

Douglas Affonso Formolo

**EFEITO AGUDO DE DIFERENTES PARÂMETROS DE
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL PROFUNDA
UNILATERAL NA AMÍGDALA SOBRE O COMPORTAMENTO
DE RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências
Orientador: Prof. Dr. Roger Walz
Coorientador: Dr. Alexandre Ademar
Hoeller

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Formolo, Douglas Affonso

Efeito agudo de diferentes parâmetros de
estimulação elétrica cerebral profunda unilateral na
amígdala sobre o comportamento de ratos / Douglas
Affonso Formolo ; orientador, Roger Walz,
coorientador, Alexandre Ademar Hoeller , 2018.

61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Estimulação Cerebral
Profunda. I. Walz, Roger. II. Hoeller , Alexandre
Ademar. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
IV. Título.

DOUGLAS AFFONSO FORMOLO

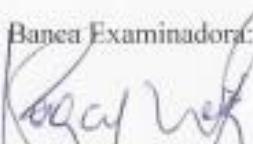
**“EFEITO AGUDO DE DIFERENTES PARÂMETROS DE
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CEREBRAL PROFUNDA
UNILATERAL NA AMÍGDALA SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

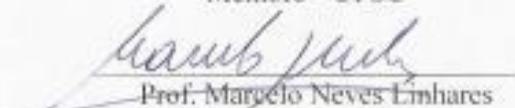
Florianópolis, 15 de fevereiro de 2018.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Roger Walz
Orientador – UFSC


Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Membro - UFSC


Prof. Marcelo Neves Linhares
Membro externo ao Programa

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a minha esposa pelo apoio e paciência em todos os momentos e aos meus pais, que auxiliaram a tornar-me a pessoa que sou hoje. Meu amor pelo trabalho e criatividade para fazê-lo herdei destes.

Sou grato a minha família, que na maior parte do tempo não faz a menor ideia do que realmente se trata o meu trabalho, mas me dá o maior apoio!! Nesta, também incluo meus amigos Carlos, Marcos e Ronan que, carinhosamente, nunca deixaram de usar um vocabulário apropriado para mostrar que estava fazendo algo errado.

Sou grato a meu Orientador e Coorientador que executaram a difícil tarefa de ter paciência! Mais importante, nunca discordaram antes de realmente terem considerado minhas ideias e, mesmo assim, nunca me desestimularam caso eu teimasse em coloca-las em prática.

Por fim, sou grato a toda a equipe que tornou esse projeto possível. Ao grupo de amigos do Laboratório de Ciências Médicas, dos quais os conselhos me pouparam o trabalho de ter de refazer uma porção de coisas. Aos alunos de iniciação científica, dos quais pude contar com a ajuda diversas vezes. E aos colegas da InPulse, que sempre estiveram disponíveis e com um desejo de inovação inspirador.

A todos, muito obrigado!!!

“Fiz esta carta mais longa porque não tive tempo
de fazê-la mais curta.”
(Blaise Pascal)

RESUMO

As doenças psiquiátricas são a principal causa de incapacidade em todo mundo. Apesar do elevado fardo social e econômico associado a estes transtornos, pouco se tem avançado em termos de tratamento. A estimulação cerebral profunda (ECP) é uma alternativa cirúrgica para modulação elétrica de estruturas profundas do sistema nervoso central, tendo sido amplamente utilizada no tratamento dos sintomas da doença de Parkinson através da estimulação do núcleo subtalâmico e globo pálido interno. A ECP da amígdala, estrutura central vinculada aos circuitos de defesa, foi recentemente proposta como alternativa terapêutica no tratamento de transtornos associados a estresse e ansiedade. O desenvolvimento de protocolos de estimulação mais específicos e eficientes é uma das principais necessidades no que se refere a ECP em neuropsiquiatria. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo investigar o efeito agudo da ECP unilateral da amígdala em duas faixas de frequência (130 e 20 Hz) e três amplitudes de corrente (10, 50 e 100 μ A) sobre o comportamento de ratos. Nas condições experimentais utilizadas neste estudo, a ECP não parece acarretar prejuízo tanto sobre a resposta defensiva como sobre a consolidação de memórias aversivas. Como a ECP da amígdala pode ser um recurso terapêutico no tratamento de transtornos associados ao estresse e ansiedade, os dados aqui apresentados contribuem de forma translacional para o aprimoramento do uso clínico da técnica de ECP.

Palavras-chave: Estimulação Cerebral Profunda. Comportamento defensivo. Memória aversiva. Transtorno de Estresse Pós-Traumático

ABSTRACT

Psychiatric diseases are the main cause of disability around the world. In spite of the high economic and social burden, the development of new treatments has been slow. The deep brain stimulation (DBS) is a surgically alternative for the modulation of deep central nervous structures, which has been widely used in the treatment of Parkinson's disease symptoms through the stimulation of the subthalamic nucleus and internal globus pallidus internus. The DBS of the amygdala, a key structure associated with the defensive system, has recently been proposed in the treatment of stress and anxiety disorders. The development of more specific and efficient stimulation protocols is one of the main necessities regarding the use of DBS in neuropsychiatry. Given so, the present study investigated the acute unilateral amygdala DBS effects using two frequency different bands (130 and 20 Hz) and three diverse current amplitudes (10, 50 e 100 μ A) over rats' behavior. Under the experimental conditions used, neither defensive behavior nor fear memory consolidation were affected by acute stimulation. As amygdala DBS is a potential therapeutic approach for the treatment of stress and anxiety disorders, these data contributes in a translational fashion for the improvement of the technique.

Keywords: Deep Brain Stimulation. Defensive behavior. Fear memory. Post-Traumatic Stress Disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conexões intrínsecas e extrínsecas do complexo amigdalóide.	22
Figura 2 – Formato de onda e parâmetros de estimulação.	25
Figura 3 – Características do eletrodo.	30
Figura 4 – Características do cabo.	30
Figura 5 – Gerador de pulso externo.	31
Figura 6 – Labirinto em Cruz Elevado.	34
Figura 7 – Campo Aberto.	35
Figura 8 – Condicionamento auditivo aversivo.	36
Figura 9 – Sistema de condicionamento.	37
Figura 10 – Avaliação da posição do eletrodo.	38
Figura 11 – Delineamento experimental da avaliação do comportamento defensivo e locomoção.	41
Figura 12 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em alta frequência sobre o comportamento defensivo de ratos no teste de LCE.	41
Figura 13 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em alta frequência sobre a locomoção de ratos no teste de CA.	42
Figura 14 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em baixa frequência sobre o comportamento defensivo de ratos no teste de LCE.	43
Figura 15 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em baixa frequência sobre a locomoção de ratos no teste de CA.	44
Figura 16 – Delineamento experimental da avaliação do condicionamento aversivo.	44
Figura 17 - Efeito da ECP em alta e baixa frequência sobre a consolidação da memória aversiva em ratos.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A fim de facilitar o entendimento de algumas abreviaturas, estas foram mantidas conforme utilizadas na língua inglesa, conforme explicitado entre parênteses.

ECP – Estimulação cerebral profunda.

BLA – Complexo basolateral da amígdala (do inglês *Basolateral complex of amygdala - BLA*).

CeA – Núcleo central da amígdala (do inglês *Central nucleus of amygdala - CeA*).

TEPT – Transtorno de estresse pós-traumático.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	JUSTIFICATIVA.....	26
1.2	HIPÓTESE.....	26
1.3	OBJETIVOS	27
1.3.1	Objetivo geral.....	27
1.3.2	Objetivos específicos	27
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	29
2.2	ANIMAIS.....	29
2.3	ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA.....	29
2.3.1	Confecção dos eletrodos.....	29
2.3.2	Confecção dos cabos.....	30
2.3.3	Gerador de pulsos externo.....	31
2.3.4	Parâmetros de estimulação.....	32
2.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAIS.....	32
2.4.1	Cirurgia estereotáxica.....	32
2.4.2	Sala de comportamento	33
2.4.3	Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	33
2.4.4	Teste de Campo Aberto (CA).....	34
2.4.5	Condicionamento auditivo aversivo	35
2.4.6	Eutanásia e verificação da posição do eletrodo	38
2.4.7	Análise estatística	39
3	RESULTADOS.....	41
3.1	EFEITOS DA AMPLITUDE DE CORRENTE NA ECP EM ALTA FREQUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO E LOCOMOÇÃO DE RATOS.	41
3.2	EFEITOS DA AMPLITUDE DE CORRENTE NA ECP EM BAIXA FREQUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO E LOCOMOÇÃO DE RATOS.	43

3.3	EFEITO DA ECP EM ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA EM RATOS.	44
4	DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO A – Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	61

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo uso terapêutico da eletricidade existe desde o momento em que foi possível produzir corrente elétrica de forma controlada, no início do século XIX (GILDENBERG, 2005; HARIZ; BLOMSTEDT; ZRINZO, 2010). Após o advento da estereotaxia, em 1947, a estimulação elétrica direta do tecido nervoso passou a ser aplicada no mapeamento das regiões corticais e identificação da posição de eletrodos em cirurgias ablativas (KRINGELBACH et al., 2007; LEWIS et al., 2016). Durante estas cirurgias, não raramente a estimulação provocava efeitos terapêuticos semelhantes ao da lesão (GILDENBERG, 2005), de tal modo que no final da década de 80 Benabid e colaboradores propuseram o seu uso no tratamento de distúrbios do movimento (BENABID et al., 1987; FAGGIANI; BENAZZOUZ, 2016; UDUPA; CHEN, 2015).

