Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2014

Efeitos comportamentais e neuronais agudos da exposição ao campo magnético contínuo em um modelo experimental de Huntington induzido pela lesão unilateral com ácido quinolínico em ratos Wistar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL
FMRP-USP**

Carolina Giorgetto

Dissertação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAROLINA GIORGETTO

Efeitos comportamentais e neuronais agudos da exposição
ao campo magnético contínuo em um modelo experimental
de Huntington induzido pela lesão unilateral com ácido
quinolínico em ratos Wistar.

Ribeirão Preto
2014

CAROLINA GIORGETTO

Efeitos comportamentais e neuronais agudos da exposição ao campo magnético contínuo em um modelo experimental de Huntington induzido pela lesão unilateral com ácido quinolínico em ratos Wistar.

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Fisioterapia

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo de Araujo

**Ribeirão Preto
2014**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Giorgetto, Carolina

Efeitos comportamentais e neuronais agudos da exposição ao campo magnético contínuo em um modelo experimental de Huntington induzido pela lesão unilateral com ácido quinolínico em ratos Wistar/ Carolina Giorgetto; orientador: João Eduardo de Araujo - Ribeirão Preto, 2014.

91 f.: il.20; 30 cm

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, 2014.

Área de Concentração: Fisioterapia.

Orientador: De Araujo, João Eduardo

1. Doença de Huntington; 2. Comportamento Motor; 3. Campo Magnético; 4. Morte Neuronal.

Nome: GIORGETTO, Carolina

Título: Efeitos comportamentais e neuronais agudos da exposição ao campo magnético contínuo em um modelo experimental de Huntington induzido pela lesão unilateral com ácido quinolínico em ratos Wistar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Fisioterapia.

Orientador: João Eduardo de Araujo

Aprovado em: 16/04/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – F.M.R.P/ USP

Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

Instituição: Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Prof. Dr. João Eduardo de Araujo

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – F.M.R.P/ USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, minha tia Sandra, meu noivo Gustavo, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao **Prof. Dr. João Eduardo de Araujo**, pela oportunidade, orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho. Obrigada por todo o aprendizado, por sua dedicação e busca de recursos para a manutenção do funcionamento do laboratório.

À **Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Mattiello- Sverzut** pela colaboração e permissão para a utilização de seu laboratório.

Ao amigo **Guilherme**, que com muita paciência e dedicação me passou seu conhecimento científico, contribuindo para a realização deste trabalho e para a formação da profissional que sou hoje.

À todos os colegas do Laboratório da Bioengenharia, em especial aos funcionários **Terezinha, Chico e Luiz** que sempre estavam prontos para ajudar.

Às amigas **Elaine, Ana Carolina, Sabrina, Karina, Sueni, Camila, Laís e Fernanda** pelo companheirismo e por sempre estarem dispostas a ajudar nos momentos de necessidade.

ABS - Álcool Absoluto

ANOVA - Análise de Variância

APO - Apomorfina

AQ - Ácido Quinolínico

AVE - Acidente Vascular Encefálico

BHE - Barreira Hematoencefálica.

CAG - Citosina-Adenosina-Guanina

CM - Campo Magnético

DA - Dopamina

DH - Doença de Huntington

DP - Doença de Parkinson

GABA - Ácido Gama- Aminobutírico

GC - Grupo Controle

GEPN - Grupo Estimulado Polo Norte

GEPS - Grupo Estimulado Polo Sul

GL - Grupo Lesão

GS - Grupo *Sham*

GSM - Grupo *Sham* Magnético

Htt - Proteína Huntintina

L-DOPA - L-3, 4-dihidroxifenilalanina

Mhtt - Proteína Huntintina Mutante

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, Forma Oxidativa

NMDA - N-metil-D-Asparato

PBS - Solução salina com tampão fosfato

PoliQ - Poliglutamina Anormal

SNC - Sistema Nervoso Central

SNC - Substância Negra Parte Compacta

SNr - Substância Negra Parte Reticulada

6- hidroxi dopamina (6-OHDA)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Em (A), imagem de um corte coronal de um cérebro normal e em (B) imagem de um corte coronal de um cérebro de uma pessoa com DH. Figura modificada de Ekman, 2008.....Pág. 27

Figura 2- Figura representativa de um corte coronal de um cérebro, com ênfase na identificação dos núcleos caudado, putâmen e estriado. Figura modificada de Dangelo e Fattinni, 2007.....Pág. 29

Figura 3- Esquema da representação das conexões funcionais dos núcleos da base durante o movimento normal. As setas vermelhas indicam que a conexão é excitatória. As setas pretas indicam que a conexão é inibitória. Figura modificada de Ekman, 2008.....Pág. 32

Figura. 4- Esquema da representação das alterações na atividade neural na DH. As setas vermelhas indicam conexão excitatória. Setas pretas indicam conexão inibitória. Setas largas representam atividade neural aumentada, e setas finas representam atividade neural diminuída. Figura modificada de Ekman, 2008.....Pág. 33

Figura. 5- Figura representativa da interação neural da APO em um modelo animal de DH. Note a menor ativação de neurônios nigroestriatais e o menor nível de dopamina, no lado do encéfalo animal lesado comparado ao lado íntegro, provocando o comportamento de giros ipsilaterais a lesão representado pela seta em curva para a esquerda. Figura modificada de Gutmann, 2010.....Pág. 39

Figura. 6- Animal posicionado no aparelho estereotáxico para procedimento cirúrgico (A) com o tecido subcutâneo removido e agulha posicionada nas referidas coordenadas (B). (C) Figura representativa do posicionamento da agulha para administração do AQ no núcleo estriado esquerdo em cada animal e da intensidade magnética aferida. Os pontos pretos representam as regiões onde as microinjeções ocorreram.....Pág. 48

Figura. 7- Animal com o escalpo removido e com magneto ancorado pelo parafuso fixado no crânio.....Pág. 49

Figura. 8- Imagem do GaussMeter utilizado para mensuração da intensidade magnética (A) e das dimensões dos magnetos utilizados na estimulação magnética dos animais. (B) diâmetro magneto (8mm) e (C) espessura do magneto (3mm). Figura modificada de BERTOLINO et al., 2013b .....Pág. 50

Figura. 9- Imagem do disco magnetizado utilizado nos grupos estimulados (seta preta) e do disco não magnetizado (seta branca) utilizado no GSM (BERTOLINO et al., 2013b) .....Pág. 50

Figura. 10- Monitor de atividades EP 149 – Insight, Ltda. utilizado para análise das respostas comportamentais espontâneas.....Pág. 52

Figura. 11- Aparelho Rota Rod EEF 411 – Insight, Ltda. utilizado para análise da resposta motora forçada.....Pág. 53

Figura. 12- Comparação da distância percorrida no monitor de atividades entre os grupos. As colunas representam a média em centímetros da distância percorrida pelos animais e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). *em relação a GC, GL e GEPN, # em relação a GC, GL e GEPN, + em relação a GS, GSM, GL, GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 60

Figura.13- Comparação do tempo de atividades no monitor de atividades entre os grupos. As colunas representam a média em segundos do tempo em que os animais se mantiveram ativos no monitor de atividades e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). * em relação GC e GEPN, # em relação a GC, GL e GEPN, + em relação a GS, GSM, GL e GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 61

Figura. 14- Comparação do comportamento relacionado aos cruzamentos entre os animais. As colunas representam a média da frequência de cruzamentos realizados pelos animais no monitor de atividades e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * em relação a GC e GEPN; # em relação a GC, GL e GEPN; + em relação a GS, GSM, GL e GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 62

Figura. 15- Comparação do comportamento relacionado aos giros anti-horários (ipsilaterais à lesão) entre os grupos. As colunas representam a média da frequência de giros ipsilaterais à lesão realizados pelos animais no monitor de atividades e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * em relação a GC, GS e GSM; # em relação a GL; + em relação a GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 63

Figura. 16- Figura representativa do deslocamento do animal durante o teste de comportamento motor, estimulado por APO (2,5mg/Kg), no monitor de atividades. Ao se deslocar, os sensores eram disparados e o movimento era registrado pelo computador. GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 64

Figura. 17- Comparação dos tempos de permanência no Rota Rod entre os animais. As colunas representam a média dos tempos de permanência em segundos no Rota Rod e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * $p < 0.05$ em relação a GC, GS, GSM, GEPS e GEPN. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 65

Figura. 18- Comparação do número de neurônios no núcleo estriado esquerdo entre os grupos. As colunas a presentam a média do número de neurônios em cada grupo e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * em relação

a GC, GS, GSM, GEPS e GEPN. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.....Pág. 66

Figura. 19- Fotomicrografias, aleatoriamente selecionadas, de cortes coronais do núcleo estriado esquerdo de animais representativos dos grupos (A) grupo “sham”, (B) grupo “sham” magnético, (C) grupo lesão, (D) grupo estimulado polo sul e (E) grupo estimulado polo norte. Na coluna da esquerda, fotomicrografias com aumento de 20x e na coluna da direita, fotomicrografias com aumento de 40x. A seta preta sinaliza o neurônio. A barra de escala em (E) representa 25µm.....Pág. 67

Figura. 20- Correlação do número de neurônios no núcleo estriado esquerdo da atividade motora espontânea, no monitor de atividades, e da atividade motora forçada, no Rota Rod.....Pág. 69

SUMÁRIO

I- RESUMO	18
II- ABSTRACT	21
III- INTRODUÇÃO	24
1. Doença de Huntington	25
2. Núcleo Estriado	29
3. Principais Modelos Experimentais da Doença de Huntington em Roedores	34
3.1. Ácido Quinolínico	35
4. Principais Modelos de Comportamento Estereotipado Em Roedores	36
4.1. Apomorfina	37
5. Campo Magnético	39
5.1. Interação dos Campos Magnéticos com o Sistema Nervoso	40
IV- OBJETIVO	42
1. Objetivo Geral	43
2. Objetivos Específicos	43
V- MATERIAIS E MÉTODOS	44

1. Animais	45
2. Procedimento Cirúrgico	46
3. Estimulação Magnética	49
4. Testes de Comportamento Motor	51
4.1. Monitor de Atividades	51
4.2. Rota Rod	52
5. Delineamento Experimental	55
6. Análise do Comportamento Motor	56
7. Análise Histológica	56
7.1 Coloração Nissl	56
7.2 Microscopia	57
8. Análise dos Resultados	57
VI- RESULTADOS	58
1. Resultados do Comportamento Motor	59
2. Resultados Histológicos	66
3. Análise de Correlação	68
IIV- DISCUSSÃO	70
VIII- CONCLUSÃO	77
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

