



AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS COM LESÃO (6-OHDA) DO NÚCLEO A11

Palavras-Chave: COMPORTAMENTO, SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS, CAMPO ABERTO.

Autores/as:

LUIZA DAMIANI DE SOUZA [FCA – UNICAMP]

ALESSANDRO SPENCER DE SOUZA HOLANDA [FCA – UNICAMP]

Profª Dra. ANDREA MACULANO ESTEVES (orientadora) [FCA – UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) é uma doença neurológica sensorial e motora, normalmente definida pela necessidade de mover os membros inferiores quando em descanso (VENKATESHIAH; IOACHIMESCU, 2015). A causa da SPI não é totalmente compreendida, mas as evidências sugerem que ela está relacionada a baixos níveis de ferro no cérebro e a regulação de dopamina (EARLEY et al., 2014). Em alguns casos, a SPI também possui uma causa genética, acometendo pessoas da mesma família. Bem como, também pode estar associada a outras condições médicas, incluindo baixos níveis de ferro no sangue e insuficiência renal (KHAN et al., 2017).

Esta síndrome afeta de 5% a 10% da população, em sua maioria mulheres acima de 35 anos de idade, existem ainda agravantes da situação como gravidez e deficiência de ferro (LEE; ZAFFKE; BARATTE-BEEBE, 2001; RIZEK; KUMAR, 2017). A gravidade dos sintomas pode evoluir com o passar da idade (ALOE et al., 2007). O tratamento da doença pode ser tanto farmacológico através de agentes dopaminérgicos, opioides, benzodiazepínicos, anticonvulsivantes, bem como não farmacológico, por meio do exercício físico (ESTEVES et al., 2009; GIANNAKI et al., 2014)

As características da doença em humanos são reproduzíveis em modelo animal já que os mecanismos fisiopatológicos são bem caracterizados (SCHMITT; HIEMKE, 1998). No modelo animal esperam-se algumas mudanças comportamentais como o aumento da atividade locomotora que por sua vez pode ser caracterizado como indicador de “necessidade de se mover”, ou seja, maior locomoção ao longo do dia durante o período de repouso dos roedores, e maior tempo de atividade desacordada são sinais esperados no fenótipo da síndrome (ROYCE, 1977; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994). Alguns modelos animais já vêm sendo descritos na literatura para a SPI. Entre eles, destacamos o modelo de lesão nos núcleos dopaminérgicos A11 com 6 hidróxi dopamina (6-OHDA) que mimetiza algumas características referentes à síndrome (QU et al., 2007).

Nesse contexto, visto que a pesquisa científica desenvolvida com animais é de grande aplicabilidade e pode fornecer resultados para futuras aplicações em estudos clínicos, é de fundamental importância a investigação do comportamento locomotor em um modelo animal SPI com lesão do núcleo A11 com 6-OHDA. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento em ratos modelo de SPI de lesão do núcleo dopaminérgico A11 com 6-OHDA durante evolução da lesão.

METODOLOGIA:

Modelo animal

O estudo foi realizado com ratos Wistar machos adultos (n=15), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Unicamp. Durante o período experimental os animais foram acondicionados no Biotério do Laboratório de Sono e Exercício Físico (LASEF) da FCA/Unicamp, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, cuja iluminação inicia-se às 6h, em temperatura controlada de (22 ± 2 ° C) com livre acesso a água e ração ad libitum.

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos e tratados em grupos de 3 a 4 animais, posteriormente isolados após primeira intervenção em gaiolas padrão de polipropileno brancas e tampas de aço inox com recuos para fornecimento de água e ração. Bem como, foram respeitadas as diretrizes de princípios éticos e práticos de uso de animais de laboratório (Andersen et al., 2004), sendo o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (n° 4726-1/(A)2018).