A estimulação cerebral profunda¹ (ECP), como doravante passou a ser denominada, é uma forma invasiva de estimulação elétrica através do implante de eletrodos em estruturas profundas do sistema nervoso central. Objetiva modular os circuitos associados com estas estruturas que encontram-se com funcionamento alterado (HAMANI; TEMEL, 2012; LEWIS et al., 2016). Tem sido amplamente utilizada no tratamento de transtornos do movimento, sendo a estimulação do núcleo subtalâmico ou do globo pálido interno alvos para a ECP aplicável ao tratamento de sintomas avançados da doença de Parkinson (FAGGIANI; BENAZZOUZ, 2016). A ECP também vem sendo testada clinicamente para tratamento de epilepsia, dor crônica e transtorno obsessivo-compulsivo fármaco-resistente por meio da estimulação de diversas estruturas encefálicas (FAGGIANI; BENAZZOUZ, 2016; UDUPA; CHEN, 2015).

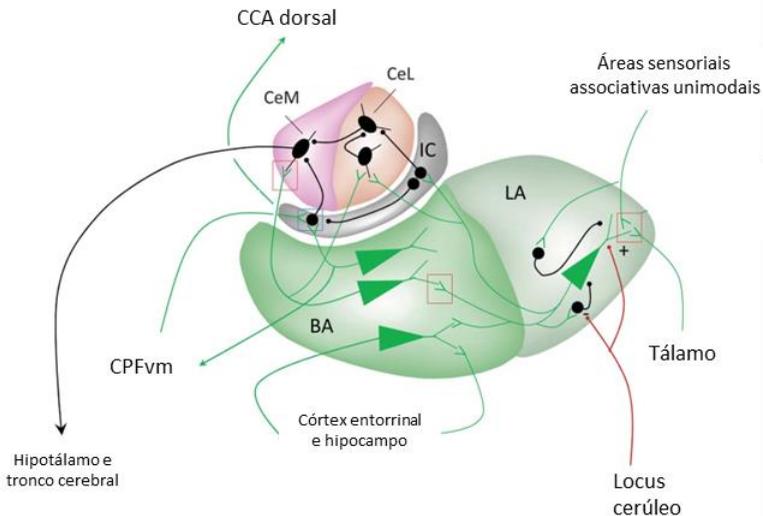
A característica de reversibilidade da ECP com possibilidade de interrupção da estimulação sem acarretar danos clinicamente relevantes à estrutura alvo tornou-a um recurso neurocirúrgico promissor também no campo da neuropsiquiatria (DIAZ et al., 2015). As doenças psiquiátricas são a principal causa de incapacidade em todo o mundo (VOS et al., 2012) e possuem elevados custos relacionados ao tratamento (GUSTAVSSON et al., 2011; SMITH, 2011). A ECP foi aprovada no tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo desde 2009, e vem sendo estudada em

¹ Compreende-se que a tradução literal do termo seria “Estimulação Encefálica Profunda”. No entanto, faremos uso do termo na forma como está traduzido em publicações de referência nacionais (DIAZ et al., 2015)

doenças como depressão refratária a medicação, síndrome de Gilles De La Tourette, síndrome de dependência e adição, obesidade, anorexia nervosa e agressividade (DIAZ et al., 2015; UDUPA; CHEN, 2015).

Dentre as estruturas investigadas, a amígdala tem sido referida como potencial alvo para neuromodulação elétrica de transtornos relacionados ao estresse (LANGEVIN, 2012). O complexo amigdalóide consiste numa série de núcleos altamente interconectados, localizados bilateralmente no córtex temporal e integrandos aos circuitos de defesa associados as emoções de ansiedade e medo (LEDOUX, 2012; PAPE; PARE, 2010). Estes núcleos podem ser divididos de maneira geral em **complexo basolateral (BLA)**, formado pelas porções lateral, basal e basomedial, e **núcleo central (CeA)**, formado pelas porções lateral e medial (SAH et al., 2003). De forma geral, informações sensoriais de diferentes modalidades convergem para a porção lateral de BLA, na qual mecanismos de plasticidade sináptica estão associados a formação de memórias aversivas. Desta região, a informação é transmitida para os núcleos basal e basomedial que se projetam para os núcleos centrais (CeA). Finalmente, CeA projeta-se ao hipotálamo e diferentes regiões do tronco cerebral que controlam as respostas autonômicas, fisiológicas e comportamentais associadas as respostas de medo e ansiedade (figura 1) (DUVARCI; PARE, 2014; PAPE; PARE, 2010). Extrinsicamente, a porção basolateral da amígdala está conectada a diferentes porções do córtex pré-frontal medial envolvidas na modulação de memórias aversivas. Também conecta-se reciprocamente com hipocampo ventral e córtex entorrinal, vinculando aspectos contextuais a estas memórias (figura 1) (DUVARCI; PARE, 2014; PAPE; PARE, 2010).

Figura 1 - Conexões intrínsecas e extrínsecas do complexo amigdalóide.



O complexo amigdalóide é uma estrutura polinucleada, ricamente conectada intrínseca e extrinsecamente. Informações de áreas associativas sensoriais e tálamo convergem na porção lateral da amígdala (LA), a qual se conecta aos núcleos basais (BA) e estes a porção medial da amígdala central (CeM). Esta, por sua vez, conecta-se ao hipotálamo e tronco cerebral, responsáveis pelas respostas autonômicas relacionadas ao estresse, ao mesmo tempo que é modulada pela porção lateral da amígdala central (CeL). A porção basal (BA) conecta-se reciprocamente com o hipocampo e córtex entorrinal, onde informações com valência emocional são adicionadas a memórias contextuais, e vice-versa. Diferentes porções do córtex medial pré-frontal, como a porção ventromeial (CPFvm) e porção dorsal do córtex cingulado anterior (CCA dorsal), conectam-se com o núcleo basal (BA) e células intercaladas (IC), responsáveis pela modulação das memórias aversivas e mecanismos de extinção (Fonte: adaptado de Benarroch [2015], tradução nossa).

A hiperatividade da amígdala e inadequado processamento inibitório decorrente de hipoatividade no córtex pré-frontal estão associados a transtornos de estresse, ansiedade e prejuízo na regulação emocional (BENARROCH, 2015; HANEY; EVINS, 2016; HAYES; HAYES; MIKEDIS, 2012; PROTOPODESCU et al., 2005). Como a ECP está associada ao bloqueio da despolarização de células próximas ao eletrodo (FLORENCE et al., 2015; MCINTYRE et al., 2004c), propôs-se em 2014 a investigação clínica da ECP da amígdala no tratamento de ex-combatentes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT)

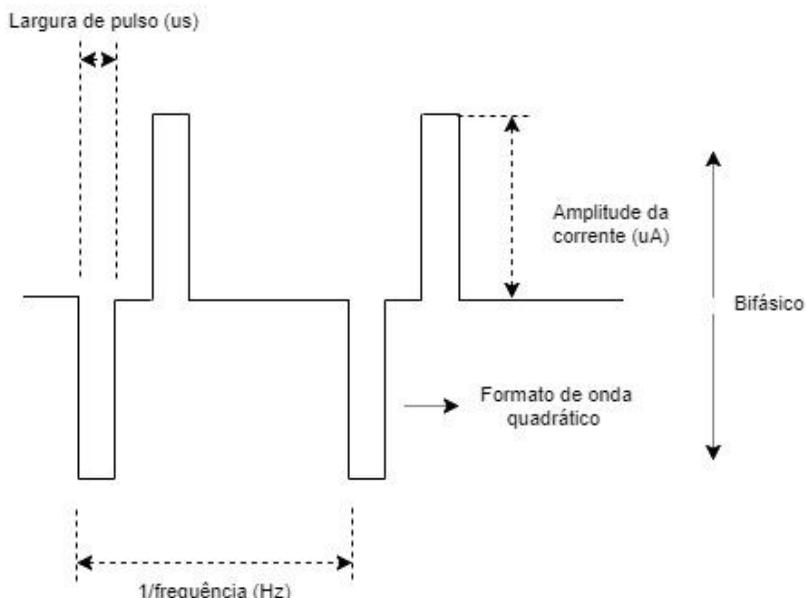
refratários aos demais tratamentos (KOEK et al., 2014; LANGEVIN et al., 2016).

Apesar dos fortes indícios quanto ao potencial benefício da ECP da amígdala no tratamento de transtornos associados ao estresse e ansiedade, os estudos experimentais não têm acompanhado a rápida expansão das pesquisas clínicas envolvendo ECP em neuropsiquiatria (HAMANI; TEMEL, 2012). Os parâmetros de estimulação da ECP da amígdala, por exemplo, tem sido baseados naqueles utilizados no tratamento dos sintomas do Parkinson por meio da estimulação do núcleo subtalâmico (KOEK et al., 2014).

