora importante com a movimentação. Tende a acometer as extremidades, com uma frequência de 4-6 Hz, podendo ocorrer espontaneamente ou induzido por alguma atividade específica (PAWYA; LYONS, 2007).

A rigidez é outro sintoma característico. É notória principalmente nas extremidades. A rigidez é do tipo tônica contínua, com uma característica de roda denteadas. Ou seja, a rigidez é contrária a movimentação dos membros, apresentando-se de forma constante durante todo o movimento. É diferente, portanto, da rigidez presente nas síndromes extra-piramidais, do tipo em canivete, onde a resistência ao movimento ocorre apenas até determinado ponto (PAWYA; LYONS, 2007).

A bradicinesia é considerada a dificuldade para se iniciar ou realizar movimentos. De

fato, os pacientes com DP apresentam uma diminuição na amplitude de movimentos realizados, presente, por exemplo, nos membros superiores ao caminhar. Além disso, os pacientes num estágio mais avançado da doença podem passar a apresentar uma dificuldade intensa para iniciar um movimento, sendo chamado de congelamento (“freezing”) (PAWYA; LYONS, 2007).

A instabilidade postural é um sintoma presente num estágio mais avançado, cerca de 10 anos após o aparecimento do tremor (HAWKES, DEL TREDICI, BRAAK, 2010). Relaciona-se à deterioração das estruturas neuronais responsáveis pelo controle axial do organismo. Dessa forma, o indivíduo não é capaz de se manter em equilíbrio, o que resulta em alterações na marcha e quedas frequentes. Quanto à marcha, se verifica a anteriorização do tronco, com passos de menor amplitude e dificuldade para se mudar o direcionamento. A marcha é do tipo em “bloco”.

1.4 Vias de controle do movimento

As estruturas neuronais responsáveis pela realização do movimento vão desde as conexões corticais até o motoneurônio. As estruturas podem ser subdivididas em quatro subsistemas distintos, que apresentam dinâmica inter-conexão: 1) córtex e tronco cerebral, 2) gânglios da base; 3) cerebelo; 4) substância cinzenta da medula espinal.

1.4.1 Côrrix e tronco cerebral

Existem dois tipos de vias dos neurônios motores superiores (NMS), que fazem contribuições distintas para a circuitaria local da medula espinal e do tronco cerebral.

O primeiro deles se origina no lobo frontal e vai incluir projeções do córtex motor primário e de estruturas pré-motoras próximas. No córtex pré-frontal e parietal posterior, ocorre a tomada de decisão, o pensamento abstrato e a predição das consequências de um ato motor (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008). Já o córtex pré-motor se relaciona com o planejamento e a seleção dos movimentos (especialmente os movimentos estimulados por uma informação sensorial prévia), enquanto o córtex motor primário é envolvido especialmente na execução de movimentos especializados. Esse sistema interage diretamente com a circuitaria motora na medula e indiretamente através de centros no tronco cerebral, os quais por sua vez se projetam para a circuitaria medular (PURVES et al., 2012).

O segundo grande grupo vai se originar nos centros do tronco cerebral: formação reticular e núcleo vestibular. O primeiro deles é especialmente importante para o controle *feedforward* da postura: movimentos que ocorrem em antecipação às mudanças na estabilidade

corporal. Em contraste, o núcleo vestibular é importante para o controle "feedback" da postura: produção de movimentos que são gerados em resposta aos sinais sensoriais indicativos de alteração na postura existente (PURVES et al., 2012).

Os neurônios motores superiores descendem pela medula espinal, fazendo conexão com os neurônios de circuitaria local e, mais raramente, de forma direta com os neurônios motores inferiores - motoneurônios alfa.

1.4.2 Cerebelo

O cerebelo recebe aferências do córtex cerebral (planejamento e inicialização de movimentos altamente especializados), assim como aferências de sistemas sensoriais, os quais irão monitorar o curso dos movimentos. Esta configuração permite a comparação entre o movimento desejado e o movimento realizado, assim como a redução na diferença entre eles (ou "erro motor"). As correções do erro motor ocorrem em tempo real e são armazenadas por longos períodos em forma de aprendizado motor (PURVES et al., 2012).

As fibras paralelas das células granulares recebem informações acerca do movimento realizado e do movimento desejado, a partir de um grande número de fibras, e fazem conexão com as células de Purkinje no córtex cerebelar. A modulação dessa aferência para as células de Purkinje ocorre a partir de fibras que ascendem da oliva inferior. A eferência do cerebelo ocorre pelo núcleo cerebelar profundo para circuitos que governam os neurônios motores superiores (PURVES et al., 2012; LEVY et al., 2008).

1.4.3 Núcleos da Base

Os núcleos da base (NB) são estruturas compostas por corpos celulares, presentes em regiões subcorticais. Podem ser divididos em quatro estruturas: o estriado, o globo pálido (GP), a substância nigra e o núcleo subtalâmico (NST). O estriado, por sua vez, é composto por duas subunidades (putâmen e núcleo caudado), da mesma forma que a substância nigra (pars compacta - SNpc e pars reticulata - SNpr). Dois núcleos talâmicos apresentam associação com os NB: núcleo ventral lateral e ventral anterior (PURVES et al., 2012).

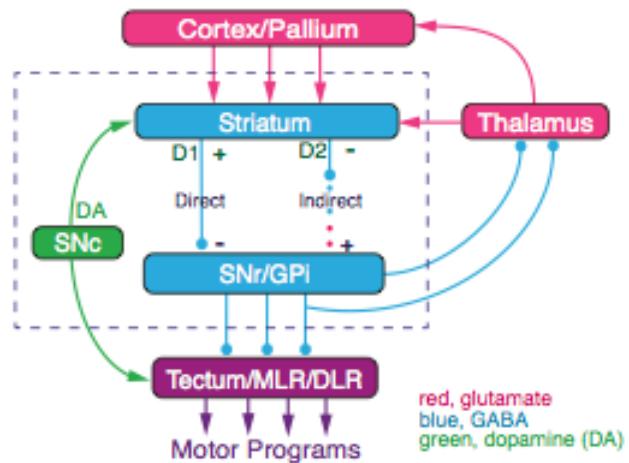
O estriado é a principal estrutura (NST também recebe) dos NB que recebe as informações de comando do córtex, majoritariamente, e do tálamo para induzir o controle motor. Os neurônios do estriado podem ser divididos em duas categorias: dentritos lisos ou dentritos espinhosos. Os últimos são os mais numerosos, atuando como neurônios da circuitaria local e de projeção, apresentando mais de um neurotransmissor (GRAYBIEL, 1990). Considerando todos os tipos de neurônios estriatais, os mais comuns são os neurônios de projeção produtores de GABA (95%).

Apesar da importância fundamental das aferências corticais para o estriado quanto a funcionalidade dos NB, algumas descobertas demonstraram que tarefas comportamentais complexas podem ser realizadas independente destas aferências. Tais estudos, em modelos animais, verificaram que, após a desconexão cortical, os animais eram capazes de apresentar atividades motoras direcionadas a objetivos: apresentavam comportamento motor direcionado para procurar comida quando estavam com fome (BJURSTEN; NORRSELL; NORRSELL, 1976; SORENSEN; ELLISON, 1970). Ao ocorrer a desconexão cortical, o comportamento motor dos animais recaiu basicamente sobre a ação dos NB nos núcleos motores do tronco cerebral e tálamo, sendo tal ação suficiente para realizar a tarefa comportamental.

As vias de saída dos NB são o globo pálido interno (GPi) e substância nigra pars reticulata (SNpr). Ambas produzem o GABA, principal neurotransmissor inibitório no corpo. A inibição tônica, promovida pelo SNpr e GPi, é o principal mecanismo de controle mediado pelos NB, agindo sobre o tálamo e tronco cerebral. Essa inibição tônica evita que movimentos descoordenados possam ser formados, garantindo que a ocorrência dos movimentos seja mediada por um controle neuronal superior (GRILLNER; ROBERTSON, 2015).

Os neurônios de projeção relacionados com o controle motor podem dar origem a duas vias: via direta e via indireta Figura 1.1.

Figura 1.1 – Conexões neuronais nos Núcleos da Base(NB).



Fonte: <GRILLNER;ROBERTSON,2015.>

A primeira delas é composta apenas por neurônios gabérgicos. Dessa forma, cada conexão é do tipo inibitória. Os neurônios de projeção do estriado se conectam com o GPi/SNpr, inibindo-os, os quais iriam inibir o tálamo e os centros motores do tronco cerebral. O desfecho dessa via é a desinibição do tálamo e desses centros, sendo portanto uma via excitatória

(FREEZE et al., 2013).

Já a via indireta é iniciada por neurônios gabérgicos, que se projetam para o Globo Pálido externo(GPe). Este, por sua vez, também é formado por neurônios gabérgicos, que iriam inibir o NST caso não fossem inibidos pelo estriado. Há consequente desinibição do NST, o qual ativa o GPi através de neurônios glutaminérgicos. Dessa forma, o desfecho da via é a ativação do GPi, com consequente inibição do tálamo e centros motores do tronco cerebral. A via indireta é, portanto, do tipo inibitória (GRILLNER; ROBERTSON, 2015).

No início de um movimento, há ativação de ambas as vias motoras (CUI et al., 2014). Por ser uma via de inibição ao movimento, era lógico imaginar que a via indireta fosse ser inibida ou abolida durante a movimentação. Porém, para garantir uma correta movimentação corporal, faz-se necessário ocorrer a inibição de algumas vias motoras específicas. Portanto, o movimento é baseado em um processo neuronal dinâmico contínuo de estimulação e inibição, sendo possível de ocorrer devido a grande variabilidade e flexibilidade das vias neuronais superiores.

Existem vias que modulam as vias direta e indireta, supra-citadas. Uma delas é a da dopamina, produzida principalmente pela SNpc. As projeções dopaminérgicas dessa estrutura têm como alvo as espinhas dentríticas dos neurônios espinhosos médios do estriado, apesar de modularm diversas outras estruturas (GERFEN; SURMEIER, 2011). Estas possuem receptores de dopamina na sua membrana. Os neurônios envolvidos na via direta possuem receptores do tipo D1 (receptores D1 e D5), que induzem aumento da excitabilidade dos mesmos. Por outro lado, os neurônios da via indireta possuem receptores do tipo D2 (receptores D2, D3 e D4), que têm atividade inibitória sobre o neurônio.

Antes, as projeções de saída dos NB eram associadas apenas ao tálamo, e a partir desse, para os alvos corticais e límbicos. Porém, os NB são vistos atualmente sob outros aspectos funcionais. Nesses, há a participação do tronco cerebral como projeção de saída dos NB. A importância do mesmo seria de controlar o início e término seletivo de sequências motoras estereotipadas ou rítmicas (GRILLNER et al., 2005; DRAGANSKI et al., 2008; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010).

Os principais centros motores no tronco cerebral incluem: o tecto, região de comando locomotor mesencefálico (RLM) e região de comando locomotor diencefálico (RLD). Estudos em roedores e lampréias mostraram que os neurônios do GPi e SNpr apresentam topografias diferentes em relação aos diferentes centros motores nos tronco cerebral (SAITO et al., 2003; TAKAKUSAKI et al., 2011).

As projeções das vias de saída dos NB para o tecto óptico (colículo superior) se relacionam aos movimentos oculares e de orientação. Já para o RLM, elas se relacionam

ao controle postural, enquanto que para a substância cinzenta peri-aquedatal e tálamo se referem, respectivamente, à vocalização e movimento das mãos e dedos.

As informações que são levadas dos NB para os centros motores no tronco cerebral também são enviados para o tálamo e córtex. De fato, há axônios no tronco cerebral que retransmitem o sinal recebido para estas estruturas, permitindo que ambas recebam uma cópia do sinal enviado para os centros motores do tronco cerebral (BECKSTEAD, 1983; PARENT; PARENT, 2004; SWANSON, 2000).

1.4.4 Substância cinzenta da medula espinal

Os neurônios da circuitaria local são encarregados de fazer a conexão das sinapses dos neurônios superiores com os motoneurônios (neurônios motores inferiores, NMI), recrutando de forma organizada os NMIs para realizar determinada tarefa. Os neurônios da circuitaria local são de dois tipos, classificados a partir da somatotopia dos NMIs (com os quais fazem conexão) presentes no corno anterior da medula espinal: 1) neurônios com axônios longos (região intermédia anterior da substância branca), com ação ipsi- e contralateral, cuja função é a manutenção da postura e equilíbrio dos indivíduos por agirem na musculatura axial; 2) neurônios com axônios curtos (região lateral da substância branca), que fazem conexão com NMIs ipsilaterais, responsáveis por movimentos apendiculares, finos de extremidades (PURVES et al., 2012).

As terminações axonais do NMIs, conjuntamente com as fibras musculares inervadas pelos mesmos, irão formar as unidades motoras. Estas são classificadas de acordo com o tamanho e a taxa de freqüência de disparo das fibras musculares. Durante o planejamento motor, já se estabelece qual será o recrutamento das unidades motoras a partir das informações sensoriais prévias. A partir do recrutamento inicial, pode ocorrer o recrutamento de unidades motores com maior grau de capacidade motora, sempre de forma progressiva. Ou seja, unidades motoras só serão ativadas se as de menor capacidade funcional não estiverem sido suficientes.

Os motoneurônios (fibras alfa) irão induzir a ativação das unidades motoras recrutadas, sendo esse estímulo realizado em fibras extra-fusais. O estímulo irá causar a contração muscular, mediado pelo interposição de actina e miosina no sarcômero (PURVES et al., 2012).

1.5 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

1.5.1 Achados neuroanatômico-patológicos

Na DP, há a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância nigra pars compacta (SNpc). A perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc ainda não está bem esclarecida. Estruturas com neurônios dopaminérgicos próximas a SNpc, como a área tegmental ventral, apresentam menor susceptibilidade à degradação. Acredita-se que isso ocorra por diferenças nos transportadores e autorreceptores da dopamina na membrana (REYES et al., 2013).

Consequentemente, na DP, há diminuição da estimulação dos dentritos nos neurônios espiculados presentes no estriado. Há menor excitação da via direta, mediada pelos receptores do tipo D1, e menor inibição da via indireta, mediada pelos receptores do tipo D2 (BRAAK; DEL TREDICI, 2008). A consequência fisiopatológica é menor inibição das vias de saída dos NB: GPi e SNpr. Estes, por sua vez, irão induzir uma inibição importante das atividades dos núcleos ventro-lateral e ventro-anterior do tálamo. A ativação cortical mediada pelo tálamo é reduzida, explicando as características hipocinéticas presentes na DP (PAWYA; LYONS, 2007).

Os primeiros sintomas tendem a aparecer quando há redução de cerca de 70% da dopamina no estriado e quando há degeneração de cerca de 50% dos neurônios dopaminérgicos na SNpc (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A região dorso-lateral do putâmen é a primeira dos NB a apresentar diminuição da dopamina. Este achado explica em parte os primeiros sintomas da doença: rigidez e bradicinesia (BROOKS et al., 2003). Posteriormente, há diminuição de dopamina na parte anterior do putâmen e do núcleo caudado, assim como redução da dopamina em outras estruturas, como córtex cerebral, medula espinal e tronco cerebral. Essas outras alterações se relacionam aos outros sintomas, motores e não-motores, da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Outra característica presente na DP são os corpúsculos de Levy. Estes são caracterizados como inclusões intracitoplasmáticas, presentes principalmente na SNpc. Outras regiões que apresentam os corpos de Levy são: córtex cerebral, núcleos motores basais do vago, gânglio simpático, núcleos basais de Meynert e locus ceruleus (OBESO et al., 2010).

1.5.2 Achados eletrofisiológicos na DP

Nas últimas duas décadas, estudos em modelos animais e em humanos geraram importantes contribuições para o conhecimento da eletrofisiologia envolvida na DP. A alteração na modulação da taxa de disparo na população neuronal, antes considerada o principal me-

canismo envolvido, divide espaço com outras teorias atuais. Extensa evidência de atividade sincrônica oscilatória em populações neuronais têm sido coletada em diversas partes do cérebro, gerando novas hipóteses eletrofisiológicas para DP (HAMMOND; BERGMAN; BROWN, 2007).

Sabe-se que a sincronia/dissincronia de neurônios de uma mesma região ou de regiões distintas é um processo fisiológico importante para diversas atividades fisiológicas normais, como em atividades cognitivas e funções motoras (SINGER, 2010). Quanto à esta última, por exemplo, em meados do século XX, estudos eletroencefalográficos demonstraram que a atividade motora voluntária se relacionava com o bloqueio de oscilações na faixa de frequência beta (JASPER; PENFIELD, 1949). Em estudos em primatas não-humanos, tal achado foi corroborado com o registro intra-cortical de Local Field Potential (LFPs) e potenciais de ação (SANES; DONOGHUE, 1993).

Atividades sincrônicas anormais, porém, podem acarretar em condições patológicas, sendo uma das principais hipóteses eletrofisiológicas para a DP atualmente. Os neurônios de projeção estriatais, em condições normais, são mantidos em um estado hiperpolarizado (com a ação dos canais de potássio), saindo do mesmo para um estado de pré-excitação através da ação sincrônica dos sinais de entrada advindos de neurônios corticais e do tálamo. Na DP, os neurônios estriatais, especialmente no estriado “desnervado” (sem aferências dopaminérgicas) apresentam aumento do limiar de ativação. Com isso, um maior número de aferências para os NB é necessário para atingir esse limiar nos neurônios estriados. Consequentemente, há formação de oscilações córtico-talâmicas-estriatais ocorrendo em baixas frequências (SMITH et al., 2004; WILSON, 2005). Essas oscilações podem resultar em sincronizações, pois os potenciais de ação tendem a ocorrer em fases mais distintas da oscilação do LFP (“time-locking”) (COSTA et al., 2006).

Consequentemente, na DP, sincronias na rede neuronal tendem a ocorrer mais facilmente do que em situações fisiológicas (JÁIDAR et al., 2010). Parte do processo se dá também pela alta quantidade de sinais de feedback presentes no eixo NB-tálamo-côrtez que permitem uma maximização de sinais, com aumento da sincronicidade. Dessa forma, até sincronizações menores podem ser rapidamente amplificadas na DP (PLENZ, 2003).

A sincronia nos NB, na DP, tende a ocorrer principalmente na faixa de frequência beta (14Hz-30Hz) (KUHN et al., 2004). Esse achado foi encontrado nos estudos em modelos animais (SHAROTT et al., 2005), assim como no registro eletrofisiológico em estudos em humanos submetidos ao procedimento de estimulação cerebral profunda. A real importância de oscilação nas faixas de frequência beta é ainda dicutida, mas alguns sinais de influência significativa na fisiopatologia da DP foram encontradas. Por exemplo, a sincronização men-

surada pelos sinais de LFP nas frequências de 8-35 Hz demonstraram correlação importante com os sintomas da DP (KUHN et al., 2006). Além disso, a terapia de reposição de dopamina e a estimulação cerebral profunda reduziram a atividade oscilatória do LFP nessas frequências com importante melhora clínica (BROWN et al., 2001). Outro ponto importante é que as mudanças nas oscilações da frequência beta para a gama, induzida por essas terapias, é a mesma mudança de padrão encontrada na execução de um movimento normal (KUHN et al., 2004).

A modificação do padrão de disparo em alguns neurônios parece também ter influência na DP. Tal fenômeno foi observado quando ocorriam as oscilações corticais de baixa frequência. Nesse caso, neurônios do NST deixavam de apresentar um padrão irregular para apresentar bursts rítmicos que ocorriam concomitantemente às oscilações corticais abaixo de 30Hz (BEVAN, M.D. et al., 2006). Devido ao fato de padrões de atividade alternantes serem transmitidos fielmente pelos neurônios do NST para o GP, SNpr e núcleo pedúnculo-pontino (NPP), acredita-se o NST desempenhe papel particularmente importante como gerador de padrões rítmicos para o eixo córtico-tálamo-estriais. (Wichmann et al, 1994).

1.6 Tratamento da DP

1.6.1 Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico da DP, até meados do século XX, se limitava a drogas anticolinérgicas. Essa terapêutica, visualizada primeiramente por Charcot, se baseava na restauração do equilíbrio de concentrações entre a dopamina e acetilcolina na DP. Ao diminuir a ação da acetilcolina, se almejava atingir o equilíbrio entre esses neurotransmissores nos NB (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

A introdução da levodopa revolucionou o tratamento da DP. Essa droga age como um substrato para a síntese de dopamina. O impacto da droga, primeiramente em modelos animais, foi bastante significativo nos sintomas motores e permitiu uma melhora importante na qualidade de vida dos pacientes (IVERSEN; IVERSEN, 2007).

A levodopa é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, quando então é convertida em dopamina pela enzima dopa-decarboxilase. A levodopa, porém, apresenta duas enzimas periféricas que a degradam: a própria dopa-decarboxilase e a catecol-O-metil-transferase (COMT) (FAHN, 2008). A apresentação comercial da levodopa envolve normalmente a associação com o inibidor de uma dessas enzimas, como a carbidopa (inibidor da dopa-decarboxilase) e entecapone (inibidor da COMT). O mais comum é a associação com a carbidopa (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

O uso da levodopa apresenta dois limitantes: complicações motoras e ineficácia a longo prazo. A concentração de dopamina no SNC parece ser o mecanismo principal envolvido nas complicações motoras. Diferentemente da condição fisiológica normal, onde há atividade tônica dos neurônios dopaminérgicos da SNpc mantendo uma concentração relativamente constante para o estriado (STOCCHI, 2009), a administração de levodopa leva às variações significativas e, consequentemente, às complicações motoras. As principais são as discinesias e as flutuações. Esses sintomas estão presentes em 90% dos indivíduos após o uso da medicação por 5 anos (OLANOW; STERN; SETHI, 2009).

Agonistas dopaminérgicos, como a bromocriptina, foram desenvolvidos objetivando superar as limitações da levodopa. Essas drogas atravessam a barreira hematoencefálica com maior facilidade que a levodopa, além de não sofrerem mecanismo oxidativo e de terem ação mais duradoura (maior meia-vida). Este último fator resulta em menores complicações motoras que a levodopa (STOCCHI, 2009).

De forma geral, a levodopa é usada para pacientes idosos, uma vez que os agonistas dopaminérgicos resultam em uma maior frequência de sintomas neropsiquiátricos e efeitos cognitivos. Por outro lado, os agonistas dopaminérgicos são preferíveis em indivíduos jovens numa tentativa de atrasar os efeitos colaterais induzidos pela levodopa. Porém, praticamente todos os indivíduos irão requerer o uso de levodopa para o manejo clínico em algum momento no curso da doença (HORSTINK et al., 2006).

O manejo das complicações motoras induzidas pela levodopa é de extrema importância. Foi demonstrado que elas estão entre as manifestações motoras da DP que mais afetam a qualidade de vida (quality of life, QOL) dos indivíduos acometidos (SOH; MORRIS; MCGINLEY, 2011).

Para ambas as complicações (discinesias e flutuações), alterar a frequência e a dosagem da levodopa é o manejo inicial. Porém em caso de persistência significativa dos mesmos, outras drogas devem ser administradas. A discinesia pode ser tratada com a administração da amantadine. Esta droga é um anti-viral, associada a: aumento da liberação de dopamina, diminuição de sua recaptação na fenda sináptica e ação direta nos receptores NMDA (OLANOW; OBESO; STOCCHI, 2006; SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

Já as flutuações motoras podem ser manejados com o uso de inibidores da catecol-O-methyltransferase (COMT), agonistas dopaminérgicos e inibidores da monoamina-oxidase (MAO). Este última age inibindo uma enzima responsável pela degradação da dopamina (OLANOW; OBESO; STOCCHI, 2006).

1.6.2 Tratamento cirúrgico

Abordagens cirúrgicas para a DP são realizadas há mais de um século. Eram, inicialmente, apenas técnicas ablativas, voltadas para o tratamento do tremor parkinsoniano. A baixa resposta, associada ao desenvolvimento da levodopa, resultou no abandono de diversas técnicas. Com a baixa resposta farmacológica à levodopa a longo prazo, estudos com técnicas de estimulação elétrica encontraram uma importante possibilidade de atuação, sendo a principal técnica cirúrgica atual. As técnicas lesionais ainda apresentam aplicações específicas, assim como novas terapêuticas cirúrgicas estão sendo criadas, como o transplante (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

A estimulação cerebral profunda (ECP) se baseia na estimulação de estruturas subcorticais. A estimulação para o tratamento da DP ocorre principalmente no núcleo subtalâmico e tálamo. Há evidências de vantagens da primeira. A ECP atenua as discinesias, permitindo aumento da dose de levodopa, além de induzir melhora de outros sintomas motores, como a bradicinesia e tremor (PAHWA; LYONS, 2007).