Os ratos foram randomicamente distribuídos em 3 grupos experimentais, 5 animais por grupo, sendo estes: o grupo (controle) constituído por animais saudáveis e que não receberam nenhuma intervenção; o grupo (SHAM), que passaram por lesão no núcleo A11 com salina; o grupo (A11), que receberam lesão no núcleo A11 com 6-OHDA. Todos os grupos tiveram o comportamento avaliado (Campo Aberto) nos momentos basal e 7, 15 e 28 dias após a lesão dos núcleos A11. Foi considerada a medida basal o dia 80 de vida dos animais.

Procedimentos Experimentais

Procedimentos cirúrgicos – Lesão no núcleo dopaminérgico A11

Os animais foram anestesiados com isoflurano e procedimentos estereotáxicos foram empregados para lesão no núcleo dopaminérgico A11 e aplicação de salina ou 6-OHDA. Os animais foram submetidos a uma tricotomia da região superior da cabeça, e colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf™). O crânio foi exposto e subsequentemente as coordenadas estereotáxicas foram demarcadas. Foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas para a lesão bilateral do núcleo A11: anteroposterior (AP), -3,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) 0,3 mm da linha média; dorsoventral (DV), -8,0 mm a partir da calota craniana. Os ratos receberam antibiótico penicilina para prevenir a infecção. Os animais também receberam 10 mg / kg de diclofenaco de sódio para auxiliar na analgesia pós-operatória e para reduzir a inflamação da ferida cirúrgica. Após a localização das medidas das coordenadas, o crânio foi perfurado com uma broca dentária e uma agulha de 30 gauge foi introduzida no núcleo A11. A agulha estava ligada a um tubo de polietileno conectado a uma seringa (Hamilton, EUA) de 10 µl cujo embolo foi impulsionado por uma bomba de microinfusão. Foram injetados um volume de 2µl a 0,2 da neurotoxina 6-OHDA diluída em 0,01% de ácido ascórbico, para o grupo SHAM foi injetado o volume 2µl de salina, utilizando-se um fluxo de 0,5 µl/min.

Teste comportamental – Teste de Campo Aberto

O teste de campo aberto (TCA) foi aplicado antes do início, semanalmente e no final do período de intervenção. Um dia antes de realizar o teste comportamental, os camundongos foram adaptados por 10 minutos para o campo aberto.

O aparelho de TCA utilizado foi uma caixa de acrílico circular (81 cm de diâmetro e 41 cm de altura) com um topo e piso aberto divididos em 12 quadrados. Os parâmetros analisados, por contadores manuais, foram locomoção periférica (número de quadrantes, próximo às paredes, percorrida), central (número total de quadrantes, da área central

percorrida) e total (soma do total de quadrantes periféricos e centrais percorridos); frequência de criação (número de vezes que o animal repousa sobre as patas traseiras); quantidade de vezes que o animal realiza secreções fisiológicas (número de fezes e urinas) e higiene (número e total de segundos de boca ou patas no corpo e na cabeça). O último foi medido usando temporizadores.

Para iniciar cada sessão, os animais foram colocados individualmente no centro da arena de TCA a duração total do teste foi de 10 minutos. No entanto, nos primeiros 5 minutos foram permitidos a exploração gratuita do meio ambiente. Enquanto isso, os 5 minutos finais foram monitorados para quantificação direta da atividade geral.

Avaliação de atividade motora e exploratória

Para medir a atividade motora foi utilizado o teste de campo aberto. Foram utilizados como índice de locomoção espontânea os resultados sobre o número total de quadrantes cruzados. A frequência de locomoção foi definida como o número de quadrantes que o animal cruzou com as quatro patas e a de levantar pelo número de vezes que o animal ergueu a parte frontal do corpo apoiado apenas nas pernas traseiras (ROYCE, 1977).