A dificuldade em se identificar os parâmetros mais adequados de ECP da amígdala, bem como de outras estruturas cerebrais aplicáveis à patologias psiquiátricas, é em grande parte devido complexa interação entre as propriedades do tecido e os parâmetros de estimulação propriamente ditos, repercutindo negativamente sobre a obtenção de resultados clinicamente relevantes (BROCKER; GRILL, 2013). As características anatômicas da estrutura e a orientação das fibras em relação ao eletrodo definem o padrão de distribuição de cargas pelo tecido estimulado (BROCKER; GRILL, 2013; KUNCEL; GRILL, 2004; SATZER et al., 2015), enquanto a composição histológica do tecido define o efeito desta carga sobre os componentes celulares da estrutura alvo (BROCKER; GRILL, 2013; RANCK, 1975; UDUPA; CHEN, 2015). Apesar dos esforços de modelagem matemática (MCINTYRE et al., 2004a, 2004b), o conhecimento dos efeitos da estimulação sobre propriedades específicas de uma determinada estrutura reside em grande medida na pesquisa experimental.

Os parâmetros de estimulação dizem respeito às características do pulso elétrico que será utilizado. Um pulso elétrico refere-se a uma quantidade de corrente elétrica emitida pelo estimulador e transmitida ao tecido por meio do eletrodo. A quantidade de corrente gerada é denominada amplitude de corrente (medida em micro [μ] ou mili [m] amperes [A]), a duração da emissão desta corrente é denominada largura de pulso (dada em microssegundos [μ s]), e a quantidade de vezes com que esta corrente elétrica será aplicada num segundo é denominada de frequência (medida em Hertz [Hz]) (figura 2) (BROCKER; GRILL, 2013; KUNCEL; GRILL, 2004; PRIME et al., 2018). Quando associados as características do tecido, os parâmetros de estimulação definem em grande medida o efeito da corrente elétrica sobre a estrutura alvo bem como de estruturas distantes através de circuitos relacionados e, conseqüentemente, seu efeito clínico.

Figura 2 – Formato de onda e parâmetros de estimulação.



Dentre as características do pulso elétrico aplicado ao tecido, a amplitude de corrente refere-se a quantidade de corrente elétrica aplicada por um determinado tempo, sendo este tempo denominado de largura de pulso. A quantidade de pulsos aplicados ao longo de um segundo é denominada frequência de estimulação. Além destes parâmetros, o formato de onda (ex. quadrática) e o tipo de fase (ex. catódica, anódica ou bifásica) também interferem no efeito da estimulação. Fonte: adaptado de Drabowsky et al., (2017).

Apesar do aumento das pesquisas translacionais (KRINGELBACH et al., 2007; KÜHN; VOLKMANN, 2016), a identificação de parâmetros de estimulação mais eficientes permanece um desafio principalmente no campo da neuropsiquiatria (FITZGERALD; SEGRAVE, 2015). Como a amígdala é uma estrutura conservada evolutivamente através das espécies é de se esperar que haja certo nível de translacionalidade dos resultados (JANAK; TYE, 2015) obtidos através de sua estimulação em estudos clínicos futuros. Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito agudo de diferentes parâmetros de ECP da amígdala de ratos sobre comportamentos tradicionalmente associados à modulação por esta estrutura límbica e suas conexões.

1.1 JUSTIFICATIVA

As doenças psiquiátricas são a principal causa de incapacidade em todo o mundo (VOS et al., 2012), com elevado impacto social e econômico. Nos Estados Unidos, aproximadamente metade da população preencherá os critérios de diagnóstico para algum transtorno psiquiátrico ao longo de suas vidas (KESSLER et al., 2005). Tomando os transtornos de ansiedade como exemplo, são responsáveis por 27,6 milhões de anos perdidos em decorrência da doença (SMITH, 2014) incorrendo em um custo anual na Europa de mais de mais de €65 milhões de euros (GUSTAVSSON et al., 2011; SMITH, 2011). No entanto, o progresso no tratamento dos transtornos psiquiátricos tem se apresentado de forma lenta, senão estanque (“Thinking big in mental health”, 2018).

Em contrapartida, a ECP tem se apresentado como uma ferramenta promissora no tratamento de transtornos psiquiátricos. Conforme sugerido recentemente, uma forte relação entre pesquisa básica e clínica será fundamental para impulsionar o desenvolvimento de novos tratamentos (DILUCA; OLESEN, 2014). Especialmente no que se refere a transtornos psiquiátricos, as pesquisas experimentais assumem um papel fundamental na identificação de protocolos de estimulação mais eficientes, mecanismos de ação e novos alvos terapêuticos (HAMANI; TEMEL, 2012).

Em analogia com os efeitos da ECP em transtornos do movimento, sabe-se que sintomas como o tremor e a rigidez na Doença de Parkinson são atenuados quase imediatamente após o início da estimulação tanto do núcleo subtalâmico como do globo pálido interno (KUMAR et al., 1998; UDUPA; CHEN, 2015). Já no caso dos pacientes com distonias, a efetividade da ECP no globo pálido interno requer meses de estimulação (KUPSCH et al., 2006). Em contrapartida, na estimulação do feixe prosencefálico medial para tratamento de depressão os efeitos parecem surgir após dias de estimulação (SCHLAEPFER et al., 2013).

Até o momento apenas três estudos experimentais investigaram os efeitos da ECP da amígdala (LANGEVIN et al., 2010; STIDD et al., 2013; SUI et al., 2014) sendo que nenhum deles investigou o efeito agudo e de diferente parâmetros de estimulação. Este estudo preenche esta lacuna na literatura científica a respeito do efeito da ECP na amígdala cujos resultados tem implicações para futuros protocolos de ECP aplicáveis aos transtornos de estresse e ansiedade.

1.2 HIPÓTESE

Estudos prévios demonstraram que a expressão de comportamento tipo-hipervigilante (LANGEVIN et al., 2010; STIDD et al., 2013) e a evocação da memória aversiva (SUI et al., 2014) foi atenuada em ratos tratados cronicamente com ECP da amígdala. Em contrapartida, a expressão de comportamentos defensivos não seria afetada por meio da estimulação crônica (STIDD et al., 2013), ainda que tenha sido modulada por meio da estimulação super-aguda (1 s) da mesma estrutura em estudo anterior (SALDÍVAR-GONZÁLEZ et al., 2003). Com exceção do último estudo (SALDÍVAR-GONZÁLEZ et al., 2003), os demais utilizaram estimulação monopolar e unilateral direita de alta frequência (acima de 100 Hz) (LANGEVIN et al., 2010; STIDD et al., 2013; SUI et al., 2014)

A ECP da amígdala pode ter aplicabilidade terapêutica no caso de comportamentos sabidamente patológicos e que afetam a qualidade de vida de pacientes. Por outro lado, a ECP desta estrutura límbica poderia ter como efeito colateral a interferência sobre respostas fisiológicas e adaptativas com componente emocional relevantes para o desempenho cognitivo e, até mesmo do ponto de vista evolutivo, importantes para a preservação da espécie. Desta forma, nossa hipótese é que a estimulação unilateral de alta frequência da amígdala de ratos poderia reduzir a expressão de comportamentos defensivos bem como prejudicar a consolidação da memória aversiva nestes animais.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito agudo de diferentes parâmetros de ECP da amígdala sobre o comportamento de ratos.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito agudo de diferentes parâmetros de ECP da amígdala na expressão de comportamentos defensivos e na locomoção de ratos.
2. Identificar o efeito agudo de diferentes parâmetros de estimulação na retenção e consolidação de uma memória aversiva.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos foram desenvolvidos levando em consideração o bem-estar animal, em conformidade com as diretrizes internacionais quanto ao uso de animais em pesquisa e recomendadas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. O número de animais por experimento foi definido estatisticamente levando-se em consideração o poder do estudo e o tamanho do efeito esperado, garantindo o número mínimo necessário de animais por grupo sem comprometer os resultados. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (projeto nº 00893 – Anexo A) e acompanhados por médica veterinária designada pelo Centro de Ciências da Saúde.

2.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade aproximada de 2 a 3 meses (290 – 350 g). A estimativa do número de animais por experimento foi realizada levando-se em consideração a probabilidade de erro do Tipo 1 de até 5%, poder do estudo de 80% e o tamanho do efeito de 0.50 a 0.68, com base em dados piloto e valor padrão estabelecido para o teste de análise de variância (ANOVA) (BECK, 2013), calculados através do software G*Power (FAUL et al., 2007). Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, e mantidos no biotério setorial do Laboratório de Ciências Médicas, com temperatura controlada (22 +/- 2°C) em número de 5 animais por caixa, com um ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7:00) e livre acesso a ração e água, exceto durante experimentos (conduzidos entre as 12-18 h).

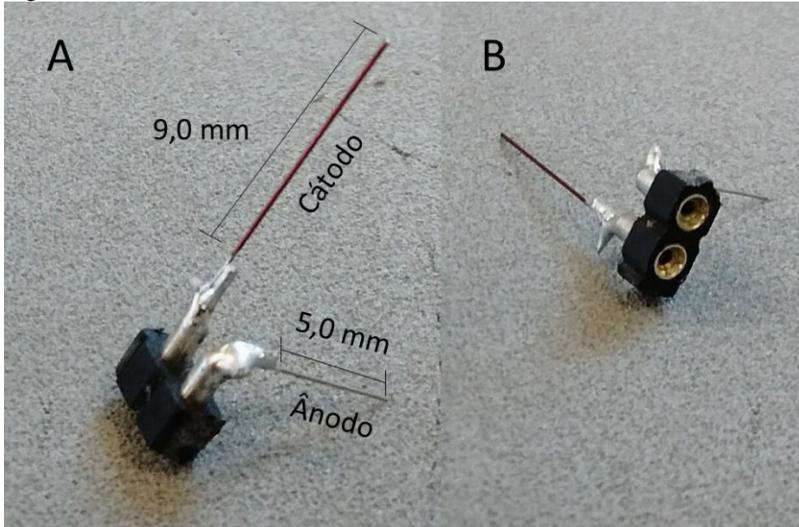
2.3 ESTIMULAÇÃO CEREBRAL PROFUNDA

2.3.1 Confeção dos eletrodos

Foi utilizado eletrodo monopolar confeccionado em nosso laboratório a partir de fio de NiCr (0,3 mm de espessura, 0,07 mm²) revestido por teflon, soldado a um micro conector de saída tipo barra-pino simples de dois canais (Figura 3). Após soldado ao microconector, o cátodo foi cortado em bisel no comprimento de 9,0 mm e o ânodo no comprimento de 5,0 mm. Após inserção do cátodo na estrutura de

interesse por meio de procedimento estereotáxico (vide descrição a seguir), o ânodo foi soldado a um microparafuso de aço inox fixado no crânio do animal.