O eletrodo implantado profundamente se comunica com uma bateria. Esta fica alojada subcutaneamente, abaixo da clavícula. A bateria tem alta durabilidade, podendo funcionar adequadamente por vários anos (PAHWA; LYONS, 2007). As vantagens do ECP sobre as técnicas ablativas incluem: possibilidade de interrupção do mecanismo de ação, sendo parcialmente reversíveis; não impossibilitam o paciente de tirar proveito de outras abordagens no futuro; permitem um ajuste posterior ao procedimento (PAHWA; LYONS, 2007).

As técnicas ablativas ainda utilizadas são: palidotomia do globo pálido interno e talamotomia. A primeira é o tratamento de escolha para os casos de discinesia induzida pela levodopa e na bradicinesia refratária a medicação. Já a segunda é um procedimento realizado raramente para casos de tremores, com baixa resposta nas discinesias (PAHWA; LYONS, 2007).

Novas abordagens cirúrgicas estão em fase de estudos. Uma delas é o transplante de células mesencefálicas de fetos para pacientes com DP. Há ainda diversas questões que inibem a sua utilização. Além da questão ética, faz-se necessário, por exemplo, determinar quais regiões neuroanatômicas devem receber o implante. Estudos imunológicos são também necessários para entender como tal implante vai interagir com o SNC do paciente com DP (SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

2 Estimulação elétrica na Doença de Parkinson

2.1 Conceitos básicos em eletricidade

A carga elétrica é uma propriedade intrínseca das partículas fundamentais de que é feita a matéria. Apresenta a capacidade de se conservar no tempo, da mesma forma que outras grandezas, como a energia. Além disso, é uma grandeza quantizada, ou seja, assume valores distribuídos de forma discreta, sendo múltiplos inteiros da carga elétrica fundamental ($e = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$) (HALLIDAY, 2008).

As cargas são de dois tipos: positiva e negativa. Tais termos foram criados arbitrariamente por Benjamin Franklin para representar tipos opostos de eletricidade. As cargas elétricas de mesmo sinal tendem a se repelir, enquanto as cargas de sinais opostos se atraem. É a chamada Lei de Coulomb:

$$F = \frac{kq_1q_2}{r}, \quad (2.1)$$

onde r é a distância entre as partículas, q_1 e q_2 representam as cargas elétricas de duas partículas, k é uma constante eletrostática e F é a força eletrostática.

A lei de Coulomb se refere às forças eletrostáticas. Estas se referem ao campo elétrico criado pela simples presença de elétron numa região, não se considerando a velocidade relativa do mesmo. Pelo princípio da superposição, as forças eletrostáticas ocorrem par a par, de forma independente, e a resultante dessas forças em uma partícula elétrica é a somação vetorial das forças eletrostáticas criadas pelas cargas ao seu redor (MONTGOMERY, 2014).

Consequentemente, uma carga elétrica externa é capaz de produzir forças eletrostáticas em estruturas que apresentem cargas elétricas em excesso (objetos eletricamente carregados). Quando a estrutura em questão não apresenta cargas elétricas sobressalentes (eletricamente neutros), a influência do campo gerado pela carga elétrica sobre a mesma irá depender de um outro fator: condutibilidade (HALLIDAY, 2008).

As estruturas compostas por elementos químicos cujos elétrons mais distantes não apresentem uma força eletrostática forte unindo-os ao núcleo permitem a formação de uma corrente interna. Esta se dá através da movimentação desses elétrons (chamados de “elétrons de condução”). Tais estruturas químicas são chamadas de condutores. Eles permitem que uma corrente gerada em outro lugar seja conduzida facilmente através do mesmo, assim como que forças eletrostáticas geradas por cargas elétricas externas causem uma movimentação

interna de elétrons, gerando uma carga induzida (polarização das cargas internas, apesar de se manterem eletricamente neutros) (HALLIDAY, 2008).

Já as estruturas isolantes não permitem a formação de elétrons de condução, por haver uma força eletrostática importante que une os elétrons ao núcleo. Dessa forma, não há a movimentação interna gerada por uma força eletrostática externa nem a condução de uma corrente elétrica através da mesma (HALLIDAY, 2008).

Esse conceito de cargas elétricas e forças eletrostáticas foi dissociado do conceito de magnetismo por muito tempo. Apenas em 1820, por trabalhos de Hans Oersted, iniciou-se a associação dessas áreas de estudo com a criação do eletromagnetismo. A primeira observação de Oersted que sugeriu esse avanço foi a descoberta de que uma corrente elétrica em um fio seria capaz de modificar a direção de uma agulha de uma bússula (HALLIDAY, 2008).

Sabe-se, atualmente, que quando há a movimentação de elétrons são criados novos campos de força. A simples movimentação de elétrons induz a criação do chamado campo magnético. Porém, se os elétrons se movem com uma aceleração (ou desaceleração) através do espaço, um campo eletromagnético é formado (MONTGOMERY, 2014).

A força eletromotiva é a capaz de gerar movimentação espontânea de elétrons. Essa força é mensurada em volts. Certas forças resistem ao fluxo de cargas elétricas, formando a resistência. O fluxo de corrente elétrica (I) depende da força eletromotriz (V) e da resistência (R), de acordo com a lei de Ohm para correntes contínuas:

$$I = \frac{V}{R}, \quad (2.2)$$

onde o fluxo de cargas elétricas (I) é mensurada em amperes. Um ampere equivale a 1 coulomb de carga em movimento por segundo. A resistência (R) é medida em ohm (MONTGOMERY, 2014).

Para os casos de correntes flutuantes, a lei de Ohm para o fluxo de corrente é:

$$I = \frac{V}{Z}, \quad (2.3)$$

onde o termo Z se refere a impedância (discutido posteriormente) (MONTGOMERY, 2014).

2.2 A Eletricidade fisiológica no Sistema Nervoso

O Sistema Nervoso (SN), com toda sua complexidade, apresenta características comuns a todo aparelho eletrônico. Apesar de não estar presente toda a linguagem determinís-

tica desse último no SN, ambos compartilham o fato de receber, processar e liberar informação a todo momento (MONTGOMERY, 2014).

Além disso, o SN, condutor de corrente elétrica, apresenta elementos íntrinsecos da eletricidade e pode ser influenciado por correntes elétricas a todo instante. Os conceitos básicos da eletricidade estão presentes em um neurônio. O mesmo apresenta uma força eletromotriz ("bateria") na membrana plasmática, capaz de induzir movimentação de íons. Além disso, apresenta canais iônicos que agem como interruptores, controlando a movimentação desses íons (MONTGOMERY, 2014).

As forças eletromotrices seriam as diferenças nas concentrações individuais dos íons entre os espaços intra- e extracelular. Por exemplo, o íon sódio apresenta maior concentração no espaço extracelular, e portanto, há uma força para movê-lo para dentro do neurônio. O contrário acontece com o potássio. Essas forças permanecem durante o tempo, pois não é atingido o equilíbrio na concentração de íons entre os espaços. Isso é possível por existir um mecanismo ativo (bomba de sódio-potássio) que mantém ativamente as diferenças individuais nas concentrações desses íons na membrana plasmática (MONTGOMERY, 2014).

Dessa forma, a diferença nas concentrações dos íons é o que determina a voltagem através da membrana, denominada de potencial de repouso. Entretanto, a voltagem na membrana pode ser também influenciada por outras forças, como a eletrostática, eletromagnética e magnética (MONTGOMERY, 2014).

Um neurônio apresenta canais iônicos sensíveis a voltagem. De tal forma que, se há modificação no potencial de membrana, eles podem apresentar abertura ou fechamento, estimulando ou inibindo maiores alterações no potencial. Se o potencial de membrana atingir determinado limiar, então há a formação do potencial de ação.

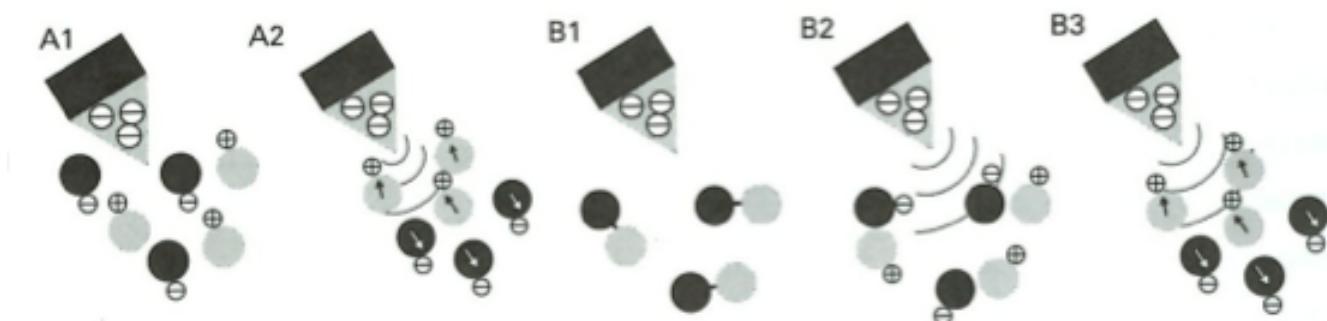
Uma sinapse individual é, na maioria das vezes, insuficiente para gerar um potencial de ação. Para tal ativação, se faz necessário dois tipos de somação de potenciais pós-sinápticos: temporal e espacial. A primeira delas se refere a presença de potenciais que ocorram em um período de tempo menor que o requerido para o potencial pós-sináptico prévio desaparecer. Já o segundo se relaciona a somação de potenciais pós-sinápticos que ocorrem sincronicamente e em localização próxima uma a outra. Em ambas as situações, o potencial de ação só é deflagrado se a somação dos potenciais pós-sinápticos atingir um nível mínimo (limiar) (MONTGOMERY, 2014).

2.3 Estimulação e registro elétrico do Sistema Nervoso

A presença de cargas elétricas gera campos de força em estruturas próximas. O cérebro humano, fisiologicamente, apresenta movimentação de cargas elétricas (íons) pela membrana a todo momento. A passagem de uma corrente elétrica de fonte externa pelo tecido cerebral cria campos de força capazes de modificar a regulação da movimentação dos íons. Dessa forma, com a estimulação elétrica, campos eletrostático, eletromagnético e magnético são formados, estabelecendo-se influências mútuas entre cargas elétricas presentes no aparato elétrico e os íons no cérebro (MONTGOMERY, 2014).

Na estimulação elétrica, ocorre a movimentação de elétrons no eletrodo em direção à ponta (em caso de corrente negativa), ou se distanciando da mesma (corrente positiva). É criado um campo eletrostático, que vai interferir na movimentação dos íons na área cerebral próxima à ponta. O campo eletrostático gerado pela ponta do eletrodo também pode causar reações de óxido-redução em substâncias químicas, com posterior formação de íons. Estes, a partir de sua carga iônica formada e do tipo (carga) da estimulação, irão apresentar uma movimentação específica em relação ao eletrodo (Figura 2.1) (MONTGOMERY, 2014).

Figura 2.1 – Estimulação elétrica e movimentação dos íons. A: movimentação de íons previamente formados; B: indução de reações de óxido-redução e movimentação dos íons recém-formados.



Fonte: <MONTGOMERY, 2014.>

A movimentação de íons no espaço extracelular, induzida pela corrente elétrica, pode deflagrar um potencial de ação. O mesmo pode seguir um direcionamento ortodrômico (corpo celular em direção ao axônio) ou antidiadrômico (axônio para corpo celular). Dessa forma,

a estimulação elétrica pode ativar redes neurais através de ambos direcionamentos do potencial de ação (MONTGOMERY, 2014).

Ao se induzir correntes elétricas no SN, íons podem ser deletérios para as estruturas nervosas. Alguns metais (aço inoxidável) usados na confecção dos eletrodos apresentam maior capacidade de degradação e consequente deposição no cérebro, devendo ser evitados. Porém, independente do tipo de material usado, faz-se necessário a remoção desses íons. Esse objetivo é conseguido se quantidade de corrente elétrica que penetra o cérebro equivaler a que é removida. A estimulação do tipo bifásica consegue desempenhar essa função. Ela ocorre em duas etapas: catódica (negativa) e anódica (positiva). A multiplicação da corrente pela duração da fase deve ser igualada entre as fases para garantir a biosegurança da estimulação. Outro aspecto relacionado a biosegurança é a densidade de corrente. O valor considerado seguro é variável, mas alguns autores recomendam um valor de $300 \text{ C/cm}^2/\text{fase}$, onde o cm^2 se refere a superfície de contato e a fase se refere a corrente multiplicada pela duração do pulso de corrente (MONTGOMERY, 2014).

Para o registro elétrico, o processo ocorre de forma oposta à estimulação elétrica. A partir das cargas iônicas presentes na estrutura cerebral registrada, cria-se um campo eletrostático. Com isto, há indução da movimentação de elétrons para dentro ou fora do material na ponta do eletrodo de registro.

2.4 Características da corrente na estimulação elétrica do Sistema Nervoso

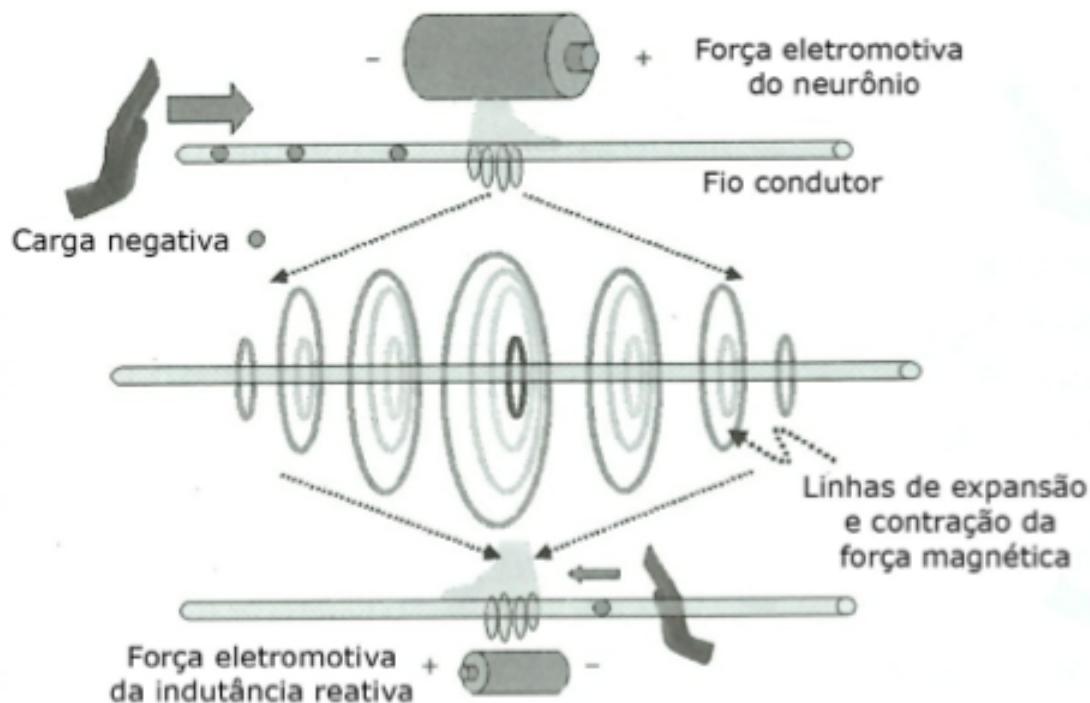
2.4.1 Corrente flutuante

Nas situações onde a corrente elétrica apresenta flutuações com o passar do tempo, a impedância é um fator que deve ser levado em consideração. A mesma pode ser dividida em dois subfatores: reatância indutiva e reatância capacitativa (MONTGOMERY, 2014).

A primeira se relaciona com a criação de um campo magnético perpendicular a passagem da corrente elétrica. Esse campo induz uma força magnética contrária à corrente se ocorrer um cruzamento entre a corrente elétrica com o campo magnético. É justamente o que ocorre na corrente alternada ou flutuante. A magnitude dessa força é diretamente proporcional ao aumento da frequência da corrente elétrica (Figura 2.2) (MONTGOMERY, 2014).

Já reatância capacitativa relaciona-se com a atuação de um capacitor, que acumula cargas elétricas. O acúmulo de cargas elétricas no capacitor gera uma resistência à passagem das mesmas. Dessa forma, a reatância capacitativa está presente sempre que a corrente en-

Figura 2.2 – Reatância indutiva.



Fonte: <MONTGOMERY, 2014.>

contra uma mudança no meio que afeta o seu fluxo. A interface de contato cérebro-eletrodo pode ser considerado um capacitor (MONTGOMERY, 2014).

No caso de uma estimulação elétrica com corrente flutuante, a voltagem é constante e, consequentemente quando há alteração na impedância irá ocorrer alteração na corrente fornecida ao cérebro (lei de Ohm). Há, portanto, uma modificação na forma da onda fornecida ao cérebro em relação a onda elétrica fornecida ao eletrodo (MONTGOMERY, 2014).

2.4.2 Corrente uniforme

Nos casos de corrente constante, há uma uniformidade na corrente fornecida ao tecido cerebral, que apresenta o mesmo formato da onda de pulso inicial fornecida ao eletrodo. De fato, se há alteração na impedância, essa será compensada pelo aumento ou diminuição da voltagem.

2.5 Estimulação cerebral profunda para Doença de Parkinson

2.5.1 Cinética e Mecanismos

A utilização da ECP é bem documentada para o tratamento de diversas condições clínicas, porém os reais mecanismos envolvidos na sua ação estão longe de ser elucidados. É um tema bastante controverso, suscintando diversos estudos (KRINGELBACH et al., 2010).

Existem diversas teorias que tentam explicar a influência da ECP em doenças neurológicas (Tabela 2.1). As teorias que abordavam a ECP como um simples mecanismo de bloqueio fisiológico ou lesão reversível são simplistas perante a complexidade de alterações envolvidas.

Hipóteses para a ação da eletricidade no tecido cerebral foram criadas. Uma delas afirma que a estimulação de um eletrodo bloqueia atividade de corpos celulares próximos, ativa neurônios mielinizados intermediários e induz ativação sublimiar dos elementos neurais distantes. A partir da estimulação das estruturas intermediárias é que se estabelecem conexões mono- e polisinápticas com a rede neural (MCINTYRE et al., 2004b).

A ativação axonal mediada pela ECP, por sua vez, resultaria na liberação de neurotransmissores, com ações nos neurônios pós-sinápticos. Tais liberações puderam ser visualizadas através de trabalhos de ECP com microdiálise (WINDELS, 2005). A resposta pós-sináptica irá depender se o neurônio estimulado é inibitório ou excitatório.

Algumas condições clínicas, como o tremor essencial, cursam com melhora rápida dos sintomas com a ECP. Esse aspecto pode ser importante para se visualizar mecanismos de ação da ECP. Os principais mecanismos envolvidos nas respostas imediatas são: liberação de neurotransmissores, ativações de elementos locais, influências autonômicas e alterações do fluxo sanguíneo cerebral (BEKAR et al., 2008; SHON et al., 2010; CHANG et al., 2008).

Porém, patologias como a depressão apresentam respostas significativas a médio e longo prazo, em semanas a meses. Os mecanismos envolvidos não podem ser explicados apenas pelos efeitos imediatos da ECP. De fato, aparecem estar envolvidos com um processo de neuroplasticidade. Portanto, certos fatores podem estar envolvidos, como: maior eficiência de sinapses, liberação de fatores tróficos, indução de neurogênese (STONE et al., 2011; TODA et. al, 2008) e mudança na conectividade.

A resposta à ECP, porém, não pode ser presumida de forma acurada. De fato, o volume de estimulação não se apresenta como um cilindro fixo ao redor do eletrodo, e consequentemente, respostas diferentes são estabelecidas (KRINGELBACH et al., 2007). Isto ocorre pois há fatores diversos que estão relacionados à resposta do tecido cerebral: parâmetros da estimulação, propriedades fisiológicas do tecido e geometria do eletrodo. Respostas neuronais

diferentes podem ocorrer se houver modificações nos seguintes parâmetros de estimulação: largura de pulso, frequência e amplitude (corrente ou voltagem).

Tabela 2.1 – Mecanismos de ação da Estimulação Cerebral Profunda(ECP).

Mecanismos de ação	Exemplos encontrados
ECP inibe a ativação dos neurônios-alvo	Bloqueio de despolarização Falha sináptica Depleção de neurotransmissor (glutamina) Hiperpolarização dos corpos celulares neuronais e dentritos Liberação do neurotransmissor inibitório (GABA, adenosina) Inibição sináptica das projeções aferentes
ECP ativa neurônios-alvo	Aumento da glutamina em neurônios-alvo de projeção Aumento da dopamina nos neurônios remanescentes na SNpc no Parkinson
ECP excita e inibe neurônios-alvo	Desacoplamento do corpo celular e axônio (inibição antidiadrômica do corpo celular e ativação ortodrônica dos axônios) Plasticidade (potenciação a longo prazo, depressão a longo prazo)
ECP interrompe padrões patológicos de oscilação e gera uma “lesão de informação	Substituição do padrões de disparo irregular por regular Promoção das frequências procinéticas e abolição das frequências de banda beta Efeitos tróficos, com liberação de neurotrofina, e geração de novos neurônios (neurogênese)

Fonte: Adaptado de STONE, 2011.

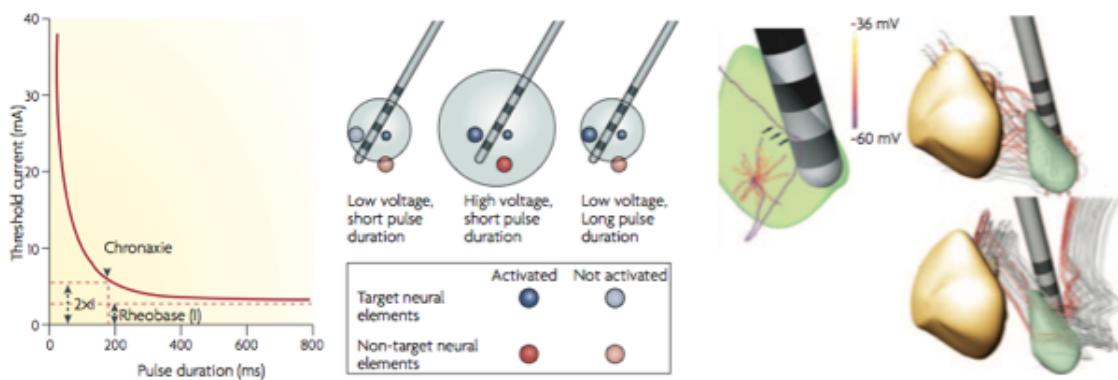
Modificações na largura de pulso alteram qual componente celular será despolarizado: corpo celular ou axônio. Alterações na amplitude da estimulação modificam o raio de estimulação das estruturas cerebrais próximas. O aumento na amplitude apresenta relação diretamente proporcional com o raio de estimulação (KRINGELBACH et al., 2007) (Figura 2.3). Por sua vez, alterações na frequência resultam em influências temporais diferentes nas atividades neuronais, sendo importantes em condições onde há sincronização neuronal patológica, como na DP.

Alterações nos parâmetros de estimulação podem ser realizadas através de um aparato externo conectado ao gerador de pulso. Porém, as alterações são mediadas apenas de acordo com a resposta clínica, caracterizando-se como uma alça aberta. Avanços na neuromodulação, com uso de métodos de neuroimagem e neurofisiologia, buscam identificar marcas de disparos neuronais patológicas (BROWN et al., 2004). Através deles, poderão ser criados aparelhos eletrônicos de alça fechada, que modifiquem os parâmetros de estimulação de acordo com a atividade neuronal presente.