GIORGETTO, C., DE ARAUJO, J. E. **Efeitos comportamentais e neuronais agudos da exposição ao campo magnético contínuo em um modelo experimental de Huntington induzido pela lesão unilateral com ácido quinolínico em ratos Wistar**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos comportamentais e morfológicos da exposição ao campo magnético contínuo em um modelo experimental de doença de Huntington. Foram utilizados 68 ratos Wistar, machos, divididos em 6 grupos: GC (controle, n=12), GS (“sham”, n=12), GSM (“sham” magnético, n=8), GL (lesão, n=12), GEPS (polo sul, n=12) e GEPN (polo norte, n=12). Os animais passaram por habituação ao Rota Rod durante 3 dias pré-cirúrgicos e por habituação ao monitor de atividade 24 horas antes da cirurgia. Após procedimentos cirúrgicos adequados, os GL, GEPS e GEPN receberam administração de ácido quinolínico (120nmol/2µL) no núcleo estriado esquerdo. Os GS e GSM receberam administração de 2µL de salina na mesma região. Ainda, nos GEPS e GEPN foi implantado no crânio de cada animal um magneto circular de neodímio (8x3mm) com potência de 3200 Gauss e no GSM foi realizado implante do mesmo material, sem estar magnetizado. No 7º dia pós-cirúrgico, os animais foram avaliados em relação à atividade motora espontânea no monitor de atividades, após 5 minutos da injeção subcutânea de apomorfina (2,5 mg/Kg), sendo que os animais do GC não receberam esta injeção, e atividade motora forçada no Rota Rod. Posteriormente aos experimentos os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados para histologia. Os resultados da avaliação comportamental espontânea evidenciaram, para o comportamento de distância percorrida, um aumento significativo do GEPS em relação aos GC, GL e GEPN, e também do GSM e GS em relação ao GC, GL e GEPN. Observamos também uma diminuição significativa do GEPN em relação aos GS, GSM, GL e GEPS [$F_{(5,62)} = 3,19$; $p < 0,05$]. Para o tempo de atividade, um aumento significativo do GEPS em relação aos GC e GEPN, e também do GSM e GS em relação ao GC, GL e GEPN. Observamos também uma diminuição significativa do GEPN em relação aos GS, GSM, GL e GEPS [$F_{(5,62)} = 5,46$; $p < 0,05$]. Para o comportamento de cruzamentos, um aumento significativo do GEPS em relação aos GC e GEPN e também do GSM e GS em relação ao GC, GL e GEPN. Observamos também uma diminuição significativa do GEPN em relação aos GS, GSM, GL, e GEPS [$F_{(5,62)} = 3,31$; $p < 0,05$]. E para o comportamento de giros anti-horários (ipsilaterais a lesão) um aumento significativo

dos GL, GEPS e GEPN em relação aos GC, GS e GSM. Observamos também uma diminuição significativa dos GEPN e GEPS em relação ao GL e ainda uma diminuição do GEPN em relação ao GEPS [$F_{(5,62)} = 16,01$; $p < 0,05$]. Os resultados referentes ao Rota Rod (atividade motora forçada) revelaram diminuição significativa do tempo de permanência no aparato do GL em relação aos demais GC, GS, GSM, GEPS e GEPN [$F_{(5,62)} = 5,46$; $p < 0,05$]. A análise histológica revelou uma perda significativa de neurônios no núcleo estriado esquerdo do GL em relação aos demais GC, GS, GSM, GEPS e GEPN [$F_{(5,66)} = 5,13$; $p < 0,05$]. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a estimulação magnética exerce efeito neuroprotetor, com reversão das alterações comportamentais e morfológicas promovidas pelo ácido quinolínico.

Palavras – Chave: Doença de Huntington. Comportamento Motor. Campo Magnético. Morte Neuronal

GIORGETTO, C., DE ARAUJO, J. E. **Neural and behavioral effects of exposure to the static magnetic field in a model of Huntington's disease induced by unilateral lesion with quinolinic acid in Wistar rats.** 2014. 91 f. Dissertation (Master in Sciences) - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.

The aim of this study was to analyze the behavioral and morphologic effects of the static magnetic field exposition in an animal model of Huntington's disease. Sixty- eight male Wistar rats were used, placed in 6 groups: GC (control group, n=12), GS (sham group, n=12), GSM (sham magnetic group, n=8), GL (lesion group, n=12), GEPS (south pole stimulated group, n=12) and GEPN (north pole stimulated group, n=12). The animals passed through habituation to Rota Rod, during the 3 days pre-surgical, and to habituation to the activity monitor, 24 hours before surgery. After appropriate surgical procedures GL, GEPS and GEPN received administration of quinolinic acid (120nmol/ 2 μ L) in the left striatum. The GS and GSM received administration of 2 μ L of saline in the same region. Also, in GEPS and GEPN was implanted, on the skull of each animal, a circular neodymium magnet (8x3mm) with a power of 3200 gauss, the GSM was performed the implant of the same material, without being magnetized. On the seventh after surgery day, the animals were evaluated referring to spontaneous motor activity in the activity monitor, 5 minutes after subcutaneous injection of apomorphine (2.5 mg / kg), whereas the animals of the CG did not receive this injection, and forced motor activity in Rota Rod. Subsequently the experiments the animals were perfused and their brains removed for histology. The results showed to spontaneous behavioral assessment, related to the behavior of distance travelled, significant increase in GEPS compared to GC, GL e GEPN, and also in GSM and GS compared to GC, GL, and GEPN, and a decrease in GEPN compared to GC, GS, GSM, GL e GEPS [$F_{(5,62)} = 3.19$, $p < 0.05$]; for time of activity, a significant increase in GEPS compared to GC and GEPN, and also in GSM and GS compared to GC, GL and GEPN, and a decrease in GEPN compared to GS, GSM, GL e GEPS [$F_{(5,62)} = 5.46$, $p < 0.05$]; for the behavior of crossings, a significant increase in GEPS compared to GC and GEPN, and also in GSM and GS compared to GC, GL and GEPN, and a decrease in GEPN compared to GS, GSM, GL, e GEPS [$F_{(5,62)} = 3.31$, $p < 0.05$]; and to the behavior of anti – hourly rotations, significant increase in GL, GEPS and GEPN compared to GC, GS, GSM, significant decrease in GEPN and GEPS compared to GL and also a decrease in GEPN compared to GEPS [$F_{(5,62)} = 16.01$, $p < 0.05$]. The results for the Rota Rod indicated a significant decrease in the permanency time on apparatus to

GL compared to GC, GS, GSM, GEPS and GEPN [$F_{(5, 62)} = 5.46, p < 0.05$]. The histological analysis revealed a significant reduction in the number of neurons in the animals of GL compared to the others groups [$F_{(5, 66)} = 5, 13, p < 0.05$]. Therefore, the results suggest that magnetic stimulation exerts neuroprotective effect, with reversal of behavioral and morphological changes caused by quinolinic acid.

Keywords: Huntington's disease. Motor Behavior. Magnetic Field. Neuronal Death.

1. DOENÇA DE HUNTINGTON

Diversas condições patológicas dentro do sistema nervoso central (SNC) são frequentemente associadas à perda significativa de células neuronais. Apesar da diversidade morfológica relacionada à morte celular na neurodegeneração, a maioria dos autores apontam dois tipos: a apoptose e a necrose (PRZEDBORSKI; VILA; JACKSON-LEWIS, 2003).

Desordens agudas acontecem de minutos a horas, como o acidente vascular encefálico (AVE). Porém, desordens crônicas, como a doença de Parkinson (DP) e a doença de Huntington (DH), se desenvolvem durante anos ou décadas e produzem degeneração neuronal relativamente lenta (GORMAN et al., 1996). A DH é uma desordem neurodegenerativa autossômica, dominante, progressiva e de caráter hereditário (LEE et al., 2012), que afeta homens e mulheres igualmente e, embora se apresente em indivíduos de várias origens, parece acometer mais frequentemente os indivíduos brancos (CARDOSO et al., 2006; SPITZ, 2010). Quanto a prevalência, nos Estados Unidos da América, cerca de 5 a 10 pessoas são afetadas para cada 100.000 indivíduos. No Brasil, no entanto, ainda não existem números exatos de pessoas com DH, há porém uma estimativa de que aproximadamente 1000 famílias são acometidas por esta doença em todo o país, em adição, em Feira Grande, uma pequena cidade de Alagoas no nordeste do Brasil, a prevalência da DH é em cerca de 1 para cada 1000 nascimentos (ALENCAR et al., 2010).

É sabido que a DH é causada por uma mutação no cromossomo 4, na região do gene IT15/HD1 (DHAENENS et al., 2009), que consiste na expansão da repetição dos trinucleotídeos citosina - adenosina - guanina (CAG), o que leva a codificação de uma poliglutamina anormal ou tóxica (polyQ) na proteína huntintina (Htt) (LEE et al.,

2012; NOPOULOS, 2012; DHAENENS et al., 2009). A Htt promove o funcionamento das vesículas sinápticas, da exocitose e da endocitose, contudo, em sua forma mutante (Mhtt), passa a alterar um importante número de proteínas pré e pós-sinápticas, bem como o controle estrutural e funcional de sinapses e a sinalização celular, resultando em alterações críticas da função neuronal (GHIGLIERI et al., 2012). Além disso, a Mhtt se mostra mais resistente à degradação proteica, levando à formação de agregados citoplasmáticos que causam degeneração axonal (SHANNON, 2004; SPITZ, 2010).

Devido às alterações neuronais provocadas pela proteína mutante, o início da DH vem acompanhado por degeneração estrutural que se estende por todo o encéfalo. A terceira, quarta e sexta camadas do córtex cerebral são severamente afetadas nesta enfermidade, bem como a substância negra compacta (SNc), globo pálido e núcleo dentado (YAMAMURA; REISINE; BEAUMONT, 1980). Porém, a principal e predominante característica desta moléstia é a atrofia generalizada do núcleo estriado (DHAENENS et al., 2009), fato relacionado à capacidade da Mhtt de gerar proteínas modificadas, que apresentam-se particularmente prejudiciais às projeções neuronais deste núcleo (GHIGLIERI et al., 2012) **(Fig. 1)**

Fig. 1- Em (A), imagem de um corte coronal de um cérebro normal e em (B) imagem de um corte coronal de um cérebro de uma pessoa com DH. Figura modificada de Ekman, 2008.

Inserida neste conjunto de alterações neuronais e de degenerações estruturais, o quadro da DH se caracteriza por uma tríade de sinais que inclui: anormalidades dos movimentos, alterações cognitivas e desequilíbrios psiquiátricos (NOPOULOS et al., 2010; LEE et al., 2012). Assim sendo, o indivíduo com esta doença pode apresentar movimentos coreicos, parkinsonismo, ataxia, distonia, bruxismo, distúrbios na marcha, disfagia, disartria, irritabilidade, depressão, perda de motivação, hostilidade, psicose, paranoia, alucinações, declínio da memória e do intelecto, perda de peso e distúrbio do sono (OCTAVIAN; JANKOVIC; JANKOVIC, 2008; DHAENENS et al., 2009).