Figura 3 – Características do eletrodo.

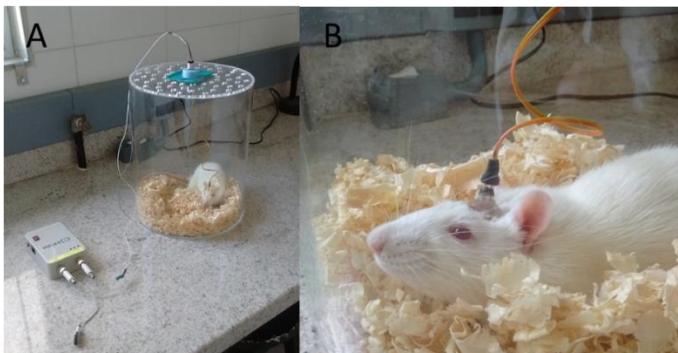


A) vista lateral; B) vista inferior. Fonte: Imagem produzida pelo autor.

2.3.2 Confeção dos cabos

Os cabos utilizados para conectar o gerador de pulso externo ao eletrodo foram confeccionados a partir de fio tipo flat duplo, soldado a um anel giratório (tipo *slip ring*) para permitir livre movimentação do animal) e, deste, a um microconector de saída complementar (tipo barrapino simples de dois canais) (Figura 4).

Figura 4 – Características do cabo.

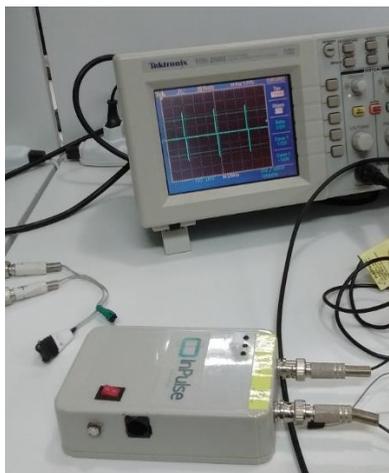


Fonte: Imagem produzida pelo autor.

2.3.3 Gerador de pulsos externo

Utilizou-se como estimulador um gerador de pulsos externo de dois canais, fabricado e cedido pela empresa InPulse (Brasil, SC) para realização dos experimentos (figura 5). O equipamento gera ondas quadráticas bifásicas com amplitude de corrente, largura de pulso e frequência de estimulação conforme definidos para cada experimento.

Figura 5 – Gerador de pulso externo.



Fonte: Imagem produzida pelo autor.

2.3.4 Parâmetros de estimulação

Os parâmetros de estimulação testados levaram em consideração os valores de referência comumente aplicados na clínica (UDUPA; CHEN, 2015) e a densidade de carga gerada, respeitando-se os limites recomendados de $30 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ (BROCKER; GRILL, 2013; KUNCEL; GRILL, 2004; PRIME et al., 2018). Enquanto a largura de pulso manteve-se constante para todos os experimentos ($90 \mu\text{s}$), foram testadas duas faixas de frequência diferentes: 130 e 20 Hz, definidas respectivamente como alta e baixa frequência. Para cada faixa de frequência, foram testadas três diferentes amplitudes de corrente: 10, 50 ou $100 \mu\text{A}$.

Levando-se em consideração o uso de eletrodo monopolar com área de $0,07 \text{ mm}^2$ e largura de pulso de $90 \mu\text{s}$, a estimativa de densidade de carga gerada por cada amplitude de corrente foi (PRIME et al., 2018):

- $10 \mu\text{A} = 1,27 \mu\text{C}/\text{cm}^2$
- $50 \mu\text{A} = 6,36 \mu\text{C}/\text{cm}^2$
- $100 \mu\text{A} = 12,73 \mu\text{C}/\text{cm}^2$

A amplitude de corrente máxima permitida para este protocolo, seguindo os valores recomendados de segurança, seria de $235,67 \mu\text{A}$.

O tempo de estimulação em todos os protocolos foi de 10 minutos, definido em função das limitações operacionais do equipamento (capaz de estimular um animal por vez). Este tempo de estimulação é considerado suficiente para a obtenção de respostas clinicamente relevantes sobre sintomas cuja resposta terapêutica é observada rapidamente em pacientes com Doença de Parkinson, como o tremor e a rigidez.

2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAIS

2.4.1 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com cetamina ($100 \text{ mg}/\text{kg}$, i.p.) e xilazina ($10 \text{ mg}/\text{kg}$) e após verificada a perda total dos reflexos pelo pinçamento das patas posteriores, procedeu-se à tricotomia da parte superior da cabeça do animal. Os ratos foram imobilizados em aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. USA) através das barras auriculares e grampo nasal. Realizou-se a assepsia da região superior da cabeça com álcool iodado seguido pela injeção subcutânea de solução de lidocaína 2% com norepinefrina, visando formação de púpula com efeito anestésico local e orientação na retirada de uma pequena área ovalada de pele. Em

seguida, realizou-se a raspagem do periósteo, deixando a calota craniana exposta. Esta, por sua vez, foi perfurada com broca odontológica para inserção de eletrodo monopolar (cátodo) na amígdala basolateral direita, seguido pela fixação de parafuso de aço inoxidável soldado ao ânodo do eletrodo. As coordenadas estereotáxicas para amígdala basolateral foram inicialmente definidas conforme atlas de Paxinos e Watson (1997) (2,8 mm anterior ao bregma, 5,0 mm lateral direito e 8,5 mm ventral) e reajustadas ao longo dos experimentos para 1,8 mm anterior ao bregma, 4,9 mm lateral direito e 8,6 mm ventral, conforme a melhora da margem de acerto em relação ao posicionamento do eletrodo avaliado *post-mortem*. Uma vez implantado o eletrodo, a área exposta foi preenchida com camada de acrílico autopolimerizante. Após a cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa para a recuperação, dotada de uma lâmpada de 40 W, a fim de evitar a hipotermia consequente da anestesia geral. Posteriormente, os animais foram realocados em suas caixas casa, onde permaneceram por pelo menos cinco dias para recuperação pós-cirúrgica.

2.4.2 Sala de comportamento

Os experimentos foram realizados na sala de comportamento do Laboratório de Ciências Médicas, com temperatura e luminosidade controladas, na fase clara do ciclo claro-escuro dos animais. Esta sala de comportamentos conta com uma antessala, isolada do local onde foram realizados os testes comportamentais, para ambientação e manejo dos animais.

2.4.3 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE consiste num aparato em forma de cruz, composto por dois braços abertos opostos um ao outro, com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, elevados 40 cm do chão; e dois braços fechados por paredes elevadas, opostos um ao outro e de iguais dimensões. No centro, uma plataforma de 10 cm² conecta os 4 braços (Figura 6). Presume-se que os braços abertos e elevados provoquem aversão inata (não condicionada) nos animais, levando a uma preferência pela exploração e permanência nos braços fechados, e que este comportamento de evitação corresponda a um comportamento defensivo em resposta as condições aversivas dos braços abertos – razão pela qual o teste é sensível a investigação de fármacos com potencial ansiolítico (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; PELLOW et al., 1985).

Figura 6 – Labirinto em Cruz Elevado.



Fonte: adaptado de <http://insightltda.com.br>

No presente estudo, imediatamente após a estimulação os animais foram colocados individualmente na plataforma central do aparato, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, para exploração livre por 5 minutos (PELLOW et al., 1985). O comportamento foi gravado por meio de sistema de vídeo monitoramento, sendo posteriormente contabilizadas as variáveis espaço-temporais: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados (considerando-se como entrada o momento em que o animal situa-se com as quatro patas no novo braço do aparato); e medidas etológicas de avaliação de risco e exploração: imersão de cabeça desprotegida, estiramento corporal protegido, comparecimento nas extremidades dos braços abertos, comportamentos de levantamento e autolimpeza (RODGERS; DALVI, 1997). Entre um animal e outro o aparato foi limpo com solução de álcool 10%.