As características individuais fisiológicas do tecido cerebral, que interferem na resposta, são: tipos celulares (neurônios: fibras aferentes, fibras de passagem, neurônios locais; e células da glia) e os canais iônicos relacionados, com as respectivas atividades de voltagem características. A partir de então, são estabelecidos dois conceitos importantes: rheobase e chroanis.

(Figura 2.3). O primeiro pode ser definido como a intensidade de corrente a ser oferecida num pulso de longa duração para disparar a atividade de um elemento neural. Já chroXanice é caracterizado por ser o tempo mínimo necessário para excitar um elemento neural com o dobro da corrente da rheobase.

Figura 2.3 – Influências da amplitude no raio de estimulação. Rheonase e chroXanice.



Fonte: KRINGELBACH, 2007.

Os valores de chroXanice seguem os diferentes níveis hierárquicos de excitabilidade: axônios mielinizados apresentam maior excitabilidade que o corpo celular, assim como axônios com maior diâmetro também apresentam maior excitabilidade que os de menor diâmetro (RANCK, 1975). Como era de se esperar, os axônios mielinizados são as estruturas que apresentam menor chroXanice: 50 - 100ms. O corpo celular, por sua vez, apresenta um chroXanice entre 200 - 700ms.

A configuração geométrica do tecido nervoso presente ao redor do eletrodo também interfere na resposta à estimulação. A orientação dos elementos neurais locais, como axônios e corpos celulares, são importantes determinantes da resposta neuronal (RANCK, 1975). Modelos computacionais de impactos de campos elétricos em subcompartimentos de neurônios sugerem que, dependendo da orientação neural relativa ao campo elétrico, o corpo celular pode ser hiperpolarizado, enquanto os axônios podem ser despolarizados, resultando em desacoplamento dos efeitos no corpo celular e no axônio (MCINTYRE et al., 2004a). Além disso, a estimulação tende a ser mais efetiva caso ocorra paralela ao axônio (MCINTYRE et al., 2004a). Os efeitos presentes nos elementos neurais dependem também da distância ao eletrodo, de tal forma que o rheobase e chroXanice aumentam com a distância.

2.5.2 Roedores

Estudos em modelos animais são fundamentais para se elucidar os mecanismos pelos quais determinados procedimentos agem. Em roedores, eles se dividiram em: *in vitro*, animais anestesiados e animais em testes comportamentais.

As pesquisas iniciais focaram em modelos *in vitro*. Porém, os resultados apresentaram variância significativa a depender da metodologia aplicada e dos parâmetros de estimulação utilizados (não sendo utilizados as correntes comumente utilizadas em humanos). Associado à isto, tais estudos não possibilitam à verificação comportamental dos animais e lesionam as diversas conexões nas preparações *in vitro*, devendo-se ter precaução ao se analisar tais resultados (CHANG et al., 2007).

A estimulação em altas frequências (EAF) do NST em roedores, em correntes de cerca de 1 uA (MAGARIOS-ASCONA et al., 2002), induziu uma despolarização inicial das células do NST, gerando um aumento progressivo da taxa de disparo. Posteriormente, seguiu-se uma atividade em burst, e após 25 segundos, uma inibição sustentada do potencial de membrana. Os autores sugeriram que a inibição sustentada ocorreu devido à uma inativação sustentada dos potenciais de ação sódio-mediadas em vez de uma depressão pós-sináptica causada pela estimulação.

Em outro estudo, uma resposta similar do NST foi verificada (LEE et al., 2003). Houve um aumento inicial na taxa de disparo até a estimulação atingir 150 Hz, seguida por inibição quando a frequência atingia 200 Hz. Acredita-se que essa inibição também ocorra por uma inativação sustentada dos potenciais de ação sódio-mediadas. Além disso, foi verificado nesse estudo que o período de inibição era positivamente correlacionado com a duração da estimulação. Tal fenômeno foi interpretado como resultante da depleção do neurotransmissor glutaminérgico no NST.

Por outro lado, resultados de outros estudos (GARCIA et al., 2003; GARCIA et al., 2005) acabaram por questionar a hipótese de inibição local promovida pela EAF do NST. Nesses, usaram-se correntes maiores (aproximadamente de 0.5-3mA), o que pode explicar em parte os diferentes resultados em relação aos outros estudos. A estimulação aboliu a atividade espontânea dos neurônios do NST, evocando uma atividade em burst recorrente com cada potencial de ação temporalmente relacionado ao pulso de estimulação. Tal excitação durou cerca de 60 minutos, bem superior aos outros trabalhos.

Possíveis explicações para esta excitação prolongada foram sugeridas em outros trabalhos (DO; BEAN, 2003). Foi demonstrado que uma corrente de sódio ressurgente, conjuntamente com uma corrente de sódio persistente, poderiam ser responsáveis pela geração de padrões de disparo tónicos e de bursting. Ambas correntes estariam sob a regulação de

processos de inativação lentos para manter a taxa de disparo constante.

Já em estudos em roedores anestesiados, a EAF do NST demonstrou uma inibição da taxa de disparo do GPi e do SNpr (BENAZZOUZ et al., 1995). Porém, quando na estimulação se utilizou parâmetros já usados de forma eficiente na resposta comportamental em outros estudos, resultados mistos de excitação ($> 4V$ de estimulação) e inibição ($< 4V$ de estimulação) foram encontrados (DEGOS et al., 2005). Tais achados em conjunto sugerem que mudanças na taxa da disparo da SNpr não podem ser taxadas como a causa primária dos efeitos da ECP. Estes podem ser mediados através de mudanças nos padrões de disparos, demonstrado com a redução dos bursts em SNpr mediado pela EAF do NST (DEGOS et al., 2005).

Para se elucidar as mudanças na atividade neuronal que permitem os efeitos terapêuticos da ECP, era necessário realizar testes nos roedores em atividades comportamentais. Um modelo utilizado foi a locomoção em esteira. Neste modelo, se visualiza os passos do animal, os períodos de contato de cada membro ao solo e a posição do animal na esteira (dianteira, intermediária ou traseira). Nos roedores com lesão crônica por 6-OHDA, foi verificado um retorno à marcha inicial com a estimulação do STN (CHANG et al., 2003; SHI et al., 2006).

Nesse estudo mais recente, a EAF do NST foi realizada com ciclos de estimulação de 20 segundos, com 3 segundos ON e 2 segundos OFF (SHI et al., 2006). Foi verificado uma inibição local do NST, com a transmissão da inibição para o NST contra-lateral. Esse estudo também demonstrou que a atividade excitatória e inibitória das células da SNpr foram iguais com a estimulação, demonstrando que a taxa de disparo média da SNpr não foi modificada significativamente durante a ECP. Além disso, nos períodos OFF, houve redução dos padrões de bursting do NST e do GPi, porém não em SNpr (SHI et al., 2006). A falha em detectar mudanças nos bursts em SNpr não exclui a possibilidade de se alterarem nos períodos ON, como foi mostrado por outro estudo em animais anestesiados (DEGOS et al., 2005).

Outro modelo comportamental que possibilitou uma boa avaliação foi o teste da assimetria de uso das patas anteriores. Nele, o animal é colocado em uma caixa cilíndrica, sendo avaliada a postura do animal, assim como o uso unilateral dos membros anteriores. Em modelos de lesão unilateral por 6-OHDA, foi verificado que a estimulação do NST em sessões de 8 a 15 minutos resultou numa reversão da assimetria do membro utilizado, assim como melhora da atividade "rearing" (se posicionar sobre os membros traseiros) (SHI et al., 2004).

Um terceiro modelo também utilizado relacionava-se ao tempo de reação. Nesse, era verificado quanto tempo o roedor precisava para realizar determinada tarefa (previamente treinada a ocorrer após determinado estímulo sensorial), assim como verificar se ocorria ativi-

dade antecipatória (prévia ao estímulo). Nesse modelo, verifica-se o funcionamento adequado da circuitaria tálamo-cortical. A estimulação do NST reduziu a negligência do lado contralateral em modelos com lesão unilateral (DARBAKY et al., 2003), assim como o número de respostas antecipatórias e o tempo de reação após o estímulo em modelos com lesão bilateral (TEMEL et al., 2005).

2.5.3 Primatas não-humanos

O uso da ECP em primatas não-humanos iniciou-se há cerca de duas décadas. O primeiro trabalho investigou a ação da estimulação em altas frequências (EAF) do NST em macacos com DP unilateral induzida por 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Tal modelo de indução é capaz de simular os sintomas parkinsonianos de rigidez e acinesia, porém não é capaz de induzir o tremor parkinsoniano. Almejava-se investigar a melhora desses sintomas através da utilização de eletromiografia, a qual avaliaria os músculos bíceps e tríceps durante atividades motoras previamente treinadas (extensão e flexão) para ocorrerem após estímulo sensorial (BENAZZOUZ et al., 1993).

Nesse estudo, a ECP induziu uma maior amplitude de movimentos e menor tempo de reação, com diminuição do tônus muscular, o qual havia sido aumentado com a lesão por MPTP. Tais efeitos foram cumulativos para cada sessão de estimulação e sugeriram melhora da rigidez e da bradicinesia/acinesia unilateral. As frequências de estimulação com melhor resposta foram entre 100-130Hz, com intensidade de 400-600 uA e pulso de duração de 0.3 ms. Não foi realizado estudo eletrofisiológico nesse trabalho (BENAZZOUZ et al., 1993).

Outro importante estudo verificou a influência da estimulação do NST no tremor de repouso. Para induzir o tremor, se realizou uma coagulação elétrica de áreas dos núcleos da base, incluindo a substância nigra e núcleo vermelho, pois o modelo de indução com MPTP era insuficiente. Tanto a estimulação mono- quanto a bipolar do STN suprimiram o tremor de repouso. O tremor foi suprimido após 3 segundos da estimulação, permanecendo com o efeito após 5 a 15 segundos a depender da frequência e intensidade da estimulação (GAO, 1999).

Nesse estudo, a intensidade da estimulação requerida para efeito positivo diminuiu com o aumento da frequência, tanto para estimulação monopolar quanto bipolar. O efeito da estimulação permaneceu estável por longo período de tempo, sendo efetiva após 2 anos do implante, com a frequência de 130 Hz, duração de pulso de 0.06 ms e intensidade de 1.2 mA para estimulação bipolar. As hipóteses criadas para a inibição do NST com a estimulação foram: inibição local da despolarização, ativação antidrómica dos neurônios do GPe e depleção do neurotransmissor glutaminérgico (GAO, 1999).

Estudo mais recente buscou caracterizar a influência da estimulação do NST no GPi e GPe. Demonstrou-se que a estimulação em altas frequências (EAF) resultou em sequências periódicas de estimulação/ inibição do GPi e GPe, que apresentavam relação temporal com o momento do estímulo. Além disso, a estimulação foi capaz de modificar o padrão irregular de disparo do GPi/GPe para um padrão regular (HASHIMOTO et al., 2003).

Conceitualmente, foi especulado que esse padrão regular de disparo em altas frequências do GPi/GPe resultante da EAF do NST representaria outra uma atividade anormal. Dessa maneira, a EAF essencialmente agiria para induzir a troca de um padrão subcortical anormal para um padrão alternativo que causaria menos efeito negativo sobre a função cortical. Esse novo padrão bloquearia a transmissão anormal dos padrões de atividade nos núcleos da base (HASHIMOTO et al., 2003).

O primeiro trabalho que verificou a taxa e ritmo de disparo do próprio NST quando este é estimulado foi realizado em primatas não-humanos (MEISSNER et al., 2005). A estimulação do NST em EAF (frequência de 130 Hz, largura de pulso 60 ms e intensidade de 100 mA) reduziu a taxa média de disparo dos neurônios do NST. O trabalho conseguiu demonstrar que essa diminuição ocorreu devido a atividade de “resetting”, induzida por cada pulso de estimulação. O conceito de “resetting” seria a ocorrência da redução da probabilidade de disparo do neurônio a praticamente zero, após cada pulso. Têm duração de 7 ms, com o neurônio retomando a probabilidade normal de disparo após esse período (MEISSNER et al., 2005).

Essa característica encontrada de resetting vai ao encontro da característica comum dos neurônios unitários: sua fase é facilmente resetada. Isso ocorre por se comportarem como osciladores relaxantes. Essa característica faz com que os neurônios tendam a se acoplar em larga escala, além de desenvolverem habilidade para aprender e guardar padrões (BUZSAKI, G., 2006).

Porém, no estudo em questão, apesar de a estimulação estimular a capacidade de “resetting” dos neurônios, houve dessincronização (ao invés de acoplamento): redução significativa da atividade sincrônica oscilatória nas faixas alfa e theta dos neurônios do NST. Não houve diferença quanto à sincronia na frequência beta, a qual já havia sido pouco induzida após o uso de MPTP (em concordância com outros estudos que também usaram MPTP para induzir a DP em primatas não-humanos). Era esperado que o “resetting” aumentasse a sincronização. Porém, o fato de o tempo de duração do “resetting” ser bastante curto (7 ms), com duração bem menor que o período nas faixas de frequência em sincronização (alfa e teta, com média de 8 Hz e período de 125 ms), resultou na detecção da dessincronização (MEISSNER et al., 2005).

O GPi também foi estimulado para o tratamento da DP, induzida por MPTP em macacos. Verificou-se o número e padrão de disparos em três momentos: animais normais, lesionados com MPTP e tratados com estimulação do GPi. A estimulação reduziu o número de spikes por neurônio em GPi, aproximando-se do número prévio à indução com MPTP (que havia induzido um aumento). Não houve efeito significativo no padrão de disparo elicitado pela estimulação (BORAUD et al., 1996).

2.5.4 Humanos

A utilização da ECP para o tratamento da DP apresenta diferentes alvos, de acordo com a sintomatologia. Os sintomas da DP apresentam diferentes mecanismos fisiopatológicos e, consequentemente, a ruptura do processo patológico necessitará de diferentes abordagens. Alguns sintomas, como o tremor (sincronização nas faixas de 4-8 Hz) e acinesia (sincronização nas faixas de 15-30 Hz) apresentam fisiopatologia mais estudada, enquanto a rigidez é pouco caracterizada (KUHN et al., 2008).

A estimulação do NST e do GPi são usados, com eficiência similar, para pacientes com os seguintes sintomas motores: rigidez proeminente, acinesia, flutuação motora e movimentos involuntários ligados a baixa dopamina. Nesses casos, a estimulação têm sido associada a resultados significativos a longo-prazo. A principal vantagem da estimulação do NST é que esse permite maior redução da dosagem da medicação dopaminérgica, porém apresenta maior incidência de efeitos colaterais psiquiátricos associados (CASTRITO, 2011).

Já pacientes que sofrem da DP tendo o tremor como sintoma predominante, tipicamente recebem a estimulação no núcleo intermédio-ventral do tálamo (SAVICA et al., 2011). Tal estimulação também é eficiente para tratar os pacientes que apresentam tremor essencial, quando este for irresponsivo a outras terapias.

Apesar do tratamento dos sintomas motores pela estimulação serem efetivos para a maioria dos sintomas motores da DP, tais alvos não induzem um benefício suficiente na marcha e instabilidade postural. Devido à isso, novos alvos estão sendo estimulados recentemente. Dentre eles, o núcleo pedúnculopontino (NPP).

O NPP apresenta importância crítica para a postura e marcha, recebendo feedback tanto do medula espinal e dos núcleos da base. Estudos recentes sugeriram que a estimulação unilateral do NPP em pacientes com DP (com importante distúrbios da marcha) resultou em menor frequência de quedas e maior estabilidade postural (STEFANI et al., 2007).

2.6 Estimulação da medula espinal para Doença de Parkinson

A estimulação da medula espinal (EME), bem-documentada em humanos para o tratamento da dor crônica, surge como uma possível terapia para a DP. Caracterizada por ser menos invasiva, apresentou resultados promissores em roedores e primatas não-humanos. Estudos estão sendo realizados em humanos, porém não há resultados conclusivos.

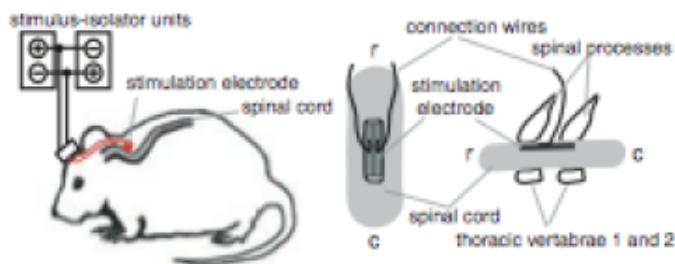
Dois importantes aspectos devem ser levados em consideração ao avaliar os efeitos nas vias neuronais influenciadas pela EME: posição do eletrodo e intensidade da corrente. As placas de cátodo e ânodo ficam sobre as meninges, separadas por cerca de 1mm. A intensidade de corrente varia, mas normalmente é 1,3 vezes superior ao limiar de excitabilidade em ratos e 1,1 vezes em camundongos (FUENTES; PETERSSON; NICOLELIS, 2010).

As estruturas da medula espinal mais próximas aos eletrodos são as colunas dorsais. Usando modelos computacionais (STRUIJK et al., 1992) para análise da influência da EME, determinou-se que a estimulação elétrica necessária para estimular estruturas abaixo da pia-máter cresce exponencialmente com a profundidade dos neurônios (HOLSHEIMER, 2002). Dessa forma, a EME estimula, majoritariamente, as colunas dorsais e raízes dorsais.

2.6.1 Roedores

A estimulação da medula espinal demonstrou restaurar a locomoção em roedores com DP (FUENTES et al., 2009). A EME ocorreu através de implante epidural nas colunas dorsais, a nível da vértebras torácicas 1 e 2 (Figura 2.4). Os eletrodos eram de platina e geravam estimulação bipolar.

Figura 2.4 – Implante epidural do eletrodo de EME.



Fonte: FUENTES, 2009

Nesse estudo, a estimulação das colunas dorsais demonstrou restaurar a capacidade de locomoção em três modelos animais: camundongos com diminuição aguda de dopamina, camundongos DAT-KO e ratos com perda neuronal dopaminérgica.

A primeira parte dos experimentos envolveu duas injeções (250mg/kg) intra-peritoneais de AMPT (alpha-methyl-para-tyrosine). Durante um período de 6 horas, foi possível induzir um estado agudo de depleção de dopamina nos camundongos. Havia um grupo controle, sem a indução do AMPT.

Realizou-se, então, um estudo eletrofisiológico antes da EME. Em ambos os grupos, a locomoção espontânea induzia modificações nas oscilações do LFP, as quais eram iniciadas alguns segundos antes da locomoção. Porém, importantes diferenças entre os grupos foram encontradas. Enquanto nos animais normais houve diminuição do poder espectral abaixo de 8Hz e aumento acima de 17 Hz, nos animais com baixa de dopamina houve diminuição nas frequências entre 5-25Hz.

Os seguintes achados eletrofisiológicos, quase que imediatas (44 +- 5ms), relacionados à EME foram encontrados: 1) análises do LFP demonstraram um desvio do poder espectral das baixas para as altas frequências, mantendo-se durante a estimulação e permanecendo por 50 segundos após o final da mesma; 2) modificação importante nos padrões de disparo neuronais, afetando 47,9% dos neurônios da área motora primária (M1) e 41,8% em neurônios estriatais; 3) redução considerável das unidades neuronais sincrônicas com o LFP: de 42%/38,8% em M1/estriado antes da estimulação para 24,5%/24% após 30 segundos da EME (FUENTES et al., 2009).

As análises do LFP permitiram a conclusão de que a EME modificou as atividades de M1 e do estriado dorso-lateral para um estado semelhante ao encontrado na transição do repouso/ movimento durante a movimentação espontânea em ambos os grupos sem EME. Como tais mudanças eletrofisiológicas ocorreram previamente a movimentação (nos grupos com e sem EME), foi gerado a hipótese de que a EME criaria um estado permissivo para o movimento, em vez de ação direta na movimentação em si (FUENTES et al., 2009). Possíveis explicações para o estado permissivo foram criadas. A primeira delas afirma que o EME, em adição a estimular vias somatosensoriais específicas, pode também recrutar sistemas de alerta no tronco cerebral, resultando em dessincronização córtico-estriatal requerida para a iniciação voluntária dos movimentos (FANSELOW; REID; NICOLELIS, 2000).

Os achados comportamentais de melhora motora no grupo controle (com a EME) reforçam a hipótese de ativação de sistemas de alerta. Foram encontrados os seguintes achados: aumento tardio (após alguns segundos) de 26 vezes e 4,9 vezes na locomoção, respectivamente, no grupo lesionado e controle após a EME, com o efeito maior observado na estimulação em 300 Hz. A mesma teoria também foi ser reforçada pelos casos de cinesia paradoxal, descrita por outros trabalhos (SCHLESINGER; ERIH; YARNITSKY, 2007; GLICKSTEIN; STEIN, 1991). Esta é definida pela melhora motora transitória e súbita dos sintomas motores em

pacientes com DP, em situações alarmantes.

Porém, uma série de observações sugerem que este parece não ser o mecanismo principal de ação da EME. Primeiramente, pelo fato de a estimulação das aferências do nervo trigêmio e outros estímulos capazes de gerar excitação importante (“air puffs”) não terem sido capazes de induzir locomoção no grupo experimental ou controle (FUENTES; PETERSSON; NICOLELIS, 2010). Além disso, os experimentos no grupo controle com animais acordados ou minimamente anestesiados produziram apenas uma resposta alerta mímina quando comparada à resposta alarmante mediante outros estímulos proprioceptivos, táticos ou noceptivos. Esse achado está de acordo com estudo prévio que afirmou que a estimulação das colunas dorsais está relacionada com efeitos alarmantes não-significativos (WALL, 1970).

Uma segunda teoria envolve o comando para a medula espinal do início de locomoção. Este é iniciado nos centros motores do tronco cerebral, especificamente RLM (região locomotora mesencefálica) e RLD (região locomotora diencefálica). Tais estruturas estão sob inibição tônica das vias de saída dos NB. Para ocorrer a inibição dessa atividade tônica, é necessário estimular os neurônios estriatais excitatórios de projeção. Em condições normais, o córtex têm poderosa influência sobre os mesmos. Porém, na DP, o limiar de excitação se torna maior. Diante disso, uma possível mecanismo de ação da EME pode ser através da ativação de áreas corticais largas, aumentando o efeito do córtex e tálamo sobre o estriado. Consequentemente, os núcleos motores do tronco cerebral ficariam desinibidos para ativar a medula espinal, dando início aos movimentos (GRILLNER et al., 2008).

A segunda parte dos experimentos envolveu camundongos DAT-KO. Os mesmos apresentam cerca de 5% de neurônios dopaminérgicos estriatais. Maiores depleções puderam ser atigidas injetando AMPT, resultando em modelo animal acinético (Sotnikova et al., 2005). Aumentando gradualmente os níveis de dopamina através de injeção de levodopa a cada hora, foi testado o limiar (threshold) de estimulação (FUENTES et al., 2009).

O primeiro grupo era composto por 4 camundongos DAT-KO tratados apenas com L-Dopa, em 6 sessões. Nesse grupo, o início da locomoção foi estabelecido após a quinta dose. Cada dose foi de 5 mg/kg, com um total de 15 mg injetados. Já no segundo grupo, 7 camundongos DAT-KO tratados com L-Dopa e EME (10 sessões), o início da locomoção ocorreu após a segunda dose. Nesse grupo, cada dose foi de 2 mg/kg, com um total de 3 mg injetados (FUENTES et al., 2009).

Dessa forma, o tratamento concomitante da L-dopa com a EME necessitou de apenas 20% da dosagem de L-dopa (redução de 80%) para induzir o início da locomoção. Além disso, a quantidade de movimentos gerados foi maior no grupo tratado com EME, também apresentando maiores valores de poder espectral. Esses achados sugerem que o EME estimula

a locomoção, até mesmo em animais com níveis muito baixos de dopamina (FUENTES; PETERSSON; NICOLELIS, 2010).

Apesar de o modelo agudo ser capaz de reproduzir os sintomas da DP, fazia-se necessário verificar a eficácia da EME em modelos de lesão crônica (terceira parte dos experimentos). Tal estudo foi possível através da injeção bilateral de 6-OHDA, que envolve desnervação das conexões nigroestriatais dopaminérgicas. As injeções bilaterais da droga foram feitas em 4 ratos, enquanto que em outros 4 animais (grupo controle) foram feitas injeções nas mesmas localidades, porém sem administração da 6-OHDA. Os ratos foram testados em duas sessões de uma hora cada: 1) sem estimulação; 2) estimulação por 30 segundos a cada 10 minutos (FUENTES et al., 2009).