As primeiras manifestações sintomatológicas da DH geralmente aparecem durante os trinta e cinco e cinquenta e cinco anos de idade, porém podem surgir em qualquer etapa da vida, sendo que em 10% dos casos os sintomas aparecem antes

dos 20 anos de idade (forma juvenil), e em 10% dos casos os sintomas aparecem após os 55 anos de idade (início tardio), e progridem por cerca de quinze a vinte anos, período este correspondente à sobrevivência do indivíduo com a enfermidade (DHAENENS et al., 2009; PAULSEN et al., 2010; SPITZ, 2010). A principal causa de morte para os portadores de DH é a pneumonia aspirativa, gerada tanto pela imobilidade quanto pela disfagia, seguida pela asfixia, traumatismos crânio-encefálicos e insuficiência cardiorrespiratória (SPITZ, 2010).

Para o diagnóstico da DH são utilizados o diagnóstico clínico, guiado pelos sintomas motores, cognitivos e psicológicos apresentados pelo indivíduo, bem como seu histórico familiar; o diagnóstico imagético, em que imagens de tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética são utilizadas para a visualização de alterações neuroanatômicas típicas da doença e, por fim, o diagnóstico molecular, o qual informa, por análise de material genético, a quantidade de expansões do CAG (SPITZ, 2010). A DH é incurável, sua progressão é incontrolável e seu tratamento é puramente sintomático. Fármacos e drogas bloqueadoras de receptores dopaminérgicos, tais como, a fenotiazina e o haloperidol são amplamente utilizados para controle dos sintomas motores da doença (LONG et al., 2012). Neste sentido, como as alterações motoras da DH mostram-se diretamente relacionadas, em especial, a disfunção do núcleo estriado e de suas projeções (DHAENENS et al., 2009) é fundamental sua compreensão para que novas propostas terapêuticas, mais eficientes do que as paliativas atuais, possam ser desenvolvidas.

2. NÚCLEO ESTRIADO

O núcleo estriado pode ser compreendido como um agrupamento de neurônios subcorticais com composição e função semelhantes. Sua localização corresponde a somatória da área do núcleo caudado com a do putâmen, e recebe este nome devido a sua aparência estriada, causada pelo atravessar de suas fibras no interior da cápsula Interna, conectando fisiologicamente o caudado ao putâmen (DANGELO; FATTINI, 2007) (**Fig. 2**).

Fig. 2- Figura representativa de um corte coronal de um cérebro, com ênfase na identificação dos núcleos caudado, putâmen e estriado. Figura modificada de DANGELO e FATTINI, 2007.

É composto por diversos tipos de neurônios, dentre eles estão: os neurônios espinhosos médios gabaérgicos, pertencentes, em sua maior parte, a região do putâmen e os neurônios não-espinhosos, sendo eles, gabaérgicos, colinérgicos, relacionados a somatostatina e relacionados ao neuropeptídeo Y. Além destes, também são encontrados os interneurônios, que somam 4 a 23% dos neurônios estriatais, e o neurônio espinhoso gigante, que representa 2% do total das células neuronais deste núcleo. Ainda em relação a composição anatômica, o núcleo estriado apresenta dois compartimentos classificados de acordo com a densidade celular: o

compartimento matricial, com baixa densidade celular, que representa cerca de 80% da área deste núcleo, e o compartimento estriossomal, com alta densidade celular, que representa aproximadamente 20% da área estriatal (MENESES, 2006).

Dentre os núcleos da base, o estriado é o principal componente relacionado ao recebimento e envio de informações, devido ao fato de ser uma região multissináptica. Recebe aferências das camadas corticais IV, V e VI, das camadas motoras III e IV, da área motora suplementar, da área sensitiva, dos núcleos Intrataminares, dos neurônios da SNc, via impulsos dopaminérgicos, e das fibras estriadas do tronco encefálico. Emite eferências para o globo pálido interno, por transmissão GABAérgica, e para a substância negra reticulada (SNr), via acetilcolina, ácido gama-aminobutírico (GABA) ou substância P (MENESES, 2006).

A partir das conexões entre o núcleo estriado com regiões cerebrais específicas, obtém-se a via direta de produção de movimentos, caracterizada pela chegada dos impulsos eferentes a seu destino final, seja ele o globo pálido interno ou a SNr, seguida por seu envio ao córtex motor, via tálamo (LANCIEGO; LUQUIN OBESO, 2012). Dessa forma, pode-se compreender o núcleo estriado como uma estrutura predominantemente relacionada a atividade motora, o que inclui: contração e força muscular, movimentos multi-articulares, sequenciamento de movimentos, habilidades automáticas, repetitivas e extremamente aprendidas, movimentos contralaterais, movimentos automáticos (balançar dos braços durante a marcha), movimentos de reação (piscar) e ajuste postural (MENESES, 2006; DANGELO; FATTINI, 2007; EKMAN, 2008). No entanto, para que estas funções sejam corretamente desenvolvidas, a atividade dos diferentes núcleos deve ser modulada, ação esta desempenhada pelos circuitos subsidiários nigro – estriado – nigral e pálido – subtálamo – palidal (EKMAN, 2008) (**Fig. 3**).

Quando algum dos componentes dos circuitos subsidiários apresentam-se comprometidos por uma doença de caráter neurodegenerativo, como a DP ou a DH, os movimentos não são mais produzidos adequadamente, o que pode resultar em hipocinesias e hipercinesias, na DP, e hipercinesias, na DH. (EKMAN, 2008). Em particular, quando o comprometimento estrutural se dá devido a presença da DH, onde ocorre, principalmente, perda de neurônios no estriado e nas suas projeções vindas da SNc, há inibição direta do globo pálido interno e da SNr pelo putâmen, levando a diminuição dos sinais provenientes destas áreas e a consequente inibição inadequada dos núcleos da base, culminando em desinibição do tálamo motor e do núcleo pedunculo pontino, finalizando na estimulação excessiva do córtex cerebral (EKMAN, 2008) **(Fig. 4)**.

Por fim, conhecendo as estrutura anatômicas e a circuitaria envolvida na DH, modelos experimentais podem ser úteis para o entendimento das respostas biológicas a novos princípios terapêuticos para esta enfermidade.

Fig. 3- Esquema da representação das conexões funcionais dos núcleos da base durante o movimento normal. As setas vermelhas indicam que a conexão é excitatória. As setas pretas indicam que a conexão é inibitória. Figura modificada de Ekman, 2008.

Fig. 4 - Esquema da representação das alterações na atividade neural na DH. As setas vermelhas indicam conexão excitatória. Setas pretas indicam conexão inibitória. Setas largas representam atividade neural aumentada, e setas finas representam atividade neural diminuída. Figura modificada de Ekman, 2008.

3. PRINCIPAIS MODELOS EXPERIMENTAIS DA DH EM ROEDORES

A maior parte do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DH, deve-se a inúmeros trabalhos experimentais realizados a partir do uso de modelos animais, capazes de reproduzir características neuropatológicas e comportamentais da doença. É ideal que o modelo animal usado possua etiologia e características similares ao que se observa em seu correspondente humano. Assim, é indispensável que o maior número possível de aspectos da doença estudada seja mimetizado (TADAIESKY, 2010). Para isso, é importante o conhecimento sobre os diferentes modelos animais de DH e os resultados que eles geram.

Atualmente, entre os modelos animais para DH, os que usam neurotoxinas são os mais utilizados, devido aos componentes neurodegenerativos e comportamentais, bastante próximos aos vistos em indivíduos com a doença. As neurotoxinas comumente empregadas com este objetivo são o ácido caínico, o ácido ibotênico e o ácido quinolínico (AQ), sendo o último, o mais frequentemente utilizado, pois, diferentemente de substâncias como ácido ibotênico e ácido caínico, não provoca convulsões, perda neuronal hipocampal, perda neuronal no córtex olfatório nem tão pouco degeneração em estruturas límbicas, sendo então uma substância de excelência para o trabalho com modelo experimental de DH (SCHWARCZ et al., 2010).

3.1. ÁCIDO QUINOLÍNICO

O AQ é um composto gerado no metabolismo do triptofano através da via das quinureninas (RIBEIRO, 2000). Mesmo sendo incapaz de passar através da barreira hematoencefálica (BHE), o AQ pode se apresentar em tecidos cerebrais quando produzido por células microgliais cerebrais ou por macrófagos que passaram por tal barreira, ou quando sintetizado por seus precursores: o ácido quinurênico, o triptofano e a 3-hidroxiquinurenina, os quais transpõem facilmente a BHE (GUILLEMIN, 2012).

Concentrações fisiológicas de AQ no encéfalo ou fluido cérebro-espinal (<100nM) levam ao aumento na produção intracelular dos níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) em neurônios primários e em astrócitos (GUILLEMIN, 2012), porém os níveis deste ácido podem ser aumentados durante uma intensa resposta imune ou processos neuroinflamatórios agudos e crônicos, quando o AQ passa a ser tóxico (RIBEIRO, 2000).

A toxicidade do AQ tem sido sugerida como mecanismo patológico envolvido em diversas doenças neurodegenerativas, podendo incluir a DH, a Doença de Alzheimer e a demência induzida pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (RIBEIRO, 2000). Embora nestas patologias a concentração do AQ não ultrapasse 1 µM, este nível já é capaz de gerar importante dano neural desencadeado pela intensa ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e consequente entrada de cálcio nas células, ocorre também dano mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio, situações que conduzem a apoptose (FOSTER; COLLINS; SCHWARCZ, 1983; SCHWARCZ et al., 1984, STONE 1993), que é mantida devido a contribuição do déficit energético na despolarização de membrana e na manutenção do estado ativo dos receptores NMDA, quadro fisiopatológico visto em encéfalos de

indivíduos com DH (FOSTER; COLLINS; SCHWARCZ, 1983; SCHWARCZ et al., 1984; STONE, 1993; SCHWARCZ, 2010; SÁNCHEZ et al., 2011).

Devido ao seu potencial fisiológico e importância farmacológica, o AQ vem sendo amplamente usado em modelo animal de indução química da DH (RIBEIRO, 2000) por se tratar de uma substância que, quando instrumental e controladamente injetada em determinada região do encéfalo animal, elicia alterações neuroquímicas, degeneração neuronal e, por consequência, determinadas alterações comportamentais similares àsquelas observadas em pacientes com a doença (SCHWARCZ et al., 1984).

4. PRINCIPAIS MODELOS DE COMPORTAMENTO ESTEREOTIPADO EM ROEDORES

O comportamento estereotipado é descrito como um comportamento no qual o indivíduo desenvolve movimentos rítmicos, repetitivos e invariáveis sem aparente funcionalidade ou propósito (POWELL et al., 1999; PRESTI; POWELL; LEWIS, 2002). No homem ele pode ser visto em indivíduos com desordens psiquiátricas, como a esquizofrenia, a compulsão-obsessiva e o autismo, e em doenças neurológicas, como a DP e a DH, contaminando os movimentos normais (PICADA, 2003).