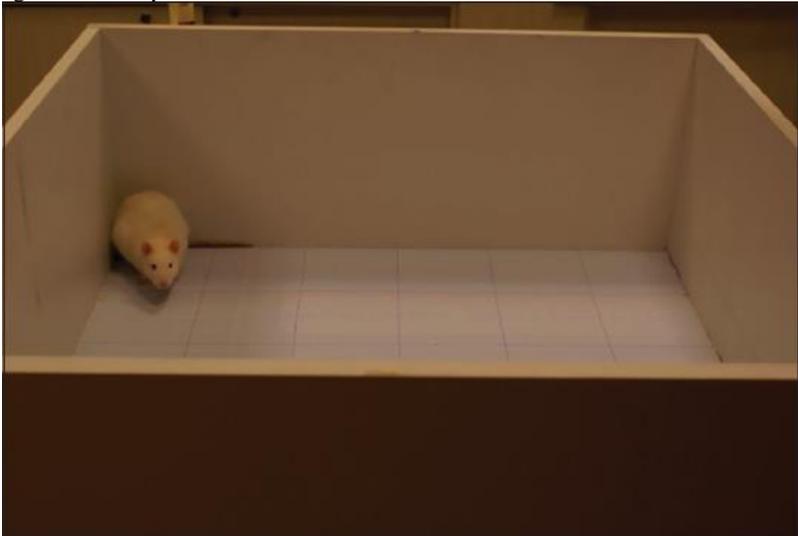
2.4.4 Teste de Campo Aberto (CA)

No presente estudo, o teste foi utilizado com o intuito de avaliar a atividade locomotora do animal (distância percorrida e velocidade média), dado que intervenções que possam interferir na atividade locomotora podem ser um viés na observação dos demais comportamentos defensivos (SCHWARZBOLD et al., 2010).

O aparato consiste numa arena com dimensões de 1 m², fechada por paredes de 40 cm de altura e confeccionada em madeira, pintada com tinta acrílica automotiva cinza a fim de contrastar com a cor do animal (Figura 7).

No presente trabalho, o teste de CA foi realizado em seguida ao teste de LCE. No início do experimento, o animal foi colocado no canto inferior esquerdo do aparato e seu comportamento registrado através de sistema de vídeo-monitoramento por 5 minutos (SUAREZ; GALLUP, 1981). As gravações foram avaliadas por meio do software ANY-MAZE® (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA), levando em consideração: distância percorrida e velocidade média (CUMMINS; WALSH, 1976; SUAREZ; GALLUP, 1981). Entre um animal e outro, o aparato foi limpo com solução de álcool 10%.

Figura 7 – Campo Aberto.



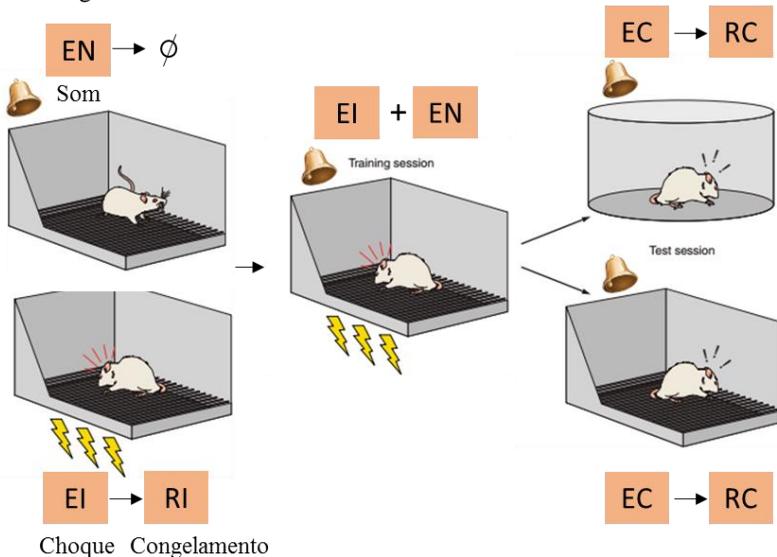
Fonte: adaptado de Mahmoudi et al. (2017)

2.4.5 Condicionamento auditivo aversivo

O condicionamento auditivo aversivo é uma forma de condicionamento clássico (PAVLOV, 1927) envolvendo a aprendizagem associativa entre um estímulo biologicamente neutro (EN) e um estímulo incondicionalmente aversivo (EI), através da associação temporal entre

ambos os estímulos (Figura 8) (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). A retenção e consolidação desta memória aversiva é dependente de mecanismos de plasticidade sináptica que ocorrem na porção lateral da amígdala basolateral (PAPE; PARE, 2010).

Figura 8 – Condicionamento auditivo aversivo.



À esquerda, superior, o animal apresentado a um estímulo biologicamente neutro (EN – som) não expressa resposta comportamental específica. À esquerda, inferior, o animal apresentado a um estímulo incondicionalmente aversivo (EI – choque nas patas), apresenta uma resposta incondicionada de defesa (RI – comportamento de congelamento). No centro, o emparelhamento temporal do EI com o EN (condicionamento clássico) caracteriza a sessão de treino. Após a sessão de treino, o EN passa a ser denominado de estímulo condicionado (EC) e a resposta incondicionada de resposta condicionada (RC). A formação de memória associativa entre EI e EC é avaliada por meio da evocação da RC na presença exclusivamente do EC, denominadas sessões de teste (a direita, superior e inferior). Fonte: adaptado de Izquierdo, Furini e Myskiw (2016).

Neste estudo, a resposta condicionada (RC) observada para avaliar o grau de associação entre EC e EI foi o comportamento de congelamento (ausência de qualquer movimento com exceção da respiração) (CURZON; RUSTAY; BROWMAN, 2009; IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). Um som contínuo (100 dB, 10 s), tocado por 10 s foi utilizado como EC (pista sonora), e choque nas patas (~0,7 mA, 1 s) como EI (GAZARINI et al., 2015). Ainda que uma pista sonora tenha sido

definida como EC, o hipocampo codifica simultaneamente informações contextuais que são vinculadas ao EC (ABEL et al., 1997; PHILLIPS; LEDOUX, 1992). Por esta razão, o tempo de congelamento frente a exposição do animal apenas ao contexto também foi discriminado (descrito a seguir).

Para realização do condicionamento, fez-se uso do sistema de condicionamento clássico (Insight, modelo EP 107C, Brasil), dotado de uma caixa de condicionamento (26 x 26 x 30cm) com chão gradeado e conectada a um gerador de choques (Figura 9). Utilizou-se o seguinte protocolo:

- Sessão de treino: após colocado na caixa de condicionamento, contou-se 2 min e 50 s para familiarização do animal com o ambiente e a formação de memória espacial relacionada ao contexto. Durante este período, contabilizou-se o tempo dispendido no comportamento de congelamento, analisado como nível basal (não associativo) desta resposta frente a exposição a ambientes novos (CURZON; RUSTAY; BROWMAN, 2009). Passados 2 min e 50 s, o animal foi apresentado ao EC (som, 100 dB, 10 s) associado ao EI (choque nas patas, ~0,7 mA, 1 s) no último segundo. Após 30 s, o animal recebeu o EI (choque), porém sem apresentação do EC. A sessão de treino durou 4 min.
- Intervenção na consolidação: passados 30 s do segundo choque, o animal foi retirado da caixa de condicionamento e submetido a ECP na caixa de estimulação, dessa forma objetivando intervir no processo de consolidação da memória.
- Sessões de teste: os animais foram submetidos a uma sessão de teste de retenção memória contextual de curta duração (reexposição apenas ao contexto) 2 h após a sessão de treino. No dia seguinte (24 h após a sessão de treino) foram submetidos a sessão de teste da memória de longa duração, sendo apresentados também ao estímulo sonoro (EC). As sessões de teste tiveram a mesma duração do treino.

O tempo de comportamento de congelamento foi convertido e posteriormente analisado como porcentagem do tempo total.

Figura 9 – Sistema de condicionamento.



Fonte: adaptado de <http://insightltda.com.br>

2.4.6 Eutanásia e verificação da posição do eletrodo

Finalizado os experimentos, os animais foram eutanasiados por meio de guilhotina sob anestesia. Após eutanásia, o tecido circundante ao local de inserção do eletrodo foi lesionado por eletrólise decorrente da aplicação de corrente elétrica contínua (7,5 mA por 15 s), possibilitando fácil visualização da posição do eletrodo. Após eletrocauterização, os encéfalos foram isolados e fixados em solução de paraformoldeído 4% por 48 h. Posteriormente, foram cortados em fatias de 100 μ m por meio de vibrátomo, sendo as fatias fotografadas e analisadas em comparação com o atlas de Paxinos e Watson (1997) para ratos (figura 10). Consideraram-se apenas os animais com a marcação do eletrodo entre as fatias 2,3 e 3,6 (anterior ao Bregma), posicionado dentro do perímetro do complexo basolateral (Figura 12).

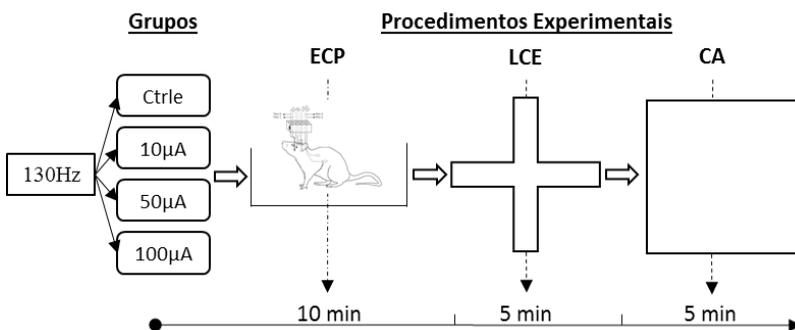
Figura 10 – Avaliação da posição do eletrodo.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITOS DA AMPLITUDE DE CORRENTE NA ECP EM ALTA FREQUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO E LOCOMOÇÃO DE RATOS.