O grupo experimental demonstrou uma melhora significativa da locomoção durante a segunda hora do experimento quando comparado à primeira hora. Já no grupo controle, houve uma diminuição da locomoção durante o período estimulatório em relação ao período prévio (FUENTES, 2009; FUENTES; PETERSSON; NICOLELIS, 2010).

A bradicinesia também foi avaliada nos ratos com lesão crônica. Foi demonstrado melhora significativa nos movimentos rápidos, de forma semelhante ao encontrado nos animais com lesão aguda (FUENTES; PETERSSON; NICOLELIS, 2010).

2.6.2 Primatas não-humanos

O uso da EME em primatas não-humanos foi realizado recentemente (SANTANA et al., 2014). Tal estudo utilizou 5 saguis adultos da espécie *Callithrix jacchus* (sagui comum). Foram realizadas microinjeções esterotáxicas no feixe medial prosencefálico, bilateralmente (3 animais) ou unilateralmente (2 animais) (ANNETT et al., 1992; MITCHELL et al., 1995; SANTANA et al., 2014).

Tal lesão resultou na redução de 42%+3% do número de neurônios dopaminérgicos, além da redução da densidade de marcação nos terminais axonais de 44%+10% em comparação aos sujeitos normais. A locomoção espontânea foi reduzida aproximadamente 75%, com os sinais da DP atingindo escores elevados nas oito categorias investigadas (75% + 29%) (VERHAVE et al., 2009).

Antes da EME, foi realizada a inibição farmacológica aguda da produção de dopamina, através da injeção subcutânea de AMPT (alfa-metil-p-tirosina), agravando os sinais da DP. O nível anatômico da estimulação foi torácico alto (T3-T4). A corrente de estimulação foi ajustada para 1.7x do valor que produziu resposta comportamental (mudanças posturais ou movimentos de cabeça ou pescoço).

A análise eletrofisiológica do LFP demonstrou a presença de oscilações sincrônicas nas faixas de frequência beta (8-20Hz) após a indução da DP. A supressão da atividade nesta frequência foi possível ser feita com EME, seja em altas ou baixas frequências, com eficácia aproximadamente semelhante, assim como ocorreu na resposta motora. Foi-se verificado também a coerência dos LFPs em pares de estruturas como uma medida indireta da conectividade funcional. Esta foi fortemente positiva apenas nas frequências de 8-15Hz nos hemisférios hemilesionados, com importante redução após a EME (SANTANA et al., 2014).

Os potenciais de ação também foram analisados. Em consonância com os resultados dos LFPs, verificou-se uma grande porção de neurônios com disparo neuronal na faixa de frequência beta durante o período OFF (56% dos neurônios registrados). Tal característica foi suprimida com a EME, com redução significativa em 26% dos neurônios beta-sincronizados (SANTANA et al., 2014).

Em contraste com as análises comportamentais e do LFP, os disparos neuronais apresentaram modificações variáveis de acordo com a frequência utilizada na EME. Altas frequências (80-300 Hz) apresentaram atividade inibitória no disparo neuronal, enquanto baixas frequências (4-20 Hz) induziram atividade excitatória (SANTANA et al., 2014).

Analizados conjuntamente, tais achados sugerem que os sintomas motores presentes na DP não se relacionam com mudanças específicas no disparo neuronal. De fato, não aparenta ocorrer um padrão de modificação dos disparos neuronais (seja um aumento ou diminuição) promovido pela EME, como ocorre na interrupção da sincronização oscilatória patológica.

Foi ainda considerado a possibilidade de estados comportamentais agirem como fator de confusão na análise dos efeitos da EME, por apresentarem importante influência no eixo NB-tálamo-côrte. Para isso, se lançou mão de uma two-way ANOVA, avaliando os disparos neuronais e LFPs com as seguintes variáveis: comportamento motor (ativo ou inativo) e a EME (estado ON e OFF). A ANOVA foi utilizada em dois animais hemilesionados, avaliando-se o hemisfério lesionado. Comparou-se esse hemisfério com o hemisfério intacto e o hemisfério parkinsoniano após tratamento agudo com levodopa. Para os casos respectivos, os tamanhos de efeito para a EME foram 13.4% e 10.8%; e para os estados comportamentais foram de 2,9% e 0,8%. Consegiu-se demonstrar, portanto, que a melhora motora foi realmente devido aos efeitos da estimulação em si (SANTANA et al., 2014).

Através da análise dos vídeos durante as sessões de estimulação/registro, os resultados motores da EME também foram mensurados. Houve melhora de: 221% na motilidade geral, 192% na frequência de episódios de locomoção espontânea e 144% na duração dos episódios de locomoção. Além disso, a distância total percorrida foi aumentada em 243%. A fração de movimentos rápidos foi o que apresentou maior melhora com o uso da EME, demonstrando

melhora importante da bradicinesia (SANTANA et al., 2014).

Foi observado ainda que a distância percorrida pelo saguis com DP tratados com a EME foi aproximadamente normalizada (91%) ao período prévio (sem a indução da DP). Porém, existiram algumas diferenças entre esses momentos. A principal delas é que os saguis com DP sob EME tenderam a apresentar menor frequência de episódios de locomoção espontânea (11%) porém com maior duração (628%) quando comparados aos saguis em estado normal (SANTANA et al., 2014).

A avaliação motora também foi realizada através da análise por observador cego às condições de estimulação, nos períodos ON e OFF. Houve redução significativa nos escores da DP de 18.4% + 13.9%. A maior redução promovida pela EME foi o freezing (31%). Outros parâmetros que apresentaram melhora importante foram: postura (23%), hipocinesia (23%) e bradicinesia (23%) (SANTANA et al., 2014).

De forma geral, o impacto da EME na resposta motora foi bastante significativo. Boa parte da significância veio do fato de sintomas motores, como a postura, marcha e velocidade na locomoção, sintomas de baixa resposta à ECP, apresentaram boa melhora com a EME (KRACK et al., 2003).

2.6.3 Humanos

Recentemente, nove caso-clínicos usaram EME para o tratamento de DP em pacientes com dor crônica associada. Sete destes trabalhos apresentaram melhora na sintomatologia motora (FENELO et al., 2012; AGARI; DATE, 2012; HASSAN, 2013; LANDI, 2013; MITSUYAMA, 2013; SOLTANI; LALKHEN, 2013; SIDIROPOULOS, 2014). Por outro lado, dois deles não obtiveram melhora (THEVATHASAN, 2010; WEISE, 2010).

Em um dos trabalhos que demonstrou resultados ineficientes no tratamento da DP (THEVATHASAN, 2010), alguns fatores da estimulação diferiram da utilizada na estimulação espinal em roedores (FUENTES et al., 2009). Tais fatores foram: geometria dos eletrodos e nível espinal de estimulação.

Quanto à geometria de eletrodos, no estudo em humanos, os mesmos eram posicionados longitudinalmente em relação a medula espinal, com formato cilíndrico e tamanho relativo à medula espinal pequeno. Por outro lado, no estudo em roedores (FUENTES et al., 2009), os mesmos eram posicionados transversalmente, com formato achatado e com tamanho relativo à medula espinal elevado. Tais diferenças resultaram numa área de contato à medula espinal estimada em 4 a 7 vezes menor no trabalho em humanos (THEVATHASAN, 2010) quando comparado ao em roedores (FUENTES et al., 2009).

Outra importante diferença ocorreu quanto ao nível de estimulação. No estudo em humanos, o nível foi cervical alto, enquanto nos roedores foi torácico alto. Apesar de aparentemente o primeiro ser capaz de ativar um maior número de neurônios (recruta fibras sensoriais dos membros superiores e tronco), proporcionalmente ele recruta menos fibras sensoriais dos membros inferiores do que no nível torácico alto. Tal achado de menor influência em membros inferiores foi possível ser detectado através da incidência de parestesia (BAROLAT et al., 1993; HOLSHEIMER, J.; BAROLAT, G., 1998). Consequentemente, a estimulação cervical alta utilizada pode ter apresentado um menor impacto em relação a marcha e controle postural, afetados na DP.

3 Justificativa

Avanços no entendimento da neurofisiologia envolvida na fisiopatologia da DP vêm permitindo a criação de novas teorias e abordagens que visam alterar o ciclo vicioso patológico da doença. Destaca-se a demonstração da presença de sincronização anormal de populações de neurônios envolvidas na sua fisiopatologia.

A diminuição da resposta a longo prazo à reposição de dopamina exógena suscitou a necessidade de outras abordagens terapêuticas. Desta forma, a estimulação cerebral profunda (ECP) tornou-se o tratamento cirúrgico de escolha para pacientes com DP. A estimulação elétrica de núcleos subcorticais, em frequências específicas, visa alterar a sincronização anormal de disparo desses neurônios e aliviar os sintomas motores da doença. A ECP demonstrou ser efetiva para alguns sintomas motores (sintomas axiais) na DP.

Há muitos estudos da eficácia da DP em alguns modelos animais (como roedores) e humanos, porém há apenas um relato da ECP para DP em primatas não-humanos. Além disso, esse estudo apresentou algumas restrições: 1) o modelo de indução da DP usado (MPTP) não é capaz de induzir o tremor parkinsoniano; 2) não foi realizado estudo eletrofisiológico nesse estudo.

Devido a elevada invasividade do procedimento de ECP, fomentou-se a necessidade de outros procedimentos menos invasivos, como a estimulação da medula espinal (EME). Resultados importantes e promissores com esta técnica em estudos com roedores, primatas não-humanos e humanos foram recentemente demonstrados e publicados; no entanto, não há estudo pré-clínico que forneça uma comparação de eficácia entre a ECP e EME.

Consequentemente, um estudo que realize a ECP sob diferentes tipos (tônica e em burst) em um modelo animal pouco utilizado (primata não-humano) permitirá uma melhor caracterização eletrofisiológica e de resposta motora da ECP, além de possibilitar serem feitos insights das diferenças entre a ECP e EME (feita em um estudo anterior) em um modelo filogeneticamente próximo ao humano.

4 Objetivos

- Caracterizar e comparar as alterações eletrofisiológicas provocadas pela estimulação cerebral profunda (tônica e em burst);
- Caracterizar e comparar os efeitos da estimulação cerebral profunda (tônica e em burst) sobre os sintomas motores observados em saguis parkinsonianos;

5 Métodos

5.1 Animais

Utilizou-se 1 primata, da espécie *Callithrix jacchus*, conhecido como sagui comum. O animal estava instalado no biotério do Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra/ Instituto Santos Dumont (IIN-ELS/ISD). O respectivo sagui foi mantido sob temperatura e ventilação controladas, favorecidas pelas características ambientais naturais da região do instituto, condizentes às mesmas características do habitat natural desse animal. Os suprimentos de água e alimentos foram ofertados à vontade. As normas práticas de uso de animais obedecem ao CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - e ao CEUA - Comitê de Ética de Uso de Animais. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo CEUA do IIN-ELS sob o protocolo 03/2015.

5.2 Desenho experimental

O processo experimental acompanhou o desempenho motor do animal em estudo em diversas etapas. Esta avaliação iniciou-se desde antes de qualquer intervenção, seguindo-se durante a fase de treinamento motor e nos pós-operatórios das cirurgias (indução da DP, implante de eletrodo cerebral profundo e de estimulação medular).

Inicialmente, o animal foi habituado ao pesquisador e à caixa de experimentos (um cubo de acrílico transparente, de dimensões 0,45 m x 0,45 m x 0,45 m). Nessa caixa, realizou-se a avaliação motora, verificando-se, entre outras características, o braço preferencial usado para buscar o alimento (marshmallows). O comportamento motor também foi avaliado com o animal dentro do biotério.

Posteriormente, induziu-se a DP através de injeções unilaterais de 6-OHDA em cada hemisfério cerebral, com intervalos de 2 semanas entre eles. A primeira injeção ocorreu no hemisfério cerebral contralateral ao membro de preferência. Matrizes de microeletrodos foram implantadas bilateralmente no mesmo procedimento cirúrgico da última injeção de 6-OHDA, sendo realizado o registro eletrofisiológico a partir de então. Os intervalos foram estabelecidos com objetivo de reduzir a morbimortalidade destes procedimentos.

Duas semanas após o último procedimento, iniciou-se a estimulação elétrica do animal. Ela ocorreu através de dois ciclos diferentes: estimulação cerebral profunda (ECP) do tipo tônica ou em burst. Cada ciclo de estimulação durou 4 dias. A sequência de estimulação

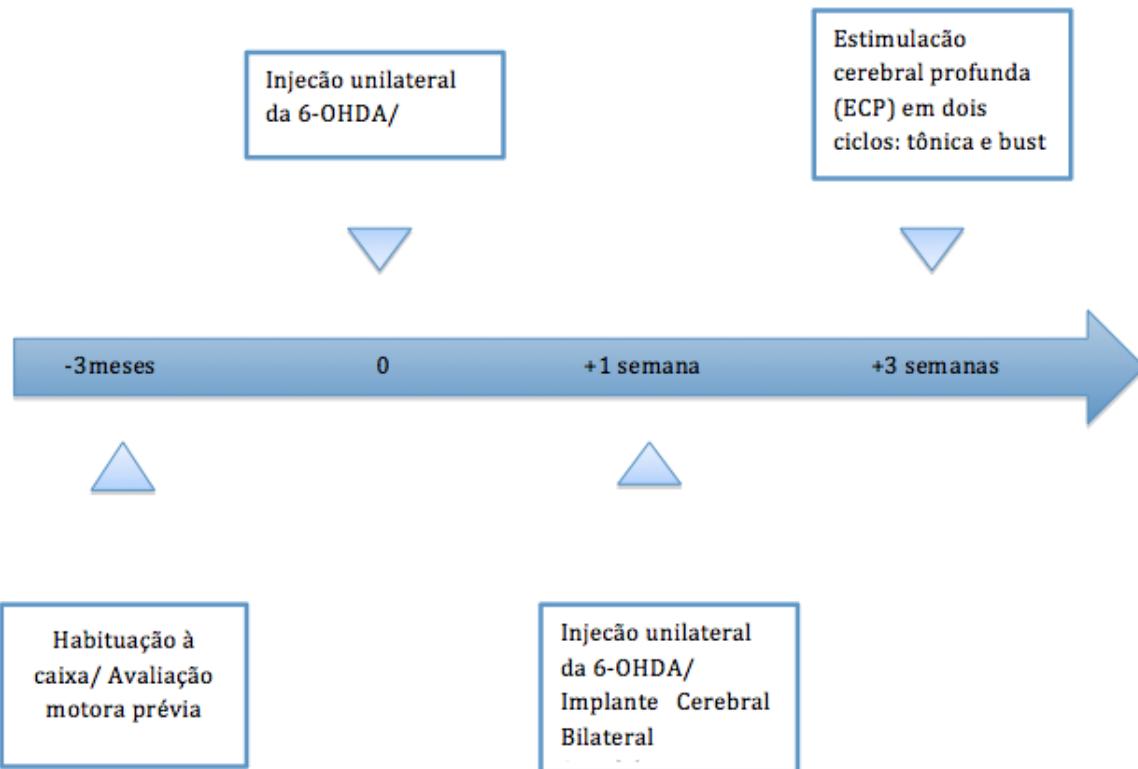
realizada foi:

- 1) Estimulação Cerebral Profunda do tipo tônica;
- 2) Estimulação Cerebral Profunda do tipo em burst;

O intervalo entre os ciclos foi de dois dias. Estabelecemos esse período de intervalos entre os ciclos (períodos de washout) para evitarmos efeito residual de um ciclo de estimulação sobre o outro.

O cronograma dos experimentos segue abaixo (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Cronograma de experimentos



Fonte: Autor

5.3 Matrizes de Eletrodos

5.3.1 Estimulação Cerebral Profunda e Registro

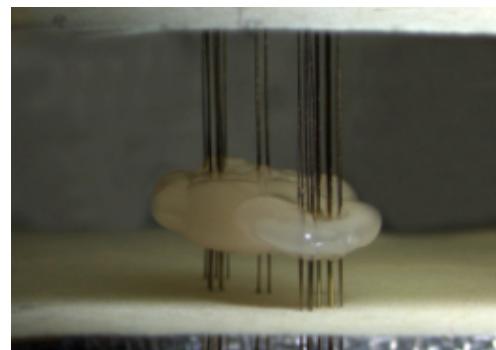
A estimulação cerebral profunda e o registro da atividade cerebral profunda foi realizado por meio de uma matriz de microeletrodos implantada no cérebro. Essa matriz foi montada pelo pesquisador, exclusivamente adaptada ao experimento, e é composta por fios de tungstênio com extremidades pontiagudas formadas por diâmetros diferentes: 100 μm e 50 μm (Figura 5.2). O primeiro deles foi utilizado para estimulação da área do núcleo subtalâmico, enquanto o fio de 50 μm foi utilizado para o registro eletrofisiológico das demais áreas. Os feixes de fios foram colados de acordo com as áreas a registradas/estimuladas (Figura 5.3).

Figura 5.2 – Fio de tungstênio com diâmetro de 100 μm , usado para a estimulação. Verifica-se a presença de extremidade pontiaguda



Fonte: Autor

Figura 5.3 – Colagem dos feixes de fios.



Fonte: Autor

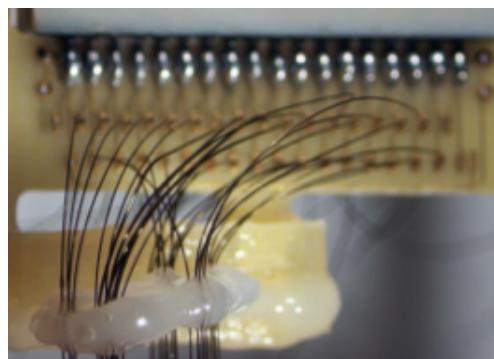
A placa de circuito impresso, acoplada ao Conector (Omnetics, Minnesota, Estados Unidos) (Figura 5.4), apresenta os orifícios representativos de cada canal por onde os fios de tungstênio, envoltos por uma superfície de material inerte (TEFLON), passarão (Figura 5.5).

Figura 5.4 – Conector acoplado a placa de circuito impresso.



Fonte: Autor

Figura 5.5 – Passagem dos fios nos canais específicos da Placa de circuito impresso.



Fonte: Autor

Cada canal teve sua impedância testada e mensurada nas duas matrizes montadas para implantação. As áreas-alvo pela matriz foram: Côrtex motor primário (M1), Putâmen (Put), Globo pálido interno (GPi), Globo pálido externo (GPe), Núcleo ventrolateral do Tálamo (VL), Núcleo ventroposterior lateral do Tálamo (VPL) e Núcleo subtalâmico (NST). Os comprimentos dos fios utilizados foram mensurados a partir da variável dorso-ventral (DV), representada conjuntamente com as variáveis ântero-posterior (AP) e médio-lateral (ML) na Tabela 5.1. A matriz de microeletrodos é mostrada a seguir (Figura 5.6).

Tabela 5.1 – Coordenadas dos locais de implante das matrizes (a partir da linha interaural).

Área	Coordenada AP	Coordenada ML	Coordenada DV
M1	10.0	6.5	14.4
PUT	8.5	6.5	9.3
GPi	8.0	3.5	7.8
GPe	8.0	5.2	8.8
VL	5.5	3.7	10.5
VPL	4.5	4.3	9.2
STN	5.5	3.7	7.55

Fonte: Autor

5.4 Procedimentos cirúrgicos

Antes de todos os procedimentos cirúrgicos, o sagui foi pesado e anestesiado com atropina (dose de 0.05 mg/kg) e Cloridrato de cetamina (10-20 mg/kg). As áreas relevantes foram tosadas. O animal, pré-anestesiado, recebeu lidocaína tópica spray a 10% na glote, seguido de intubação com tubo endotraqueal, mantendo-se a anestesia com uma mistura de oxigênio e isofluorano (1-5%).

5.4.1 Cirurgia de Indução da DP

Após tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico, o animal foi posicionado em aparelho esteriotáxico, com posterior incisão no sentido ântero-posterior, na linha média, com uma faca elétrica.

Mediante uma broca de dentista, trepanações (pequenos furos) foram feitas nas coordenadas ântero-posterior (AP), médio-lateral (ML) e dorso-ventral (DV) de acordo com protocolo descrito (Tabela 5.2) (SANTANA et al., 2014). Através do uso de um braço estereotáxico e uma seringa Hamilton de 5 microlitros conectada a uma bomba de micro-injeção, 4 injeções de 2 microlitros e 1 injeção de 3 microlitros de 6-OHDA (fluxo: 0,5 microlitros/segundo) foram feitas no feixe prosencefálico medial. Após cada injeção, a seringa foi mantida no local por cerca de 10 minutos, antes de ser lentamente retirada (Figura 5.7).

5.4.2 Cirurgia para implantes de microeletrodos cerebrais

Esta cirurgia foi realizada num segundo momento cirúrgico, após a injeção unilateral de 6-OHDA. Com o animal já posicionado no braço estereotáxico, mediante uma broca de dentista, trepanações foram feitas para os parafusos e pequenas craniotomias para as matrizes de eletrodos nas coordenadas previamente marcadas (Figura 5.8) (Figura 5.9). Parafusos foram fixados ao crânio. As craniotomias foram mantidas úmidas com solução salina ou

Figura 5.6 – Os fios de estimulação (100 μm de diâmetro) estão posicionados na região do Núcleo Subtalâmico (STN), com comprimento de 13,5mm. Para as demais áreas, fios de registro (50 μm) foram utilizados com os seguintes comprimentos: Área motora primária (M1) - 6,4mm, Putâmen (Put) - 9,3mm, Globo pálido Interno (GPi) - 12,15mm, Globo pálido externo (GPe) - 13,2mm, Núcleo ventrolateral do Tálamo (VL) - 10,5mm e Núcleo ventroposterior lateral do Tálamo (VPL) - 11,8mm.



Fonte: Autor

espuma cirúrgica umedecida com solução salina.

As matrizes foram fixadas ao crânio mediante acrílico dental. Após isto, uma capa de acrílico dental foi aplicada entre as matrizes e os parafusos, criando um capacete fixo no osso. Uma pequena peça plástica de forma alargada foi fixada no capacete para posterior fixação de conectores.

5.5 Avaliação Motora

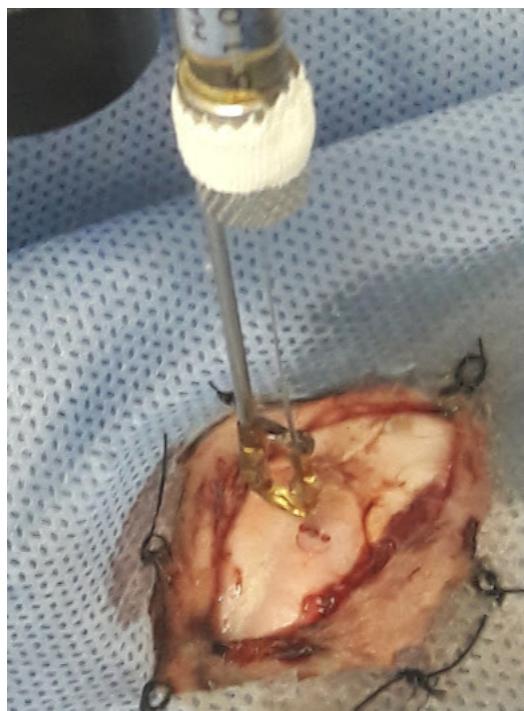
Foi realizada uma avaliação motora dos animais, antes das injeções e durante todo o restante do experimento. Essa avaliação foi constituída por 3 testes comportamentais, descritos abaixo:

Tabela 5.2 – Volume de 6-OHDA a ser injetado em cada coordenada (em relação a linha interaural).

Volume uL	Coordenada AP	Coordenada ML	Coordenada DV
2	6.5	1.2	6.0
2	6.5	1.2	7.0
2	6.5	2.2	6.5
2	6.5	2.2	7.5
3	6.5	3.2	8.0

Fonte: Autor

Figura 5.7 – Seringa Hamilton posicionada, através do uso de um braço estereotáxico, após trepanações.