Devido à importância clínica, as disfunções comportamentais vem sendo amplamente investigadas pela ciência, e seu estudo é possível com o uso de modelos animais que, para reproduzirem a estereotipia vista em seu correspondente humano, utilizam drogas dopaminomiméticas capazes de induzi-la, a partir da alteração da

atividade dopaminérgica por elas desencadeadas, base neurobiológica do comportamento estereotipado (PICADA, 2003).

Os modelos de comportamento estereotipado mais frequentemente reproduzidos envolvem o uso de substâncias como a apomorfina (APO), a anfetamina e o metilfenidato.

4.1. APOMORFINA

A APO é um alcaloide semissintético benzilisoquinolínico que foi obtido pela primeira vez em 1869, através de um tratamento com morfina. Sua estrutura bifenílica é composta por um anel aromático com duas hidroxilas vicinais nos carbonos C10 e C11, formando um anel catecólico que, associado ao nitrogênio metilato, confere a APO similaridade estrutural a dopamina (DA) (PICADA, 2003). Devido a estas características estruturais, a APO é considerada como um agonista dopaminérgico direto, que, ao adentrar no encéfalo se acumula prontamente no núcleo estriado, agindo sobre os receptores dopaminérgicos D1 e D2 pré e pós-sinápticos, alterando os níveis de DA entre os hemisférios cerebrais, via modulação assimétrica das sinapses córticoestriatais conduzidas pelos neurônios nigroestriatais. Esta atividade dopaminérgica central faz com que a APO tenha indicação clínica para o tratamento de indivíduos com DP nos estágios finais da doença, já que possui ação antiparkinsoniana similar a L-3, 4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), e para o tratamento contra a disfunção erétil, com associação da ativação da via ocitocinérgica sobre os núcleos periventriculares do hipotálamo (PICADA, 2003; KOUZMINE, 2004).

Na ciência experimental, o uso da APO é relacionado ao estudo do comportamento estereotipado. Neste sentido, o animal, quando submetido a altas

doses desta substância (5mg/Kg), passa a desenvolver atos intensificados de auto-higiene, farejar, lambear, roer, se levantar sobre as patas traseiras e se locomover. Em direção oposta, quando baixas doses de APO são aplicadas (0,5mg/Kg), o animal passa a apresentar baixa atividade locomotora (LJUNGBERG; UNGERSTEDT, 1977).

Uma outra vertente experimental, também relacionada a estereotipia, para o uso da APO é dada pelo teste do comportamento rotacional em modelos animais de DH e DP. No modelo animal de DH, a infusão unilateral de AQ no núcleo estriado, provoca, dentre outros eventos, a morte dos neurônios nigroestriatais, produtores de DA, com posterior depleção ipsilateral à lesão desse neurotransmissor. Essa depleção gera uma assimetria tanto nos níveis de DA quanto na sensibilidade a ela. Quando se associa APO a este modelo de DH, o animal passa a apresentar comportamento ipsiversivo a lesão, devido à combinação dos fenômenos neuroquímicos e estruturais provocados pelo AQ com os fenômenos centrais supracitados provocados pela APO (PICADA, 2003; GUTMANN, 2010) (**Fig. 5**).

Fig. 5- Figura representativa da interação neural da APO em um modelo animal de DH. Note a menor ativação de neurônios nigroestriatais e o menor nível de dopamina, no lado do encéfalo animal lesado comparado ao lado íntegro, provocando o comportamento de giros ipsilaterais a lesão representado pela seta em curva para a esquerda. Figura modificada de Gutmann, 2010.

5. CAMPO MAGNÉTICO

Os campos magnéticos (CMs) vem sendo alvo de grande investigação na literatura científica há décadas, uma vez que pesquisas demonstraram que exercem influência sobre diversos sistemas biológicos, dentre eles: o ósseo, o tegumentar, o cardiovascular, o pancreático e o nervoso (GMITROV et al., 1995; GMITROV; OHKUBO, 1998; SCHIRMACHER et al., 2000; DINIZ et al., 2002; KOBIERSKA et al., 2002; CHANG et al., 2004; HAYASHI et al., 2004; BERTOLINO et al., 2006; ALEXANYAN; KATAEVA; ROMANOV, 2008; EDWARDS; TALELLI; ROTHWELL 2008;). Essa influência ocorre devido a existência de algum grau de diamagnetismo

em alguns componentes inorgânicos e em todos os componentes orgânicos da estrutura molecular da membrana celular (ROSEN, 2003). Dessa forma, a interferência exercida pelos CMs pode atingir diferentes organelas, células, tecidos e órgãos (TENFORDE, 2003; KOBIERSKA et al., 2002; TOFANI et al., 2001), podendo ainda influenciar o metabolismo celular, a taxa de transcrição, alguns genes e mudanças na permeabilidade da membrana celular (HONG, 1995; ROSEN, 2003). Foi evidenciado também que os CMs são capazes de atuar a níveis iônicos, modulando o influxo e a concentração intracelular dos íons cálcio (FANELLI et al., 1999), que estão envolvidos na manutenção da homeostase celular, no desenvolvimento do organismo e nos processos apoptóticos (KOCH et al., 2003). Sendo assim, os CMs podem aumentar a sobrevivência celular através de inibição de apoptose (FANELLI et al., 1999), podendo ser um importante recurso na terapia de morbididades que tenham como base este fenômeno celular.

5.1. INTERAÇÃO DOS CAMPOS MAGNÉTICOS COM O SISTEMA NERVOSO

No âmbito da terapêutica, os CMs são utilizados com o propósito de investigação e modulação da excitabilidade de áreas corticais de forma não-invasiva, indolor e segura. Isto é possível através da estimulação magnética transcraniana, recurso que favorece o tratamento de indivíduos com desordens cinéticas, bem como o tratamento da epilepsia e da depressão (EDWARDS et al., 2008; FREGNI; PASCUAL-LEONE, 2001).

Outra aplicabilidade para os CMs foi demonstrada por Bertolino et al. (2013a-b) quando demonstraram a relação existente entre a neuroproteção exercida pelos

CMS contínuos e a supressão comportamental em animais. No primeiro trabalho, os autores mostraram que os CMS contínuos foram capazes de exercer efeito neuroprotetor com reversão das alterações comportamentais, morfológicas e histoquímicas geradas pela isquemia encefálica global em Gerbilos. No trabalho mais recente de Bertolino et al. (2013b), nesta mesma linha, demonstraram que os CMS contínuos promoveram efeito neuroprotetor com reversão das alterações comportamentais, morfológicas e histoquímicas desencadeadas pela neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em modelo químico de DP em ratos Wistar.

Apesar do grande interesse sobre os efeitos causados pela exposição aos CMS, as informações que se tem disponíveis na literatura científica ainda são vagas e muito divergentes entre si, principalmente quando questionada a intensidade, tipos de campos e modos de exposição utilizados (FANELLI et al., 1999). Os trabalhos encontrados na literatura, em sua maioria, utilizam CMS intermitentes, gerados por corrente elétrica e sem definição dos polos, o que faz permanecer pouco conhecida as ações dos CMS contínuos, bem como a existência da diferença de efeitos entre os polos magnéticos sobre o SNC (BERTOLINO et al., 2013a). No entanto, os estudos citados sugerem que o CM contínuo pode promover melhoras nas discinesias por atenuar os danos celulares causados por lesões experimentais de caráter isquêmico e neurotóxico, modulando o processo de morte neuronal.

Por isso, torna-se necessária continuar a investigação dos possíveis efeitos produzidos por um CM contínuo, gerados por magnetos com polaridades definidas sobre os neurônios no núcleo estriado, área ainda não investigada, e sobre o comportamento motor. Para tanto, utilizamos o modelo experimental de DH produzido por AQ associado ao uso de APO em ratos.

1. OBJETIVO GERAL

- Analisar os efeitos da exposição ao campo magnético contínuo, polo norte e sul, 7 dias após administração de AQ no núcleo Estriado esquerdo de ratos Wistar associado a aplicação de APO subcutânea.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos da estimulação magnética, polo norte e sul, sobre o comportamento motor, espontâneo e forçado.
- Analisar os efeitos morfológicos da estimulação magnética, polo norte e sul, no núcleo Estriado de ratos Wistar.

1. Animais

Foram utilizados 68 ratos albinos (*Rattus norvegicus*, Rodentia, Muriade), machos, da linhagem Wistar machos, pesando entre 220 a 260g. Os animais foram alojados no biotério do laboratório de bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo, sob controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro escuro de 12/12 horas, alimentados com ração e água *ad libitum* (à vontade). Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno com grade de inox (para não haver atração com o magneto) forradas com serragem, com quatro animais por gaiola. Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram nas gaiolas por um período total de sete dias até a finalização dos experimentos, com livre acesso à água e comida durante esse período.

Os animais foram alocados em 6 grupos independentes por sete dias, nos seguintes protocolos:

I- *Grupo Controle (GC)*: Animais ingênuos, sem estimulação magnética, tendo seu comportamento avaliado no monitor de atividades e Rota Rod no sétimo dia. Número total de animais igual a 12.

II- *Grupo “Sham” (GS)*: Animais falso – operados, submetidos a cirurgia experimental com microinjeção de 2 μL de solução salina a 0,9% no núcleo estriado esquerdo e a injeção subcutânea de APO (2,5 mg/Kg), tendo seu comportamento avaliado no monitor de atividades e Rota Rod no sétimo dia. Número total de animais igual a 12.

III- *Grupo “Sham” Magnético (GSM)*: Animais falso-operados, submetidos a cirurgia experimental com microinjeção de 2 μL de solução salina a 0,9% no núcleo estriado esquerdo, a falsa estimulação magnética e a injeção subcutânea de APO (2,5

mg/Kg) tendo seu comportamento avaliado no monitor de atividades e Rota Rod no sétimo dia. Número total de animais igual a 8.

IV- *Grupo Lesão (GL)*: Animais submetidos à cirurgia experimental com microinjeção de 2µL AQ no núcleo estriado esquerdo e a injeção subcutânea de APO (2,5 mg/Kg), tendo seu comportamento avaliado no monitor de atividades e Rota Rod no sétimo dia. Número total de animais igual a 12.

V- *Grupo Estimulado Polo Sul (GEPS)*: Animais submetidos à cirurgia experimental com microinjeção de 2µL AQ no núcleo estriado esquerdo, à estimulação magnética com o polo sul do magneto e a injeção subcutânea de APO (2,5 mg/Kg), tendo seu comportamento avaliado no monitor de atividades e Rota Rod no sétimo dia. Número total de animais igual a 12.

VI- *Grupo Estimulado Polo Norte (GEPN)*: Animais submetidos à cirurgia experimental com microinjeção de 2µL AQ no núcleo estriado esquerdo, à estimulação magnética com o polo norte do magneto e a injeção subcutânea de APO (2,5 mg/Kg), tendo seu comportamento avaliado no monitor de atividades e Rota Rod no sétimo dia. Número total de animais igual a 12.