Os animais foram separados em quatro grupos de acordo com as diferentes amplitudes de corrente com a qual foram estimulados numa frequência de 130 Hz (Controle, 10, 50 e 100 μ A). Após ECP, foram imediatamente submetidos aos testes de LCE e CA (Figura 11).

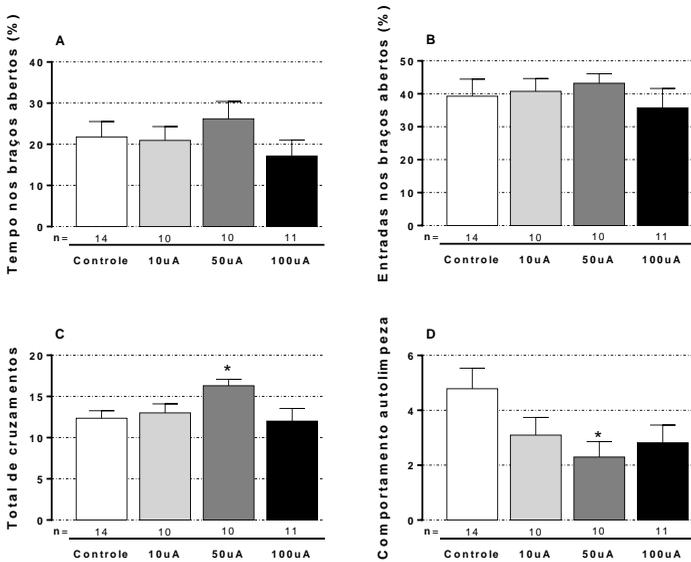
Figura 11 – Delineamento experimental da avaliação do comportamento defensivo e locomoção.



Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo ANOVA de uma via tendo como fator as intensidades de corrente, não foram encontradas diferenças na porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos (Figura 12 A-B). Em contrapartida, o grupo estimulado com 50 μ A aumentou o número total de cruzamentos ($F(3, 41) = 2,9, p = 0,05$), bem como diminuiu a frequência de comportamentos de autolimpeza ($F(3, 41) = 2,8, p = 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 12 C-D). Os comportamentos de imersão de cabeça desprotegida, estiramento corporal protegido, frequência de comparecimento nas extremidades dos braços abertos e comportamento de levantamento não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (dados não apresentados).

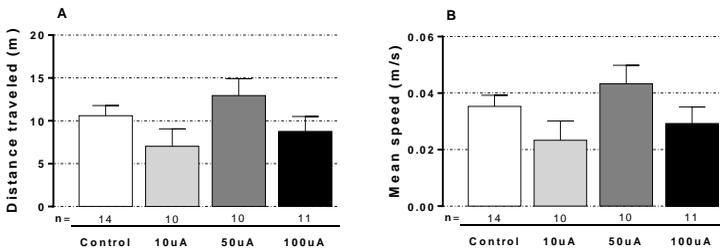
Figura 12 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em alta frequência sobre o comportamento defensivo de ratos no teste de LCE.



Resultados apresentados em forma de média, acompanhados do erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma via seguido por teste post hoc de Dunnet (todos os grupos Vs Controle). * $p \leq 0,05$ em relação ao Controle; n de 10 a 14 por grupo, especificado abaixo de cada coluna.

No que se refere ao impacto do tratamento sobre a locomoção no teste de CA, ANOVA de uma via não revelou diferenças entre os grupos quanto à distância total percorrida e velocidade média no teste de CA (Figura 13 A-B).

Figura 13 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em alta frequência sobre a locomoção de ratos no teste de CA.



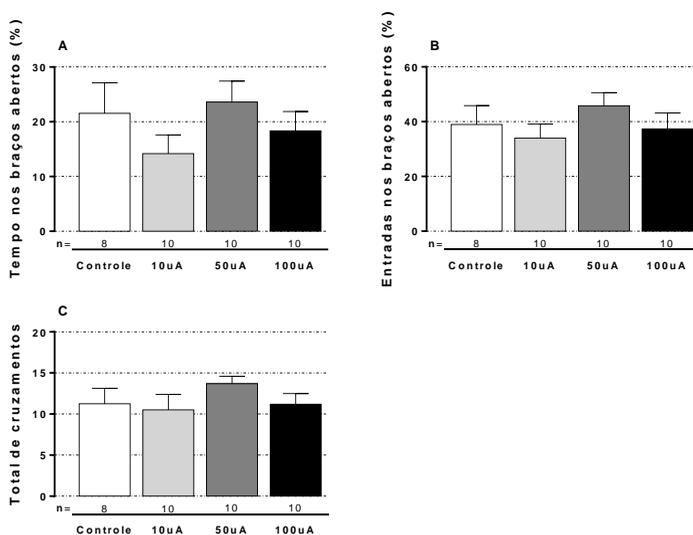
Resultados apresentados em forma de média, acompanhados do erro padrão da

média, analisados por meio de ANOVA de uma via; n de 10 a 14 por grupo, especificado abaixo de cada coluna.

3.2 EFEITOS DA AMPLITUDE DE CORRENTE NA ECP EM BAIXA FREQUÊNCIA SOBRE O COMPORTAMENTO DEFENSIVO E LOCOMOÇÃO DE RATOS.

Conforme experimento anterior, os animais foram separados em quatro grupos de acordo com a amplitude de corrente, porém foram estimulados com baixa frequência (20 Hz), e submetidos aos testes de LCE e CA (figura 11, frequência em 20 Hz). Conforme ANOVA de uma via tendo como fator as intensidades de corrente, não foram encontradas diferenças na porcentagem de tempo ou de entrada nos braços abertos, tampouco no número total de cruzamentos (Figura 14 A-c). Também não houve diferença na expressão dos demais comportamentos etológicos (dados não apresentados) avaliados no teste de LCE.

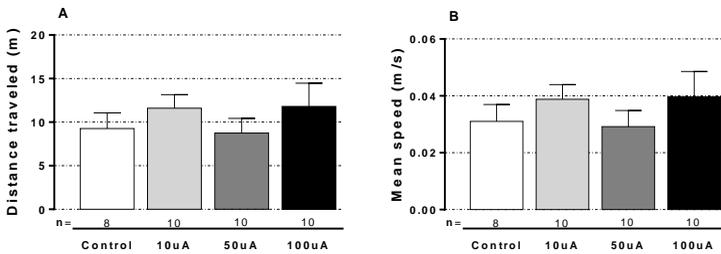
Figura 14 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em baixa frequência sobre o comportamento defensivo de ratos no teste de LCE.



Resultados apresentados em forma de média, acompanhados do erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma via; n de 8 a 10 por grupo, especificado abaixo de cada coluna.

Em relação aos efeitos da estimulação sobre a locomoção, não houveram diferenças entre os grupos quanto à distância total percorrida e velocidade média no teste de CA (Figura 15 A-B).

Figura 15 - Efeitos da amplitude de corrente na ECP em baixa frequência sobre a locomoção de ratos no teste de CA.



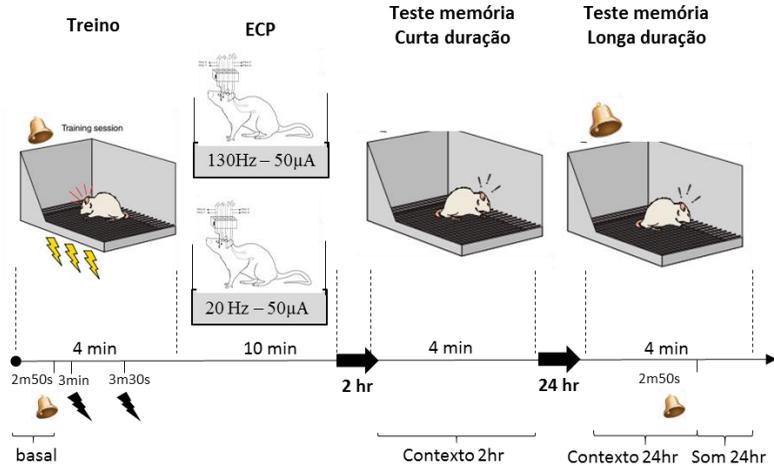
Resultados apresentados em forma de média, acompanhados do erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma via; n de 8 a 10 por grupo, especificado abaixo de cada coluna.

3.3 EFEITO DA ECP EM ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA EM RATOS.

Os efeitos da ECP em alta (130 Hz) ou baixa frequência (20 Hz) sobre a consolidação da memória aversiva de ratos foram avaliados utilizando-se uma amplitude de corrente de 50 μ A, tendo como base seus efeitos nos experimentos anteriores. Foram realizados dois experimentos, um para alta e outro para baixa frequência, cada qual com um grupo Controle (Figura 16).

Figura 16 – Delineamento experimental da avaliação do condicionamento aversivo.

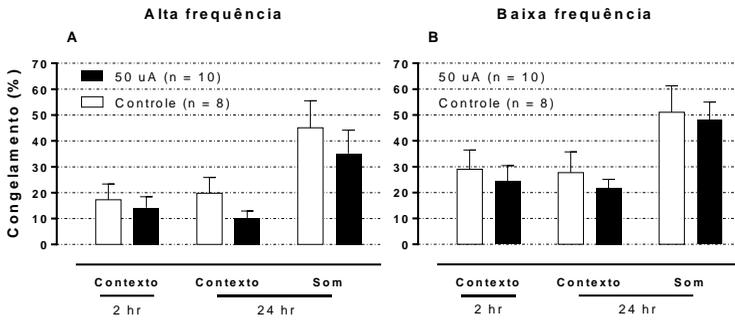
Procedimentos Experimentais



Fonte: imagens adaptadas de Izquierdo, Furini e Myskiw (2016), esquema elaborado pelo autor.