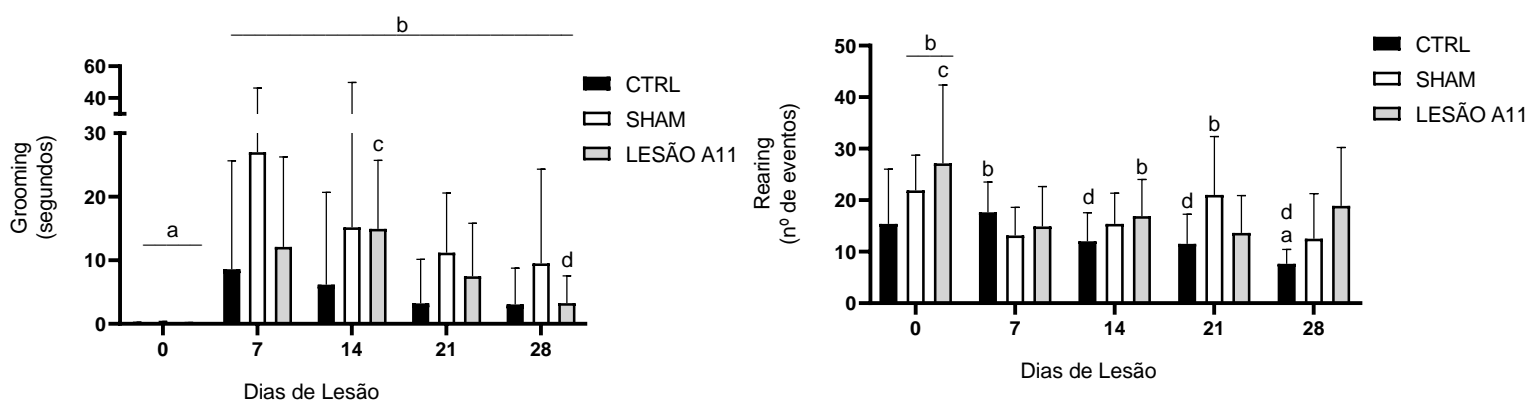
Análise de imunofluorescência

Secções transversais do cérebro na região do núcleo A11 para imunomarcção foram lavadas com PBS 1 vez por 3 minutos. Seguido por metanol gelado 15 minutos a 20°C e em seguida lavada com PBS-T 3 vezes por 5 minutos. Foram adicionados solução de pré-bloqueio de ácido maleico BSA 5% com 1% glicina por um período de 1 hora. Em seguida foi adicionado solução primária por overnight. Após essa etapa o tecido foi lavado novamente com PBS-T 3 vezes por 5 minutos. Foi adicionado solução secundária por 1 hora em local sem nenhuma iluminação e total escuridão. Posteriormente a lâmina foi mergulhada em PBS-T rapidamente e adicionado 50 ul de sudan black por 1 minuto e meio. A análise morfométrica da imunofluorescência das lâminas aconteceram em microscópio com uma câmera digital. Para processamento das imagens, foi utilizado os softwares Metamorph da universal Imaging Corporation e o Image Pro-plus. Entre três e quatro secções do cérebro foram analisadas em todos os grupos.

Análise estatística

Para as análises inferenciais, foi verificada a distribuição normal e homogeneidade de variância com Kolmogorov-Smirnov e Levine. Para comparação entre os grupos foram utilizados os testes de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas e post hoc de Duncan $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



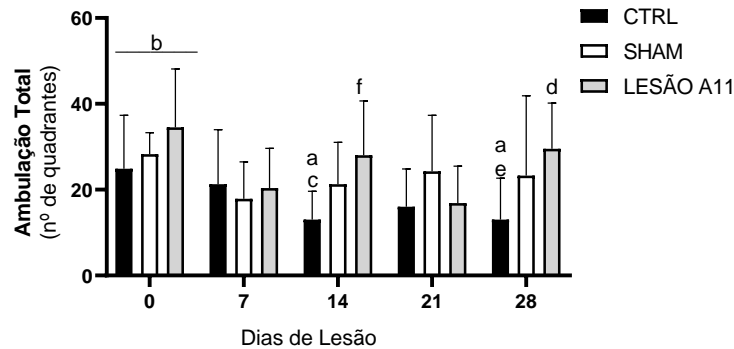


FIGURA 1- Análise do comportamento dos animais modelos de SPI. Grupos: (CTRL; n=8) Controle sem lesão; (SHAM; n=8) Lesão com Salina; (Lesão; n=8) Lesão com 6-OHDA. Foram utilizados cinco animais em cada grupo.