2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para realização do processo cirúrgico, cada animal foi anestesiado intraperitonalmente com tribromoetanol (250 mg/kg) e levado a um aparelho estereotático digital (EEF 339 – Insight, Ltda.), onde sua cabeça foi fixada pelo rochedo temporal e incisivos superiores (**Fig. 6A**). Após a fixação, foi realizada tricotomia na região dorsal da cabeça e uma injeção subcutânea de 0,2 ml de

lidocaína a 2% por via intradérmica para remoção do tecido subcutâneo e do periósteo. Com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda, foi realizada microinjeção de AQ (Sigma - Aldrich Brasil, Ltda.), na concentração de 120nmol em 2µL de solução salina a 0,9% (De PABLOS et al., 2005), unilateralmente no núcleo estriado esquerdo através de uma agulha Hamilton de 30 gauge (**Fig. 6B**), em uma taxa de 0,33 µl/min, utilizando as seguintes coordenadas adaptadas do atlas de Paxinos e Watson (1998), tendo bregma como referência: +0,7mm anteroposterior (AP), +2,8mm mediolateral (ML) e -6.0mm dorsoventral (SONG et al., 2007) (**Fig. 6C**). O AQ foi microinjetado lentamente durante 5 minutos e a agulha permaneceu na mesma posição por mais 4 minutos para a completa difusão da droga.

Os animais falso-operados (GS) e os falso-operados com falsa estimulação (GSM) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém, ao invés de receberem AQ, receberam 2µl de solução salina a 0,9% no núcleo estriado esquerdo.

Nos grupos com estimulação magnética e no GSM, imediatamente após a microinjeção, foi fixado um parafuso no periósteo dos animais para ancoragem de um pequeno magneto circular e, posteriormente, do capacete de acrílico que ocluía a incisão e continha o magneto (**Fig. 7**). Nos GL e GS, os animais receberam apenas o parafuso para fixação do capacete acrílico.

Ao final da cirurgia cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 120.000 U.I de penicilina G benzatina (Fontoura- Wyeth- Brasil) no término da cirurgia.

Fig. 6- Animal posicionado no aparelho estereotáxico para procedimento cirúrgico (A) com o tecido subcutâneo removido e agulha posicionada nas referidas coordenadas (B). (C) Figura representativa do posicionamento da agulha para administração do AQ no núcleo estriado esquerdo em cada animal e da intensidade magnética aferida. Os pontos pretos representam as regiões onde as microinjeções ocorreram.

Fig. 7- Animal com o escalpo removido e com magneto ancorado pelo parafuso fixado no crânio.

3. ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA

Foram utilizados magnetos circulares de Neodímio, ferro e boro com dimensões de 8mm x 3mm e intensidade magnética de 3200 Gauss (0,32Tesla), posicionados imediatamente acima do perióstio, no crânio do animal.

Um medidor de campo magnético (GaussMeter – TMGAG-1T, GLOBALMAG, Brasil) (**Fig. 8**) foi utilizado para mensurar a intensidade magnética presente no núcleo estriado, sendo aferido nesta região 1600 Gauss (0,16 T) (**Fig 6C**).

Fig. 8- Imagem do GaussMeter utilizado para mensuração da intensidade magnética (A) e das dimensões dos magnetos utilizados na estimulação magnética dos animais. (B) diâmetro magneto (8mm) e (C) espessura do magneto (3mm). Figura modificada de BERTOLINO et al., 2013b.

Os magnetos do GSM foram constituídos do mesmo material, porém não estavam magnetizados (**Fig. 9**).

Fig. 9- Imagem do disco magnetizado utilizado nos grupos estimulados (seta preta) e do disco não magnetizado (seta branca) utilizado no GSM (BERTOLINO et al., 2013b).

4. TESTES DE COMORTAMENTO MOTOR

4.1. Monitor de Atividades

Foi utilizado um monitor de atividades (EP 149 – Insight, Ltda.) composto por 16 sensores de infravermelho e caixa de monitoramento em acrílico cristal com dimensão de 50 X 50 cm e 48 cm de altura (**Fig. 10.**) O monitor se conecta a um computador através de uma interface serial e registra respostas comportamentais de distância percorrida, tempo de atividade, cruzamentos e giros em sentido anti-horário

Vinte e quatro horas antes da cirurgia os animais foram colocados, um a um, no monitor de atividades, onde permaneceram por 5 minutos para a habituação local. Após 7 dias do procedimento cirúrgico para os respectivos grupos, os animais foram recolocados no equipamento e seu comportamento motor foi registrado por 15 minutos, de acordo com o delineamento experimental (**Fig. 10.**).

Fig. 10- Monitor de atividades EP 149 – Insight, Ltda. utilizado para análise das respostas comportamentais espontâneas.

4.2. Rota Rod

Imediatamente após a avaliação no monitor de atividades, cada animal foi levado ao equipamento Rota Rod (EEF 411 – Insight, Ltda.), que avalia o comportamento motor forçado e o equilíbrio do animal (**Fig. 11**).

Este equipamento apresenta uma superfície cilíndrica que se move em torno de seu eixo, com uma aceleração progressiva e invariável de 5,5 RPM, onde o animal deve equilibrar-se. Quando o animal precipitava da superfície de teste, o sistema

detectava a queda, através de um circuito microprocessado, e interrompia a cronometragem, registrando o tempo de permanência do animal no equipamento.

Para que os animais se adaptassem ao aparato, foi realizado um período de habituação correspondente aos três dias que antecederam a cirurgia. Neste período os animais passaram por três tentativas de permanência no Rota Rod.

Fig. 11- Aparelho Rota Rod EEF 411 – Insight, Ltda. utilizado para análise da resposta motora forçada.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Durante os três dias que antecederam a cirurgia, os animais foram levados ao Rota Rod em funcionamento para adaptação a tarefa do aparato. Nesse período os animais passaram por três tentativas de permanência no Rota Rod.

Vinte e quatro horas antes da cirurgia, os animais foram levados ao monitor de atividades e colocados individualmente no centro do assoalho deste equipamento, onde permaneceram por 5 minutos com a finalidade de desenvolver habituação ao local.

Após a realização da cirurgia, quando os animais recobravam a consciência, foram alojados novamente no biotério por outros 7 dias. No sétimo dia pós-cirúrgico, os animais de todos os grupos, exceto aqueles que compunham o GC, receberam uma injeção subcutânea de APO (2,5 mg / Kg) (Sigma - Aldrich Brasil, Ltda.) (BIANCHI et al., 1986) antes de terem seu comportamento testado. A APO foi injetada no animal de acordo com a sequência de teste, sendo assim, o animal que recebeu a APO permanecia em sua gaiola por 5 minutos, tempo necessário para o início do efeito da substância. Cinco minutos após a injeção, os animais foram colocados individualmente no monitor de atividade para avaliação da atividade motora espontânea, por 15 minutos, e ao término, foram levados ao Rota Rod, onde o equilíbrio foi avaliado (atividade motora forçada).

6. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MOTOR

Para análise do comportamento motor espontâneo, os animais foram avaliados, sob ação de APO, no monitor de atividades por 15 minutos, sendo observada as seguintes respostas motoras: **distância percorrida** (distância percorrida pelo animal durante o período de permanência no monitor. Registrada em centímetros), **cruzamentos** (toda vez que o animal se movia, os feixes de infravermelho eram interrompidos e os sensores disparados com finalidade de registro), **tempo de atividade** (tempo de atividade de locomoção do animal durante seu período de permanência no monitor. Registrado em segundos) e **giros anti-horários** (frequência da produção de giros em sentido anti-horário realizada pelo animal durante seu período de permanência no monitor). Os critérios para a análise comportamental no monitor de atividades foram adotados conforme o trabalho de Bertolino et al. (2013b), sendo que a observação dos Giros Anti-Horários foi realizada apenas neste trabalho.

No Rota Rod, os animais foram colocados individualmente logo após o monitor de atividades, e passaram por nova habituação a este equipamento, correspondente a permanência do animal, por pelo menos 2 segundos, com as 4 patas em contato com a superfície de teste imóvel. Quando os animais mostravam equilíbrio frente ao cilindro, foram recolocados por 3 vezes, agora com o cilindro em movimento. O tempo de permanência foi cronometrado pelo aparelho, que era interrompido quando o animal caía. Os dados obtidos equivalem a média das três tentativas do tempo de permanência do animal no equipamento em funcionamento. Os critérios para análise comportamental no Rota Rod foram adotados conforme os utilizados no trabalho de Bertolino et al. (2013b).

7. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a análise comportamental, os animais receberam uma dose excessiva, por via intraperitoneal, de tribromoetanol (250mg/ Kg) e foram perfundidos intracardiacamente com 50 mM de salina fosfatada (PBS) e fixados com paraformaldeído a 4% em fosfato (PB, pH 7,4) a 100 mM. Após a perfusão, os encéfalos dos animais foram dissecados e mantidos por 24 horas em uma solução crioprotetora de sacarose a 30% a 4°C e congelados com isopentano e gelo seco. Cortes coronais de 40 µm de espessura foram feitos em um criostato (CM 1850 UV – Leica Biosystems, Ltda.), preparados em lâminas de microscopia e corados com Nissl, para a marcação do núcleo níssil do citoplasma dos neurônios.

7.1. Coloração de Nissl

Para coloração de Nissl, os corte foram mergulhados em uma sequência de soluções composta por:

- Álcool absoluto (ABS) – imersos por 5 minutos
- ABS com Clorofórmio – imersos por 10 minutos
- Álcool 95% - imersos por 5 minutos
- Álcool 70% - imersos por 5 minutos
- Água destilada – imersos por 5 minutos

Na sequência, os cortes ficaram imersos em corante de cresil violeta por 2 minutos e, em seguida foram lavados seguindo novamente na sequência de soluções composta por álcool 70%, álcool 95%, ABS com clorofórmio, ABS, álcool com xilol e

xilol. Ao final deste processo, os cortes foram selados com permount e lamínula e deixados secando ao ar livre por 24 horas, antes da análise por microscopia.

7.2. Microscopia

Após secas, as laminas foram analisadas em um microscópio Leica- DM2500 com um sistema de câmera digital Leica - DFC300FX para aquisição de imagens. A análise morfométrica foi realizada pelo programa AxioVision, versão 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging System, USA). A contagem do número de neurônios foi realizada unilateralmente, no núcleo Estriado esquerdo, de acordo com as coordenadas estereotáticas estabelecidas, e em um único campo de visão selecionado no local da microinjeção. Esse procedimento foi realizado em todos os cortes histológicos, e a média do número de neurônios foi considerada para a análise estatística.

8. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados da avaliação comportamental no monitor de atividades, no Rota Rod, bem com os dados da análise morfológica de todos os grupos foram analisados estatisticamente através da análise de variância de uma via (ANOVA). As diferenças detectadas entre os grupos quanto ao comportamento motor espontâneo e forçado, bem como quanto a morfologia, foram evidenciadas pelo teste de *Holm-Sidak*. Os resultados foram considerados diferentes estatisticamente para $p < 0,05$. Para a análise da correlação entre o número de neurônios no núcleo Estriados esquerdo e a atividade motora, foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

1. RESULTADOS DO COMPORTAMENTO MOTOR

Para as variáveis observadas no monitor de atividades (atividade motora espontânea), podemos observar, após 7 dias de experimento, em relação ao comportamento de **distância percorrida** um aumento significativo do GEPS em relação aos GC, GL e GEPN, e também do GSM e GS em relação ao GC, GL e GEPN. Observamos também uma diminuição significativa do GEPN em relação aos GS, GSM, GL e GEPS [$F_{(5,62)} = 3,19$; $p < 0,05$] (**Fig. 12**). Para o **tempo de atividade**, um aumento significativo do GEPS em relação aos GC e GEPN, e também do GSM e GS em relação ao GC, GL e GEPN. Observamos também uma diminuição significativa do GEPN em relação aos GS, GSM, GL e GEPS [$F_{(5,62)} = 5,46$; $p < 0,05$] (**Fig. 13**). Para o comportamento de **cruzamentos**, um aumento significativo do GEPS em relação aos GC e GEPN e também do GSM e GS em relação ao GC, GL e GEPN. Observamos também uma diminuição significativa do GEPN em relação aos GS, GSM, GL, e GEPS [$F_{(5,62)} = 3,31$; $p < 0,05$] (**Fig. 14**). E para o comportamento de **giros anti-horários** (ipsilaterais a lesão) um aumento significativo dos GL, GEPS e GEPN em relação aos GC, GS e GSM. Observamos também uma diminuição significativa dos GEPN e GEPS em relação ao GL e ainda uma diminuição do GEPN em relação ao GEPS [$F_{(5,62)} = 16,01$; $p < 0,05$] (**Fig. 15**).

O monitor de atividade, também nos permite observar o deslocamento dos animais durante o teste. Esse deslocamento não pode ser quantificado do ponto de vista estatístico, entretanto fica bastante evidente que o deslocamento dos animais do GL é diferente dos animais dos GC, GS, GSM e GEPN (**Fig. 16**).

Os resultados referentes ao Rota Rod (atividade motora forçada) revelaram diminuição significativa do tempo de permanência no aparato do GL em relação aos demais GC, GS, GSM, GEPS e GEPN [$(F_{(5,62)} = 5,46; p < 0,05)$] (**Fig. 17**).

Fig. 12- Comparação da distância percorrida no monitor de atividades entre os grupos. As colunas representam a média em centímetros da distância percorrida pelos animais e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). * em relação a GC, GL e GEPN, # em relação a GC, GL e GEPN, + em relação a GS, GSM, GL, GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

Fig.13- Comparação do tempo de atividades no monitor de atividades entre os grupos. As colunas representam a média em segundos do tempo em que os animais se mantiveram ativos no monitor de atividades e as barras representam + o erro padrão da média (EPM). * em relação a GC e GEPN, # em relação a GC, GL e GEPN, + em relação a GS, GSM, GL e GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

Fig. 14- Comparação do comportamento relacionado aos cruzamentos entre os animais. As colunas representam a média da frequência de cruzamentos realizados pelos animais no monitor de atividades e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * em relação a GC e GEPN; # em relação a GC, GL e GEPN; + em relação a GS, GSM, GL e GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

Fig. 15- Comparação do comportamento relacionado aos giros anti- horários (ipsilaterais à lesão) entre os grupos. As colunas representam a média da frequência de giros ipsilaterais à lesão realizados pelos animais no monitor de atividades e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * em relação a GC, GS e GSM; # em relação GL; + em relação a GEPS. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

Fig. 16- Figura representativa do deslocamento do animal durante o teste de comportamento motor, estimulado por APO (2,5 mg/Kg), no monitor de atividades. Ao se deslocar, os sensores eram disparados e o movimento era registrado pelo computador. GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5 mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

Fig. 17- Comparação dos tempos de permanência no Rota Rod entre os animais. As colunas representam a média dos tempos de permanência em segundos no Rota Rod e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * $p < 0.05$ em relação a GC, GS, GSM, GEPS e GEPN. $p < 0.05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5 mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5 mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5 mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

A análise morfométrica no núcleo estriado esquerdo após 7 dias de lesão por AQ, mostrou uma redução significativa no número de neurônios dos animais do grupo GL em relação aos demais grupos [$F_{(5,66)} = 5,13$; $p < 0,05$] (**Fig. 18 e 19**).

Fig. 18- Comparação do número de neurônios no núcleo estriado esquerdo entre os grupos. As colunas apresentam a média do número de neurônios em cada grupo e as barras representam + erro padrão da média (EPM). * em relação a GC, GS, GSM, GEPS e GEPN. $p < 0,05$ ANOVA seguida do teste de *Holm Sidak*. GC= animais ingênuos; GS= animais do grupo “sham” submetidos a APO (2,5mg/Kg); GSM= animais do grupo “sham” magnético submetidos a APO (2,5mg/Kg); GL= grupo submetido a lesão com AQ e a APO (2,5mg/Kg); GEPS= grupo lesão com AQ, exposto ao polo sul e submetido a APO (2,5mg/Kg); GEPN, grupo lesão com AQ, exposto ao polo norte e submetido a APO (2,5mg/Kg). O número de animais utilizados foi de 12 para cada grupo, exceto para o GSM, onde utilizou-se 8 animais.

Fig. 19- Fotomicrografias, aleatoriamente selecionadas, de cortes coronais do núcleo estriado esquerdo de animais representativos dos grupos (A) grupo “sham”, (B) grupo “sham” magnético, (C) grupo lesão, (D) grupo estimulado polo sul e (E) grupo estimulado polo norte. Na coluna da esquerda, fotomicrografias com aumento de 20x e na coluna da direita, fotomicrografias com aumento de 40x. A seta preta sinaliza o neurônio. A barra de escala em (E) representa 25 μm .

3. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A análise de correlação de Pearson, demonstrou existir uma correlação negativa entre a redução do número de neurônios no núcleo Estriado esquerdo e o aumento da atividade motora espontânea induzida pela APO: **distância percorrida** ($r = -0,04$), **tempo de atividade** ($r = -0,03$), **cruzamentos** ($r = -0,07$), **giros anti-horários** ($r = -0,39$) (**Fig. 20**). Entretanto, o teste demonstrou haver uma correlação positiva entre a redução do número de neurônios no núcleo estriado esquerdo e o **tempo de permanência no Rota Rod** ($r = 0,06$) (**Fig. 20**).

Fig. 20- Correlação do número de neurônios no núcleo estriado esquerdo, das atividades motoras espontâneas, no monitor de atividades, e da atividade motora forçada no Rota Rod.

VII- DISCUSSÃO

O modelo animal de DH a partir de microinjeção de AQ é amplamente utilizado no contexto científico devido a sua capacidade excitotóxica, consequente a ativação incessante de receptores NMDA seguida da intensa entrada de cálcio nas células provocando morte neuronal, (RIBEIRO, 2000; SCHWARCZ, 2010), e também devido ao fato de que o AQ não provoca danos a outras áreas cerebrais, (SCHWARCZ, 2010). Um dos fatores importantes para o sucesso da cirurgia experimental com AQ é a dosagem utilizada e o tempo de avaliação pós-lesão. Trabalhos demonstraram que as dosagens de 60 nmol/ μ L, 100 nmol/ μ L, 120 nmol/ μ L, 240 nmol/ μ L e 480 nmol/ μ L, geram padrão estrutural neuropatológico semelhante ao visto em encéfalos com DH, com lesão estriatal moderada e perda significativa de neurônios estriatais (HUGHES et al., 1999; RODRÍGUEZ- MARTÍNEZ et al., 2000). Já, o trabalho realizado por De Pablos et al. (2005) mostrou que, o período de sete dias após a cirurgia experimental, é adequado para a visualização dos efeitos perda de neurônios estriatais por AQ. Nesse sentido em nosso trabalho, nós também utilizamos uma dose de 120nmol/2 μ L e analisamos o comportamento no sétimo dia de lesão, o que garantiu a adequação metodológica do nosso protocolo.

Para que os efeitos da lesão do estriado, nesse modelo experimental, possam ser observados adequadamente, do ponto de vista comportamental, é fundamental a utilização da APO. Desse modo, o trabalho de Song et al. (2007) utilizando o campo aberto, mostrou um aumento dos giros ipsilaterais à lesão. Na mesma direção, Gutmann et al. (2010), sete dias após a cirurgia experimental com microinjeção de 1-metil – 4-fenil- 1,2,3,6- tetrahidropirindina no núcleo estriado, também relataram um aumento do comportamento rotacional ipsilateral a lesão. Outro fator importante para a obtenção de alteração de comportamento induzida pela APO é a extensão da área lesionada a partir da cirurgia experimental, que deve ser superior a 90% da morte de

neurônios dopaminérgicos (LAZZARETTI, 2011). Em nosso trabalho, a análise morfológica revelou importante redução de neurônios no estriado, fator importante para a modificação do comportamento induzido pela APO.

O comportamento de animais submetidos ao campo aberto, também é alterado pela APO mesmo sem a presença de lesões experimentais no estriado, como observamos em nossos grupos controles. O trabalho de Ljungberg e Ungerstedt (1977) mostra que o comportamento motor espontâneo de ratos Sprague Dawley pode se modificar frente a diferentes dosagens de APO. A dose de 0,05 mg/Kg reduz a atividade nos animais, a dose de 0,2 mg/Kg torna os animais um pouco mais ativos, a dose de 1 mg/Kg induz a locomoção, o farejar e o roer, e a dose de 5 mg/Kg induz os mesmos comportamentos, porém de maneira mais intensa. Em nosso trabalho, também utilizamos a APO para a adequada observação das modificações comportamentais, e a dose 2,5 mg/ Kg vai em direção de que doses mais altas provocam desinibição comportamental. Dessa maneira, em nosso trabalho, todos os animais controles injetados com APO, apresentaram comportamentos hipercinéticos no monitor de atividades, assim como o visto no trabalho de Ljungberg e Ungerstedt (1977). O mesmo aconteceu com os animais com lesão no estriado e também com os animais com lesão no estriado e estimulados com o polo sul. Esse relato, está relacionado aos comportamentos de distância percorrida, tempo de atividade e cruzamentos, que não são comportamentos classicamente analisados nesse tipo de modelo experimental de lesão estriatal. Entretanto, quando analisamos o comportamento de giros anti-horários (ipsilaterais a lesão), os animais com lesão estriatal e com lesão estriatal e estimulação magnética apresentaram esse comportamento aumentado. Essa resposta comportamental observada em nosso trabalho está de acordo com os trabalhos de Song et al. (2007) e de Gutmann et al. (2010). De uma maneira geral,

em nosso trabalho o campo magnético norte diminuiu, em todos os comportamentos analisados, a estereotipia.

Em um trabalho recente do nosso laboratório, que avaliou o comportamento motor espontâneo no monitor de atividades pós-lesão por 6- hidroxidopamina bilateral na SNc, também relatou um melhor desempenho dos animais estimulados pelo campo magnético quando analisados os comportamentos de cruzamentos, distância percorrida e tempo de atividade. Nesse trabalho, diferente do nosso, o melhor desempenho comportamental se deu para os animais estimulados com o polo magnético sul (BERTOLINO et al., 2013b). E ainda, em um outro trabalho, com isquemia cerebral global em gerbilos, também se observou melhor desempenho dos animais estimulados no monitor de atividades, porém sem distinção dos efeitos dos diferentes polos (BERTOLINO et al., 2013a).

O modelo de avaliação motora forçada, nesse trabalho o teste de Rota Rod, é uma ferramenta tradicional utilizada para avaliar o desempenho motor de animais com lesão estriatal induzida por AQ. Nos trabalhos do nosso laboratório, citados anteriormente, o campo magnético foi eficiente para reverter o baixo desempenho dos animais, submetidos aos modelos experimentais de lesão, nesse teste. O mesmo foi encontrado no nosso atual trabalho, observamos que os animais estimulados pelo campo magnético norte e sul apresentam um desempenho semelhante aos animais dos grupos controles. Dessa maneira, fica bem demonstrada, sob os aspectos comportamentais, a eficácia dos campos magnéticos utilizados em nosso trabalho para a manutenção desse comportamento no modelo de lesão estriatal por AQ.

Estudos como os de Bassani (2013), Teixeira (2011) e Capitelli (2007), vêm investigando métodos com efeitos neuroprotetores frente a diversos modelos de lesão

neurotóxica. De maneira semelhante, nosso trabalho analisou as possibilidades terapêuticas baseadas na propriedade neuroprotetora do campo magnético contínuo.

Corroborando nossos dados comportamentais para o GL, em nossa morfologia o núcleo estriado esquerdo apresenta uma redução de neurônios, pelo procedimento experimental cirúrgico, que foi o fator chave para os resultados obtidos com a estimulação pela APO. Por outro lado, a exposição da área lesada aos polos magnéticos, mantém um maior número de neurônios no estriado. A presença desse maior número de neurônios fica evidente, quando observamos o comportamento de giros anti- horários e quando analisamos o desempenho do GEPN nos comportamentos de cruzamentos, distância percorrida e tempo de atividade. Um maior número de neurônios, entretanto parece ser fundamental para o desempenho comportamental no teste de Rota Rod. Nossa análise de correlação revelou existir a correlação linear positiva entre a redução do número de neurônios e a diminuição da atividade motora forçada desses animais. Dessa maneira, o Rota Rod é um modelo adequado para avaliar o desempenho motor e o sítio de lesão.

O teste de correlação de Pearson também mostrou uma correlação linear negativa entre a redução do número de neurônios e o aumento da atividade motora espontânea. Esse fato, possivelmente está relacionado a presença da APO durante a análise comportamental, já que a mesma exacerba o comportamento motor nos animais com e sem a lesão estriatal. Entretanto, no teste do Rota Rod, os grupos sem lesão e com APO não apresentam a modificação comportamental observada no monitor de atividades. Pode ser que quando os animais foram submetidos a atividade motora forçada, teste de Rota Rod, o efeito da apomorfina estaria ausente, uma vez que os animais foram levados ao aparato após 20 minutos da injeção da substância, que tem seu efeito suprimido aproximadamente 30 minutos após sua injeção

(BIANCHI et al., 1986). Uma outra possibilidade é que o comportamento estereotipado estimulado pela APO é inibido pela tarefa motora de se manter sobre o cilindro em movimento. A presença da APO durante o teste do monitor de atividade e sua possível ausência no teste de Rota Rod, nos leva a propor que os dados diferenciais obtidos com o campo magnético norte em relação ao campo magnético sul, se dá pela possível interação desse campo com a molécula de APO. O polo magnético norte poderia ter bloqueado a interação da APO com a área estriatal lesada. Caso essa hipótese possa ser confirmada em estudos futuros, o campo magnético pode exercer efeitos funcionais relacionados a determinadas moléculas no SNC.

Sendo assim, existe uma correlação entre um maior número de neurônios e os comportamentos que analisamos em nosso trabalho, revelando o efeito neuroprotetor da exposição ao campo magnético contínuo. Uma possível explicação para os resultados morfológicos obtidos seria o potencial de interação do campo magnético com o metabolismo de cálcio mostrado em trabalhos anteriores, como os de Gartzk e Lange (2002), Teodori et al. (2002), Chionna et al. (2003) e Pirozzoli et al. (2003). Nesta mesma linha, Fanelli et al. (2002), em seu estudo, demonstraram que culturas celulares expostas a campos magnéticos apresentam maior sobrevivência por inibição de mecanismos de apoptose via modulação do influxo de cálcio.

Finalmente, confirmamos a hipótese inicial, de forma convincente, utilizando variáveis comportamentais associadas a evidências morfológicas, que o campo magnético estático pode interferir no processo de morte neural e consequentemente, no comportamento motor, induzido por APO, de ratos submetidos ao modelo experimental de DH induzido por AQ no núcleo estriado.

Para trabalhos futuros, no entanto, sugerimos investigação mais detalhada quanto ao tipo de morte neural sobre o qual o campo magnético estático interferiu, e sugerimos também a busca sobre maiores detalhes em relação a possível interação funcional do campo magnético estático com as moléculas de APO.

VIII- CONCLUSÃO

➤ Este trabalho sugere que o campo magnético é capaz de reverter as alterações de desempenho motor produzidas pela lesão estriatal com ácido quinolínico associada ao uso de apomorfina. Ainda, a estimulação pelo polo magnético norte produz os melhores resultados comportamentais quando comparado ao polo magnético sul.

➤ O campo magnético contínuo em animais submetidos ao modelo experimental da doença de Huntington exerce efeito neuroprotetor, com atenuação da morte de neurônios do núcleo estriado sem distinção dos efeitos dos diferentes polos.

➤ A neuroproteção, exercida pelos campos magnéticos estáticos, pode ter ocorrido pela modulação do processo de morte neural.

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. A.; LOPEZ, A. M.; FIGUEIREDO, E.; PORCIÚNCULA, C. G.; MONLEÓ, I. Prevalence of Huntington's disease in Feira Grande, a small city in Northeastern Brazil. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81. Setembro. 2010. Disponível em: http://jnnp.bmj.com/site/abstractbooks/A21_jnnp222638.pdf>. Acesso em: 22. abr. 2014

ALEXANYAN, Z. A.; KATAEVA, G. V.; ROMANOV, S. P. Effect of transcranial magnetic stimulation on the emotional state of patient after stroke. *International Journal of Psychophysiology*, 69: 242- 275, 2008.

BASSANI, B. T. **Efeitos neuroprotetores e tipo- antidepressivo da melatonina em modelo animal de doença de Parkinson induzido por rotenona em ratos.** 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

BERTOLINO, G.; BRAGA, A. F.; ROSA, K. O. L. C.; BRITO JUNIOR, L. C.; DE ARAUJO, J. E. Macroscopic and histological effects of magnetic field exposition in the processo f tissue reparation in Wistar rats. *Archives Dermatological Research*, 298: 121- 126, 2006.

BERTOLINO, G.; BUIATTI, F. L. A.; DE SOUZA, H, C, D.; COIMBRA, N. C.; DE ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments after bilateral global ischemia surgery and exposure to static magnetic field: evidence in the motor cortex, the hippocampal CA1 region and the neostriatum. *International Journal of Radiation Biology*, 1: 1- 19, 2013a.

BERTOLINO, G.; DE SOUZA, H, C, D.; DE ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments in Wistar rats with a 6-OHDA lesion in the substantia nigra compacta and exposure to a static magnetic field. ***Electromagnetic Biology and Medicine***, 32(4): 527-535, 2013b.

BIANCHI, G.; LANDI, M.; GARATINI, S. Disposition of apomorphine in rat brain areas: relationship to stereotypy. ***European Journal of Pharmacology***, 131: 229- 236, 1986.

CAPITELLI, S.C.; **Efeitos da melatonina em um modelo animal de Parkinsonismo induzido pelo MPTP**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.

CARDOSO, F.; SEPPI, K.; MAIR, K. J.; WENNING, G. K.; POEWE, W. Seminar on choreas. ***The Lancet Neurology***, 5 (5): 589-602, 2006.

CHANG, W. H. S.; CHEN, L. T.; SUN, J. S.; LIN. F. H. Effect of pulse-burts electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. ***Bioelectromagnetics***, 25: 457- 465, 2004.

CHIONNA, A.; DWIKAT, M.; PANZARINI, E.; TENUZZO, B.; CARLA, E. C.; VERRI, T.; PAGLIARA, P.; ABBRO, L.; DINI, L. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. ***European Journal of Histochemistry***, 47: 299–308, 2003.

DANGELO, G. J.; FATTINI, A, C. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

DHAENENS, M.C.; BURNOUF, S.; SIMONIN, C.; BRUSSEL, V.E.; DUHAMEL, A.; DEFEBVRE, L.; DURU, C.; VUILLAUME, I.; CAZENEUVE, C.; CHARLES, P.; MAISON, P.; DEBRUXELLES, S.; VERNY, C.; GERVAIS, H.; AZULAY, P.J.; TRANCHAN, C. A genetic variation in the ADORA2A gene modifies age at onset in Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, 35: 474- 476, 2009.

DE PABLOS, M. R.; HERRERA A. J.; TOMA'S-CAMARDIEL, M.; MACHADO, A.; CANO, J. Deprenyl enhances the striatal neuronal damage produced by quinolinic acid. **Molecular Brain Research**, 141: 48-57, 2005.

DINIZ, P.; SHOMURA, K.; SOEJIMA, K.; ITO, G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. **Bioelectromagnetics**, 23: 398- 405, 2002.

EDWARDS, M. J.; TALELLI, P.; ROTHWELL, J. C. Clinical applications of transcranial magnetic stimulation in patients with movement disorders. **The Lancet Neurology**, 7: 827- 40, 2008.

EKMAN, L, L. **Neurociências**: fundamentos para a reabilitação. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

FANELLI, C.; COPPOLA, S.; BARONE, R.; COLUCCI, C.; GUALALDI, G.; VOLPE, P.; GHIBELLI, L. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{++} influx. ***The FASEB Journal***, 13: 95–102, 1999.

FOSTER, A.C.; COLLINS, J.F.; SCHWARCZ, R. On the excitotoxic proprieties of quinolinic acid, 2,3-pyridine dicarboxylic acid and structurally related compounds. ***Neuropharmacology***, 22: 1331-1342, 1983.