Conforme Teste *t* de *Student*, não houve diferença na expressão do comportamento de congelamento basal entre os grupos (dados não apresentados). Conforme ANOVA de uma via com medidas repetidas (estimulação como fator), a estimulação em 50 μA , tanto em alta quanto em baixa frequência, não alterou significativamente a expressão do comportamento de congelamento comparado aos animais controle (Figura 17 A-B).

Figura 17 - Efeito da ECP em alta e baixa frequência sobre a consolidação da memória aversiva em ratos.



Resultados apresentados em forma de média e acompanhados do erro padrão da média. Não houve diferença na expressão do comportamento de congelamento basal entre os grupos (dados não apresentados). Dados analisados por meio de ANOVA de uma via com medidas repetidas (estimulação como fator); n de 8 a 10 por grupo.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a investigar o efeito agudo de diferentes parâmetros de ECP da amígdala sobre o comportamento em animais. Contrário à hipótese inicial, os resultados apresentados sugerem que a expressão de comportamentos defensivos, locomoção e consolidação da memória aversiva em ratos não são afetados pela ECP aguda da amígdala, independente da frequência ou densidade de carga utilizadas.

Os mecanismos de ação da ECP permanecem parcialmente desconhecidos, mas sugere-se que seus efeitos se deem a curto e longo prazo. Acredita-se que a interação entre diferentes propriedades do tecido e o campo elétrico de estimulação resulte na inibição de componentes celulares próximos ao eletrodo (corpos celulares) e ativação de componentes distantes (fibras mielinizadas), gerando um complexo de inibição e ativação com resultados a curto e longo prazo (FLORENCE et al., 2015; MCINTYRE et al., 2004c; RANCK, 1975; UDUPA; CHEN, 2015).

Apesar do comportamento de ratos não ter sido agudamente afetado pela estimulação da amígdala (conforme aqui demonstrado), o efeito agudo da ECP tem sido experimentalmente demonstrado na estimulação de outras estruturas. Quando aplicada no fórnix durante a execução de uma tarefa espacial (7 min), a ECP reverte o efeito induzido por escopolamina (antagonista de receptores colinérgicos) (HESCHAM et al., 2013). Cogita-se que tal efeito possa estar associado ao aumento dos níveis de acetilcolina no hipocampo, que atingem um pico após 20 min de estimulação do fórnix (HESCHAM et al., 2016). Não obstante a ECP aguda desta estrutura também possa resultar em melhora da memória espacial a longo prazo, especula-se que tal efeito seja independente de aumento da neurogênese hipocampal (HESCHAM et al., 2017). Em contrapartida, a estimulação aguda do núcleo anterior do tálamo (1 h) aumenta a neurogênese associada ao giro denteado (TODA et al., 2008) e melhora a performance de animais tratados com corticosterona em tarefa espacial 28 dias após a ECP (HAMANI et al., 2011).

Dessa forma, levantamos a hipótese de que nossos sejam, em parte, devido à estimulação apenas unilateral da amígdala. Apesar deste modelo ter sido previamente demonstrada como suficiente para modulação de comportamento defensivo e memória aversiva em ratos (LANGEVIN et al., 2010; STIDD et al., 2013; SUI et al., 2014), tais estudos fizeram uso de protocolos de estimulação crônica (4h/dia ao longo de 7 dias).

É igualmente importante considerar a hipótese de que o efeito biológico da estimulação aguda desta estrutura seja rapidamente interrompido após encerrada a ECP. Como mencionando anteriormente, tal qual no controle dos sintomas motores da doença de Parkinson por meio da estimulação do núcleo subtalâmico (KUMAR et al., 1998), é possível que o putativo efeito da ECP da amígdala seja rapidamente revertido após encerrada a estimulação. No protocolo por nós aplicado, o intervalo entre o fim da estimulação e o teste de LCE foi de aproximadamente 1 min, sendo em média de 10 min para o CA. Conforme demonstrado por Rodriguez-Romaguera, Monte e Quirk (2012), a melhora da evocação da memória de extinção associada a ECP da porção dorsal do estriado ventral evidenciou-se apenas quando a estimulação foi realizada em conjunto com o protocolo de extinção, permanecendo inalterada quando os animais foram estimulados antes ou depois.

Desta forma, sugere-se que estudos futuros investiguem os efeitos da ECP bilateral da amígdala, avaliando os aspectos comportamentais tanto em função do tempo de estimulação quanto durante o período da estimulação.

Não obstante, é necessário levar em consideração que o efeito decorrente da estimulação da amígdala possa ser dependente de mecanismos de plasticidade associados a estimulação crônica (FLORENCE et al., 2015; HAMANI; TEMEL, 2012). A exemplo do tratamento da distonia por meio da estimulação do globo pálido interno (KUPSCH et al., 2006), é possível que a ECP da amígdala leve meses para apresentar melhora clínica. De fato, os resultados preliminares do tratamento do TEPT identificaram uma melhora clinicamente relevante nos sintomas após 5 meses de ECP bilateral da amígdala (LANGEVIN et al., 2016). Neste sentido, o fato da estimulação unilateral aqui testada não ter afetado agudamente a expressão de comportamentos defensivos, tampouco a retenção e consolidação da memória aversiva, sugere a preservação de mecanismos naturais de defesa em protocolos de tratamento por meio de ECP da amígdala. No entanto, futuras investigações envolvendo protocolos crônicos de estimulação bilateral são necessários para confirmar tal hipótese.

Apesar do potencial terapêutico associado a ECP da amígdala no tratamento de transtornos de estresse e ansiedade (BARI et al., 2014; LAVANO et al., 2018; REZNIKOV; HAMANI, 2017; TAGHVA et al., 2013), poucos estudos tem oferecido embasamento experimental para o cenário clínico (LANGEVIN et al., 2010; STIDD et al., 2013; SUI et al., 2014). Sugere-se que uma forte associação entre pesquisa básica e clínica seja a melhor forma de se contrapor ao elevado impacto econômico e

social dos transtornos psiquiátricos (DILUCA; OLESEN, 2014). O desenvolvimento de novos parâmetros de pulso e de estimulação figura entre os cinco fatores centrais sugeridos para o aprimoramento dos efeitos da ECP por meio da investigação translacional (KÜHN; VOLKMANN, 2016). Desta forma, os dados aqui apresentados contribuem para o aprimoramento do uso clínico da técnica de ECP, ao mesmo tempo em que sugerem perguntas relevantes para o avanço das pesquisas experimentais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a ECP unilateral da amígdala pelo período de 10 minutos, utilizando-se de eletrodo monopolar, não afeta a expressão de comportamentos defensivos ou a consolidação da memória aversiva de ratos, independente da frequência ou densidade de carga gerada (até $12,73 \mu\text{C}/\text{cm}^2$). Levanta-se a hipótese de que tais resultados possam ser decorrentes do modelo de estimulação unilateral utilizado ou de um efeito biológico dependente de estimulação contínua. Estudos adicionais são necessários para o esclarecimento de tais hipóteses.

Nas condições experimentais utilizadas neste estudo, a ECP não parece acarretar prejuízo tanto sobre a resposta defensiva como sobre a consolidação de memórias aversivas. Como a ECP da amígdala pode ser um recurso terapêutico no tratamento de transtornos associados ao estresse e ansiedade, os dados aqui apresentados contribuem de forma translacional para o aprimoramento do uso clínico da técnica de ECP, ao mesmo tempo em que sugerem perguntas relevantes para o avanço das pesquisas experimentais.

REFERÊNCIAS

- ABEL, T. et al. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 615–626, 1997.
- BARI, A. et al. Limbic Neuromodulation. Implications for Addiction, Posttraumatic Stress Disorder, and Memory. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 1387–145, 2014.
- BECK, T. W. The Importance of A Priori Sample Size Estimation in Strength and Conditioning Research. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 27, n. 8, p. 2323–2337, 2013.
- BENABID, A. L. et al. Combined (Thalamotomy and Stimulation) Stereotactic Surgery of the VIM Thalamic Nucleus for Bilateral Parkinson Disease. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 50, n. 1–6, p. 344–346, 1987.
- BENARROCH, E. E. The amygdala: Functional organization and involvement in neurologic disorders. **Neurology**, v. 84, n. 3, p. 313–324, 20 jan. 2015.
- BROCKER, D. T.; GRILL, W. M. Principles of electrical stimulation of neural tissue. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 116p. 3–18.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.
- CUMMINS, R. A.; WALSH, R. N. The Open-Field. p. 482–504, 1976.
- CURZON, P.; RUSTAY, N. R.; BROWMAN, K. E. **Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2009.
- DIAZ, A. P. et al. Estimulação cerebral profunda nas doenças psiquiátricas resistentes ao tratamento. In: CARVALHO, A. F.; NARDI, A. E.; QUEVEDO, J. (Eds.). **Transtornos psiquiátricos resistentes ao tratamento - diagnóstico e manejo**. Porto Alegre: Artmed, 2015. p. 288–309.
- DILUCA, M.; OLESEN, J. The cost of brain diseases: A burden or a challenge? **Neuron**, v. 82, n. 6, p. 1205–1208, 2014.