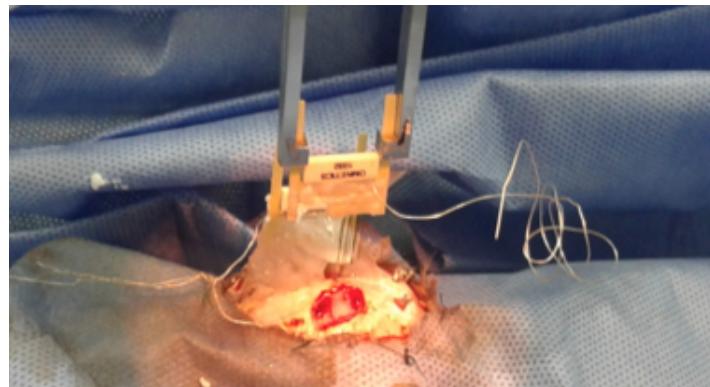
Fonte: Autor

5.5.1 Teste de Recuperação de Objetos

O teste de recuperação de objetos foi usado para avaliar a execução de movimentos finos, especificamente a habilidade de alcançar e agarrar pedaços de marshmallows. Este teste foi realizado em uma caixa de acrílico (0,45 m x 0,45 m x 0,45 m) com 9 aberturas circulares em uma de suas paredes. Essas aberturas permitem o acesso a 3 prateleiras localizadas na parte externa da caixa.

Antes de cada sessão de teste, 18 marshmallows foram distribuídos ao longo das 3

Figura 5.8 – Visualização da craniotomia e posicionamento da matriz para o implante.



Fonte: Autor

Figura 5.9 – Visão superior do implante da matriz de microeletrodos.



Fonte: Autor

prateleiras (3 marshmallows por abertura). Os animais foram treinados para recolher os marshmallows colocados nessas prateleiras. Para cada sessão, se contabilizou o número total de marshmallows recuperados e qual a mão foi usada para recuperá-los. Esta tarefa foi realizada entre 1 e 3 vezes por semana durante todo o período do experimento. Todas as sessões foram gravadas por 2 câmeras, posicionadas acima e na frente da caixa.

5.5.2 Atividade Locomotora espontânea

A atividade locomotora espontânea dos animais foi avaliada na caixa experimental (a mesma usada no teste de recuperação de objetos). Foi realizada entre 1 a 3 vezes por semana durante todo o período do experimento, na mesma sessão do teste recuperação de objetos, através da análise de vídeos.

5.5.3 Escala de impedimento motor

A escala de impedimento motor foi elaborada para quantificar alterações comportamentais que podem não ser evidentes no teste de recuperação de objetos. Ao todo, são quantificados 16 parâmetros através da escala: tremor em repouso, tremor em movimento, imobilidade, locomoção, habilidades motoras finas, bradicinesia, hipocinesia, rigidez, equilíbrio corporal (espontâneo), equilíbrio corporal (induzido), postura, resposta de alarme, escalada, habilidades motoras grosseiras, expressão facial e vocalização. A pontuação de cada um desses itens pode variar entre 0 e 3. A pontuação total desta escala pode variar entre 0 e 84. Quanto maior o comprometimento motor, maior a pontuação. O procedimento de aplicação da Escala de Impedimento Motor foi feito semanalmente, na gaiola-residência dos animais, durante todo o experimento.

5.6 Administração de AMPT

O AMPT é um fármaco que inibe a enzima tirosina hidroxilase (TH), provocando uma rápida e profunda depleção de dopamina estriatal.

Administramos o AMPT no animal em cada um dos dias em que foram realizados os testes experimentais de recuperação de objetos e registro/estimulação elétrica. Foram dadas 2 injeções de 240 mg/kg (s.c.) com intervalo de 3 horas entre uma injeção e outra. Seis horas após a primeira injeção, iniciamos o registro/estimulação diário.

5.7 Estimulação elétrica

A estimulação elétrica foi realizada quando o animal estava dentro da caixa de experimento. Toda a estimulação foi gerada por um estimulador de 4 canais (STG4004, Multichannel Systems MCS GmbH).

5.7.1 Estimulação cerebral profunda

O protocolo para estimulação cerebral profunda, do tipo tônico e em burst, foi realizado conforme a Tabela 5.3 e Tabela 5.4.

No tipo tônico, durante ciclos de 5 minutos foi-se realizado uma estimulação com frequência de 130 Hz, largura de pulso 60 us e intensidade de corrente inicial de 1000 uA. A cada novo ciclo, a intensidade de corrente aumentou 200 uA. Fizemos 4 ciclos, até a corrente de intensidade máxima de 1600 uA. Entre os ciclos, intervalos de 5 minutos sem estimulação foram realizados.

O mesmo raciocínio foi utilizado para a estimulação em burst. A única diferença resultou da divisão feita para cada ciclo de estimulação de 5 minutos. Cada ciclo passou a ser composto por: 1) 2,5 minutos iniciais de estimulação em burst, com 5 pulsos consecutivos, frequência de 500 hz, largura de pulso de 20 us, com a intensidade de corrente aumentando 200 uA a cada novo ciclo (valor inicial: 1000u); 2) 2,5 minutos finais de estimulação tônica, realizados com os mesmos parâmetros da ECP do tipo tônico.

Tabela 5.3 – Parâmetros de estimulação da estimulação cerebral profunda, do tipo tônica.

Frequência-Hz	Largura de pulso - us	Intensidade - uA	Tempo - min	Tipo de estimulação
130	60	1000	5	tônica bifásica
-	-	-	5	
130	60	1200	5	tônica bifásica
-	-	-	5	
130	60	1400	5	tônica bifásica
-	-	-	5	
130	60	1600	5	tônica bifásica

Fonte: Autor

Tabela 5.4 – Parâmetros de estimulação da estimulação cerebral profunda, do tipo em burst.

Frequência-Hz	Largura de pulso - us	Intensidade - uA	Tempo - min	Tipo de estimulação
500	20	1000	2,5	burst (5 pulsos consecutivos)
130	60	1000	2,5	tônica bifásica
-	-	-	5	-
500	20	1200	2,5	burst (5 pulsos consecutivos)
130	60	1200	2,5	tônica bifásica
-	-	-	5	-
500	20	1400	2,5	burst (5 pulsos consecutivos)
130	60	1400	2,5	tônica bifásica
-	-	-	5	-
500	20	1600	2,5	burst (5 pulsos consecutivos)
130	60	1600	2,5	tônica bifásica

Fonte: Autor

5.8 Registro

Cada tipo de estimulação ao qual o animal foi submetido durou 4 dias consecutivos. As análises dos registros de vídeo e eletrofisiológicos se ateram ao segundo dia de cada tipo de estimulação.

5.8.1 Registro de vídeos

Desde a fase de treinamento do sagui na atividade de recuperação de marshmallows, iniciamos o registro por vídeo de sua movimentação dentro da caixa. Esse registro foi realizado durante todo o projeto, em todas as ocasiões que o animal era colocado dentro da caixa de acrílico.

Dessa forma, temos registros de vídeo: 1) na fase de treino; 2) entre a primeira e segunda cirurgia de indução da DP (ainda sem o registro eletrofisiológico, pois as matrizes cerebrais ainda não estavam implantadas); 3) após a segunda cirurgia, durante os ciclos de estimulação (concomitantes ao registro eletrofisiológico).

5.8.2 Registro e análise eletrofisiológica

O registro ocorreu após cerca de duas semanas do implante da matriz de microeletrodos. Diariamente, foram realizados registros dos animais dentro da caixa de acrílico por cerca de duas horas.

Em cada dia, o animal era registrado em três situações: 1) Período baseline (sem estimulação) por 15 minutos; 2) Período de estimulação, durando entre 30 minutos a 1 hora; 3) Período pós-estimulação por 15 minutos.

Antes do início das sessões experimentais, os animais eram anestesiados com isofluorano inalatório (1% em O₂) e um cabo para registro era acoplado aos conectores das matrizes. Após um período de cerca de quinze minutos de recuperação do animal, iniciavámos o registro eletrofisiológico.

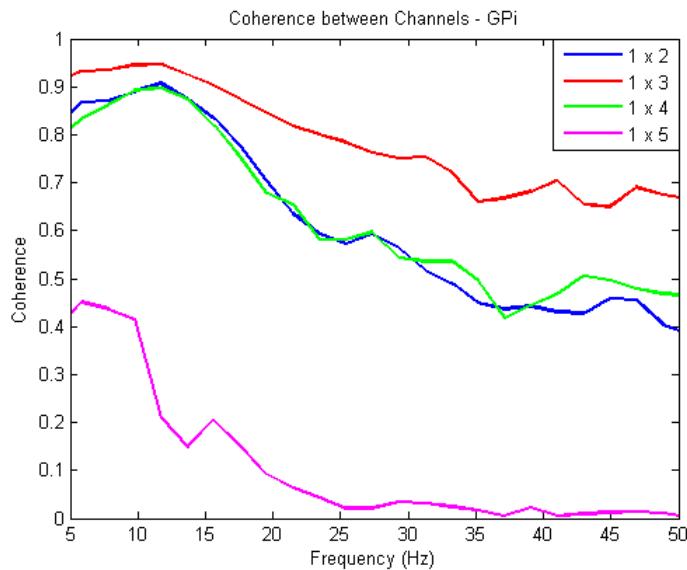
O cabo era conectado a um pré-amplificador (Plexon inc., USA) e ligado a um processador de aquisição multi-neural. Com esse sistema, era possível registrar os potenciais de ação (disparos multi-unitários e unitários) e os potenciais de campo local (PCLs) simultaneamente. Os sinais de disparos dos 32 canais foram amostrados a 40 kHz, filtrados (154 Hz - 8.8 kHz) e digitalizados em janelas de 800 *us*. Os PCLs foram amostrados a 1 kHz e filtrados (5- 50 Hz).

Os PCLs (Potencial de campo local) foram diretamente importados para o Matlab® (v. 8.1.0.604 R2013a, USA). Avaliamos os sinais de Potencial de campo local (PCL) de cada um dos canais de registro. Para tal, recorremos a análise de coerência entre os canais da mesma área registrada. Dessa forma, canais com sinais de LFP representativos de uma área não-congruentes aos seus pares foram excluídos da análise.

Tal avaliação foi realizada para cada dia de estimulação, e permitiu a exclusão de canais ruidosos ou inativos que poderiam interferir nas avaliações eletrofisiológicas a serem

realizadas a posteriori (Figura 5.10).

Figura 5.10 – Coerência entre o canal 1 do Globo Pálido Interno (GPi) com os 4 canais restantes da mesma área. Verifica-se altas coerências com canais 2, 3 e 4 e baixa coerência com o canal 5, o qual foi excluído da análise.



Fonte: Autor

5.9 Análise Histológica

Após o término dos experimentos, o animal foi perfundido após sedação profunda com cloridrato de cetamina (50 mg/kg). Seu encéfalo e medula foi retirado e guardado para posteriores procedimentos de análise histológica.

O cérebro foi submetido à cortes de 50 μ m, no aparelho de criostato. Os cortes forem posteriormente armazenados no freezer à temperatura de -80 C.

Os cortes submetidos à reação da Tirosina Hidroxilase (TH). Para esta, utilizamos o cérebro de outro sagui como controle para o resultados encontrados. Este sagui havia sido submetido ao implante de matriz cerebral para registro eletrofisiológico, porém não havia sido submetido a estimulação cerebral profunda. O seu cérebro encontrava-se conservado em freezer a -80C.

A reação foi realizada em lâminas correspondentes, de tal maneira que cada lâmina do animal em estudo foi comparada a uma lâmina representativa de uma região semelhante no animal controle.

As lâminas correspondentes (duplas de lâminas) foram colocadas no mesmo recipiente, sendo submetidas às mesmas etapas da reação de TH concomitantemente. Dessa forma, apenas lâminas que foram submetidas à mesma reação de TH foram comparadas.

6 Resultados

6.1 Resultados eletrofisiológicos:

6.1.1 Estimulação ECP - tônica:

Iniciamos a análise eletrofisiológica do animal a partir do ciclo de ECP do tipo tônica. Dessa forma, separamos os sinais de PCLs (Pontecial de Campo Local) do segundo dia desse tipo de estimulação.

O sinal foi divido em diversos momentos de acordo com o protocolo de estimulação: baseline; 4 períodos de estimulação sob diferentes intensidades; 3 períodos sem estimulação intercalados ao da ECP; período de pós-estimulação.

A análise de espectrograma foi realizada durante todo o sinal. Tal análise permitiu avaliar espectros de potência de PLCs de acordo com a frequência do sinal. A relação é mostrada através da variável tempo, permitindo a análise de flutuações da relação entre a magnitude e a frequência do sinal.

Observamos que a variável estimulação tônica (período ON) exerce influência importante no poder espectral presente em algumas frequências. As oscilações na faixa de frequência entre 8-20Hz foram as mais susceptíveis a tal variação. Tais oscilações apresentavam magnitude considerável durante os períodos sem estimulação (período OFF), com consequente redução do poder espectral com a estimulação tônica.

Este achado foi ainda mais realçado quando individualizamos a análise (separamos três vetores de tempo de 50 segundos relacionados a estimulação de 1600uA: período pré-estimulação, período de estimulação e período pós-estimulação). Durante a estimulação, a ECP tônica foi capaz de reduzir a oscilação sincrônica em baixas frequências (8-20hz), presentes nos 50 segundos finais do período pré-estimulatório para todas as áreas($p < 0.05$), exceto o GPe. O período pós-estimulatório não apresentou diferenças significativas quanto à diminuição do poder espectral em faixas de 8-20Hz em relação ao período pré-estimulatório, com exceção dos núcleos do tálamo (VLM e VLl)($p < 0.05$) (Figura 6.1).

Almejando verificar de forma mais detalhada o poder espectral em cada frequência do sinal, analisamos os PCLs através do fft (Fast Fourier Transform) para cada área.

Nas análises de fft, usamos os mesmos 50 segundos do período pré-estimulatório e estimulatório de 1600 uA, usado no espectrograma descrito anteriormente. Verificamos redução

do poder espectral entre 8-20 Hz nas áreas do córtex motor primário (M1), nos núcleos do tálamo (VPL e VL), globo pálido interno (GPi) e putâmen (PUT) durante o período ON. No globo pálido externo (GPe) não houve redução significativa nessa faixa de frequência (Figura 6.2) (Figura 6.3).

A seguir, analisamos as coerências entre áreas durante os períodos ON e OFF. Houve redução na coerência entre as áreas na faixa de frequência entre 8-20 Hz. Um exemplo da interferência da estimulação na coerência entre um núcleo do tálamo (VPL) e as demais áreas é mostrada a seguir (Figura 6.4).

6.1.2 Estimulação ECP - burst:

Posteriormente, realizamos a análise da ECP em burst. Os passos realizados foram os mesmos que os da estimulação tônica.

O espectrograma feito utilizou-se também de janelas de 50 segundos, porém eram relacionados a três momentos da estimulação em burst com 1200 uA (pré-estimulatório, estimulatório e pós-estimulatório).

Houve redução significativa do poder espectral nas frequências entre 8-20 Hz durante o período ON ($p<0.05$), com exceção do GPe. Porém, tal redução mostrou-se menor nas áreas dos núcleos do tálamo quando comparados à redução promovida pela ECP tônica (Figura 6.5).

Foi-se realizado também a análise do FFT de todas as áreas registradas. Verificou-se que a redução do poder espectral ocorreu em bandas de frequências similares às ocorridas pela ECP tônica para todas as áreas. (Figura 6.6) (Figura 6.7).

6.1.3 Resultados comportamentais:

A análise de movimentação espontânea demonstrou um aumento na duração total (somatório da duração dos episódios) (6x) e na frequência de episódios (4x) dos movimentos realizados durante o período ON (ECP tônica) quando comparados ao período OFF.

Por apresentarem parâmetros diferentes, não agrupamos os períodos de estimulação em um único grupo para análise. Realizamos o teste de Student para análise da movimentação espontânea durante e entre as estimulações. A estimulação tônica sob intensidade de 1200 uA (o mesmo usado para o espectrograma) foi o único período ON que demonstrou apresentar valores ($M = 19,68$; $DP = 0,82$) de duração total de locomoção estatisticamente superiores ($t = 26,64$; $p = 0,024$; $r = 0,99$) à algum período OFF. O período OFF questão foi o de pós-estimulação (1200uA) ($M = 4,10$; $DP = 0,01$). Não houve diferença estatística entre os

períodos ON e OFF (seja na ECP tônica ou em burst) quanto à frequência de episódios de locomoção.

Ao correlacionarmos com o espectrograma de estimulação, chegamos às seguintes conclusões: 1) a diminuição do poder espectral em baixas frequências promovido pela estimulação ECP (tônica ou em burst) aumentou o número de episódios de locomoção e a duração total dos episódios; 2) a alteração na oscilação promovida pela estimulação tônica 1200 uA foi o único período que aumentou de forma estatisticamente significativa a duração total; 3) nenhum período ON induziu uma melhora estatisticamente significativa na frequência dos episódios.

6.2 Imunohistoquímica:

6.2.1 Reação de Tirosina-Hidroxilase:

Realizamos a reação de Tirosina-Hidroxilase para verificação da desnervação da via nigro-estriatal do animal em questão. Para isso, realizamos um estudo comparativo de lâminas correspondentes entre o nosso animal e o animal controle.

Verificamos, através dessa reação, a presença de morte neuronal importante na região do estriado no animal submetido a esse estudo. Ao compararmos ambos os hemisférios desse animal, a lesão induzida pela 6-OHDA foi, aparentemente, mais proeminente no lado esquerdo (Figura 6.8) (Figura 6.9). Tais conclusões puderam ser tiradas pelo decréscimo na coloração do estriado nos hemisférios do animal estudado (especialmente no esquerdo) em relação à apresentada pelo animal controle.

Figura 6.1 – Espectograma das áreas cerebrais registradas no hemisfério esquerdo durante 3 períodos: 1) 50 segundos de período pré-estimulação; 2) 50 segundos de estimulação tônica 1600uA; 3) 50 segundos de período pós-estimulação. Redução do poder espectral em baixas freqüências durante estimulação (ON).

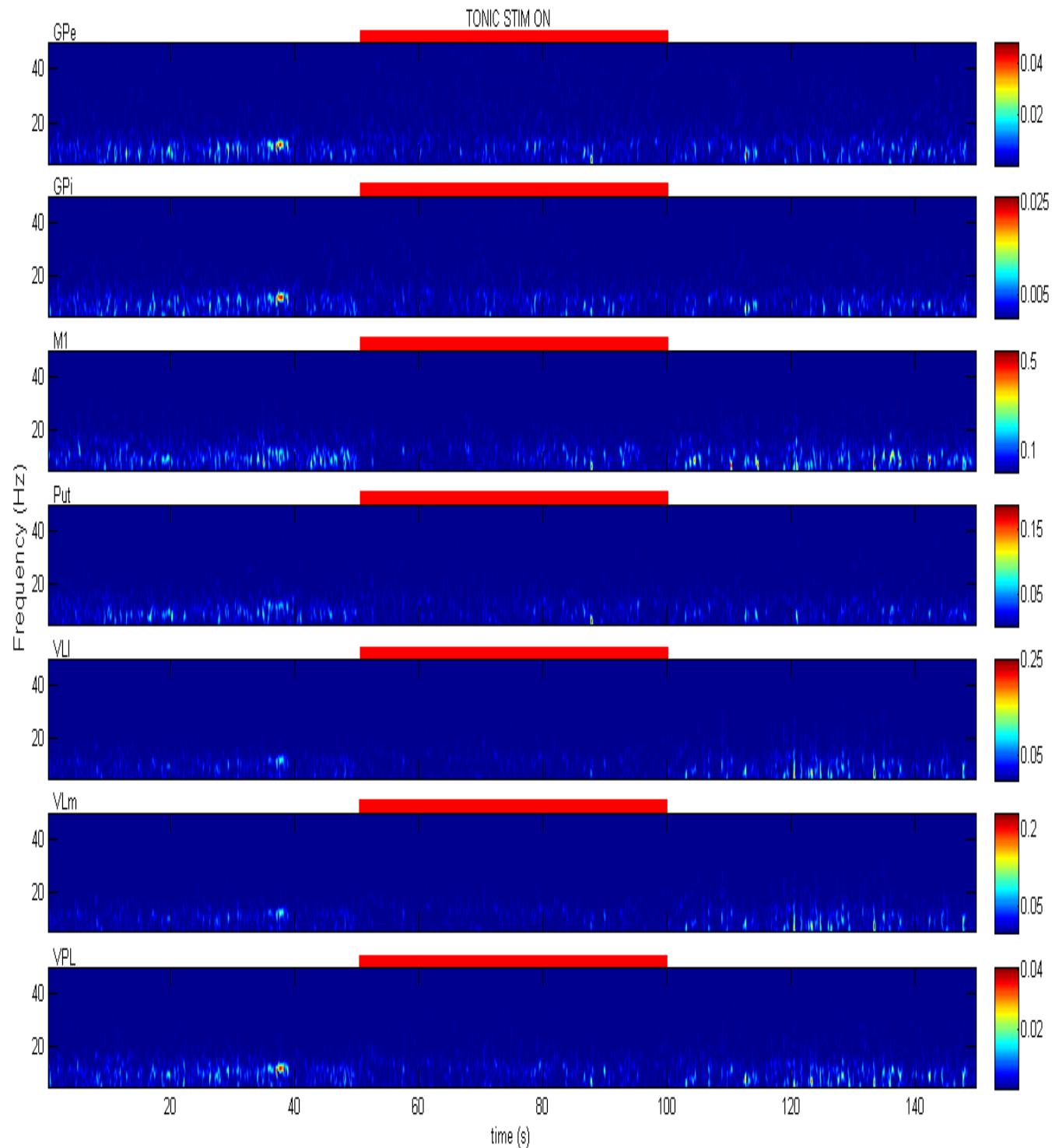
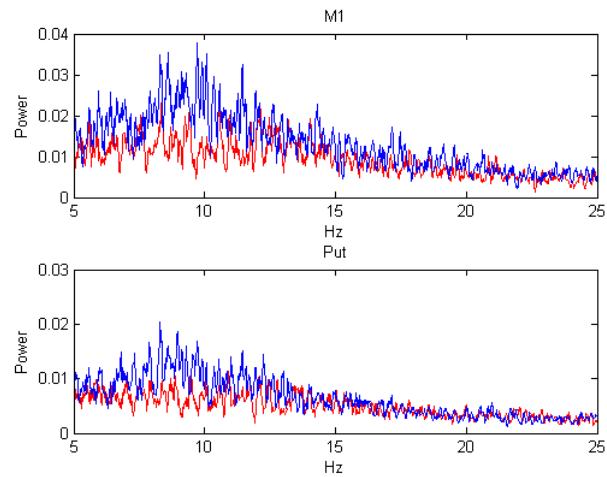
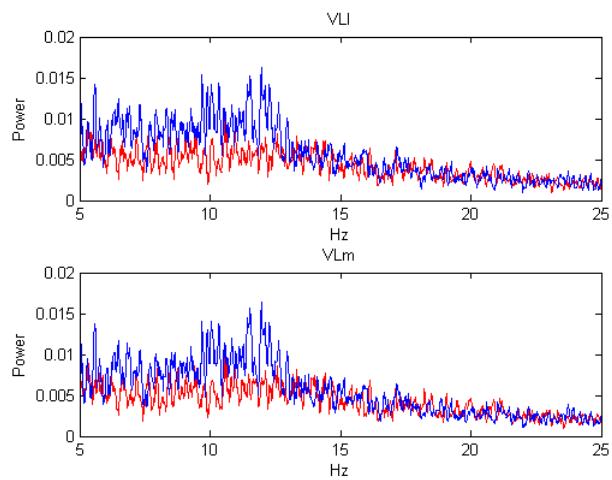


Figura 6.2 – Fast Fourrier Transform (FFT) das área motora primária (M1) e putâmen (Put) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação tônica 1600uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz.



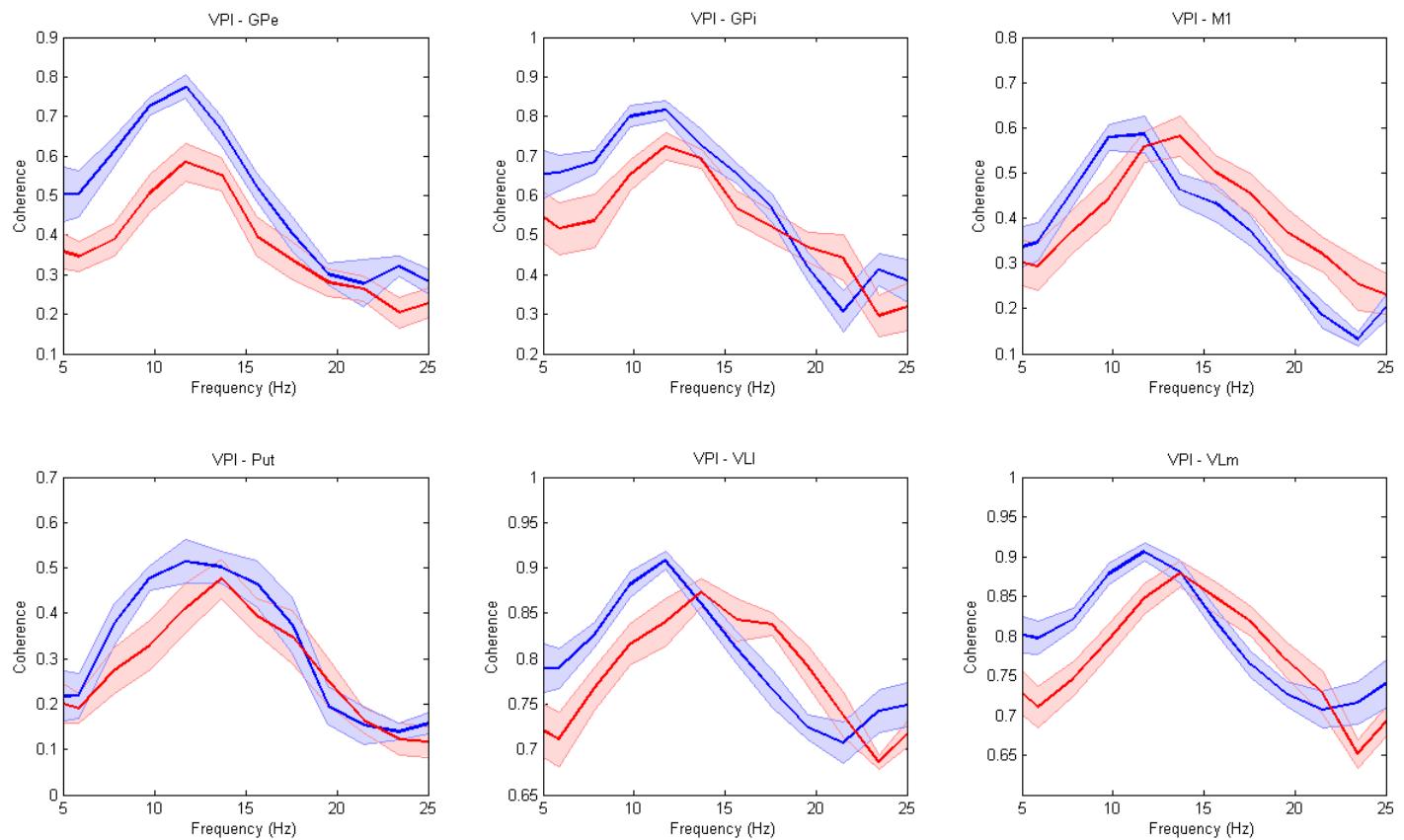
Fonte: Autor

Figura 6.3 – Fast Fourrier Transform (FFT) dos núcleos do tálamo (VLL e VLm) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação tônica 1600uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz.



Fonte: Autor

Figura 6.4 – Coerência entre o núcleo ventralposterior (VPL) do tálamo em relação às demais áreas. Azul: período OFF; Vermelho: período ON (1600uA). Houve redução da coerência, durante a estimulação, entre as frequências de 8-20 Hz.



Fonte: Autor

Figura 6.5 – Espectograma das áreas cerebrais registradas no hemisfério esquerdo durante 3 períodos: 1) 50 segundos de período pré-estimulação; 2) 50 segundos de estimulação em burst a 1200uA; 3) 50 segundos de período pós-estimulação. É possível observar que houve uma redução do poder espectral em baixas freqüências durante estimulação (ON).

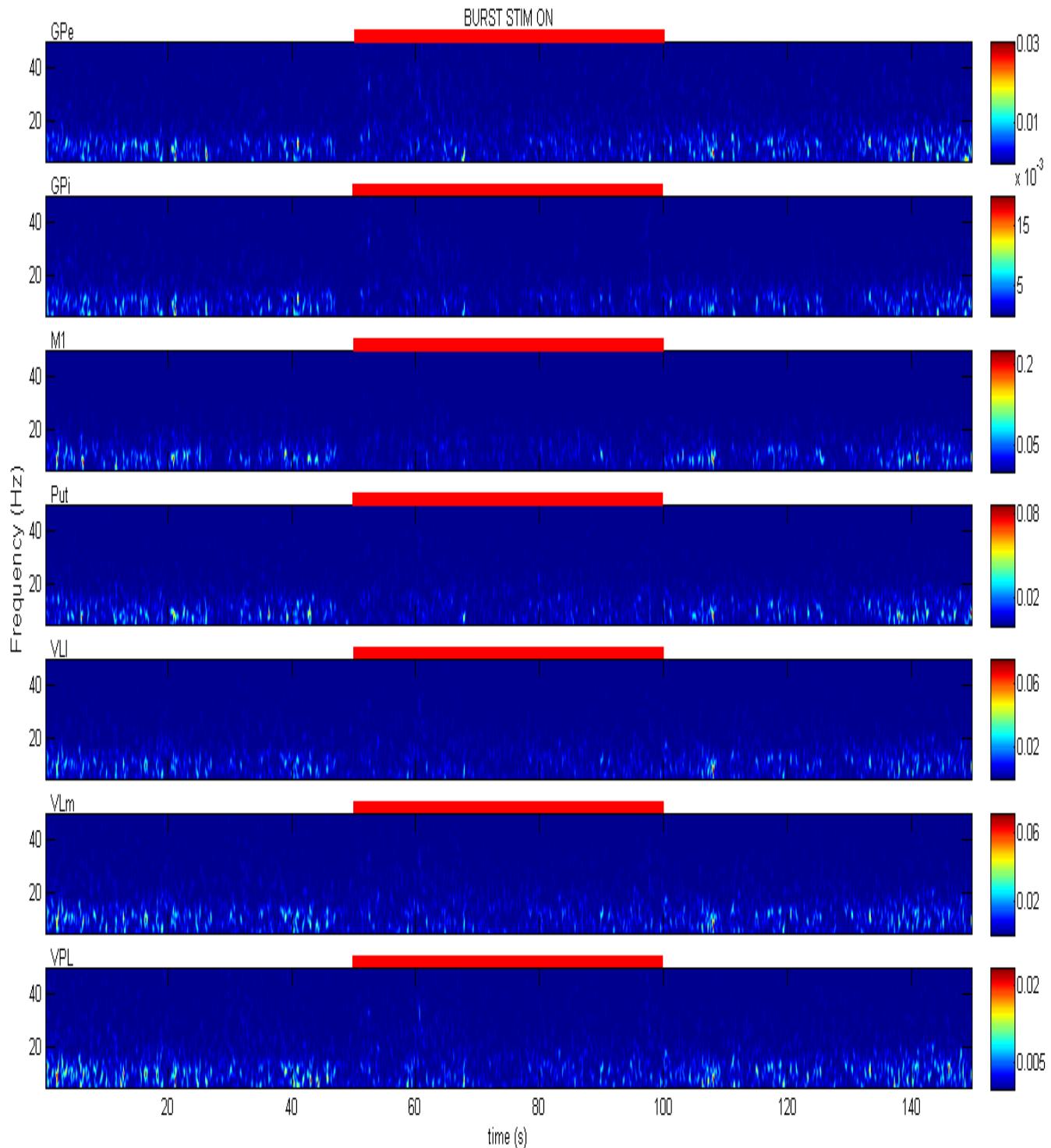
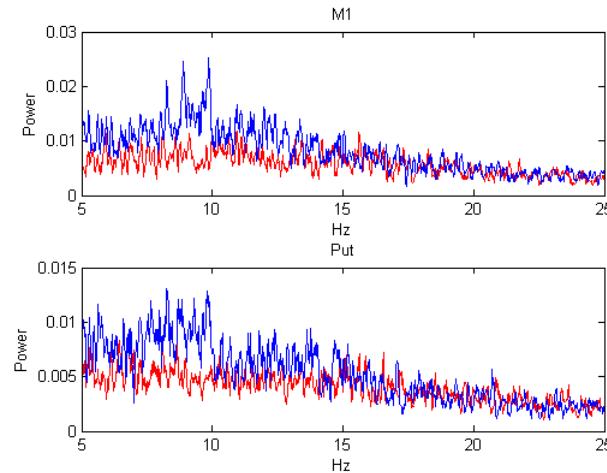
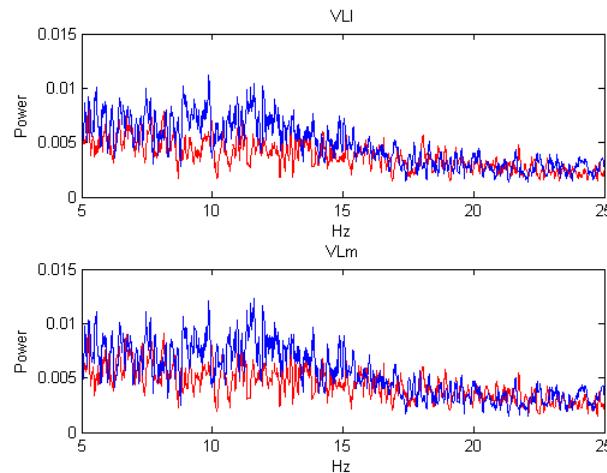


Figura 6.6 – Fast Fourier Transform (FFT) das área motora primária (M1) e putâmen (Put) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação em burst 1200uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz.



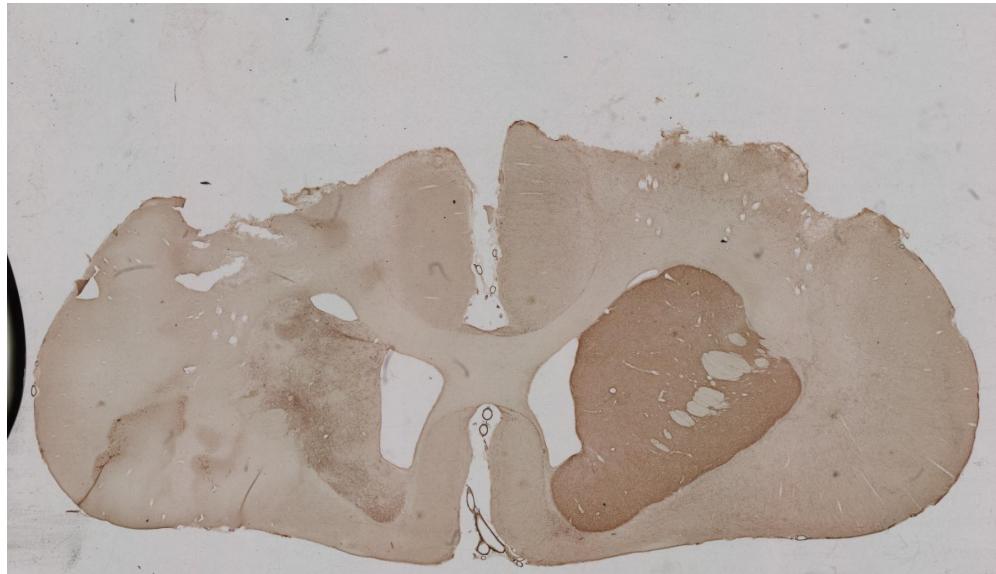
Fonte: Autor

Figura 6.7 – Fast Fourier Transform (FFT) dos núcleos do tálamo (VLL e VLm) analisado durante: 1) baseline (azul - 50 segundos de período pré-estimulação); 2) período ON (vermelho - 50 segundos de estimulação em burst 1200uA). Presença de diminuição do poder espectral durante período ON na faixa de frequência entre 8-20 Hz. Entretanto, demonstrou menor redução do poder espectral em putâmen quando comparada à ECP tônica.



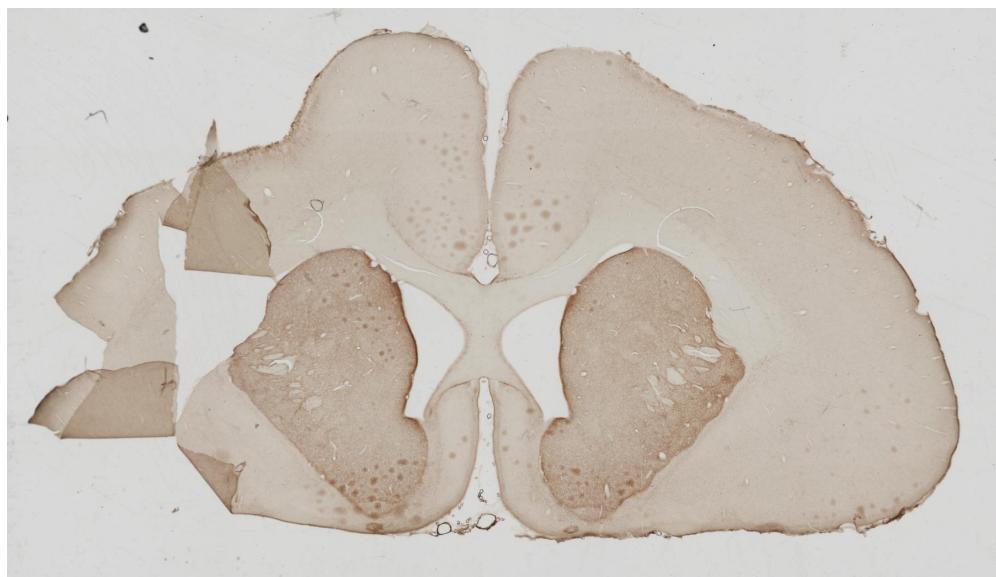
Fonte: Autor

Figura 6.8 – Tirosina-Hidroxilase em cérebro do sagui do estudo em questão. Percebe-se a morte neuronal em região do estriado, mais proeminente no lado esquerdo.



Fonte: Autor

Figura 6.9 – Tirosina-Hidroxilase em cérebro do sagui usado como animal-controle.



Fonte: Autor

7 Discussão

Ao analisarmos os espectogramas (ECP tônica e em burst), evidencia-se que estimulação cerebral profunda (tônica ou em burst) do núcleo subtalâmico (NST) reduziu a magnitude das oscilações dos Potencial de Campo Local (PCLs) na faixa de frequência low-beta (8-20hz), quando comparado aos momentos OFF, prévios a estimulação.

Ao compararmos tal achado ao do processo fisiológico de movimentação em condições normais, algumas afirmações podem ser feitas. A primeira delas é a de que a ECP, em linhas gerais e por mecanismos não completamente entendidos, modifica o estado patológico a um estado similar às condições normais.

A segunda delas ressalta a importância primordial que os mecanismos de sincronização/dessincronização entre neurônios parecem apresentar para funções corticais superiores, como a locomoção, e de como estes estão afetados na DP. Parte dessa importância parece advir da maior capacidade que a sincronização têm de induzir um efeito significativo (através da somação de inputs) em alguns grupos de neurônios em um curto espaço de tempo. Da mesma maneira, grupos de neurônios sincrônico ao perderem a sincronia, diminuem o output em um curto período. Como os neurônios se caracterizam como unidades unitárias oscilantes, e a oscilação é o mecanismo energeticamente menos custoso para se sincronizar/dessincronizar, alterações na sincronia das oscilações são fundamentais para se modificar estados neuronais em um curto espaço de tempo (BUZSAKI, G., 2006).

Esses achados nos espectogramas desse estudo parecem indicar, portanto, que tais estimulações (ECP tônica e em burst) são capazes de interferir nesse delicado processo de interações entre oscilações neuronais, afetado na DP (sincronização patológica na faixa de frequência beta). Isso vai ao encontro de outros achados na literatura. Nestes, também se demonstrou a redução da sincronização patológica sob ECP (BROWN et al., 2001). Diversas alterações eletrofisiológicas e neuroanatômicas podem ser a causa da ruptura da sincronização patológica, sendo provavelmente, multifatorial. Algumas suposições foram levantadas em estudo prévio em primatas não-humanos: inibição local da despolarização, ativação antidiátrômica dos neurônios do GPe e depleção do neurotransmissor glutaminérgico (GAO, 1999).

Ao compararmos os espectogramas e os gráficos de FFT (Fast Fourier Transform) dos dois tipos de ECP, verificamos particularidades quanto ao efeito promovido por cada estimulação (ECP tônica x ECP burst), as quais podem indicar diferentes mecanismos de interrupção da beta-sincronização.

De fato, ao induzirmos a estimulação cerebral profunda sob dois diferentes mecanismos, almejávamos realmente encontrar algumas diferenças entre estes grupos. Como a probabilidade de uma parte de neurônio ser excitada (corpo celular ou axônio) depende do tempo de estimulação, a variação entre ECP tônica ou em burst pode interferir em qual parte do neurônio é ativada. Em uma escala maior, vias neuronais diferentes podem ser estimuladas através desses tipos de estimulação.

No espectrograma da estimulação burst, verificamos, que os núcleos do tálamo (VPL, VL) tiveram redução do poder espectral nas faixas de 8-20 Hz, porém tal redução foi menor do que à causada pela ECP tônica. Por outro lado, a estimulação em burst aparentou ser mais eficiente em reduzir a sincronização dessas baixas frequências no córtex motor primário. Nas demais áreas (Put, GPi, GPe), as alterações induzidas por esses tipos de estimulação foram similares, porém foram comparativamente bem menos evidentes do que nas demais áreas.

Estudo prévio realizado sobre ECP tônica no NST em primatas não-humanos fez postulações importantes sobre o mecanismo de ação da mesma através da análise dos padrões de disparo. Verificou-se, por exemplo, que a estimulação do NST era capaz de modificar o padrão irregular de disparo de algumas regiões, como o GPi/GPe, para um padrão regular. Especula-se que o NST seja um transmissor fiel de padrões de atividade alternantes para outras áreas cerebrais (Wichmann et al., 1994), e que a ECP do NST induza um padrão regular de disparo em GPi/GPe representativo de uma outra atividade anormal, sendo esta capaz de bloquear a transmissão anormal dos padrões de atividade nos núcleos da base (HASHIMOTO et al., 2003).

Os achados da redução do poder espectral com a estimulação cerebral profunda foram, posteriormente, correlacionados com os dados da resposta motora. Observamos um aumento de 600% na duração total e de 150% na duração por episódio de locomoção do animal sob ECP em comparação ao períodos OFF. Porém, a estimulação tônica sob intensidade de 1200 uA foi o único período ON que demonstrou apresentar valores de duração total de locomoção estatisticamente superiores ($t = 26,64$; $p = 0,024$; $r = 0,99$) à algum período OFF. Não houve diferença estatística entre os períodos ON e OFF (seja na ECP tônica ou em burst) quanto à frequência de episódios de locomoção.

O fato de a maior parte dos períodos de estimulação não terem causado um aumento significativo na locomoção vai ao encontro de trabalhos em humanos. Nestes, se verifica que os sintomas axiais (fundamentais para a marcha) são pouco responsivos à ECP. Sabe-se, por exemplo, que a instabilidade postural e distúrbios de marcha tendem a ser sintomas difíceis de serem manejados com a ECP na DP (FASANO et al., 2015).

Por outro lado, os sintomas apendiculares (tremor, rigidez e acinesia) apresentaram uma boa resposta à estimulação de núcleos cerebrais profundos. O mesmo foi encontrado em estudo prévio da ECP em NST para primatas não-humanos, o qual demonstrou melhora significativa da bradicinesia/acinesia unilateral e da rigidez (BENAZZOUZ et al., 1993). Tal estudo utilizou-se do modelo de MPTP (útil para simular rigidez e acinesia), testando-se a melhora desses sintomas através da utilização de eletromiografia, que avaliou os músculos bíceps e tríceps durante atividades motoras previamente treinadas (extensão e flexão) para ocorrerem após estímulo sensorial (BENAZZOUZ et al., 1993).

Em estudos em humanos, a melhora dos sintomas apendiculares a ECP também foi encontrada. Nestes, o tremor responde melhor a estimulação talâmica, enquanto os demais sintomas apendiculares apresentam resposta mais significativa à estimulação dos demais núcleos (Globo Pálido Interno e Núcleo Subtalâmico) (FASANO et al., 2015).

O animal em nosso estudo apresentou ainda uma característica comportamental específica. Ele apresentava uma tendência a realizar movimentos circulares sempre que iniciava a locomoção. A justificativa para tal característica deve-se a maior indução de morte neuronal no hemisfério esquerdo do que no direito (comprovada pela reação de imunohistoquímica). Como o animal apresenta uma tendência a rotacionar e girar a cabeça para o lado ipsilateral a injeção de 6-OHDA (SANTANA et al., 2014), acreditamos que a diferença lesional entre os hemisférios justifique este comportamento apresentado.

Os achados eletrofisiológicos e comportamentais da ECP puderam posteriormente serem comparados aos encontrados na EME em primata não-humanos (SANTANA et al., 2014).

Nesse estudo, verificou-se a coerência dos LFPs em pares de estruturas, sendo fortemente positiva apenas nas frequências de 8-15Hz nos hemisférios hemilesionados (parkinsonianos), com importante redução após a EME (SANTANA et al., 2014). Esse achado foi também observado na ECP em nosso estudo.

Quanto à resposta motora, a EME demonstrou uma redução importante nos seguintes sintomas: o freezing (31%), postura (23%), hipocinesia (23%) e bradicinesia (23%) (SANTANA et al., 2014). Tais sintomas axiais não apresentaram, no geral, uma resposta importante a ECP em nosso estudo.

A melhora nos sintomas axiais (postura) encontradas na EME pode explicar o achado, no mesmo estudo, de normalização aproximada (91%) da distância pecorrida pelo saguis com DP tratados com EME em relação ao período prévio (sem a indução da DP). Porém, existiram algumas diferenças entre esses momentos. A principal delas é que os saguis com DP sob EME tenderam a apresentar menor frequência de episódios de locomoção espontânea (11%) porém

com maior duração (628%) quando comparados aos saguis em estado normal (SANTANA et al., 2014).

As hipóteses para a ação da EME sugeriram mecanismos diferentes aos propostos pela ECP. O primeiro deles era de que a EME criaria um estado permissivo para a locomoção, ao invés de agir sobre o movimentação em si (teoria da cinesia paradoxal). Acreditou-se que a ativação de sistemas de alerta poderia explicar este fenômeno, porém a estimulação de estruturas sensorias passíveis de estimular mais fortemente os sistemas de alerta não demonstraram a mesma melhora motora (FANSELOW; REID; NICOLELIS, 2000). Além disso, estudo da EME em humanos demonstrou melhora crônica da locomoção, o que fala contra a suposta importância da cinesia paradoxal como mecanismo de ação da EME. Isso ocorre pois a exposição crônica permite a habituação a situação alarmante (nesse caso, a EME), não sendo esta capaz de justificar a melhora clínica a longo prazo (PINTO DE SOUSA et al., 2017).

Já uma segunda hipótese sugere que a EME seria capaz de ativar uma maior área cortical. Isso resultaria em uma maior input para os núcleos da base, o que permitiria alterações na neurocircuitaria local, permitindo que o movimento fosse realizado.

Similaridades e diferenças entre a ECP e a EME poderão ser melhor esmiuçadas em estudos pré-clínicos posteriores que façam as análises comportamentais e eletrofisiológicas no mesmo modelo animal (nesse caso, primatas não-humanos), submetidos às mesmas condições experimentais. Consequentemente, conclusões mais robustas poderão ser tomadas a respeito da melhora induzida por ambas, o que poderá resultar em importantes insights para estudos em humanos.

Referências

- AGARI, T.; DATE, I. Spinal cord stimulation for the treatment of abnormal posture and gait disorder in patients with Parkinson's disease. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, v. 52, n. 7, p. 470-474, 2012.
- ANNET, L.E. et al. Behavioural analysis of unilateral monoamine depletion in the marmoset. *Brain*, vol. 115, n. 3, p. 825-856, 1992.
- BAROLAT, G. et al. Mapping of sensory responses to epidural stimulation of the intraspinal neural structures in man. *J. Neurosurg*, v. 78, p. 233-239, 1993.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 896p.
- BECKSTEAD, R. M. Long collateral branches of substantia nigra pars reticulata axons to thalamus, superior colliculus and reticular formation in monkey and cat. Multiple retrograde neuronal labeling with fluorescent dyes. *Neuroscience*, v. 10, n. 3, 1983.
- BEKAR, L. et al. Adenosine is crucial for deep brain stimulation-mediated attenuation of tremor. *Nature Medicine*, v. 14, n. 1, p. 75-80, 2008.
- BENAZZOUZ, A. et al. Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur.J.Neurosci.*, v. 5, n. 0953-816X (Print), p. 382-389, 1993.
- BENAZZOUZ, A. et al. Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neuroscience Letters*, v. 189, n. 2, p. 77-80, 1995.
- BJURSTEN, L. M.; NORRSELL, K.; NORRSELL, U. Behavioural repertory of cats without cerebral cortex from infancy. *Experimental Brain Research*, v. 25, n. 2, p. 115-130, 1976.
- BORAUD, T. et al. High frequency stimulation of the internal Globus Pallidus (GPi) simultaneously improves parkinsonian symptoms and reduces the firing frequency of GPi neurons in the MPTP-treated monkey. *Neuroscience Letters*, v. 215, n. 1, p. 17-20, 1996.
- BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003.
- BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkin-

son's disease reconsidered. *Experimental Neurology*, v. 212, n. 1, p. 226–229, 2008.

BROOKS, D. J. et al. Assessment of neuroimaging techniques as biomarkers of the progression of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v. 184, n. SUPPL. 1, p. 68–79, 2003.

BROWN, P. et al. Effects of stimulation of the subthalamic area on oscillatory pallidal activity in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, v. 188, n. 2, p. 480–490, 2004.

BUZSAKI, G.. *Rhythms of the Brain*. 1. ed. New York: Oxford University Press, 2006. 448p.

CASTRITO, A. Ten-Year Outcome of Subthalamic Stimulation in Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, v. 68, n. 12, p. 1550, 2011.

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

CHANG, J.-Y. et al. Studies of the neural mechanisms of deep brain stimulation in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 31, p. 643–657, 2007.

COSTA, R. M. et al. Rapid Alterations in Corticostriatal Ensemble Coordination during Acute Dopamine-Dependent Motor Dysfunction. *Neuron*, v. 52, n. 2, p. 359–369, 2006.

CUI, G. et al. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, v. 494, n. 7436, p. 238–242, 2014.

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*, v. 18, n. 4, p. 951–956, 2003.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. *Neuron*, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DEGOS, B. et al. Neuroleptic-Induced Catalepsy: Electrophysiological Mechanisms of Functional Recovery Induced by High- Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus. *Neurobiology of Disease*, v. 25, n. 33, p. 7687–7696, 2005.

DO, M. T. H.; BEAN, B. P. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: Modulation by slow inactivation. *Neuron*, v. 39, n. 1, p. 109–120, 2003.

FAHN, S. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 23, n. SUPPL. 3, 2008.

FASANO, A. et al. Axial disability and deep brain stimulation in patients with Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, v. 11, n. 2, p. 98–110, 2015.

FUENTES, R.; PETERSSON, P.; NICOLELIS, M. A. L. Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: Mechanistic approach. *European Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 7, p. 1100–1108, 2010.

G E ALEXANDER, M R DELONG, AND P. L. S. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annual Review of Neuroscience*, v. 9, p. 357–381, 1986.

GARCIA, L. Dual effect of high frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *The journal of neuroscience*, v. 23, n. 25, p. 8743–51, 2003.

GERFEN, C. R.; SURMEIER, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, v. 34, p. 441–66, 2011.

GILDENBERG, P. L. Evolution of Neuromodulation. v. 77030, p. 71–79, 2005.

GRAYBIEL, A. M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, v. 13, n. 7, p. 244–254, 1990.

GRILLNER, S. et al. Mechanisms for selection of basic motor programs - Roles for the striatum and pallidum. *Trends in Neurosciences*, v. 28, n. 7, p. 364–370, 2005.

GRILLNER, S.; ROBERTSON, B. The basal ganglia downstream control of brainstem motor centres—an evolutionarily conserved strategy. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 33, p. 47–52, 2015.

HAMMOND, C.; BERGMAN, H.; BROWN, P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends in Neurosciences*, v. 30, n. 7, p. 357–364, 2007.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 16, n. 2, p. 79–84, 2010.

HORSTINK, M. et al. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: Early (uncomplicated) Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, v. 13, n. 11, p. 1170–1185, 2006.

IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences*, v. 30, n. 5, p. 188–193, 2007.

JÁIDAR, O. et al. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *The Journal of . . .*, v. 30, n. 34, p. 11326–11336, 2010.

KUHN, A. A. et al. Event-related beta desynchronization in human subthalamic nucleus correlates with motor performance. *Brain*, v. 127, n. 4, p. 735–746, 2004.

K??HN, A. A. et al. Reduction in subthalamic 8–35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson’s disease. *European Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 7, p. 1956–1960, 2006.

KRINGELBACH, M. L. et al. Translational principles of deep brain stimulation. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 8, n. 8, p. 623–635, 2007.

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

KUHN, A. A. et al. High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus Suppresses Oscillatory Activity in Patients with Parkinson’s Disease in Parallel with Improvement in Motor Performance. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 24, p. 6165–6173, 2008.

LEES, A. J. et al. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Movement Disorders*, v. 23, n. 6, p. 777–783, 2008.

LOUGHBOROUGH, W. period. *During*. v. 109, p. 1966–1968, 1966.

MAGARIOS-ASCONE, C. et al. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons: A possible cellular mechanism in Parkinson’s disease. *Neuroscience*, v. 115, n. 4, p. 1109–1117, 2002.

MCINTYRE, C. C. et al. Electric field and stimulating influence generated by deep brain stimulation of the subthalamic nucleus. *Clinical Neurophysiology*, v. 115, n. 3, p. 589–595, 2004a.

MCINTYRE, C. C. et al. Uncovering the mechanism(s) of action of deep brain stimulation: Activation, inhibition, or both. *Clinical Neurophysiology*, v. 115, n. 6, p. 1239–1248, 2004b.

MEISSNER, W. et al. Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain*, v. 128, n. 10, p. 2372–2382, 2005.

OBESO, J. A et al. Missing pieces in the Parkinson’s disease puzzle. *Nature medicine*, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010.

OBESO, J. A. et al. Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson’s disease. *Movement Disorders*, v. 23, n. SUPPL. 3, p. 548–559, 2008.

OLANOW, C. W.; OBESO, J. A.; STOCCHI, F. Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson’s disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurology*,

v. 5, n. 8, p. 677–687, 2006.

OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology*, v. 72, n. 21 SUPPL. 4, 2009.

PARENT, M.; PARENT, A. The pallidofugal motor fiber system in primates. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 10, n. 4, p. 203–211, 2004.

PINTO DE SOUSA et al. Spinal cord stimulation improves gait in patients with Parkinson's disease previously treated with deep brain stimulation. *Mov Disord*, v. 32, n. 2, p. 278–282, 2017.

RANCK, J. B. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: A review. *Brain Research*, v. 98, n. 3, p. 417–440, 1975.

REDGRAVE, P. et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 11, n. 11, p. 760–72, 2010.

REYES, S. et al. Variability in neuronal expression of dopamine receptors and transporters in the substantia nigra. *Movement Disorders*, v. 28, n. 10, p. 1351–1359, 2013.

SAITO, K. et al. Nigral GABAergic inhibition upon cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus. *European Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 4, p. 879–886, 2003.

SANTANA, M. B. et al. Characterization of long-term motor deficits in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in the common marmoset. *Behavioural Brain Research*, v. 290, p. 90–101, 2015.

SANTANA, M. B. et al. Spinal cord stimulation alleviates motor deficits in a primate model of Parkinson disease. *Neuron*, v. 84, n. 4, p. 716–22, 2014.

SAVICA, R. et al. Deep brain stimulation in benign tremulous parkinsonism. *Archives of neurology*, v. 68, n. 8, p. 1033–6, 2011.

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*, v. 1013, n. 1, p. 98–106, 2004.

SHON, Y.-M. et al. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus evokes striatal dopamine release in a large animal model of human DBS neurosurgery. *Neuroscience letters*, v. 475, n. 3, p. 136–140, 2010.

SINGER, W. *Temporal Coherence: A Versatile Code for the Definition of Relations. The Senses: A Comprehensive Reference*, v. 2, p. 1–9, 2010.

- SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, v. 81, n. 1, p. 29–44, 2007.
- SMITH, Y. et al. The thalamostriatal system: A highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends in Neurosciences*, v. 27, n. 9, p. 520–527, 2004.
- SOH, S.-E.; MORRIS, M. E.; MCGINLEY, J. L. Determinants of health-related quality of life in Parkinson's disease: A systematic review. *Parkinsonism e Related Disorders*, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2011.
- SORENSEN, C. A.; ELLISON, G. D. Striatal organization of feeding behavior in the decorticate rat. *Experimental Neurology*, v. 29, n. 1, p. 162–174, 1970.
- SS, K. B. R. E. H I GH - FRE Q UEN C Y S T I MULAT I O N O F THE S U B THALAM IC NU C LEU S S U PP RE SS E S EX P ER I MENTAL RE S T I NG TREM O R I N THE M O NKEY. n. 1, 1999.
- STEFANI, A. et al. Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease. *Brain*, v. 130, n. 6, p. 1596–1607, 2007.
- STOCCHI, F. The hypothesis of the genesis of motor complications and continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 15, n. 1, p. S9–S15, 2009a.
- STOCCHI, F. The hypothesis of the genesis of motor complications and continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 15, n. 1, p. S9–S15, 2009b.
- STONE, S. S. D. et al. Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus*, v. 21, n. 12, p. 1348–1362, 2011.
- SWANSON, L. W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, v. 886, n. 1-2, p. 113–164, 2000.
- TEIVE, H. A. G. et al. As contribuições de Charcot e de Marsden para o desenvolvimento dos distúrbios do movimento nos séculos XIX e XX. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 59, n. 3 A, p. 633–636, 2001.
- 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*, v. 193, n. 1, p. 43–52, 2005.
- WILSON, C. J. The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron*, v. 45, n. 4, p. 575–585,

2005.

WINDELS, F. Pallidal Origin of GABA Release within the Substantia Nigra Pars Reticulata during High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus. *J Neurosci*, v. 25, n. 20, p. 5079–5086, 2005.

Anexos

ANEXO A – Manuscript Garcia et al.

Title: Insights from Spinal Cord Stimulation History in Parkinson Disease

Authors: Bruno Braz Garcia¹, Mariana Ferreira Pereira de Araújo¹, Hougelle Simplício^{1,2}

Affiliations: ¹Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience, Santos Dumont Institute, Macaiba, Brazil

²State University of Rio Grande do Norte, Mossoró, Brazil

Key points:

- Spinal Cord Stimulation as a safe and well established therapy
- Beta-band synchronous oscillatory activity disruption
- Challenges from methods heterogeneity in human studies
- Parkinson's disease refractory symptoms response to Spinal Cord Stimulation

Abstract

Parkinson Disease (PD) current available therapeutic choices have strong limitations, and commonly present refractory symptoms despite all efforts. In the last decade Spinal Cord Stimulation (SCS), a well established therapy for chronic pain, has assumed a new role as a viable choice in controlling symptoms such as bradykinesia, rigidity and balance. It also has the advantage of being less invasive than Deep Brain Stimulation. The main studies regarding the SCS in PD are here reviewed in a chronological manner, from the first studies in animal models to the latest clinical trials performed. Despite important findings, such as the role of beta band activity in PD pathophysiology, and SCS neuroprotective effect, the heterogeneity of methodologies used and the small

samples in human studies pose a challenging problem to be addressed in order to have a rigorous patient selection and widen SCS clinical applicability.

Keywords: parkinson; spinal cord stimulation; deep brain stimulation; beta oscillations; basal ganglia;

1. INTRODUCTION

Parkinson Disease (PD) was primarily described in 1817 by James Parkinson, who defined the disease as "shaking paralysis". This suggestive nomination arrived from his clinical observations of concomitant presence of involuntary tremors with loss of muscular strength. Decades later, Jean Charcot detailed others motor symptoms, as bradykinesia and rigidity¹ .

The hallmark symptoms of the disease are: tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability. Classically, the symptoms affects unilaterally with progression to the contralateral hemibody in 5 years. However, non-motor symptoms were recently linked to PD, affecting patients several years before the first motor symptomatology² .

The tremor is characterized as a resting tremor (with important improvement with movements), which frequency ranges from 4 to 6 Hz. The rigidity has a continuous tonic characteristic ("cog-wheeling" signal). Both symptoms affect more the extremities. The bradykinesia is defined as the difficulty to initiate a movement, and may present as freezing in advanced PD patients. The postural instability is present after several years from the first tremor occurrence, and is related to a inability of axial control. The patient is not able to keep himself in balance, with frequent falls³.

The chronic progressive neurodegeneration of PD restricts pharmacologic-induced improvements. However, they are primordial for PD control. Jean Charcot was pioneer in visualizing the first medicamentous treatment for PD. It

consisted of anticholinergic drugs, aimed to establish the balance between dopamine and acetylcholine in the basal ganglia. The pharmacological treatment was restricted to such therapy for several years⁴.

Decades later, levodopa (L-dopa) introduction allowed a significant improvement in quality of life in PD patients⁵. Levodopa acts as a dopamine precursor with significant results, however it is not able to mimic the normal variations in dopamine concentrations. Therefore, levodopa-induced motor complications may be present, affecting 90% of PD patients after 5 years of levodopa administration. The most common complications are dyskinesia and motor fluctuations⁶.

Surgical techniques for PD have been in use for a century. Initially, ablative surgeries were used for the treatment of parkinsonian tremor⁷. With the development of stereotaxic surgeries for humans⁸, a reproducible method for targeting brain areas was created. As a consequence, ablative surgeries were widely performed. A hallmark surgery for PD was performed in 1954, using stereotaxy to damage the ventral intermedio nucleus of thalamus⁹.

Levodopa introduction¹⁰ suspended the need for PD surgical treatment. However, long-term ineffectiveness and motor complications of levodopa reemerged lesional surgical techniques decades later. The most common target areas were: Thalamus, Globus Pallidus Internus (GPI) and Subthalamic Nucleus(STN)⁴.

However, at that time, the use of electrical current in the brain was not restricted as a method for damaging brain structures. The search for new approaches of electrical currents arrived from intra-operative clinical observations in the 1950s¹¹. During a stereotaxic surgery, before the current-mediated damage, low-intensity electrical stimulation (not capable of damage brain areas) was applied to detect brain target areas and areas that should be avoided. An important finding by neurosurgeons during this initial step was that electrical stimulation, depending on the stimulation parameters, could mimic the clinical effects of electric current-mediated damage.

Even though this finding was described decades before, the first reported deep brain stimulation (DBS) for DP in humans was in 1987, when Benabid stimulated the Vim (ventral intermedio nucleus of thalamus)¹². The first report of permanent stimulators for Deep brain stimulation for PD patients occurred years later. In 1993, Bennabid stimulated the Subthalamic Nucleus (STN) with promising results¹³.

There are several advantages of DBS when compared to lesional surgeries. First, DBS does not induce permanent alterations. Also, those patients may have an adjustment after the surgery and DBS does not exclude the patient to be submitted to another procedure in the same brain area.

Although DBS has demonstrated efficient results in motor improvements, some factors restrict its benefit. First, DBS is a highly-invasive procedure, with several possible complications, requiring minutious selection of the patients that may undergo this procedure. As PD is a chronic neurodegenerative disease, several patients are in the elderly population and submit them to a procedure as DBS may not be acceptable. Second, DBS is a procedure with elevated costs and several patients may not afford for it. Also, some cardinal symptoms do not improve significantly with DBS. The most common irresponsible symptoms are related to axial control and include: bradykinesia, rigidity and balance.

Therefore, DBS may not be applicable to an important percentage of PD patients. Different surgical approaches are needed in order to allow less invasive procedures and more efficient results for some refractory symptoms.

In 1967 spinal cord stimulation (SCS) was used for the first time for the treatment of chronic pain in a patient diagnosed with inoperable bronchogenic carcinoma. Shealy, Mortimer and Reswick, with their pioneering work¹⁴, opened the way for a therapeutic approach since then being used for those patients with refractory neuropathic pain and in such diverse cases ranging from phantom limb pain to pain following corrective surgeries for severe scoliosis¹⁵⁻²² (for a recent review see Sinclair et al²³). SCS effects on

chronic pain are thought to be exerted by mediating the electrical activation of large diameter afferent fibers of the dorsal column, accordingly with Melzack's and Wall's theory^{24,25}.

Fuentes et al. paved the way for broadened therapeutic uses of SCS in 2009. Mice with acute dopamine-depletion and chronically lesioned rats with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), both PD animal models, restored high speed locomotion (121 -180 mm/s) and total amount of locomotion after dorsal columns stimulation. The former in a translational context would mean improvement of bradykinesia²⁶.

This novel therapeutic approach proposed by Fuentes et al. has spanned a series of studies investigating the method's applicability both in animal models and human clinical trials. And despite the growing interest in this field, there are yet many questions to be answered, such as the ideal stimulation parameters, what is the underlying mechanism behind SCS and PD, who are the optimal candidates and many others. The present review aims to summarize and discuss the findings regarding the use of SCS in PD, following the chronological evolution of the field and highlighting important physiological and clinical features.

2. SPINAL CORD STIMULATION ROLE IN PD

2.1. Rodents pioneering study

The first study investigating the use of SCS in PD was performed by Fuentes et al. in 2009²⁶, based on findings from epilepsy studies. Both epilepsy and PD show aberrant synchronized low-frequency neural oscillations, which are hypothesized to play important roles in these conditions neurodynamics²⁷⁻³⁴. When peripheral nerve afferents were stimulated, both in epilepsy animal models and in epileptic patients, the

resulting desynchrony reduced the frequency and duration of seizure episodes^{27,28,30}. The natural question then was: could the same apply to motor symptoms of PD via the stimulation of afferent somatic pathways²⁶?

In this study, three animal models were used: wild-type and dopamine-transporter knockout (DAT-KO) mice, following acute dopamine depletion through pharmacological synthesis inhibition (by means of alpha-methyl-para-tyrosine, AMPT), and chronic dopaminergic denervation of the striatum using bilateral 6-OHDA lesion in rats²⁶.

Custom-made flat bipolar platinum electrodes were chronically implanted in an epidural position, above the dorsal columns of the spinal cord at the upper thoracic levels. Electrophysiological analysis before SCS in wild-type mice with acute depletion demonstrated oscillations between 1.5 to 4 Hz and in the lower beta range (10 to 15 Hz). After SCS animals showed an increased amount of locomotion, on average 26 times higher than the pre-stimulation period, and also an increase in fast movements (which the authors establish as a parallel to improvement in bradykinesia). The strongest effect was achieved with a 300-Hz stimulation. In addition, spectral changes in oscillations shifted to higher frequencies during SCS, and lasting on average 50 s after its end²⁶.

DAT-KO mice, presenting only 5% of the striatal dopaminergic neurons, were considered a complete akinetic model. These mice were tested regarding the threshold levels of L-dopa necessary to restore movement. After SCS the average reduction obtained was 80%. Bilateral 6-OHDA lesioned rats, the chronic PD model, showed significant total locomotion and fast movements improvement after SCS²⁶.

2.2. Human studies and conflicting results

Following 2009 study, Thevathasan et al.³⁵ in 2010 attempted SCS as a therapeutic approach in 2 PD patients, diagnosed according to the UK Brain Bank criteria³⁶. To assess improvement in motor behavior, researchers used the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) applied by 2 independent and blinded neurologists. Patient 1, 75 years old, had a motor impairment classified as moderate (off/on medication motor UPDRS = 30/18), while patient 2 classified as severe (off/on medication 51/38). Both had spinal stimulators (Medtronic models 3487a and 3898) implanted into the high cervical epidural space.

Optimal stimulation frequencies were sought between 30 and 300 Hz and with intensities varying up to 4.0 V / 240 μ s. But no clear optimal parameters could be established. Thus, patient 1 was assigned 130 Hz and patient 2 300 Hz. Next, intensity paresthesia thresholds were determined. Both patients underwent 3 experimental conditions: off stimulation, subthreshold stimulation (no paresthesia), and suprathreshold (with paresthesia)³⁵.

Opposite to what would be expected from the previous rodents study, no significant improvements in UPDRS were obtained in any of the experimental conditions. Secondary outcomes considered in the study (Hand-Arm Movement test, timed foot tapping score and time to walk 10 m test) also failed to show any significant improvements³⁵.

In a subsequent paper, Fuentes et al.³⁷ elaborated on the possible explanations for these different findings, focusing on two main issues: electrode geometry and spinal cord level of stimulation. According to their argument, the animal study had a electrode/spinal cord contact area from 4 to 7 times higher. Regarding the spinal level of the implant, the animal study used high thoracic level while the human used high cervical levels. Fuentes et al.³⁷ suggest that despite the apparent recruitment of more neurons, proportionally high cervical level allows a lower recruitment of sensory fibers from the lower limbs and thus explaining the lack of impact in gait and postural control.

By 2014 seven new published studies had brought a new perspective on the feasibility of SCS as a PD therapy in humans.

Fénelon et al.³⁸ reported the case of a 74 years old man, which had developed a tremor-dominant type of PD predominating on the right side by the age of 69 years old. Imaging through [(123)I]FP-CIT SPECT showed asymmetric striatal loss of binding consistent with PD. Using L-dopa, 1200 mg/day, obtained partial control of tremor. The patient had been under treatment for 13 years with an T9-T10 implanted SCS device (Symmix quadripolar electrode and Itrel-3 pulse generator, Medtronic, Inc., Minneapolis, USA) due to a neuropathic pain in lower limbs.

Researchers then designed four sessions (2 to 5 weeks apart) of SCS, with overnight L-dopa withdrawal, to test the effects on motor symptoms. Using 130 Hz, 410 ms pulse width, 3.5 V, during the sessions and 100 - 130 Hz in between sessions. The outcomes were assessed through UPDRS-III, time to walk 7 m - turn - walk back, and pain level in lower limbs by the visual analogue scale (VAS) 0 - 10. Two blinded neurologists rated the scores³⁸.

Both motor score and most UPDRS subscores were reduced 50% with SCS, reaching the same levels of on-drug / off-SCS condition. Effects being bilateral and symmetric both in upper and lower limbs. Noteworthy is the fact that on - SCS / on - L-dopa revealed only a slight and not significant improvement when compared to these therapies isolated. Also SCS in this study showed no gait benefit. In session 3 surface electromyography was used concomitantly to assess specificities of SCS effects, and although tremor amplitude was markedly decreased, no change in its frequency or pattern could be observed³⁸.

Meanwhile Agari and Date³⁹ were able to enroll in their study 15 PD patients (5 men, 10 women), aged between 63 to 79 years (mean 71.1 years) and with disease duration ranging between 7 and 31 years (mean 17.2 years). One main focus of this study was the control of pain that PD patients often experience, specially low back and

leg pain^{40,41}. Thus enrolled patients had low back and lower limb pain refractory to medication, rehabilitation and neural block.

Epidural space parallel dual leads (4 or 8 electrodes) were inserted percutaneously, under local anesthesia, and implanted at the location where the test stimulations were able to cover 80% of the pain region (between T7-T12 for most patients). SCS frequency ranged between 5-20 Hz, amplitude 0-4 V and pulse width within 210-330 ms. SCS effects were assessed through a 0-10 VAS (pain evaluation), UPDRS both for motor functions and activities of daily living (ADL), Timed Up and Go (TUG) tests and time to walk 10 m test. Importantly that all patients were approximately at an 80% drug-on state when evaluated. All evaluations were made prior to surgery, 3 months later, 6 months and 12 months later³⁹.

After SCS, all patients had a significant decrease of pain where mean VAS score shifted from 8.9 to 2.0. Pain relief kept low even 12 months after surgery, with a mean VAS score of 2.3. SCS effects on UPDRS motor subscore revealed significant improvement in posture, postural stability, body bradykinesia and gait in the first 3 months after surgery. But at 12 months this improvement decreased. Gait specific scores also followed the same behavior, with a 3 months increase and 12 months return to prior surgery values. ADL total scores in UPDRS revealed an improvement after surgery, specially the subscores turning in bed and adjusting bed clothes and sensory complaints related to parkinsonism³⁹.

Other studies include Weise et al.⁴², Hassan et al.⁴³, Mitsuyama et al.⁴⁴, Soltani & Lalkhen⁴⁵ and Landi et al⁴⁶. In Weise et al. clinical report SCS failed to show improvements other than pain reduction. But from an overall view, despite some conflicting results, they show benefits from SCS regarding PD associated pain symptoms, improvements in UPDRS motor scores, postural control, gait tests, and resting tremor. For a more detailed review of these studies see de Andrade et al⁴⁷.

2.3. Revisiting animal models

Three important new studies in animal models investigating the effects of SCS in PD were published between 2014 and 2016.

Santana et al.⁴⁸, investigated the underlying mechanisms involved in the cortico-basal ganglia-thalamic loop in a monkey model PD model, and how SCS affected this system. The study used 5 adult male common marmosets (*Callithrix jacchus*), lesioned with 6-OHDA by injection in the medial forebrain bundle either in one or both hemispheres. Through postmortem immunohistochemical analysis, the authors observed a decrease in midbrain dopaminergic neurons of 42% (\pm 23%) and a decrease of 44% (\pm 10%) in axonal terminal staining density in the caudate-putamen. Additionally, the authors proposed an adapted method for assessing the severity of parkinson through clinical signs/deficits. These animals, on average, had a decreased spontaneous locomotion to one-fourth of prelesion activity, and signs assessed approached the maximum score. Before SCS, animals underwent acute pharmacological inhibition of dopamine synthesis with subcutaneous AMPT injections to maximize PD signs. The PD model developed by Santana et al. thus appears to be a reliable one, and noteworthy is the importance of the model when considered the common marmoset phylogenetic relationship with humans.

Animals were stereotactically implanted with brain recording electrodes in M1, S1, putamen, GPi, external GP (GPe), Ventroposterolateral nucleus (VPL) and STN. SCS electrodes, composed of two-plate platinum (each 1x33mm with 0.5 mm spacing), were implanted 2 weeks after the recording electrodes at T3-T4 level. Stimulation parameters were: pulse width of 200 or 400 μ s separated by 100 μ s, frequency ranging in between 4-300 Hz, and intensities thresholds varied between 100-1600 μ A⁴⁸.

All stimulation frequencies in this study revealed similar efficacy. SCS induced alleviation of motor impairments, caused a 221% increase in general motility of trunk,

head, limbs and tail. Increased in 192% spontaneous locomotion bouts frequency and 144% the duration of locomotion periods. The total distance covered also showed a significant 243% increase. Specific motor deficits that revealed the highest reduction were freezing (31%), hypokinesia (23%), posture (23%) and bradykinesia (21%). Faster movements benefited the most from SCS, replicating the results of Fuentes et al.²⁶ with rodents, and being interpreted by both authors as a reduction of bradykinesia⁴⁸.

Electrophysiological data yielded a shift in the local field potential (LFP). Where prior to SCS all PD monkeys showed a strong activity in the beta band (8-20 Hz), after stimulation this band activity decreased significantly, in most parts of the cortico-basal ganglia-thalamic loop (except for the GPe). This suppression could be obtained independent of the frequency of SCS. Firing rate pattern of neurons in the loop couldn't explain the improvements obtained, corroborating with prior studies^{26,37} that hypothesized the disruption of synchronized oscillatory activity is the main underlying mechanism. Accordingly, different regions of the loop showed a strong coherence exclusively in the beta band. To further analyse this hypothesis the authors studied the neurodynamics of the loop when under SCS and under L-dopa treatment, and found a pivotal role of the disruption of the system beta-band synchrony. Through single or pairs of SCS pulses the recordings showed an early activation of primary somatosensory pathways (VPL and S1), being the possible regions responsible for the phase-reset mechanism that causes desynchronization in the beta band⁴⁸.

A 2014 study by Shinko et al.⁴⁹, building upon prior findings of the neuroprotective effects of SCS⁵⁰⁻⁵⁵, investigated how PD models would behave under SCS neuroprotection perspective. For this study the authors used a total of 80 adult female Sprague-Dawley rats, divided in two experimental designs. The first aimed to evaluate the neuroprotective effects of high cervical SCS, and thus rats were assigned to four groups (n = 10, each), control, 2 Hz, 50 Hz and 200 Hz. The second aimed at

evaluating the relationship between SCS and secretion of neurotrophic and growth factors, assigning animals in two groups (n = 20, each), control and 50 Hz⁴⁹.

All rats had a silver ball electrode with a 2 mm diameter implanted in the epidural space over the dorsal column, at C1-C2 vertebrae level. Rats in SCS groups received a daily, 1 hour-long stimulation, for 16 days. Those in the control group received no electrical stimulation. 6-OHDA was inject in the right striatum in the second day after starting SCS. Stimulating frequencies were used assigned by groups and intensities followed individual adjustment according to the 80% motor threshold intensity. For this study two behavioral tests for the PD symptoms were use, the cylinder test and amphetamine-induced rotation⁴⁹.

In the behavioral tests, animals under SCS at 2 and 50 Hz showed a slightly, but not significant, improvement in the cylinder test. Amphetamine-induced rotation test revealed a better performance comparing to control for all SCS groups, but only the 50 Hz had a significant difference. Immunohistochemical investigations demonstrated a significant preservation of tyrosine hydroxylase (TH) positive fibers in the striatum for all the SCS groups in comparison to control, and those in the 50 Hz group displayed also a preservation of neurons in the Substantia Nigra pars compacta (SNc). Analysis regarding neurotrophic and growth factors revealed that vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were increased in the SCS 50 Hz group when compared to control, but no other significant differences could be observed⁴⁹.

Brys et al.⁵⁶ published in 2016 a study where the effects of SCS on a progressive PD model were assessed, rather than the majority of studies available so far that used acute models (e.g. 6-OHDA). To achieve this, the authors injected adeno-associated virus (AAV) vectors encoding human alpha-synuclein in the substantia nigra. Alpha-synuclein is a presynaptic protein and a major component of Lewy bodies, highly associated with the physiopathology of PD. This injection leads to a progressive

neuronal degeneration of the nigrostriatal pathway and culminates in motor symptoms, following a progressive and advantageous for preclinical settings⁵⁶.

Thirty adult males Sprague-Dawley rats were used, distributed in four groups: control (n = 8), control + SCS (n = 4), synuclein (n=9) and synuclein + SCS (n = 7). Vectors carrying the alpha-synuclein gene were inject in the right substantia nigra for the synuclein groups and empty viral vector were injected in the same location for the control groups. Behavioral tests performed were the Open-field (rectangular arena) test and Cylinder test. Custom-made SCS electrodes were inserted in the epidural space at the T2 vertebra level, at the second and third weeks after vectors injections. SCS groups underwent stimulation sessions in the open-field arena for 30 minutes once a week, with a frequency of 300 Hz. Current was delivered as biphasic squared pulses with 400 μ s duration. Intensities were determined before each session individually, starting at 25 μ A and increasing until head and/or vibrissae movements were consistently observed⁵⁶.

As expected, an augmented expression of alpha-synuclein was found in the striatum and midbrain (substantia nigra and ventral tegmental area). TH immunoreactivity revealed dopaminergic denervation in the striatum and loss of dopaminergic neurons in the injected substantia nigra. Parameters necessary for an accurate model of PD. Authors found a difference, although not significant, between stimulated and non-stimulated groups in striatal denervation extension. Which could point towards a neuroprotective effect, as seen by Shinko et al.⁴⁹. Assessment of total locomotor activity in the open-field test over 10 weeks demonstrated no significant difference between time or groups. Nevertheless, synuclein rats had a significant decrease in contralateral forepaw use in the cylinder test. Rats undergoing SCS, however, showed a significant interaction between time and groups, revealing a decrease in motor asymmetry⁵⁶.

Based on the fact that stimulation in the study occurred weekly, the authors suggest that, together with the immediate effects of the disruption of beta band synchronic oscillations, SCS can exert long-term positive effects in motor activity through increased levels of growth factors and their resulting neuroprotection⁵⁶, as proposed by Shinko et al⁴⁹.

2.4. Returning to Clinical Trials

In the latest study with humans, Souza et al.⁵⁷ assessed the effects of SCS in patients that had previously undergone DBS treatment. Inclusion criteria were: diagnosis of advanced idiopathic PD, significant postural instability and gait disturbance despite optimized treatment with medications and bilateral STN DBS. Patients who had a history of psychiatric and/or cognitive dysfunctions were excluded. Four patients were enrolled in this study, 3 males and 1 female, ages ranging from 56 to 69 years old.

Continuously delivery of SCS was obtained through the implantation of paddle electrodes with 3 columns of contacts (5-6-5 Model 39565, Medtronic Inc., Dublin, Ireland) in the epidural space of the upper thoracic spine (T2-T4 level). The pulse generator (Model 37714, Medtronic Inc.) was capable of adjusting automatically the current amplitude depending on patient's' current position (upright or supine). For this investigation, frequency used was 300 Hz, and a pulse width of 90 μ s. Anodes and cathodes settings were, respectively, outer and inner contacts. Stimulation amplitude was 105% of the threshold for paresthesia (4.6 \pm 1.9 V, upright and 2.0 \pm 0.5 V, supine position). The first set of measurements were recorded prior to surgery, 1, 3 and 6 months after SCS. Both on and off medication conditions were evaluated (1 week apart), the off condition being achieved by a discontinuance of at least 12 hours. This first set consisted of: TUG, timed up and go test with dual task (TUG-DT), 20 m walking

test, 20 m walking test with obstacles and stride length. The second set of measurements were performed at baseline (prior to surgery) and 6 months after SCS, consisting of: Parkinson Disease Questionnaire 39 (PDQ-39), UPDRS-III, Berg balance scale and Freezing of Gait Questionnaire⁵⁷.

Improvements could be observed in all four patients regarding gait measures when receiving SCS in the on DBS / off medications condition. Likewise, at 6 months, TUG and TUG-DT scores when compared to baseline improved 63.2% and 54.0%, respectively. The 20 m walking test time and number of steps decreased significantly by 58% and 65.7% , respectively. Stride length also showed an increase of 170%. The same trend could also be observed in the 20 m walking test with obstacles, where time / number of steps decreased 63.3% and 70.1%, respectively. PDQ-39, used as a quality of life parameter, ameliorated by 44.7% after 6 months of SCS. UPDRS-III scores, compared to baseline, in the condition on DBS/ off medications showed an improvement after SCS at 1, 3 and 6 months of 36.8%, 48.7% and 38.3%, respectively. The same score at 6 months, when in the on DBS/ on medications/ on SCS condition, was 50% lower. Berg balance scale, which measures static balance and the risk of falls, improved 8% after SCS, as did the Freezing Gait Questionnaire, which improved by 56.4% at 6 months. Another interesting result, culminating from a subsection of experiments performed by the authors, show that these improvements couldn't be replicated when using 60 Hz stimulation⁵⁷.

3. DISCUSSION

SCS as a therapeutic approach for PD has developed in a steady and fast pace, as shown by the time lapse between the first study in rodents by Fuentes et al.²⁶ in 2009 and the many subsequent studies in humans (n=8) by 2014⁴⁷. Certainly a decisive factor for this swift advancement was the well established position of SCS for chronic pain,

going back to the sixties¹⁴, which is a condition that affects many PD patients and where Agari and Date³⁹ showed an important role for the therapy. Despite the fact that the majority of these studies consisted only of clinical cases or few patients enrolled, they constantly showed benefit from SCS regarding motor scores, gait, bradykinesia, postural stability and quality of life. Both Thevathasan et al³⁵ and Weise et al⁴² studies showed no benefit from SCS in PD investigated parameters. However, the consequent questions raised further improved the search for explanations of the underlying mechanisms. Thevathasan et al.³⁵ proposed that Fuentes et al.²⁶ results could be explained by a paradoxical kinesis effect, where an intense arousal evoked by high-frequency stimulation of sensory ascending fibers would result in a “startle reflex” in those rodents. In a review study, Fuentes et al.³⁷ elaborated on possible causes of the difference in results, as discussed above in **2.2**, and proposed the “permissive state” mechanism, where SCS acts unlocking the corticobasal ganglia circuit from its synchronous activity, allowing the initiation of volitional movement. Hypothesis further corroborated by Santana et al.⁴⁸ findings. Nevertheless, many of the minor conflicting results between the human studies could be explained as a result of small samples, and in a sense promoted a pursuit in animal models of a more satisfactory understanding of SCS role in PD.

Santana et al.⁴⁸ study yielded strong evidences for the “permissive state” proposal, where beta band synchronous oscillatory behavior of the corticobasal ganglia circuit can be disrupted via VPL/S1 phase-reset mechanism. In addition, as shown by Shinko et al.⁴⁹ and Brys et al.⁵⁶ studies, SCS seems to exert a neuroprotective effect in PD.

4. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The pursuit of SCS as a therapeutic approach to PD has already revealed underlying mechanisms that were unknown to the scientific community until recently. But most importantly are the potential benefits that patients refractory to other forms of treatment can obtain from a well established and less invasive procedure, that yields promising results in several aspects of PD. Especially regarding irresponsible symptoms such as bradykinesia, rigidity and balance. Yet many questions remain unanswered and need to be addressed. . How to choose adequately patients who will benefit from SCS? Which stimulation parameters should be used? Where are the ideal electrodes implantation sites? What is most efficient geometry of electrodes? The effects are consistent in a longer period, where no data is yet available? Future studies, with more enrolled patients and targeting the many presented questions are necessary before SCS becomes a daily reality in clinical practice.

1. Teive, H. A. G. *et al.* As contribuições de Charcot e de Marsden para o desenvolvimento dos distúrbios do movimento nos séculos XIX e XX. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 633–636 (2001).
2. Braak, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211 (2003).
3. Hawkes, C. H., Del Tredici, K. & Braak, H. A timeline for Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 16, 79–84 (2010).
4. Singh, N., Pillay, V. & Choonara, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 29–44 (2007).
5. Iversen, S. D. & Iversen, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188–193 (2007).
6. Olanow, C. W., Stern, M. B. & Sethi, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 72, (2009).
- 7 . Meyers, R. The modification of alternating tremor, rigidity and festination by surgery of the basal ganglia. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 21, 602-665 (1942).

8. Spiegel, E.A., Wycis, H.T., Marks, M., Lee, A.J. Stereotaxic Apparatus for Operations on the Human Brain. *Appl Neurophysiol.* 37, 313-315 (1975).
9. Hassler, R. & Riechert, T. Indications and localization of stereotactic brain operations. *Nervenarzt.* 20, 441-447 (1954)
10. Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S. & Gellene, R. Modification of Parkinsonism - Chronic Treatment with L-Dopa. *N. Engl. J. Med.* 280, 337-345 (1969).
11. Hassler, R. Die zentralen Systeme des Schmerzes. *Acta Neurochir.* 8, 353-423 (1960).
12. Benabid, A.L. et al. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson's disease. *Appl Neurophysiol.* 50, 344-346 (1987).
13. Benabid, A. L. et al. Chronic VIM thalamic stimulation in Parkinson's disease, essential tremor and extra-pyramidal dyskinesias. *Acta Neurochir Suppl.* 58, 39-44 (1993).
- 14. Shealy, C.N., Mortimer, J.T. & Reswick, J. B. Electrical inhibition of pain by stimulation of the dorsal columns: preliminary clinical report. *Anesth. Analg.* 46, 489-491 (1967).**
"First report of spinal cord stimulation in the literature."
15. Aló, K. M., Redko, V. & Charnov, J. Four Year Follow-up of Dual Electrode Spinal Cord Stimulation for Chronic Pain. *Neuromodulation* 5, 79-88 (2002).
16. Mailis-Gagnon, A., Furlan, A.D., Sandoval J.A., Taylor R.S. Spinal cord stimulation for chronic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD003783 (2004).
17. North, R. B. et al. Spinal cord stimulation for axial low back pain: a prospective, controlled trial comparing dual with single percutaneous electrodes. *Spine (Phila. Pa. 1976).* 30, 1412-1418 (2005).
18. Taylor, R. S., Van Buyten, J.-P. & Buchser, E. Spinal cord stimulation for chronic back and leg pain and failed back surgery syndrome: a systematic review and analysis of prognostic factors. *Spine (Phila. Pa. 1976).* 30, 152-160 (2005).
19. Kumar, K. et al. Spinal cord stimulation versus conventional medical management for neuropathic pain: A multicentre randomised controlled trial in patients with failed back surgery syndrome. *Pain* 132, 179-188 (2007).
20. Buvanendran, A. & Lubenow, T. J. Efficacy of transverse tripolar spinal cord stimulator for the relief of chronic low back pain from failed back surgery. *Pain Physician* 11, 333-8 (2008).

21. Grothusen, J. R., Canlas, B. R., Yap, A. N. B., Fernando, B. Y. & Paiso, H. M. S. Spinal cord stimulation for control of low back pain after multiple corrective surgeries for severe scoliosis: Report of a case. *Pain Pract.* 9, 404–405 (2009).
22. Rigoard, P. *et al.* Back pain: A real target for spinal cord stimulation? *Neurosurgery* 70, 574–585 (2011).
23. Verrills, P., Sinclair, C. & Barnard, A. A review of spinal cord stimulation systems for chronic pain. *J. Pain Res.* 9, 481–492 (2016).
24. Melzack, R & Wall, P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150, 971-979 (1965).
25. Meyerson, B. A. & Linderoth, B. Mode of Action of Spinal Cord Stimulation in Neuropathic Pain. *J. Pain Symptom Manage.* 31, 6–12 (2006).
- 26. Fuentes, R., Petersson, P., Siesser, W. B., Caron, M. G. & Nicolelis, M. A. Spinal cord stimulation restores locomotion in animal models of Parkinson's disease. *Science* (80-.). 323, 1578–1582 (2009).**
“First well designed study demonstrating motor improvement in a Parkinson Disease model with Spinal Cord Stimulation”
27. Fanselow, E. E., Reid, a P. & Nicolelis, M. a. Reduction of pentylenetetrazole-induced seizure activity in awake rats by seizure-triggered trigeminal nerve stimulation. *J. Neurosci.* 20, 8160–8168 (2000).
28. George, M. S. *et al.* Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy. *Biol. Psychiatry* 47, 287–95 (2000).
29. Brown, P. *et al.* Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 1033–1038 (2001).
30. DeGiorgio, C. M., Shewmon, A., Murray, D. & Whitehurst, T. Pilot study of Trigeminal Nerve Stimulation (TNS) for epilepsy: A proof-of-concept trial. *Epilepsia* 47, 1213–1215 (2006).
31. Costa, R. M. *et al.* Rapid Alterations in Corticostriatal Ensemble Coordination during Acute Dopamine-Dependent Motor Dysfunction. *Neuron* 52, 359–369 (2006).
32. Hammond, C., Bergman, H. & Brown, P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 30, 357–364 (2007).
33. Krishna, V., Sammartino, F., King, N. K. K., So, R. Q. Y. & Wennberg, R. Neuromodulation for Epilepsy. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 27, 123–131 (2016).
34. Klinger, N. V. & Mittal, S. Clinical efficacy of deep brain stimulation for the treatment of medically refractory epilepsy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 140, 11–25 (2016).

35. Thevathasan, W. et al. Spinal cord stimulation failed to relieve akinesia or restore locomotion in Parkinson disease. *Neurology*. 74, 1325–1328 (2010).
36. Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L. & Lees, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease : a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55, 181–184 (1992).
37. Fuentes, R., Petersson, P. & Nicolelis, M. A. L. Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: Mechanistic approach. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1100–1108 (2010).
38. Fénelon, G. et al. Spinal cord stimulation for chronic pain improved motor function in a patient with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 213–214 (2012).
39. Agari, T. & Date, I. Spinal Cord Stimulation for the Treatment of Abnormal Posture and Gait Disorder in Patients With Parkinson's Disease. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 52, 470–474 (2012).
40. Broetz, D., Eichner, M., Gasser, T., Weller, M. & Steinbach, J. P. Radicular and nonradicular back pain in Parkinson's disease: A controlled study. *Mov. Disord.* 22, 853–856 (2007).
41. Nègre-Pagès, L., Regragui, W., Bouhassira, D., Grandjean, H. & Rascol, O. Chronic pain in Parkinson's disease: The cross-sectional French DoPaMiP survey. *Mov. Disord.* 23, 1361–1369 (2008).
42. Weise, D., Winkler, D., Meixensberger, J. & Classen, J. Effects of spinal cord stimulation in a patient with Parkinson's disease and chronic back pain. *J. Neurol.* 257, S217 (2010).
43. Hassan, S., Amer, S., Alwaki, A. & Elborno, A. A patient with Parkinson's disease benefits from spinal cord stimulation. *J. Clin. Neurosci.* 20, 1155–1156 (2013).
44. Mitsuyama, T., et al. Spinal cord stimulation for chronic lumbar pain in patients with Parkinson's disease. *Stereotac. Funct. Neurosur.* 19, 273-273 (2013).
45. Soltani, F., & Lalkhen, A. Improvement of parkinsonian symptoms with spinal cord stimulation: consequence or coincidence?. *J. of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 84, e2-e2 (2013).
46. Landi, A. et al. Spinal Cord Stimulation for the Treatment of Sensory Symptoms in Advanced Parkinson's Disease. *Neuromodulation Technol. Neural Interface* 16, 276–279 (2013).
47. de Andrade, E. M. et al. Spinal cord stimulation for Parkinson's disease: a systematic review. *Neurosurg. Rev.* 39, 27–35 (2016).
48. Santana, M. B. et al. Spinal cord stimulation alleviates motor deficits in a primate model of parkinson disease. *Neuron* 84, 716–722 (2014).
“Yielded strong evidence for the underlying mechanisms of the Spinal Cord Stimulation in Parkinson's Disease.”

49. Shinko, A. *et al.* Spinal cord stimulation exerts neuroprotective effects against experimental Parkinson's disease. *PLoS One* 9, 1–8 (2014).
50. Yadav, A.P. *et al.* Chronic spinal cord electrical stimulation protects against 6-hydroxydopamine lesions. *Scientific Reports* 4, 3839 (2014).
51. Visocchi, M., Di Rocco, F. & Meglio, M. Protective Effect of Spinal Cord Stimulation on experimental early cerebral vasospasm. *Stereotact Funct Neurosurg.* 76, 269–275 (2001).
52. Visocchi, M. *et al.* Spinal Cord Stimulation and early experimental cerebral spasm : the “functional monitoring” and the “preventing effect”. *Acta Neurochir.* 143, 177–185 (2001).
53. Patel, S., Huang, D-L. & Sagher, O. Evidence for a central pathway in the cerebrovascular effects of spinal cord stimulation. *Neurosurgery*. 55, 201–206 (2004).
54. Gurelik, M., Kayabas, M. & Karadag, O. Cervical spinal cord stimulation improves neurological dysfunction induced by cerebral vasospasm. *Neuroscience*. 134, 827-832 (2005).
55. Yang, X., Farber, J. P., Wu, M., Foreman, R. D. & Qin, C. Roles of dorsal column pathway and transient receptor potential vanilloid type 1 in augmentation of cerebral blood flow by upper cervical spinal cord stimulation in rats. *Neuroscience*. 152, 950–958 (2008).
- 56 . Brys, I., Bobela, W., Schneider, B. L., Aebischer, P. & Fuentes, R. Spinal cord stimulation improves forelimb use in an alpha-synuclein animal model of Parkinson's disease. *Int. J. Neurosci.* 7454, 1–9 (2016).
57. Souza, C. P. de *et al.* Spinal cord stimulation improves gait in Parkinson's disease patients previously treated with DBS. *Mov. Disord.* 0, 1–5 (2016).