FREGNI, F.; PASCUAL-LEONE, A. Estimulação magnética transcraniana: uma nova ferramenta para o tratamento da depressão? ***Revista de Psiquiatria Clínica***, 28 (5):253-265, 2001.

GARTIZK, E.; LANGE, K. Cellular target of weak magnetic fields: ionic conduction along actin filaments of microvilli. ***American Journal of Physiology***, 283: 1333-1346, 2002.

GHIGLIERI, V.; BAGETTA, V.; CALABRESI, P.; PICCONI, B. Review: Functional interactions within striatal microcircuit in animal models of Huntington's disease. ***Neuroscience***, 211: 165-184, 2012.

GMITROV, J.; OHKUBO, C.; YAMADA, S.; GMITROVA, A.; XU, S. Static magnetic field effects on sinocarotid baroreceptor in rabbits exposed under conscious conditions. ***Bioelectromagnetics***, 14: 217- 228, 1995.

GMITROV, J.; OHKUBO, C. Static magnetic field effect on baroreflex sensitivity in rabbits. ***Bioelectromagnetics***, 17: 217- 228, 1998.

GORMAN, A. M.; MCGOWAN, A.; O'NEILL, C.; COTTER, T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. ***Journal of the Neurological Sciences***, 139: 45-52, 1996.

GUILLEMIN, G. J. Quinolinic Acid, the inescapable Neurotoxin. ***The FEBS Journal***, 279 (8):1356- 1365, 2012.

GUTMANN, P, A, D. **Estudo do efeito da lesão da substância negra pars compacta sobre a liberação de dopamine no estriado em ratos durante o teste de rotação e durante o treino na tarefa de esquiva ativa de duas vias.** 2010. 86 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

HAYASHI, T.; OHNISHI, T.; OKABE, S.; TERAMOTO, N.; NONAKE, Y.; WATABE, H.; IMANAYASHI, E.; OHTA, Y.; JINO, H.; EJIMA, N.; SAWADA, T.; IIDA, H.; MATSUDA, H.; UGAWA, Y. Long term effect of motor cortical repetitive transcranial magnetic stimulation induces. ***Annals of Neurology***, 56 (1): 77- 85, 2004.

HONG, F.T. Magnetic field effects on biomolecules, cells, and living organisms. ***Biosystems***, 36: 187–229, 1995.

HUGUES, P.E .; ALEXI, T.; WLLIAMS, C. E.; CLARK, R. G.; GLUCKMAN, P, D. Administration of recombinant human activin- A has powerful neurotrophic effects on select striatal phenotypes on the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. **Neuroscience**, 92 (1): 197- 209, 1999.

KOBIERSKA, A. L.; CIESLAR, G.; SIERON, A.; GRZYBEK, H. Influence of alternating extremely low frequency ELF magnetic field on structure and function of pancreas in rats. **Bioelectromagnetics**, 23: 49- 58, 2002.

KOCH, C. L. M. B.; SOMMARIN, M.; PERSSON, B. R. R.; SALFORD, L. G.; EBERHARDT, J. L. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. **Bioelectromagnetics**, 24: 395-402, 2003.

KOUZMINE, I. **Estudos de mecanismos dopaminérgicos, nicotínicos e adenosinérgicos em modelos de parkinsonismo induzidos por 6-Hidroxidopamina e MPTP em ratos**. 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

LANCIEGO, J. L.; LUQUIN, N.; OBESO, J. A. Funcional neuroanathomy of the basal ganglia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** 2012; doi:10.1101/cshperspect.a009621

LAZZARETTI, C. **Fatores interferentes na indução da atividade rotacional em induzida pelo teste de motricidade sobre grade em modelo animal de doença de Parkinson.** 2011. 40 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande, do Sul, Porto Alegre. 2011.

LEE, H. J.; LEE, M.J.; RAMOS, M. E.; GILLIS, T.; MYSORE, S. J.; KISHIKAWA, S.; HADZI, T.; HENDRICKS, E. A.; HAYDEN, R. M.; MORRISON, J. P.; NANCE, M.; ROSS, A. C.; MARGOLLIS, L. R.; SQUITIERI, F.; GELLERA, C.; TORTOSA, G. E.; AYUSO, C.; SUCHOWERSKY, O.; TRENT, R. J.; MCCUSKER, E.; NOVELLETTO, A.; FRONTALI, M.; JONES, R.; ASHIZAWA, T.; FRANK, S.; HILARIE, M.; HERSCH, M. S.; ROSAS, D. H.; LUCENTE, D.; HARRISON, B. M.; ZANKO, A.; ABRAMSON, K. R.; MARDER, K.; SEQUEIROS, J.; LANDWEHRMEYER, B. G.; MEYERS, H. R.; MCDONALD, E. M.; GUSELLA, F. J. T. A repeat variation in the GRIK2 gene does not influence age at onset in Huntington's disease ***Biomechanical and Biophysical Research Communication***, 424: 404-408, 2012.

LJUNGBERG, T.; UNGERSTEDT, U. Different behavioral patterns induced by apomorphine: evidence that the method of administration determines the behavioral response to the drug. ***European Journal of Pharmacology***, 46: 41-50, 1977.

LONG, D. J.; MATSON, R. W.; JUHL, R. A.; LEAVITT, R. B.; PAULSEN, S. J.; 80GdG as a marker for Huntington disease progression. ***Neurobiology of Disease***, 46: 625-634, 2012.

MENESES, S. M. **Neuroanatomia aplicada**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

NOPOULOS, C.P.; AYLWARD, H.E.; ROSS, A.C.; JOHNSON, J.H.; MAGNOTTA, A.V.; JUHL, R.A.; PIERSON, K.P.; MILLS, J.; LANGBHN, R. D.; PAULSEN, S.J. Cerebral cortex structure in promodal Huntington disease. ***Neurobiology of Disease***, 40: 544-554, 2010.

OCTAVIAN.; R; JANKOVIC.; A; JANKOVIC, J. Symptomatic treatment of Huntington Disease. ***Neurotherapeutics***, 5: 181-197, 2008.

PAULSEN, S.J.; NOPOULOS, C.P.; AYLWARD, E.; ROSS, A.C.; JOHNSON, H.; MAGNOTTA, A.V.; JUHL, A.; PIERSON, K. R; MILLS, J.; LANGBHN, D.; NANCE, PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? ***The Journal of Clinical Investigation***, 111: 3-10, 2003.

PICADA, N. J. **Efeitos da apomorfina e de um produto de sua autoxidação em diferentes modelos biológicos**. 2008. 97 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2008.

PIROZZOLI, M. C.; MARIANO, C.; LOVISOLO, G. A.; LACONI. C.; MOSIELO, L.; NEGRONI, A. Effects of 50 Hz electromagnetic field exposure on apoptosis and differentiation in a neuroblastoma cell line. ***Bioelectromagnetics***, 24 (7): 510- 316, 2003.

POWELL, S. B.; NEWMAN, H. A.; PENDERGAST, J. F.; LEWIS, M. H. A rodent model of spontaneous stereotypy: initial characterization of developmental, environmental and neurobiological factors. ***Physiology & Behavior Journal***, 66: 355- 363, 1999.

PRESTI, M. F.; POWELL, S. B.; LEWIS, M. H. Dissociation between spontaneously emitted and apomorphine- induced stereotypy in *Peromyscus maniculatus bairdii*. ***Physiology & Behavior Journal***, 75:347- 353, 2002.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? ***J. The Journal of Clinical Investigation***, 111: 3-10, 2003.

RIBEIRO, C. A. J. **Efeito da Administração Intraestriatal Aguda de Ácido Quinolínico Sobre Metabolismo Energético em Ratos Jovens**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

RODRÍGUEZ- MARTÍNEZ, E.; CAMACHO, A.; MALDONADO, D. P.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; SANTAMARÍA, D.; GALVÁN- ARZAT, S.; SANTAMARÍA, A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. ***Brain Research***, 858: 436- 439, 2000.

ROSEN, A. D. Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems. ***Biochemistry and Biophysics***, 39: 163–173, 2003.

SÁNCHEZ, S. T.; LESCOANO, B. L.; AMADOR, A. E.; ARMESTO, D. I.; FUENTE, P. N.; PEDRE, L. L.; FRAGUELA, G. E. M.; LEÓN, M. F. J.; TURNER, F. L.; VERDECIA, F. I. Establecimiento de las condiciones para el transplante de células de medula ósea em um modelo de enfermidade de Huntington y su efecto funcional a través de la conducta motora. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 13(2): 107-126, 2011.

SCHWARCZ,R.; FOSTER,A.C.; FRENCH, E.D.; WHETSELL Jr.; W.O.; KOHLER,C.; Excitotoxic models for neurodegenerative disorder. **Life Sciences**, 35: 19-32, 1984.

SCHWARCZ, R.; GUIDETTI, P.; SATHYASAIKUMAR, V.K.; MUCHOWSKY, J.P. Of mice, rats and men. Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. **Progress in Neurobiology**, 90: 230-245, 2010.

SHANNON, K. Huntington's disease and other choreas. Continuum. **Lifelong Learning in Neurology**, 10: 65-89, 2004.

SONG, J.; LEE, S.; KANG, W.; PARK, J.; CHU, K., LEE, S.; HWANG, T.; CHUM, H.; KIM, M. Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine- induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesion. **Neuroscience Letters**, 423: 58- 61, 2007.

SPITZ, M. Doença de Huntington e outras coreias. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto/ UFRJ**, 1: 29-39, 2010.

STONE, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. ***Pharmacological Reviews***, 45: 309-379, 1993.

TADAIESKY, M, T. **A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da doença de Parkinson: efeitos do antagonismo do receptor CB**. 2010. 79 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

TEIXEIRA, A. D. M. **Efeito neuroprotetor da catequina e do estresse de imobilização subcrônico na doença de Parkinson experimental**. 2011. 205 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2011.

TENFORDE, T. S. The wonders of magnetism. ***Bioelectromagnetics***, 24: 3- 11, 2004.

TEODORI, L.; GOHDE, W.; VALENTE, M. G.; TAGLIAFERRI, F.; COLETTI, D.; PERNICONI, B.; BERGAMASCHI, A.; CERELLA, C.; GHIBELLI, L. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. ***Cytometry***, 49:143–149, 2002.

TOFANI, S.; BARONE, D.; CINTORINO, M.; SANTI, M. M.; FERRARA, A.; ORLASSINO, R.; OSSOLA, P.; PEROGGIO, F.; ROLFO, K.; RONCHETTO, F. Static and ELF magnetic field induce tumor growth inhibition and apoptosis. ***Bioelectromagnetics***, 22(6): 419- 428, 2001.

YAMAMURA, I.H.; REISINE, D.T.; BEAUMONT, K. Huntington's disease: alterations in GABA and Benzodiazepine receptors in the human brain. ***Brain Research Bullettin***, 5: 773-775, 1980.