Os resultados demonstraram que os animais com lesão 6-OHDA já apresentavam diferenças significativas no comportamento motor a partir do décimo quarto dia. Os animais do grupo lesão e SHAM apresentaram maior taxa de ambulação total e rearing. Isto provavelmente ocorreu devido à perda de neurônios e diminuição da síntese de dopamina decorrentes da lesão no núcleo A11 (ZHAO, H et al., 2007; DA CUNHA-MELO et al., 2009). O aumento da atividade locomotora também é semelhante em outros modelos animais com lesão A11 ou com privação de ferro, sendo controlada e normalizada após tratamento com agonista dopaminérgico (QU et al., 2007).

As taxas de grooming foram significativamente maiores nos animais do grupo SHAM, seguidos pelos animais do grupo LESÃO. Isso condiz com a fisiopatologia da doença, visto que os animais ao apresentarem desconforto executam atividades motoras (DA CUNHA-MELO et al., 2009).

O grupo controle apresentou valores menores de *rearing* do que os grupos SHAM e LESÃO. Alguns estudos mostram que animais que possuem a SPI tendem a ter valores menores de *rearing* que os animais do grupo controle, o que é o contrário do que se apresenta neste caso (MARIANO et al., 2014).

Não foram observados comportamentos agressivos ou de ataque em nenhum dos grupos. Além disso, a diferença entre as taxas de ambulação total mostra que os ratos do grupo LESÃO apresentaram sintomas da síndrome, uma vez que exerceram atividade locomotora maior que os demais grupos (QU et al., 2007).

A diminuição dos neurônios DA nos núcleos A11 foi significativamente correlacionada com o aumento das atividades locomotoras no modelo animal. (ZHAN et al., 2007). No entanto, o aumento identificado no grupo SHAM, pode estar atrelado ao número da amostra utilizado, assim como pode estar relacionado a um possível efeito dopaminérgico afetado pela lesão no núcleo A11 (ONDO et al., 2000).

A atividade motora aumentada pode ser reforçada pela redução de tirosina hidroxilase (TH) através de imagens representativas de imunofluorescência. Na qual a enzima limitante da taxa na síntese de dopamina apresentou redução de TH, no grupo SHAM, e uma ausência exacerbada no grupo LESÃO. Sabe-se que a perda de modulação da dopamina no núcleo A11 para a coluna dorsal pode resultar na desinibição das entradas sensoriais e, assim, favorece a ocorrência de sensações musculares anormais, logo uma inquietação muscular semelhante a identificada na SPI (CLEMENS et al., 2006).

No entanto, uma limitação do estudo foi a morte neuronal de dopamina nos núcleos A11 no grupo SHAM após os 28 dias de lesão (dado não mostrado).

CONCLUSÕES:

Em suma, os resultados sugerem que os comportamentos apresentados pelos animais do grupo LESÃO são similares aos sintomas da SPI, pois apresentam taxa de ambulação e *grooming* maiores que o grupo controle. A lesão com 6-OHDA provavelmente não se espalhou pelo SNC ou VPA, caracterizando a efetividade da lesão.

BIBLIOGRAFIA:

- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M. KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. PRINCÍPIOS ÉTICOS E PRÁTICOS DO USO DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2004.
- CLEMENS, S., RYE, D., AND HOCHMAN, S. RESTLESS LEGS SYNDROME: REVISITING THE DOPAMINE HYPOTHESIS FROM THE SPINAL CORD PERSPECTIVE. **Neurology**. 2006, 67, 125–130.
- DA CUNHA-MELO, Livia Fulgêncio et al. SÍNDROME DAS PERNAS INQUIETAS, 2009.
- EARLEY, C. J. et al. ALTERED BRAIN IRON HOMEOSTASIS AND DOPAMINERGIC FUNCTION IN RESTLESS LEGS SYNDROME (WILLIS-EKBOM DISEASE). **Sleep Medicine**. Elsevier B.V.
- ESTEVEES, A. M. et al. EFFECT OF ACUTE AND CHRONIC PHYSICAL EXERCISE ON PATIENTS WITH PERIODIC LEG MOVEMENTS. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, jan. 2009. v. 41, n. 1, p. 237–242.
- GIANNAKI, C. D. et al. EPIDEMIOLOGY, IMPACT, AND TREATMENT OPTIONS OF RESTLESS LEGS SYNDROME IN END-STAGE RENAL DISEASE PATIENTS: AN EVIDENCE-BASED REVIEW. **Kidney International. Nature Publishing Group**.
- HIROTSU, C. et al. 0742 EPIDEMIOLOGY OF RESTLESS LEGS SYNDROME AND PERIODIC LIMB MOVEMENT IN THE EPISONO COHORT. **Sleep**, v. 40, p. A275, 2017.
- KHAN, F. H. et al. IRON, DOPAMINE, GENETICS, AND HORMONES IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF RESTLESS LEGS SYNDROME. **Journal of Neurology**. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co.
- KG. LEE, K. A.; ZAFFKE, M. E.; BARATTE-BEEBE, K. RESTLESS LEGS SYNDROME AND SLEEP DISTURBANCE DURING PREGNANCY: THE ROLE OF FOLATE AND IRON. **Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine**, 1 maio. 2001. v. 10, n. 4, p. 335–341..
- MARIANO, Melise Oliveira et al. CHANGES IN MOTOR BEHAVIOR DURING PREGNANCY IN RATS: THE BASIS FOR A POSSIBLE ANIMAL MODEL OF RESTLESS LEGS SYNDROME. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, p. 436-441, 2014.
- ONDO WG, HE Y, RAJASEKARAN S, LE WD. CLINICAL CORRELATES OF 6-HYDROXYDOPAMINE INJECTIONS INTO A11 DOPAMINERGIC NEURONS IN RATS: A POSSIBLE MODEL FOR RESTLESS LEGS SYNDROME. **Mov Disord**. 2000 JAN;15(1):154-8.
- QU, Shen et al. LOCOMOTION IS INCREASED IN A11-LESIONED MICE WITH IRON DEPRIVATION: A POSSIBLE ANIMAL MODEL FOR RESTLESS LEGS SYNDROME. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 66, n. 5, p. 383-388, 2007.
- RIZEK, P.; KUMAR, N. RESTLESS LEGS SYNDROME. **CMAJ. Canadian Medical Association**.
- ROYCE, J. R. ON THE CONSTRUCT VALIDITY OF OPEN-FIELD MEASURES. **Psychological Bulletin**, 1977. v. 84, n. 6, p. 1098–1106.
- SCHMITT, U.; HIEMKE, C. STRAIN DIFFERENCES IN OPEN-FIELD AND ELEVATED PLUS-MAZE BEHAVIOR OF RATS WITHOUT AND WITH PRETEST HANDLING. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, abr. 1998. v. 59, n. 4, p. 807–811.
- SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. THIGMOTAXIS AS AN INDEX OF ANXIETY IN MICE. INFLUENCE OF DOPAMINERGIC TRANSMISSIONS. **Behavioural Brain Research**, 31 mar. 1994. v. 61, n. 1, p. 59–64.
- VENKATESHIAH, S. B.; IOACHIMESCU, O. C. RESTLESS LEGS SYNDROME. **Critical Care Clinics**. W.B. Saunders.
- ZHAO, H., ZHU, W., PAN, T., XIE, W., ZHANG, A., ONDO, W.G. and LE, W. (2007), SPINAL CORD DOPAMINE RECEPTOR EXPRESSION AND FUNCTION IN MICE WITH 6-OHDA LESION OF THE A11 NUCLEUS AND DIETARY IRON DEPRIVATION. **J. Neurosci. Res.**, 85: 1065-1076.