DUVARCI, S.; PARE, D. Amygdala Microcircuits Controlling Learned Fear. **Neuron**, v. 82, n. 5, p. 966–980, jun. 2014.

FAGGIANI, E.; BENAZZOUZ, A. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: From history to the interaction with the monoaminergic systems. **Progress in Neurobiology**, 2016.

FAUL, F. et al. G*Power: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, n. 2, p. 175–191, 2007.

FITZGERALD, P. B.; SEGRAVE, R. A. Deep brain stimulation in mental health: Review of evidence for clinical efficacy. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 49, n. 11, p. 979–93, 2015.

FLORENCE, G. et al. Deep Brain Stimulation: More Complex than the Inhibition of Cells and Excitation of Fibers. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, p. Epub ahead of print, 2015.

GAZARINI, L. et al. PTSD-Like Memory Generated Through Enhanced Noradrenergic Activity is Mitigated by a Dual Step Pharmacological Intervention Targeting its Reconsolidation. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, p. pyu026-pyu026, 2015.

GILDENBERG, P. L. Evolution of neuromodulation. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 83, n. 2–3, p. 71–79, 2005.

GUSTAVSSON, A. et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 10, p. 718–779, 2011.

HAMANI, C. et al. Memory rescue and enhanced neurogenesis following electrical stimulation of the anterior thalamus in rats treated with corticosterone. **Experimental Neurology**, v. 232, n. 1, p. 100–104, 2011.

HAMANI, C.; TEMEL, Y. Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disease: Contributions and Validity of Animal Models. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 142, p. 142rv8-142rv8, 2012.

HANEY, M.; EVINS, A. E. Does Cannabis Cause, Exacerbate or Ameliorate Psychiatric Disorders? An Oversimplified Debate Discussed. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 2, p. 393–401, 2016.

HARIZ, M. I.; BLOMSTEDT, P.; ZRINZO, L. Deep brain stimulation between 1947 and 1987: the untold story. **Neurosurgical focus**, v. 29, n.

2, p. E1, 2010.

HAYES, J. P.; HAYES, S. M.; MIKEDIS, A. M. Quantitative meta-analysis of neural activity in posttraumatic stress disorder. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 2, n. 1, p. 9, 2012.

HESCHAM, S. et al. Deep brain stimulation of the forniceal area enhances memory functions in experimental dementia: The role of stimulation parameters. **Brain Stimulation**, v. 6, n. 1, p. 72–77, 2013.

HESCHAM, S. et al. Fornix deep brain stimulation enhances acetylcholine levels in the hippocampus. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 8, p. 4281–4286, 2016.

HESCHAM, S. et al. Fornix deep brain stimulation induced long-term spatial memory independent of hippocampal neurogenesis. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 2, p. 1069–1075, 2017.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284–292, 2015.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions' of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593–602, 2005.

KOEK, R. J. et al. Deep brain stimulation of the basolateral amygdala for treatment-refractory combat post-traumatic stress disorder (PTSD): study protocol for a pilot randomized controlled trial with blinded, staggered onset of stimulation. **Trials**, v. 15, n. 1, p. 356, 10 dez. 2014.

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

KÜHN, A. A.; VOLKMANN, J. Innovations in deep brain stimulation methodology. **Movement Disorders**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2016.

KUMAR, R. et al. Double-blind evaluation of subthalamic nucleus deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, n. 3, p. 850–855, 1 set. 1998.

KUNCCEL, A. M.; GRILL, W. M. Selection of stimulus parameters for deep brain stimulation. **Clinical Neurophysiology**, v. 115, n. 11, p. 2431–2441, nov. 2004.

KUPSCH, A. et al. Pallidal Deep-Brain Stimulation in Primary Generalized or Segmental Dystonia. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 19, p. 1978–1990, 9 nov. 2006.

LANGEVIN, J. The amygdala as a target for behavior surgery. **Surgical Neurology International**, v. 3, n. 2, p. 40, 2012.

LANGEVIN, J.-P. et al. Deep brain stimulation of the amygdala alleviates post-traumatic stress disorder symptoms in a rat model. **Journal of psychiatric research**, v. 44, n. 16, p. 1241–5, 2010.

LANGEVIN, J.-P. et al. Deep Brain Stimulation of the Basolateral Amygdala for Treatment-Refractory Posttraumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 10, p. e82–e84, maio 2016.

LAVANO, A. et al. DBS in Treatment of Post-Traumatic Stress Disorder. **Brain Sciences**, v. 8, n. 1, p. 18, 2018.

LEDOUX, J. Rethinking the Emotional Brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653–676, fev. 2012.

LEWIS, P. M. et al. Brain Neuromodulation Techniques: A Review. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 406–21, 2016.

MAHMOUDI, J. et al. A Protocol for Conventional Sleep Deprivation Methods in Rats. **journal of experimental and clinical neuroscien**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 31 jan. 2017.

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, mar. 2004a.

MCINTYRE, C. C. et al. Cellular Effects of Deep Brain Stimulation: Model-Based Analysis of Activation and Inhibition. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, n. 4, p. 1457–1469, abr. 2004b.

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, jun. 2004c.

PAPE, H.-C.; PARE, D. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 419–463, abr. 2010.

PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Annals of neurosciences**, v.

17, n. 3, p. 136–141, 1 jun. 1927.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274–285, abr. 1992.

PRIME, D. et al. Considerations in performing and analyzing the responses of cortico-cortical evoked potentials in stereo-EEG. **Epilepsia**, v. 59, n. 1, p. 16–26, jan. 2018.

PROTOPODESCU, X. et al. Differential Time Courses and Specificity of Amygdala Activity in Posttraumatic Stress Disorder Subjects and Normal Control Subjects. p. 464–473, mar. 2005.

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.

REZNIKOV, R.; HAMANI, C. Posttraumatic Stress Disorder: Perspectives for the Use of Deep Brain Stimulation. **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, v. 20, n. 1, p. 7–14, jan. 2017.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997.

RODRIGUEZ-ROMAGUERA, J.; MONTE, F. H. M. DO; QUIRK, G. J. Deep brain stimulation of the ventral striatum enhances extinction of conditioned fear. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 8764–8769, 2012.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev.**, v. 83, n. 3, p. 803–834, 2003.

SALDÍVAR-GONZÁLEZ, J. A. et al. Effect of electrical stimulation of the baso-lateral amygdala nucleus on defensive burying shock probe test and elevated plus maze in rats. **Life Sciences**, v. 72, n. 7, p. 819–829, 2003.

SATZER, D. et al. Anatomic correlates of deep brain stimulation electrode impedance. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 86, n. 4, p. 398–403, 2015.

SCHLAEPFER, T. E. et al. Rapid Effects of Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1204–1212, jun. 2013.

SCHWARZBOLD, M. L. et al. Effects of Traumatic Brain Injury of Different Severities on Emotional, Cognitive, and Oxidative Stress-Related Parameters in Mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 27, n. 10, p. 1883–1893, out. 2010.

SMITH, K. Trillion-dollar brain drain. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 15–15, 4 out. 2011.

SMITH, K. Mental health: a world of depression. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 181, 2014.

STIDD, D. A. et al. Amygdala Deep Brain Stimulation Is Superior to Paroxetine Treatment in a Rat Model of Posttraumatic Stress Disorder. **Brain Stimulation**, v. 6, n. 6, p. 837–844, nov. 2013.

SUAREZ, S. D.; GALLUP, G. G. An ethological analysis of open-field behavior in rats and mice. **Learning and Motivation**, v. 12, n. 3, p. 342–363, 1981.

SUI, L. et al. Deep brain stimulation of the amygdala alleviates fear conditioning-induced alterations in synaptic plasticity in the cortical-amygdala pathway and fear memory. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 7, p. 773–782, 2014.

TAGHVA, A. et al. Posttraumatic stress disorder: Neurocircuitry and implications for potential deep brain stimulation. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 91, n. 4, p. 207–219, 2013.

Thinking big in mental health. **Nature Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1–1, 9 jan. 2018.

TODA, H. et al. The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. **Journal of Neurosurgery**, v. 108, n. 1, p. 132–138, 2008.

UDUPA, K.; CHEN, R. The mechanisms of action of deep brain stimulation and ideas for the future development. **Progress in Neurobiology**, v. 133, p. 27–49, 2015.

VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2163–

2196, dez. 2012.

ANEXO A – Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00893
Título
Metodologias utilizadas no Laboratório de Ciências Médicas
Data de Entrada
04/12/2013

Resultado:
Aprovado
Data/Prazo
05/09/2014

Considerações

Ofício nº 177/CEUA/PROPESQ/2014
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Roger Walz – Departamento de Clínica Médica - CCS
Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de oito mil camundongos (*Mus musculus*) e cinco mil ratos (*Rattus Norvegicus*).

Como o protocolo atual PP00893 foi aprovado e contempla a metodologia aprovada no protocolo PP00807, a CEUA recomenda que o pesquisador deve avaliar o encerramento do PP00807 com o envio do relatório no estágio atual ou que na manutenção dos dois protocolos ativos, atente que na elaboração do relatório final dos dois protocolos, fique claro a distinção de produção entre eles.

- Procedência do animal: Biotério Central UFSC.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 10/12/2018

Data 10/09/2014

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE