UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REABILITAÇÃO E DESEMPENHO
FUNCIONAL

Thairyne Olivato

Análise Funcional do Efeito do Campo Magnético Contínuo em Gerbilos Isquêmicos
pós-injeção de Apomorfina e Racloprida.

Ribeirão Preto

2018

Thairyne Olivato

Análise Funcional do Efeito do Campo Magnético Contínuo em Gerbilos Isquêmicos
pós-injeção de Apomorfina e Racloprida.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, junto ao Departamento de
Ciências da Saúde, para obtenção do título
de mestre em Reabilitação e Desempenho
Funcional.

Área de Concentração: Fisioterapia

Orientador: João Eduardo de Araújo

Ribeirão Preto

2018

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.

Olivato, Thairyne

Análise Funcional do Efeito do Campo Magnético Contínuo em Gerbilos Isquêmicos pós-injeção de Apomorfina e Racloprida.

86 p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação.

Orientador: Araujo, João Eduardo de.

1. Isquemia cerebral. 2. Gerbilo. 3. Campo Magnético.
4. Apomorfina. 5. Racloprida.

Nome: Olivato, Thairyne

Título: Análise Funcional do Efeito do Campo Magnético Contínuo em Gerbilos
Isquêmicos pós-injeção de Apomorfina e Racloprida.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____ Julgamento: _____
Assinatura: _____

Dedicatória

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade da existência.

Dedico aos meus pais, Luis e Mara, que sempre me apoiaram em todas as escolhas que fiz em minha vida e estiveram ao meu lado em todos os momentos, me fornecendo todo suporte e amor que só se pode esperar daqueles que nos amam.

Dedico também ao meu filho, Nicolas, que me impulsionou e se tornou minha principal motivação para que este trabalho fosse concluído e ao meu irmão, Luís Vinícius, pelo apoio e ajuda.

Muito obrigada.

Com carinho.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Eduardo de Araujo pela confiança, por todo ensinamento e por me oferecer esta grande oportunidade.

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos que cedeu seu laboratório para a avaliação histológica deste trabalho, e também a sua aluna Tamiris, que me ajudou imensamente e não mediu esforços para que esta etapa fosse concluída.

Aos funcionários do prédio da Fisioterapia, Samuel, Marília e Rubens. Sem a ajuda de todos eles este trabalho não seria possível.

A todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram ao longo desta jornada, Takae, Raquel, Tamyris e a Kelly, que me ajudaram de maneira direta ou indireta, e compartilharam conhecimento para a realização dos procedimentos colocados em prática neste trabalho.

A todos os meus familiares que de alguma maneira, mesmo que indireta, colaboraram com a conclusão deste trabalho.

E aos animais que participaram deste projeto.

Resumo

Resumo

Olivato, T. **Análise Funcional do Efeito do Campo Magnético Contínuo em Gerbilos Isquêmicos pós-injeção de Apomorfina e Racloprida.** 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Há décadas os campos magnéticos (CMs) são alvo de investigação científica. Entretanto, o grande corpo de evidências, está relacionado a campos eletromagnéticos e não a campos magnéticos contínuos. Nosso interesse é direcionado para a modulação das respostas comportamentais e motoras, na preservação de neurônios pós-lesão isquêmica e na possibilidade de uma interferência funcional com drogas que modifiquem a neurotransmissão encefálica. Utilizamos 130 Gerbilos, alocados em 13 grupos experimentais. Grupos específicos foram submetidos a isquemia encefálica global bilateral e a implantação de um capacete magnético com potencia de 3200G. Quatro dias após os procedimentos cirúrgicos os animais foram avaliados no monitor de atividades e no Rotarod, após receberem uma injeção de Apomorfina (APO) (2,5mg /kg) ou Racloprida (RAC) (0,9ml/kg). Valor de p significativo <0,05. No monitor de atividades, os animais do grupo isquemia atravessaram o maior número de sensores horizontais ($F_{12,117}$: 9,39) e verticais ($F_{12,117}$: 10,60) do que todos os outros grupos. Animais isquêmicos injetados com APO e tratados com campo magnético atravessam um número menor de sensores do que os grupos isquêmicos. Os isquêmicos injetados com APO e estimulados com o polo norte dispararam menos sensores do que os isquêmicos injetados com APO. Animais injetados com RAC com ou sem estimulação magnética dispararam menos sensores do que os animais isquêmicos e isquêmicos tratados com polo norte e sul. No teste do Rotarod, o grupo isquêmico apresentou o menor tempo de permanência no teste do que os demais grupos. Ainda, animais isquêmicos tratados com APO e RAC e estimulação magnética pelo polo norte apresentam maior tempo de permanência em relação aos grupos isquemia e isquemia injetado com Apo e RAC ($F_{12,117}$: 11,29). Nossos dados confirmam a possibilidade de interação dos polos magnéticos e os mecanismos de ação das drogas utilizadas no experimento.

Palavras chave: Isquemia cerebral, Gerbilo, Campo Magnético, Apomorfina, Racloprida.

Abstract

Olivato, T. **Functional Analysis of the Effect of Continuous Magnetic Field on Ischemic Gerbils after Injection of Apomorphine and Raclopride.** 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

For decades, magnetic fields (CMs) have been the subject of scientific research. However, the great body of evidence is related to electromagnetic fields and not to continuous magnetic fields. Our interest is directed to the modulation of behavioral and motor responses, the preservation of neurons after brain ischemic injury and the possibility of functional interference with drugs that modify brain neurotransmission. We used 130 gerbils, allocated in 13 experimental groups. Specific groups were submitted to bilateral global brain ischemia and the implantation of a magnetic helmet with power of 3200G. Four days after the surgical procedures, the animals were evaluated on the activity monitor and Rotarod after receiving an injection of Apomorphine (APO) (2.5 mg / kg) or Raclopride (RAC) (0.9 ml / kg). Significant p value was set as <0.05. In the activity monitor, the animals in the ischemia group crossed fired the largest number of horizontal sensors ($F_{12,117}$: 9,39) and vertical sensors ($F_{12,117}$: 10,60) than all the other groups. Ischemic animals injected with APO and magnetic field fired a smaller number of sensors than the ischemic groups and injected with APO. Animals stimulated with the north pole fired fewer sensors than ischemic animals injected with APO. RAC injected animals, with or without magnetic stimulation fired fewer sensors than ischemic animals or ischemic with north and south magnetic stimulation. In the Rotarod test, the ischemic group had the shortest permanence time in the test than the other groups. Still, ischemic animals treated with APO and RAC and North Pole magnetic stimulation present a longer permanence time in comparison to the ischemia group and ischemia with APO and RAC. Ischemic animals injected with APO and magnetic field pass through a smaller number of sensors than the ischemic groups and injected with APO. In the Rotarod test, the ischemic group had the shortest residence time in the test than the other groups. Still, ischemic animals treated with APO and north pole present a longer residence time in relation to the ischemia groups with APO and RAC ($F_{12,117}$: 11,29). Our data confirm the possibility of interaction of the magnetic poles and the action mechanisms of action of the drugs used in the experiment.

Key words: Cerebral ischemia, Gerbil, Magnetic Field, Apomorphine, Raclopride.

Lista de Abreviaturas

AVE - Acidente vascular encefálico.....	20
IEG - Isquemia Encefálica Global.....	20
OMS - Organização Mundial da Saúde.....	20
ATP - Adenosina Trifosfato.....	22
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio.....	22
RR - Rotarod.....	24
CA - Campo Aberto.....	24
SNC - Sistema Nervoso Central.....	25
LCE - Labirinto em Cruz Elevado.....	27
DA - Dopamina.....	27
ENV - Estimulação Nervo Vago.....	28
CEMs - Campos Eletromagnéticos.....	28
CMs - Campos Magnéticos.....	30
CME - Campo Magnético Estático.....	30
PPT - Potencial Pós Tetânico.....	30
PRA - Período Refratário Absoluto.....	30
APO - Apomorfina.....	31
RAC - Racioprida.....	33
CC - Grupo Controle.....	37

CS - Grupo Sham.....	37
GSM - Grupo Sham Magnético.....	37
SMS - Sham Magnético Salina.....	38
GI - Grupo Isquemia.....	38
GIPN - Grupo Isquemia Polo Norte.....	38
GIPS - Grupo Isquemia Polo Sul.....	38
GIAPO - Grupo Isquemia Apomorfina.....	38
GIRAC - Grupo Isquemia Racloprida.....	38
GIAPON - Grupo Isquemia Apomorfina Norte.....	38
GIRACN - Grupo Isquemia Racloprida Norte.....	38
GIAPOS - Grupo Isquemia Apomorfina Sul.....	38
GIRACS - Grupo Isquemia Racloprida Sul.....	39
RPM - Rotações por minuto.....	40
H&E -Hematoxilina e Eosina.....	41
FJ - Fluoro Jade C.....	48

Lista de Figuras

Figura 1: Animal anestesiado na tábua cirúrgica, com as artérias carótidas ocluídas por tração, realizada por fio de sutura durante o procedimento cirúrgico experimental40

Figura 2: Figura representativa dos magnetos de neodímio, ferro e boro magnetizado utilizados nos grupos estimulados (seta preta) e do magneto não magnetizado, utilizado no grupo “sham” (seta branca). Note que, na presença de limalha de ferro, o material magnetizado promove a atração da limalha para o corpo do magneto (seta preta), enquanto que no material não magnetizado não há atração da limalha (seta branca). Figura utilizada sob autorização de BERTOLINO, G. 2008.....41

Figura 3: Monitor de atividades utilizado no experimento. Note as barras pretas onde estão localizados os sensores de infravermelho.....43

Figura 4: Aparelho Rotarod utilizado nesse trabalho. No centro do equipamento pode ser observado o cilindro onde os animais eram posicionados e na parte inferior as plataformas que interrompiam a cronometragem do tempo quando o animal apresentava a queda.....44

Figura 5: Número de cruzamentos detectados pelos sensores horizontais de infravermelho no monitor de atividade. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GS= grupo falsa cirurgia; GSM= grupo falsa cirurgia e falso campo magnético; GSMS= grupo falsa cirurgia, falso campo magnético e injetado com salina; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul; GIAPO= grupo isquemia tratado com apomorfina; GIAPON= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo norte; GIAPOS= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo sul; GIRAC= grupo isquemia tratado com racloprida; GIRACN= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo norte; GIRACS= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo sul. *relação com o GS; #relação com o grupo GI; +relação ao GIAPO; &em relação ao GIPN e GIPS. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10..... 50

Figura 6: Número de levantamentos detectados pelos sensores verticais de infravermelho no monitor de atividade. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GS= grupo falsa cirurgia; GSM= grupo falsa cirurgia e falso campo magnético; GSMS= grupo falsa cirurgia, falso campo magnético e injetado com salina; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul; GIAPO= grupo isquemia tratado com apomorfina; GIAPON= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo norte; GIAPOS= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo sul; GIRAC= grupo isquemia tratado com racloprida; GIRACN= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo norte; GIRACS= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo sul. *relação com o GS; #relação com o grupo GI; +relação com o grupo GIAPO; &relação aos grupos GIPN e GIPS. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 1051

Figura 7: Tempo de permanência no teste de Rotarod. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GS= grupo falsa cirurgia; GSM= grupo falsa cirurgia e falso campo magnético; GSMS= grupo falsa cirurgia, falso campo magnético e injetado com salina; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul; GIAPO= grupo isquemia tratado com apomorfina; GIAPON= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo norte; GIAPOS= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo sul; GIRAC= grupo isquemia tratado com racloprida; GIRACN= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo norte; GIRACS= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo sul. *relação com o GS; #relação com o grupo GI; +relação com o grupo GIAPO e GIAPOS; &relação com o GIRAC e GIRACS. $p < 0,05$ Anova seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 1052

Figura 8: Figura representativa da comparação da densidade de neurônios no Hipocampo (CA1). Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul. *em relação aos grupos CG e #em relação ao GI. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.....54

Figura 9: Figura representativa da comparação do número de neurônios no córtex motor (M1). Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul. *em relação aos grupos

CG e [#]em relação ao GI. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.....55

Figura 10: Figura representativa da comparação do número de neurônios no estriado. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul. *em relação aos grupos CG e [#]em relação ao GI. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.....56

1.0 Introdução.....	19
1.1 Acidente Vascular Encefálico	20
2.0 Isquemia Encefálica Global	20
2.1 Modelos Animais de Lesão Isquêmica	21
2.2 Isquemia Global e Áreas Encefálicas Acometidas	23
3.0 Modelos Animais de Avaliação do Comportamento.....	24
3.1 Rotarod	25
3.2 Campo Aberto.....	26
3.3 Modelos Animais e Drogas que modificam o Desempenho Motor.....	26
3.3.1 Apomorfina	27
3.3.2 Racloprida	28
4.0 Modificadores da Resposta Isquêmica e Plasticidade Encefálica	29
4.1 Campo Magnético	30
4.1.1 Interação dos Campos Magnéticos com o Sistema Nervoso Central.....	32
5.0 Objetivos.....	33
5.1 Objetivos Específicos	34
6.0 Material e Métodos	35
6.1 Animais e Grupos Experimentais.....	36
6.2 Procedimento Cirúrgico.....	38
6.3 Estimulação Magnética.....	39
6.4 Drogas e Doses	40
6.4.1 Salina.....	40
6.4.2 Apomorfina.....	40
6.4.3 Racloprida.....	41
6.5 Análise Comportamental	41
6.5.1 Monitor de Atividades	41
6.5.2 Rotarod	42
6.6 Análise Histológica	43
6.7 Análise dos Resultados	44
7.0 Resultados.....	45
7.1 Resultados Comportamentais.....	46
7.2 Resultados Histológicos.....	48
7.2.1 Resultados Morfológicos.....	48
7.2.2 Resultado Histoquímico.....	54
8.0 Discussão	56
9.0 Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	66

Introdução

1.1 Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma doença neurológica importante desencadeada pela presença de distúrbios neurológicos globais ou focais, decorrentes da oclusão do fluxo sanguíneo encefálico, que pode desencadear sequelas temporárias ou permanentes (FEIGIN et al., 2010; MICHALSKI et al., 2015). O AVE continua a ser a principal causa de incapacidade a longo prazo e a segunda principal causa de morte em todo o mundo, resultando em cerca de 6.000.000 de mortes anualmente (WOODRUFF et al., 2011; ZHAO & WILLING, 2018). No Brasil o AVE é a causa mais frequente de óbito na população adulta (10% dos óbitos), apresentando a quarta taxa de mortalidade por AVE entre os países da América Latina (RIBEIRO et al., 2016). O AVE pode ocorrer de duas maneiras: pela interrupção do fluxo sanguíneo, caracterizando um AVE isquêmico (responsável por 87% dos casos diagnosticados), ou pela ruptura dos vasos sanguíneos, levando ao AVE hemorrágico (correspondente aos outros 13% dos casos) (YU et al., 2014). Em ambos os casos ocorre a isquemia e morte de células neuronais e gliais locais (Ministério da Saúde, 2013).

Diferentes problemas como, parada cardíaca, asfixia, choque, hipertensão grave, lesões cerebrais e intercorrências em cirurgias torácicas e cardíacas podem provocar uma isquemia encefálica global (IEG) temporária. Um AVE desencadeado nos modelos de IEG não mimetiza a condição de AVE isquêmico propriamente dito e, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apenas suas consequências neurológicas. Os modelos experimentais de IEG são comumente utilizados para o estudo do comprometimento das atividades encefálicas pós lesão (SPRAY; EDVINSSON, 2016), proporcionando informação clínica relevante, em relação aos déficits cognitivos e em relação ao comprometimento da função motora.

Sendo assim, trabalhos experimentais têm enfrentado o desafio de buscar estratégias para modificar as redes neurais, ou até mesmo interferir no processo de isquemia após a lesão e assim, promover melhores estratégias que compensem a lesão tecidual (MURPHY; COBBET, 2009) contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas. E dessa maneira, buscamos propor uma abordagem diferente na recuperação comportamental e na função motora.

2. Isquemia Encefálica Global

2.1 Modelos Animais de lesão isquêmica

O emprego de modelos animais permite o estudo e a investigação da fisiopatologia da isquemia encefálica (GERRIETS et al., 2003), assim como a experimentação com novos modelos terapêuticos, contribuindo para o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento (DITTMAR et al., 2003), tornando-se indispensáveis para o estudo dos mecanismos e das possibilidades terapêuticas pós AVE (PAGNUSSAT et al., 2012). Além disso, devido as limitações presentes em estudos que envolvem sujeitos humanos, os modelos animais de isquemia são muito úteis para descrever a remodelação e a reorganização dos neurônios (WAHL & SCHWAB, 2014). Nos modelos de IEG, dois ou quatro vasos cervicais são temporariamente ocluídos e a circulação restaurada após determinado tempo. Nesses modelos, os mais utilizados são a oclusão da artéria cerebral média, oclusão das carótidas, modelos de craniectomia e trombóticos, aplicação de endotelina 1 em sítios específicos, entre outros (FLURI et al., 2015).

O modelo de oclusão de dois vasos cervicais tem se mostrado uma técnica fácil de ser realizada em um único procedimento, com uma intervenção cirúrgica menos invasiva que permite maior abrangência para os experimentos (MCBEAN; KELLY, 1998). O objetivo do modelo de oclusão de dois vasos é produzir uma lesão isquêmica global na qual, tanto o início quanto a reversão da isquemia sejam rápidos. A técnica mais simples, do ponto de vista operacional, é a oclusão das carótidas comuns em Gerbilos da Mongólia. Para isso, é realizada a oclusão de ambas artérias carótidas comuns externas, bilateralmente por 5 minutos, seguida de perfusão (DE ARAUJO et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 2012).

De fato, os Gerbilos da Mongólia são amplamente utilizados nos modelos de isquemia global (CANISTRO et al., 2010; LEE et al., 2010) devido a sua semelhança anatomofisiológica com a espécie humana e ainda, porque estes animais possuem uma fragilidade na circulação do sangue pelo encéfalo, devido a falta de comunicação arterial posterior, que conecta o sistema vertebro basilar e as artérias

carótidas, constituindo um círculo de Willis incompleto (YANG; CAI; LEE, 2016), o que possibilita que poucos minutos de oclusão da artéria carótida seja capaz de gerar morte celular e consequente comprometimento das funções cerebrais (KITABATAKE et al., 2015; WOODRUFF et al., 2011). Nesse contexto, há mais de 40 anos esses animais veem sendo utilizados na pesquisa básica experimental já que, do ponto de vista instrumental e operacional, a realização da técnica de oclusão se torna mais simples (LEVINE; SOHN, 1969).

2.2 Isquemia global e áreas encefálicas acometidas

Devido a tolerância limitada à isquemia, o encéfalo é um dos órgãos mais vulneráveis a processos isquêmicos, em razão de seu metabolismo anaeróbico restrito e às baixas reservas de glicogênio (SADELLI et al., 2017). Para funcionar adequadamente os neurônios requerem um suprimento regular de sangue, oxigênio e glicose. A deficiência no suprimento desses componentes, após a interrupção do fluxo sanguíneo, promove uma deficiência da síntese de adenosina trifosfato (ATP), resultando em um colapso nos mecanismos dependentes de energia (FONTELES, 2013) seguida pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de glutamato, acúmulo de cálcio intracelular e indução de processos inflamatórios que prejudicam o tecido cerebral (LIPTON et al., 1999). Subsequentemente, ocorre o infarto tecidual e perda neuronal por processos necróticos e apoptóticos (DE ARAUJO et al., 2008).

A liberação massiva de glutamato, conduz inúmeros neurônios a morte devido a hiperestimulação (DE ARAUJO et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012; KITABATAKE et al., 2015). Após a isquemia, a excitotoxicidade conduz a inflamação e estresse oxidativo no tecido encefálico, resultando em disfunção da barreira hematoencefálica, alterações microvasculares, morte celular e consequentemente danos cerebrais (LAKHAN et al., 2009). Essa sequência de eventos, denominada cascata isquêmica, leva a lesão tecidual irreversível (FLURI et al., 2015), sendo acompanhada por déficits comportamentais e funcionais.

Como resposta a isquemia global induzida pela privação de fluxo sanguíneo, oriundo da obstrução das carótidas, ocorre uma neurodegeneração em regiões

específicas e vulneráveis do encéfalo, como o observado no estriado, córtex cerebral (KITABATAKE et al.; 2015) e na região mais vulnerável, a CA1 do hipocampo (YAN et al., 2014).

A região CA1 no hipocampo tem um importante papel no aprendizado e no processamento de memória (RILJACK et al, 2010). A morte neuronal nesta região é chamada de “atrasada” em comparação a outras regiões, (ECKERT; ABRAHAM, 2013; YAN, et al., 2012) já que o processo de morte se acentua no 4º dia pós evento isquêmico (DE ARAUJO et al., 2012). Em outras áreas como a área motora M1 do córtex motor, que está envolvida com processos referentes ao aprendizado motor (PAGNUSSAT et al., 2012), a morte celular pós isquemia apresenta também uma perda neuronal adicional após o 4º dia do evento isquêmico (DE ARAUJO et al., 2012). De maneira distinta, no estriado, a morte neuronal acontece em poucas horas após o evento isquêmico, chegando a aproximadamente 20% de neurônios sobreviventes em 4 horas (WINTER et al., 2004). Trabalhos realizados em nosso laboratório com modelos isquêmicos em Gerbilos da Mongólia mostram que o córtex motor e o estriado são as estruturas mais afetadas seis dias após a isquemia global (DE ARAUJO et al., 2008, DE ARAUJO et al., 2012).

Considerando o papel importante destas estruturas no controle de diferentes tipos de comportamento e da motricidade, espera-se que a isquemia encefálica produza alterações funcionais que podem ser avaliadas em modelos comportamentais e alterações morfológicas detectáveis em análises histológicas (AUSTIN et al., 2014).

3. Modelos animais de avaliação do comportamento

O uso de modelos animais em roedores para estudo de doenças neurológicas é bastante antigo, devido as semelhanças bioquímicas e genéticas com os correspondentes humanos, diferentes espécies permitem o estabelecimento de correlações importantes para o entendimento da fisiopatologia das mais diferentes

doenças, além disso, podem proporcionar também oportunidade para o estudo de novas abordagens terapêuticas (SHIOTSUKIA et al., 2010) .

Para esse fim, existe uma considerável variedade de testes comportamentais, que são comumente utilizados na investigação básica e pré-clínica para testar, por exemplo, os efeitos de fármacos na aprendizagem e na memória, bem como para avaliar o grau de ansiedade, as habilidades cognitivas e o comportamento motor (FEYISSA et al., 2017).

Com relevância direta ao nosso trabalho, os testes motores podem ser divididos em testes gerais, incluindo o teste do cilindro em movimento, testes de rastreamento genérico, sistemas de escalas de movimentos involuntários anormais, entre outros; teste de atividade locomotora, incluindo o teste do campo aberto (CA) em arena circular ou quadrada, o rotômetro (*automated rotometer test bowls*), o teste da roda para correr (*wheel running*); testes de coordenação motora e equilíbrio incluindo o teste de Rotarod (RR), o teste do balanço (*balance beam*), entre outros; e os testes de avaliação do desempenho das extremidades, incluindo o teste de Collins, o teste da escadaria e o teste de alcance (*Mouse Phenome Database*) (PINTO et al., 2012, BROOKS; DUNNETT, 2009).

Entre os diferentes testes comportamentais, os testes de RR em conjunto com o teste do CA constituem a principal abordagem para a caracterização do desempenho motor em diferentes modelos animais experimentais.

3.1 Rotarod

O RR é um teste amplamente utilizado para avaliar incapacidade motora em roedores. O tempo que os animais são capazes de permanecer no cilindro em movimento é considerado um correlato de capacidade motora (FEYISSA et al., 2017). Desde sua primeira utilização, há mais de 50 anos, o teste de RR tem sido utilizado como uma ferramenta simples para testar os efeitos de drogas, lesões encefálicas ou estados de doenças neurológicas degenerativas, constituindo uma ferramenta prática e validada para avaliação do desempenho motor em roedores (DUNHAM & MIYA, 1947; STROOBANTS et al., 2013). Tradicionalmente, o RR tem

sido utilizado nos estudos experimentais pré-clínicos com drogas, onde o objetivo é identificar efeitos adversos motores e sistêmicos. Atualmente o teste RR, representa uma forma de caracterização motora em modelos animais no que diz respeito ao equilíbrio, coordenação motora, controle neuromuscular e na também para descrever aprendizagem motora (PINTO et al., 2012). Para um desempenho ideal, os ratos devem apresentar uma resposta apropriada, que consiste em permanecer no cilindro, evitando a queda. A tarefa de equilíbrio também serve como treinamento simétrico para o sistema motor, à medida que, os roedores se alinham ortogonalmente ao eixo do cilindro rotativo.

3.2 Campo Aberto

Desenvolvido por Hall e Ballachey (1932), o teste do CA (open field) foi inicialmente destinado para estimar a atividade locomotora e a disposição exploratória de roedores. O teste é bastante utilizado na avaliação do comportamento exploratório e atividade geral de roedores (PERALS et al., 2017). No teste do CA, são registrados os padrões de locomoção, tanto no centro do aparato como nas regiões periféricas (próximas às paredes) da arena, o que pode representar não somente o desempenho motor no teste, mas também informações relacionadas a ansiedade presente nos animais (CARTER et al., 2013). Outros comportamentos como, levantamentos, autolimpeza, entre outros, também podem refletir o estado emocional do animal frente a um novo ambiente. Sendo um teste utilizado para analisar a atividade exploratória e, com base nela, o comportamento ansiolítico ou ansiogênico em roedores, também podem ajudar a entender o papel de drogas que produzem alterações no perfil exploratório (De ARRUDA et al., 2011)

3.3 Modelos animais e drogas que modificam o desempenho motor

Os modelos animais para avaliação do comportamento são fundamentalmente atrelados ao estudo de drogas, que atuam em diferentes sistemas, pois podem quantificar a maneira como os animais reagem ao ambiente

antes e após a utilização de alguma molécula biologicamente ativa (WILLNER; MITCHELL, 2002). Diferentes trabalhos foram realizados para testar o efeito de drogas como por exemplo, cocaína, cafeína, apomorfina, racloprida, alprazolam, fluoxetina, utilizando o CA, RR, labirinto em cruz elevado (LCE), teste de natação forçada modificada, entre outros (AREAL et al., 2015; SANTOS et al., 2015; WONG et al., 2018; SHAHZAD et al., 2014; HALEEM & FARHAN, 2015).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório, em animais saudáveis e isquêmicos, utilizando os testes do RR, CA e LCE pós injeção de apomorfina, pentilenotetrazol, alprazolam e nicotina (GIORGETTO et al., 2015; BERTOLINO et al., 2013b; BRITO et al., 2016; KITABATAKE et al., 2016), foi possível observar que os animais injetados com essas diferentes drogas, modificam de forma evidente seu comportamento padrão e até mesmo o comportamento modificado por lesões encefálicas específicas. Dessa maneira, evidências nossas e de outros laboratórios mostram a importância e a validade de modelos de avaliação do comportamento animal para o entendimento do mesmo e sua reação frente a presença de drogas ativas no SNC.

Com interesse direto ao nosso presente trabalho, SANGUEDO e cols., (2014) mostraram que a apomorfina pode induzir aumento do perfil locomotor em ratos, por ativação dopaminérgica. Por outro lado, a racloprida pode diminuir o desempenho motor em ratos por antagonismo de receptores dopaminérgicos D2/D3 (CAREY et al., 2004)

3.3.1 Apomorfina

A Apomorfina (6-methyl-6 α β -noraporphine- 10,11-diol) (APO) é um alcaloide semi-sintético benzil isoquinolínico que foi obtido pela primeira vez em 1869, através do tratamento ácido da 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). O uso da APO é baseado em sua estimulação inespecífica do sistema dopaminérgico e, devido a suas características

estruturais, é considerada como um agonista dopaminérgico direto que, ao penetrar no encéfalo, se acumula prontamente no estriado (núcleos caudado e putâmen), agindo sobre os receptores dopaminérgicos D1 e D2 pré e pós sináptico, alterando os níveis de DA entre os hemisférios cerebrais, via modulação assimétrica das sinapses córticoestriatais conduzidas pelos neurônios no sistema nigroestriatal (PICADA, 2003; KOUZMINE, 2004).

As vias mais frequentes de administração da APO são a sublingual e subcutânea, evitando o acentuado metabolismo hepático de primeira passagem, que ocorre na via enteral (oral). Após a administração, a APO é rapidamente absorvida, atingindo um pico de concentração plasmática em 40-60 minutos, sendo metabolizada principalmente no fígado (DELEU et AL., 2002). No SNC, o sistema dopaminérgico está envolvido em funções motoras, motivacionais, emocionais e cognitivas. 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, lambe, roer, se levantar sobre as patas traseiras e se locomover. Em direção oposta, quando em baixas doses (0,5 mg/kg), o animal passa a apresentar baixa atividade locomotora (ARROYO-GARCIA et al., 2018).

3.3.2 Racloprida

A Racloprida (RAC), pertencente a classe dos neurolépticos da saliciamida. É um composto sintético que age como um antagonista seletivo nos receptores de dopamina D2, antagonizando a receptividade induzida pela APO (HAKAN, 1988). Foi constatado que a RAC, que também é agente antipsicótico, possui potencial efeito bloqueador dos receptores centrais de dopamina D2, suprimindo a atividade locomotora exploratória, a locomoção na esteira e a resposta de esquila condicionada em ratos. O perfil comportamental da RAC difere dos antipsicóticos clássicos, como o haloperidol, bloqueando os receptores centrais de dopamina (DA), bem como do agonista DA parcial, o preclamol, que inibe a neurotransmissão central da DA pela ativação dos auto-receptores DA. Assim, embora semelhante ao

haloperidol em outros aspectos, doses relativamente altas de RAC são necessárias para produzir catalepsia, indicando menor propensão a produzir efeitos colaterais extrapiramidais severos (ALAKURTTI et al., 2015).

Embora a expressão dos receptores D2/ D3 seja mais alta no estriado, as projeções dopaminérgicas possuem eferências difusas que terminam nas regiões límbica, talâmica e cortical. Nas áreas extra-estriatais, a RAC tem sido considerada menos adequada para medir a atividade da DA. A ligação da RAC parece ser muito menor em áreas extra-estriatais do que em estriatais, devido à menor densidade de receptores D2 / D3, resultando em baixas taxas de sinal-ruído que dificultam a confiabilidade da medição. Apesar disso, há evidências de que o potencial de ligação da RAC também pode ser observado em regiões extra-estriatais após manipulações farmacológicas ou comportamentais (STOKES et al., 2010). Distúrbios patológicos que alteram a ligação extra-estriatal da RAC foram associadas a doenças como, Parkinson, Huntington e Alzheimer (ALAKURTTI et al., 2015; POLITIS et al., 2011).

4. Modificadores da resposta isquêmica e plasticidade encefálica

Apesar dos avanços no tratamento pós AVE, estratégias eficazes para a preservação e recuperação dos neurônios aplicáveis na terapia clínica são muito escassas. Confrontados com a falta de opções de tratamento, várias estratégias tem sido investigadas com o objetivo de melhorar a recuperação motora. Entre as propostas para esse fim, podemos encontrar desde agentes farmacológicos, atividade física e até mesmo, recursos não convencionais como a Estimulação do Nervo Vago (ENV) e o uso de substâncias naturais de plantas (BOUROUROU; HEURTEAUX; BLONDEAU, 2016).

Estudos recentes mostram que a atividade física tem sido eficaz na manutenção da saúde global e também para a manutenção de estruturas encefálicas. Dessa maneira, podemos apontar que a atividade física pode melhorar a resposta aos eventos isquêmicos encefálicos, reduzir a área do infarto após o AVE, e minimizar a frequência e a severidade dos sintomas nos sobreviventes

(KITABATAKE, 2016). O exercício físico pode afetar o hipocampo nos seus aspectos neuroquímicos, incrementar a atividade neuronal, a proliferação, a sobrevivência de células granulares e a sobrevivência neuronal após a isquemia (ARIDA et al., 2004). Desta maneira, a atividade física não somente pode reduzir a incidência do AVE, como também os danos neurais associados à sua ocorrência e a severidade das incapacidades (ZHANG et al., 2010).

Em outros estudos presentes na literatura, a ENV foi utilizada para induzir a liberação de neuromoduladores e aumentar a plasticidade neural, modulando a resposta neuro-inflamatória e dessa maneira melhorando a recuperação pós AVE e a recuperação do funcionamento cognitivo, sugerindo um potencial efeito terapêutico da ENV (KHODAPARAST et al., 2014; JIANG et al., 2015). Há também evidências do uso de substâncias naturais como a curcumina, devido suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas. Mais recentemente, a curcumina demonstrou ter influência protetora durante distúrbios neurológicos, como doenças neurodegenerativas, isquemia cerebral, lesão por reperfusão e depressão (MIAO et al., 2015). Em ambos os casos, tanto a neuroproteção induzida pelo ENV quanto a influência protetora induzida pela curcumina, estão possivelmente associadas a mecanismos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (XUA et al., 2018).

Ainda, como possibilidade de interferência na resposta isquêmica, alguns trabalhos mostram que a exposição a campos eletromagnéticos (CEMs) de baixa intensidade, além de afetar a transmissão sináptica, a plasticidade do SNC (SUN et al., 2016) também podem interferir com processos de morte neuronal (BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO 2013b; FANELLI et al., 1999; GIORGETTO et al., 2015).

4.1. Campo Magnético

Diferentes sistemas celulares são afetados pelos Campos Magnéticos (CMs) através da interferência na suscetibilidade das biomoléculas, modificações estruturais intracelulares, e nas alterações das reações enzimáticas (ALBUQUERQUE et al., 2016; WANG et al., 2014). Os efeitos esperados a nível celular são complexos, pois dependem da intensidade, magnitude, frequência de

exposição e do sistema biológico estimulado (KOCH et al., 2003). Os CMs são classificados como fracos quando apresentam potência menor que 1 (um) mT (< 1 mT), moderados quando apresentam potência entre 1mT e 1 Tesla (T) ($1 \text{ mT} \geq 1 \text{ T}$), fortes quando a potência está entre 1 T e 5 T ($1 \text{ T} \geq 5 \text{ T}$) e ultra forte quando a potência é maior que 5 T ($> 5 \text{ T}$) (ROSEN, 2003a).

Os CMs há décadas são alvo de grande investigação na literatura científica, uma vez que, pesquisas demonstraram sua influência sobre diversos sistemas biológicos, dentre eles: o ósseo, o tegumentar, o cardiovascular, o pancreático e o nervoso (GMITROV et al., 1996; 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;). A maioria desses trabalhos utilizou a estimulação por campos elétrico magnéticos (CEMs), entretanto, principalmente em nosso laboratório, trabalhos vêm utilizando o campo magnético estático (CME) como fonte de estímulo no tecido neural (BERTOLINO et al., 2013(a); BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b; GIORGETTO et al., 2015).

Os tecidos biológicos apresentam algum grau de diamagnetismo em alguns componentes inorgânicos e, em todos os componentes orgânicos da membrana celular, além disso os CMs podem influenciar o metabolismo celular, a taxa de transcrição, alguns genes e modificar a permeabilidade da membrana celular (ROSEN, 2003a), proporcionando a ativação de diversas respostas nas propriedades biomecânicas e na comunicação intracelular (ROSEN, 1994). Esta reorganização pode ser observada através da redução da adesão celular e alteração nos seus níveis iônicos em células de câncer de mama (WANG et AL., 2014).

Já está bem documentado que os CMs são capazes de atuar em níveis iônicos, modulando o influxo e a concentração intracelular dos íons de cálcio (Ca^{2+}), amplamente envolvidos na manutenção da homeostase e nos processos de morte celular por apoptose (FANELLI et al., 1999; KOCH et al., 2003). Ainda, podem interferir com os canais de sódio (Na^+) localizados na membrana celular e alterar a função dos canais iônicos (ROSEN, 2003b) e o fluxo transmembrana de Ca^{2+} (FANELLI et al., 1999).

4.1.1 Interação dos Campos Magnéticos com o Sistema Nervoso Central

Os efeitos gerados pela exposição dos CMs sobre a morfologia e a viabilidade celular, são desencadeados por meio da combinação de três fenômenos induzidos: ligação de íon-proteína, modificação nos radicais livres e alterações nas membranas. Com relação as ligações de íon-proteína, a ação dos CMs facilita a comunicação intercelular e potencializa o transporte da informação (ALBUQUERQUE et al., 2016). A exposição aos CMs afeta os radicais livres prevenindo os efeitos oxidativos que provocam danos as moléculas (MIYAKOSHI, 2005). Na membrana celular sua interferência se dá pela repolarização, o que equilibra a permeabilidade da membrana e aumenta sua suscetibilidade (WANG et al., 2014).

A capacidade dos CMs de interferir na permeabilidade da membrana celular, e assim, facilitar ou impedir a transmissão de informações interneurônios é discutida em diferentes parâmetros. As investigações se baseiam nas propriedades biomecânicas (WANG et AL., 2014), na atuação nos canais de Ca^{2+} e Na^+ (ROSEN, 2013 a-b), em sua interposição no Potencial Pós Tetânico (PPT) e no Período Refratário Absoluto (PRA) celular (SUN et al., 2016). No entanto, a interferência na liberação do íon Ca^{2+} parece ser a hipótese mais adequada para modificar a comunicação intercelular e possivelmente originar as demais modificações biológicas descritas na literatura (ALBUQUERQUE et al., 2016).

Para uma revisão, é importante lembrar que o Ca^{2+} atua como mensageiro em processos intracelulares (PRINA-MELLO et al., 2006), como a diferenciação, a proliferação e a regulação da morte celular por apoptose (CUI et al, 2014). Dessa maneira, o Ca^{2+} pode desencadear a exocitose e dar início a variadas formas de endocitose. A alteração do equilíbrio dos canais de Ca^{2+} é extremamente relevante para a regulação neuronal, uma vez que são ativados por forte despolarização e sua desativação ocorre de maneira lenta. Sendo assim, os CMs podem aumentar a sobrevivência das células através da inibição da morte por apoptose, podendo se transformar em um importante recurso na terapia de doenças que possuam como base a desregulação desse mecanismo (FANELLI, 1999; BERTOLINO et al., 2013(a); BERTOLINO; De SOUZA; De ARAUJO, 2013b; GIORGETTO et al., 2015).

Além da possibilidade de interferência com os processos de apoptose neuronal, em 1966 Picton mostrou que CMs fracos podem influenciar o comportamento de rotações durante o voo de moscas de frutas (*Drosophila melanogaster*). E ainda, que esse comportamento poderia ser modificado em relação a definição do polo magnético no modelo de estimulação comportamental utilizado.

Trabalhos realizados em nosso laboratório revelaram que o CME pode de fato apresentar efeitos neuroprotetores e ainda promover a manutenção da homeostase comportamental. BERTOLINO et cols. (2013a) mostraram que o CME foi capaz de exercer efeito neuroprotetor e reverter às alterações comportamentais e morfológicas produzidas por isquemia encefálica global em Gerbilos. No mesmo ano, BERTOLINO et cols. (2013b) mostraram que o CME também promove efeito neuroprotetor e reverte as alterações comportamentais e morfológicas após a microinjeção da neurotoxina 6- hidroxidopamina na substância negra compacta, um modelo químico da doença de Parkinson em ratos Wistar. Em outro trabalho Giorgetto et cols. (2015), reportaram os mesmos efeitos neuroprotetores encontrados nos trabalhos anteriores, entretanto, dessa vez, foram obtidos após lesão estriatal por ácido quinolínico, em um modelo experimental da doença de Huntington.

Entretanto, nesse trabalho surgiu uma evidência ainda não reportada nos trabalhos anteriores. Uma vez que, no modelo experimental da doença de Huntington é necessário a utilização APO, e a resposta APO induzida foi diferente para os animais estimulados com o CME, foi criada a hipótese da capacidade desses interagirem com moléculas biologicamente ativas no SNC, como a APO. Sendo assim, é fundamental dar continuidade com a investigação do papel funcional do CME na neuroquímica de estruturas encefálicas e a possibilidade de modificação do comportamento droga induzido.

Objetivos

1. Objetivo Geral

Analisar os efeitos morfológicos e comportamentais após quatro dias de exposição a um CME de 3.200 Gauss, polo norte e polo sul, em Gerbilos submetidos à isquemia encefálica global bilateral e injetados com APO ou RAC.

2. Objetivos Específicos

Analisar efeitos da injeção subcutânea de APO e da injeção intraperitoneal de RAC no comportamento de Gerbilos isquêmicos submetidos ao CME no Monitor de Atividade e Rotarod.

Quantificar o impacto da lesão isquêmica no estriado, área CA1 do hipocampo e área M1 do córtex motor, utilizando morfometria após coloração com Hematoxilina e Eosina.

Descrever a presença de lesão apoptótica utilizando histoquímica após coloração com Fluoro Jade C.

Material e Métodos

6.1 Animais e grupos experimentais

Esse trabalho foi aprovado pelo comitê de ética de experimentação animal nº 090/2014, por estar de acordo com os princípios éticos em experimentação animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados 130 roedores da espécie *Meriones mongolicus* (*Rodentia, Gerbillinae*), Gerbilo da Mongólia, pesando entre 60 - 70g, distribuídos em 13 grupos experimentais. Os animais foram alojados no biotério do laboratório experimental do curso de Fisioterapia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), em gaiolas de polipropileno com grade de aço inox (para não haver atração com o magneto), forradas com serragem, com controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro escuro de 12/12 horas.

Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram nas gaiolas por um período total de quatro dias até a finalização dos experimentos, com livre acesso à água e comida durante todo o experimento. O número de animais foi igual a 10 em cada grupo.

Todos os animais tiveram seu comportamento avaliado no Monitor de Atividade e Rota Rod.

Grupo Controle (GC): Animais que não foram submetidos a nenhum tipo de manipulação cirúrgica ou injeção de drogas.

Grupo “Sham” (GS): Animais que tiveram a cirurgia interrompida antes da oclusão das artérias carótidas.

Grupo “Sham” Magnético (GSM): Animais que tiveram a cirurgia interrompida antes da oclusão das artérias carótidas e implante de magnetos não magnetizados.

Grupo “Sham” Magnético + Salina (SMS): Animais que tiveram a cirurgia interrompida antes da oclusão das artérias carótidas, implante de magnetos não magnetizados e submetidos a injeção intraperitoneal de salina a 0,9% (0,01mg/g).

Grupo Isquemia (GI): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum.

Grupo Isquemia Polo Norte (GIPN): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum, com implante de magneto com o polo norte direcionado a calota craniana.

Grupo Isquemia Polo Sul (GIPS): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum, com implante de magneto com o polo sul direcionado a calota craniana.

Grupo Isquemia + Apomorfina (GIAPO): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum e injeção subcutânea de APO (2,5mg/kg) 5 minutos antes da avaliação comportamental.

Grupo Isquemia + Racloprida (GIRAC): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum e injeção intraperitoneal de RAC (0,9mg/kg) 5 minutos antes da avaliação comportamental.

Grupo Isquemia Polo Norte + Apomorfina (GIAPON): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum, com implante de magneto com o polo norte direcionado a calota craniana e injeção subcutânea de APO 5 minutos antes da avaliação comportamental.

Grupo Isquemia Polo Norte + Racloprida (GIRACN): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum, com implante de magneto com o polo norte direcionado a calota craniana e injeção intraperitoneal de RAC (0,9mg/kg) 5 minutos antes da avaliação comportamental.

Grupo Isquemia Polo Sul + Apomorfina (GIAPOS): Animais submetidos à cirurgia experimental com oclusão bilateral das artérias carótidas comum, à estimulação magnética com o polo sul e injeção subcutânea de APO (2,5mg/kg), comportamento avaliado no Monitor de Atividades e RR.

Grupo Isquemia Polo Sul + Racloprida (GIRACS): Animais submetidos à cirurgia experimental para oclusão bilateral das artérias carótidas comum, com implante de magneto com o polo sul direcionado a calota craniana e injeção intraperitoneal de RAC (0,9mg/kg) 5 minutos antes da avaliação comportamental.

6.2. Procedimento Cirúrgico

Para a realização do procedimento cirúrgico para oclusão das artérias carótidas comuns, os animais dos grupos isquemia foram anestesiados por via intraperitoneal com Zoletil (2,5mg/kg) e levados a uma tábua cirúrgica. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita a retirada de pelos na região do ventral do pescoço e aplicado iodo. Foi então realizada a tricotomia, seguida de uma incisão ventral no pescoço. Os tecidos subcutâneo e muscular foram afastados, e as artérias carótida comum foram expostas bilateralmente e ocluída por cinco minutos através de um fio de sutura (Figura 1). Durante esse período, a região foi irrigada com cloreto de sódio estéril para prevenir a desidratação tecidual. Uma checagem visual foi realizada para assegurar que o fluxo sanguíneo havia sido interrompido. Após cinco minutos, o fio de sutura foi solto e a artéria foi liberada, provocando a reperfusão da região irrigada. Em seguida foi feita a sutura na região ventral do pescoço com fio de nylon 3-0 (Shalon®).

Nos grupos com estimulação magnética, imediatamente após a sutura da região ventral do pescoço, os animais foram posicionados ventralmente na tábua cirúrgica, foi injetada lidocaína subcutânea no topo do crânio para a remoção do escalpo. O periósteo foi exposto e nele, fixado posteriormente a sutura coronal, um pequeno magneto circular. Em seguida, um capacete de cimento acrílico foi colocado para recobrir a incisão que continha o imã.

No grupo falso operado, a cirurgia foi interrompida antes da oclusão das artérias. No grupo falsa estimulação magnética o procedimento para a fixação do magneto e do capacete de contenção foi realizado por completo, porém o magneto não recebeu carga magnética.

Após a cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de 120.000 U.I de penicilina G benzatina (Fontoura-“Wyeth”-Brasil) para evitar infecção e foram mantidos em aquecimento até o completo retorno anestésico.

Figura 1: Animal anestesiado na tábua cirúrgica com as artérias carótidas ocluídas pela tração realizada no fio de sutura durante o procedimento cirúrgico experimental.

6.3. Estimulação Magnética

Foram utilizados magnetos de neodímio ferro boro com dimensões de 8 mm por 3 mm e intensidade magnética de 3200 Gauss (0,32 Tesla). Magnetos *sham* foram constituídos do mesmo material, porém não estavam magnetizados (Figura 2).

Figura 2 - Figura representativa dos magnetos de neodímio, ferro e boro magnetizado utilizados nos grupos estimulados (seta preta) e do magneto não magnetizado, utilizado no grupo *sham* (seta branca). Note que, na presença de limalha de ferro, o material magnetizado promove a atração da limalha para o corpo do magneto (seta preta), enquanto que no material não magnetizado não há atração da limalha (seta branca). Figura utilizada sob autorização de BERTOLINO, G. 2008.

6.4. Drogas e Doses

Todos os animais dos grupos com injeção de Salina, ou APO ou RAC receberam as injeções 5 minutos antes da avaliação comportamental no Monitor de Atividades (GIORGETTO et al., 2015).

6.4.1 Salina

A solução salina a 0,9% (0,01ml/g) foi injetada por via intraperitoneal nos animais falso estimulados com magneto.

6.4.2 Apomorfina

A APO (2,5mg/kg) (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizada em suspensão salina (0,9%), contendo 2% de *Tween* 80, injetada por via subcutânea. Esta dose foi

previamente testada em trabalhos anteriores e se mostrou adequada para modificar as respostas comportamentais em ratos (BIANCHI et al., 1986) e em Gerbilos (GIORGETTO et al., 2015).

6.4.3 Racloprida

A RAC (0,9ml/kg) (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizada em suspensão salina (0,9%), contendo 2% de *Tween* 80, injetada por via intraperitoneal. A dose utilizada já foi testada em trabalhos anteriores (SIMÓN et al., 2000; CHEAL, 1980).

6.5 Análise Comportamental

6.5.1 Monitor de Atividade

Para avaliar o comportamento motor espontâneo, foi utilizado um monitor de atividades de acrílico e alumínio anodizado, composto por 16 sensores de infravermelho nas barras laterais, com dimensão externa de 50 x 50cm e 48 cm de altura ("Insight", Ltda - Ribeirão Preto/SP-Brasil) (Figura 3). O monitor se conecta a um computador através de um software específico ("Insight", Ltda - Ribeirão Preto/SP-Brasil) e registrou as respostas comportamentais de **Cruzamentos** (toda vez que o animal cruzou as delimitações de 3x3cm do assoalho do monitor os sensores de infravermelho foram disparados) e **Levantamentos** (quando o animal realizou a exploração vertical, erguendo seu corpo apoiado somente nas patas traseiras).

Vinte e quatro horas antes da cirurgia experimental, todos os animais foram levados ao monitor de atividades e colocados um a um por um período de cinco minutos para a habituação ao local (KITABATAKE et al., 2015). No quinto dia pós-habituação, todos os animais foram recolocados no monitor e seu comportamento registrado por 15 minutos.

Figura 3 - Monitor de atividades utilizado no experimento. Note as barras pretas onde estão localizados os sensores de infravermelho.

6.5.2 Rotarod

Imediatamente após a avaliação no monitor de atividades, cada animal foi levado ao equipamento RR (EEF 411 – Insight, Ltda.), que avalia o comportamento motor forçado e o equilíbrio do animal (Figura 4).

Este equipamento possui uma superfície cilíndrica que se move em torno de seu eixo, com uma aceleração progressiva e invariável de 5,5 rotações por minuto (RPM), onde o animal deve equilibrar-se. Ao cair da superfície de teste, o sistema detectava a queda e interrompia a cronometragem, registrando o tempo de permanência do animal no equipamento.

Três dias anteriores e no dia da cirurgia experimental, todos os animais foram levados ao RR e colocados um a um até que se habituassem ao cilindro em movimento, conforme os critérios descritos por BERTOLINO et al. (2013b). Os animais deveriam permanecer por pelo menos três segundos com as quatro patas no cilindro durante 3 tentativas.

A análise comportamental final se deu após o protocolo que cada grupo experimental estava submetido e imediatamente após a última avaliação no monitor de atividade. Mais uma vez, os animais tiveram três tentativas de permanência no cilindro em movimento e os dados obtidos equivalem à média dos três tempos registrados no teste.

Figura 4 - Aparelho Rotarod utilizado nesse trabalho. No centro do equipamento pode ser observado o cilindro onde os animais foram posicionados e na parte inferior as plataformas que interrompiam a cronometragem do tempo quando o animal apresentava a queda.

6.6 Análise Histológica

Após a finalização da avaliação do comportamento dos animais, os animais foram pesados e receberam uma dose excessiva de Zoletil (10mg/kg) via intraperitoneal. Em seguida, foi realizada uma incisão no tórax e o mediastino foi exposto. A aorta descendente torácica foi ocluída, o coração foi exposto e foi realizada uma incisão no átrio direito. O ventrículo esquerdo foi puncionado por meio de um equipo sanguíneo e conectado a uma seringa de 60ml. Os encéfalos foram perfundidos com salina (PBS) e fixados com paraformaldeído a 4% em fosfato (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os animais foram decapitados e os encéfalos removidos e mantidos por 24 horas em uma solução crioprotetora de sacarose a 30% a 4°C.

Posteriormente, os encéfalos foram congelados com isopentano resfriado com gelo seco e mantidos resfriados a -80. Cortes coronais de 30 µm de espessura foram feitos em um criostato (CM 1850 UV - Leica Biosystems, Ltda.), preparados em lâminas de microscopia e corados utilizando-se a técnica de hematoxilina e eosina (H&E).

Para a realização da análise morfométrica, as lâminas coradas foram colocadas em um microscópio eletrônico (Axiolmager Z1 Zeiss, Alemanha) e avaliadas sempre com coordenadas estereotáticas estabelecidas para a mesma estrutura. Para a área motora M1 foi usado o Bregma 3,20mm, para o estriado foi usado o Bregma 1,20mm e para o hipocampo foi usado o Bregma -3,60mm (Paxinos e Watson, 1998). Em seguida, os locais selecionados foram digitalizados em forma de imagem com aumento de 40x. A análise foi realizada pelo software AxionVision versão 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging System, EUA) através da contagem de neurônios.

Somente os grupos GC, GI, GIPN e GIPS foram submetidos à análise histológica, uma vez que as drogas utilizadas em nosso experimento não poderiam modificar o sítio de lesão.

Para a realização da análise histoquímica, foram feitos cortes em seções com espessura de 30 µm e fixados em lâminas gelatinizadas, sendo marcados com Fluoro-Jade C (FJ). O Fluoro-Jade C é frequentemente utilizado como marcador de lesão neuronal. As lâminas foram incubadas em solução de permanganato de potássio a 0,06% por 15 min, e em seguida banhadas em solução de Fluoro-Jade C a 0,001% (Millipore; EUA) e ácido acético a 01% por 30 min. Logo após as lâminas foram lavadas e cobertas com lamínulas utilizando Fluoromount (Millipore; EUA) como meio de montagem.

6.7 Análise dos Resultados

Os dados da avaliação comportamental no monitor de atividade, o tempo de permanência no RR e os dados da análise morfológica foram analisados através da análise de variância de uma via (ANOVA) e sempre que foram detectadas diferenças entre os grupos ($p < 0,05$), estas foram evidenciadas pelo teste *post hoc* de Holm-Sidak. Para os testes estatísticos foi utilizado o programa SigmaPlot®13.

Resultados

7.1. Resultados Comportamentais

Para as variáveis observadas no monitor de atividades (atividade motora espontânea), em relação ao número de cruzamentos não encontramos diferenças significativas em relação aos grupos considerados como controles, a saber os grupos GC, GS, GSM e GSMS. O GI disparou um número maior de sensores horizontais do que o GS. Os grupos GIPN e GIPS dispararam um menor número de sensores horizontais do que o GI. Esse perfil também foi encontrado nos grupos GIAPON, GIAPOS, GIRAC, GIRACN e GIRACS. O GIAPON também disparou um menor número de sensores horizontais do que o GIAPO. Ainda, os grupos GIRAC, GIRACN e GIRACS dispararam um menor número de sensores horizontais em relação aos grupos GIPN e GIPS ($F_{12,117}$: 9,39; $P<0,05$) (Figura 5).

Figura 5 - Número de cruzamentos detectados pelos sensores horizontais de infravermelho no monitor de atividade. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GS= grupo falsa cirurgia; GSM= grupo falsa cirurgia e falso campo magnético; GSMS= grupo falsa cirurgia, falso campo magnético e injetado com salina; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul; GIAPO= grupo isquemia tratado com apomorfina; GIAPON= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo norte; GIAPOS= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo sul; GIRAC= grupo isquemia tratado com racloprida; GIRACN= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo norte; GIRACS= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo sul. *relação com o GS; #relação com o grupo GI; +relação ao GIAPO; &em relação ao GIPN e GIPS. $p<0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.

O mesmo padrão de ativação comportamental foi encontrado para o comportamento de levantamentos. Não encontramos diferenças significativas em relação aos grupos considerados como controles. O GI disparou um número maior de sensores verticais do que o GS. Os grupos GIPN e GIPS dispararam um menor número de sensores verticais do que o GI. Esse perfil também foi encontrado nos grupos GIAPON, GIAPOS, GIRAC, GIRACN e GIRACS. O GIAPON também disparou um menor número de sensores verticais do que o GIAPO. Ainda, os grupos GIRAC, GIRACN e GIRACS dispararam um menor número de sensores verticais em relação aos grupos GIPN e GIPS ($F_{12,117}$: 10,60; $P < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6 - Número de levantamentos detectados pelos sensores verticais de infravermelho no monitor de atividade. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GS= grupo falsa cirurgia; GSM= grupo falsa cirurgia e falso campo magnético; GSMS= grupo falsa cirurgia, falso campo magnético e injetado com salina; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul; GIAPO= grupo isquemia tratado com apomorfina; GIAPON= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo norte; GIAPOS= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo sul; GIRAC= grupo isquemia tratado com racloprida; GIRACN= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo norte; GIRACS= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo sul. *relação com o GS; #relação com o grupo GI; +relação com o grupo GIAPO; &relação aos grupos GIPN e GIPS. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.

O desempenho dos animais no teste de RR, onde avaliamos o comportamento motor forçado, mais uma vez não revelou diferenças significativas em relação aos grupos controles. Por outro lado, encontramos um menor tempo de permanência no aparato no GI em relação ao GS. Além disso, os grupos GIPN, GIPS, GIAPON e GIRACN apresentaram um maior tempo de permanência em relação ao GI. Ainda, o GIAPON apresenta maior tempo de permanência em relação aos GIAPO e GIAPOS. O GIRACN também apresenta maior tempo de permanência em relação aos GIRAC e GIRACS ($F_{12,117}$: 11,29; $P < 0,05$) (Figura 7).

Figura 7- Tempo de permanência no teste de Rota Rod. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GS= grupo falsa cirurgia; GSM= grupo falsa cirurgia e falso campo magnético; GSMS= grupo falsa cirurgia, falso campo magnético e injetado com salina; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul; GIAPO= grupo isquemia tratado com apomorfina; GIAPON= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo norte; GIAPOS= grupo isquemia tratado com apomorfina e com polo sul; GIRAC= grupo isquemia tratado com racloprida; GIRACN= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo norte; GIRACS= grupo isquemia tratado com racloprida e com polo sul. *relação com o GS; #relação com o grupo GI; +relação com o grupo GIAPO e GIAPOS; &relação com o GIRAC e GIRACS. $p < 0,05$ Anova seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.

7.2. Resultados Histológicos

Para análise da histologia, foram consideradas as áreas CA1 do hipocampo, córtex motor (M1) e estriado de todos os animais dos grupos apresentados. Somente os grupos GC, GI, GIPN e GIPS foram submetidos à análise histológica, uma vez que as drogas utilizadas em nosso experimento não poderiam modificar o sitio de lesão. Para a análise morfológica foi feita a contagem de neurônios através do software Axio Vision versão 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging System, EUA).

7.2.1. Resultados Morfológicos

A comparação entre os grupos na região do hipocampo revelou uma redução estatisticamente significativa na densidade dos neurônios na área CA1 do

hipocampo do GI em relação ao GC, GIPN e GIPS. Ainda, os grupos GIPN e GIPS apresentam uma menor densidade de neurônios do que o GC ($F_{3,47}$: 61,76; $P<0,05$) (Figura 8 e 11).

Figura 8- Figura representativa da comparação da densidade de neurônios no Hipocampo (CA1). Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul. *em relação aos grupos CG e #em relação ao GI. $p<0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.

A comparação entre os grupos na região do córtex motor (M1) revelou uma redução significativa na quantidade de neurônios do córtex motor do grupo GI em relação ao CG, GIPN e GIPS. Ainda, os grupos GIPN e GIPS apresentam um menor número de neurônios do que o GC ($F_{3,47}$: 22,36; $P<0,05$) (Figura 9 e 12).

Figura 9- Figura representativa da comparação do número de neurônios no córtex motor (M1). Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul. *em relação aos grupos CG e #em relação ao GI. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.

A comparação entre os grupos na região do estriado revelou uma redução significativa na quantidade de neurônios no grupo GI em relação ao CG, GIPN e GIPS. Ainda, os grupos GIPN e GIPS apresentam um menor número de neurônios do que o GC ($F_{3,47}$: 17,72; $P < 0,05$) (Figura 10 e 13).

Figura 10- Figura representativa da comparação do número de neurônios no estriado. Os dados são apresentados pela média + EPM. CG= grupo controle; GI= grupo isquemia; GIPN= grupo isquemia tratado com polo norte; GIPS= grupo isquemia tratado com polo sul. *em relação aos grupos CG e #em relação ao GI. $p < 0,05$ ANOVA seguida de *Holm Sidack*. O número de animais em cada grupo foi igual a 10.

Figura 11- Fotomicrografias de cortes coronais da área CA1 do hipocampo de gerbilos. (A) grupo controle, (B) grupo isquemia, (C) grupo isquemia estimulado com campo magnético polo norte e (D) grupo isquemia estimulado com campo magnético polo sul. Note a severa redução no número de células piramidais em CA1 do GI quando comparado com o GC e a preservação destas mesmas células nos grupos estimulados GIPN e GIPS quando comparado com o GC (setas). A barra em D representa 37 μm em A, B, C e D.

Figura 12 - Fotomicrografias de cortes coronais da área motora (M1) do córtex motor de gerbilos. (A) grupo controle, (B) grupo isquemia, (C) grupo isquemia estimulado com campo magnético polo norte e (D) grupo isquemia estimulado com campo magnético polo sul. Note a redução no número de neurônios do GI quando comparado com o GC e a preservação neuronal nos grupos estimulados GIPN e GIPS quando comparado com o GC (setas). A barra em D representa 37 μ m em A, B, C e D.

Figura13- Fotomicrografias de cortes coronais do estriado de gerbilos. (A) grupo controle, (B) grupo isquemia, (C) grupo isquemia estimulado com campo magnético pólo norte e (D) grupo isquemia estimulado com campo magnético pólo sul. Note a redução no número de neurônios do GI quando comparado com o GC e a preservação neuronal nos grupos estimulados GIPN e GIPS quando comparado com o GC (setas). A barra em D representa 37 μ m em A, B, C e D.

7.2.2. Resultado Histoquímico

As Fotomicrografias de cortes encefálicos coronais de gerbilos tratados com histoquímica de fluorescência (Fluoro Jade C) para marcação de morte neuronal, revelaram um grande número de marcações positivas nos animais isquêmicos (Figura 14).

Figura 14- Fotomicrografias representativas de animais isquêmicos sem tratamento magnético. Coluna da esquerda, cortes histológicos obtidos através de microscopia ótica e técnica de Hematoxilina e Eosina. Coluna da direita cortes histológicos obtidos através de microscopia de fluorescência e histoquímica para células neuronais com Fluoro Jade C. A) estriado, aumento de 40 x; B) córtex motor, aumento de 40 x; C) Hipocampo, aumento de 10 x. As setas representam a marcação de morte neuronal.

Discussão

Iniciamos esse trabalho, guiados por uma expectativa gerada em um trabalho anterior do nosso laboratório, que o CME poderia interferir com drogas que modificam a resposta motora em testes comportamentais específicos. Essa hipótese surgiu quando o polo magnético Norte, bloqueou as rotações produzidas por apomorfina em ratos com lesão química no estriado (GIORGETTO et al., 2015). Dessa maneira, nossos experimentos foram desenhados para testar essa hipótese.

No presente estudo, realizamos cirurgias experimentais para a produção de lesões isquêmicas globais, utilizando a oclusão bilateral das artérias carótidas em gerbilos. Esse modelo experimental animal é amplamente utilizado no contexto científico e em nosso laboratório (DE ARAUJO et al., 2008; SILVEIRA et al., 2018) devido à ausência da comunicação entre o sistema anterior e posterior de circulação sanguínea no encéfalo, não sendo necessário nenhuma outra intervenção para oclusão do fluxo sanguíneo em outros vasos.

Está bem estabelecido na literatura, que a privação do fluxo sanguíneo através da oclusão bilateral das artérias carótidas em gerbilos, por um período mínimo de 5 minutos, é suficiente para promover eventos fisiopatológicos de lesão neuronal tais como: excitotoxicidade, despolarização, inflamação e apoptose (SIM et al., 2004; De ARAUJO et al., 2012). Alguns neurônios são mais vulneráveis a essa privação de fluxo sanguíneo, em especial os neurônios piramidais do hipocampo, neurônios estriatais e algumas partes do córtex cerebral. Seguindo nessa linha, trabalhos mostram uma grande redução de neurônios piramidais na área CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo quatro dias após a isquemia encefálica global bilateral por 5 minutos seguida de reperusão (JI et al., 2007; De ARAUJO et al., 2012). Nossos dados, mais uma vez vão ao encontro de outros trabalhos na literatura e dos nossos trabalhos prévios com esse modelo experimental (SILVEIRA et al., 2018; KITABATAKE et al., 2015; De ARAUJO et al., 2012; BERTOLINO et al., 2013a; De ARAUJO et al., 2008).

Em relação ao mecanismo de morte neuronal, observado nesse modelo de isquemia global, vários trabalhos sugeriram um mecanismo de morte celular por apoptose (WANG et al., 2008; SIM et al., 2004; LEE et al., 2003).

As características morfológicas da apoptose, incluindo encolhimento das células, condensação da cromatina, fragmentação do DNA internucleosômico, formação de corpos apoptóticos e formação de células tunel positivas, foram relatadas em neurônios submetidos à morte isquêmica (LIEB et al., 1995). Além

disso, para evidenciar os sinais de neurodegeneração e as diferenças na vulnerabilidade de células neuroniais pós isquemia, utilizamos o Fluoro Jade C. Sendo um derivado de fluoresceína polianiônica, pode se ligar de forma sensível e seletiva aos neurônios degenerativos apresentando maiores detalhes morfológicos de neurônios em degeneração e possui compatibilidade com vários protocolos histológicos de processamento e coloração (SCHMUED et al., 2005).

Trabalhos que utilizam a isquemia encefálica são entre outras propostas, úteis para testar a potencialidade farmacológica de drogas. Esses trabalhos revelaram que, de maneira geral, muitas drogas com potencial neuroprotetor atuam como antagonistas de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), bloqueando os canais de Ca^{2+} ou ainda, como inibidoras de radicais livres (BIAN et al., 2007). Nessa mesma linha, FANELLI e cols. (1999) e KOCH e cols. (2003) mostraram que os CMs são capazes de atuar a níveis iônicos, modulando o influxo e a concentração intracelulares dos íons cálcio. Dessa maneira, podemos justificar a maior preservação de neurônios em nossos animais estimulados por CMs.

Uma vez que, a isquemia encefálica global bilateral produz degenerações morfológicas, também é de se esperar as modificações no desempenho motor desses animais isquêmicos. Em nosso modelo, essa alteração motora é caracterizada pela hiperatividade observada na exploração do monitor de atividade (campo aberto), que é definida pelo aumento do número de cruzamentos e levantamentos (atividade espontânea) e está intimamente associada à perda significativa de neurônios piramidais do hipocampo, em especial na área CA1 (De ARAUJO et al., 2012; ZÚÑIGA et al., 2008; JELENKOVIC et al., 2006; BABCOCK et al., 1993). Também observamos prejuízos no desempenho motor desses animais no teste de RR, que se relaciona a atividade motora forçada. O baixo desempenho nesse teste, está associado como pudemos observar em nosso trabalho e, em trabalhos anteriores, a redução de neurônios no estriado e na área motora M1 (De ARAUJO et al., 2012; De ARAUJO et al., 2008).

Em nosso trabalho, os animais isquêmicos não estimulados com o campo magnético apresentaram as alterações comportamentais descritas na literatura pela redução de neurônios nas áreas afetadas pelo nosso modelo de isquemia global. Mais uma vez, evidenciamos o papel neuroprotetor do CME utilizados em nosso estudo, já que, dados morfológicos e comportamentais, dão suporte a essa afirmação e corroboram trabalhos anteriores do nosso grupo (BERTOLINO, 2008;

BERTOLINO, 2013; GIORGETTO et al., 2015). Possivelmente, os campos magnéticos produzem neuroproteção por inibição de mecanismos apoptóticos, já que nosso modelo de isquemia ativa esses mecanismos, como pudemos mostrar pela técnica de Fluoro Jade C e como mostrado por Bertolino (BERTOLINO, 2008) com a técnica de células Túnel positivas.

Fanelli e cols. (1999) mostraram que culturas celulares expostas a CMs apresentam maior sobrevivência por inibição de apoptose e pela modulação do influxo de CA^{2+} . Ikehara e cols. (2002) também relataram uma modificação da concentração de CA^{2+} intracelular em culturas celulares pós-exposição a campo magnético. Uma vez que bloqueio de canais de CA^{2+} estão possivelmente envolvidos com o mecanismo de ação de drogas neuroprotetoras (BIAN et al., 2007) e que, a utilização de antagonistas de cálcio 24h pós-evento isquêmico reduzem de maneira significativa a hiperatividade motora pós isquemia encefálica global (ARAKI et al., 1999) possivelmente esse é o mecanismo que pode justificar nossos resultados nos grupos estimulados com os CMs, que revelam neuroproteção e uma melhor homeostasia comportamental.

Com nossos dados comportamentais e morfológicos corroborados pela literatura corrente, podemos então discutir o principal motivador desse trabalho que foi analisar o comportamento de drogas que interferem com o comportamento motor em conjunto com a estimulação magnética. Com essa expectativa, utilizamos duas drogas que interferem diretamente no mecanismo dopaminérgico, a APO e a RACO. A RACO é um antagonista do receptor dopaminérgico D2, enquanto a APO é um agonista de receptores dopaminérgicos D1 e D2 (HALPERN et al., 2013).

Apesar do mecanismo glutamatérgico, envolvido no processo de morte neuronal isquêmica, ser muito bem descrito na literatura, existem evidências também para uma grande liberação de dopamina após lesões isquêmicas focais e globais (BRANNAN et al., 1987; RICHARDS et al., 1993)

Já está bem reportado que lesões nigro-estriatais produzem liberação de dopamina, que por sua vez, exercem efeito neurotóxico e contribui para a morte neuronal (LIEB et al., 1995).

A dopamina é um neurotransmissor que interfere com diversas funções sensoriomotoras. Por exemplo, a doença de Parkinson e a esquizofrenia são desordens tipicamente associadas a disfunções no sistema dopaminérgico e que

podem ter seus sintomas aliviados por drogas que modificam sua atividade (BARBEAU et al., 1972; MU et al., 2007).

Manipulações no sistema dopaminérgico em animais saudáveis também interfere com seu desempenho comportamental. Assim, o comportamento motor espontâneo de ratos Sprague Dawley com integridade no estriado pode se modificar frente a diferentes dosagens de APO. Nesse sentido, a dose de 1mg/Kg induz a locomoção, o farejar e o roer e a dose de 5mg/Kg induz os mesmos comportamentos, porém de maneira mais intensa (LJUNGBERG & UNGERSTEDT, 1977). Em Gerbilos, a hipercinesia no campo aberto pode ser visualizada com a dose de 2,5 mg/kg (GIORGETO et al., 2015), possivelmente uma diferença de resposta dose dependente em relação a diferentes espécies de animais. Em nosso trabalho, os animais isquêmicos apresentam um padrão locomotor aumentado no teste do campo aberto, revelado pelo número de cruzamentos e levantamentos, e o mesmo padrão está presente nos animais isquêmicos que receberam a dose de 2,5 mg/kg de APO. Entretanto, temos um fator complicador para a interpretação do efeito da APO, uma vez que a própria lesão isquêmica global também produz um aumento da resposta exploratória no campo aberto.

Trabalhos anteriores com animais isquêmicos correlacionaram de maneira inequívoca o aumento do perfil exploratório no CA com a diminuição de neurônios no hipocampo. A APO, como agonista de receptores dopaminérgico pode ter melhorado a ativação de neurônios no estriado, que em nossa análise morfométrica estavam reduzidos em aproximadamente 50% e assim, poderia mediar também o padrão exploratório aumentado. Essa hipótese ganha força quando observamos o perfil exploratório reduzido dos nossos animais no grupo RAC, uma antagonista de receptores dopaminérgicos. Isso deixa evidente a necessidade da neurotransmissão dopaminérgica, mesmo que afetada pela lesão isquêmica (MARTÍN et al., 2013) na produção do comportamento motor.

Gerbilos isquêmicos submetidos a estimulação magnética apresentam mais neurônios no hipocampo, estriado e área motora M1 cortical que seus controles isquêmicos como já discutimos anteriormente. Também, não existem diferenças na preservação de neurônios pós isquemia em relação ao polo magnético utilizado na estimulação, como mostrado nos trabalhos anteriores do nosso grupo (BERTOLINO, 2008; BERTOLINO, 2013; GIORGETO et al., 2015). Entretanto, o que chama

atenção do ponto de vista comportamental, é que nós encontramos diferenças do comportamento observado no CA, entre os grupos polos norte e sul para os animais injetados com APO, mas não para os animais injetados com RAC.

A RAC produziu uma importante inibição do comportamento exploratório dos animais isquêmicos no CA, independente da estimulação magnética. Mesmo com um significativo maior número de neurônios, nos animais estimulados por ambas as polaridades magnéticas, a diminuição da atividade dopaminérgica pelo antagonismo de receptores D2 diminuiu a exploração dos animais. Assim, acreditamos que a RAC não sofreu nenhum tipo de interferência observável pelo tratamento magnético, já que modificou o comportamento de gerbilos no CA na direção esperada. Nessa linha, Patel e cols. (2012) descreveram que comportamento locomotor no teste do CA é dopamina dependente, uma vez que a RAC diminui esse comportamento em camundongos com prosencéfalo *knock-out*.

Diferente do comportamento RAC induzido, o comportamento APO induzido foi modificado por ambos polos magnéticos, com maior inibição no polo magnético norte. Com mais neurônios no hipocampo, o comportamento exploratório dos animais submetidos ao CME norte e sul basicamente se normaliza. Como discutimos anteriormente, a hiperatividade APO induzida esperada nos animais submetidos ao campo magnético não foi observada (IKRAM et al., 2011).

A hiperatividade APO induzida é o padrão nesse teste, já que modelos animais de hiperatividade APO induzida são utilizados para investigar o potencial de drogas antipsicóticas, para testar efeito de novas drogas ou até mesmo de drogas clássicas como a clozapina (CHINDO et al., 2015). Sob essa perspectiva, nossos dados possuem um abrangente potencial para a investigação clínica, já que, por exemplo, a terapêutica a base de apomorfina pode produzir diferentes reações inadequadas em relação a motricidade e até mesmo a comportamentos psicóticos (HALEEM & FARHAN, 2015).

Em nosso trabalho, o teste do RR pode nos auxiliar a entender um pouco melhor o papel de interferência do campo magnético na APO e na RAC. Diferente do campo aberto, o RR é um teste clássico para estudar as incapacidades motoras pós-disfunção dopaminérgica no estriado, como por exemplo em modelos animais da doença de Parkinson (SHIOTSUKIA et al., 2010).

Em nosso trabalho, a exposição ao CME norte e sul reverte o baixo desempenho dos animais isquêmicos nesse teste. Em ambos os casos, a

recuperação de neurônios no estriado, em torno de 30 a 50 por cento pode ser a responsável por esse melhor desempenho. Como a neurotransmissão dopaminérgica parece ser fundamental para o bom desempenho nesse teste e tanto a desregulação e/ou o excesso da dopamina pode produzir um baixo desempenho dos animais (AYTON et al., 2013) podemos observar esse baixo desempenho nos nossos animais isquêmicos com manipulação no sistema dopaminérgico (APO e RAC). Na mesma direção, nossos animais isquêmicos estimulados com o campo magnético sul, mesmo apresentando mais neurônios do que os animais isquêmicos, pela presença da APO e da RAC não apresentam um bom desempenho no teste.

Em nosso trabalho, entretanto, o que chama a atenção é o desempenho dos animais que foram estimulados pelo campo magnético norte e injetados com APO e RAC. O desempenho desses animais no teste é superior ao desempenho dos animais isquêmicos injetados com APO e RAC e também superior aos injetados e estimulados com o campo magnético sul. O comportamento é semelhante ao dos animais isquêmicos tratados com campo magnético sem manipulação do sistema dopaminérgico.

Sendo assim, apoiado em dois testes comportamentais, podemos propor que realmente existe uma importante interferência do polo magnético norte na manipulação dopaminérgica por APO e RAC.

Não podemos explicar como o CME pode agir de maneira tão seletiva na produção das respostas que encontramos. Em relação a essa seletividade, Picton (1966) mostrou que o padrão de voo da *Drosophila melanogaster* pode exibir um maior número de rotações para a direita ou para a esquerda de maneira dependente ao polo magnético utilizado em sua estimulação.

Um recente trabalho, publicado por Sun e cols. (2016), mostrou que a ação dos CEM modifica os potenciais de ação pré-sinápticos, interferindo na liberação dos conteúdos das vesículas sinápticas. Quanto maior o influxo de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico maior a liberação de neurotransmissores (FANELLI et al., 1999), assim nossa hipótese é que a ação do CME, que modificou a ação das drogas utilizadas, se deu pela modulação dos canais iônicos, interferindo com a modulação do sistema dopaminérgico em diferentes estruturas, não impedindo (polo sul) ou impedindo (polo norte) a atuação da droga utilizada.

Acreditamos que avançamos consideravelmente com o entendimento do efeito do CME pós-isquemia em Gerbilos e podemos propor que de maneira seletiva

o CME norte interfere com a ação de drogas que interferem no mecanismo dopaminérgico. Será importante que nos próximos trabalhos, utilizemos outras análises neuroquímicas, e modelo agonista/antagonista através da microinjeção em estruturas específicas, que poderão nos ajudar a entender os sítios e as moléculas que estão sendo ativadas ou inibidas após estimulação química e magnética.

Conclusão

Em Gerbilos isquêmicos submetidos ao teste do Rotarod apenas o polo magnético norte foi capaz de interferir com o mecanismo de ação da APO e da RAC.

Em Gerbilos isquêmicos submetidos ao teste do Monitor de Atividade ambos os polos magnéticos foram capazes de interferir com o mecanismo de ação da APO, mas não tiveram nenhum tipo de interação com a RAC.

A redução de neurônios nas áreas CA1 do hipocampo, Área Motora M1 e Estriado se dá por morte apoptótica e o tratamento por ambos campos magnéticos preserva neurônios nessas áreas.

Referências Bibliográficas

ALAKURTTI, K.; JOHANSSON, J.J.; JOUTSA, J.; LAINE, M.; BÄCKMAN, L.; NYBERG, L.; RINNE, J.O. Long-term test–retest reliability of striatal and extrastriatal dopamine D2/3 receptor binding: study with [¹¹C] raclopride and high-resolution PET. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, p. 1199–1205, 2015.

ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Single Units in the Medial Prefrontal Cortex with Anxiety-Related Firing Patterns Are Preferentially Influenced by Ventral Hippocampal Activity. **Neuron**, v. 71, p. 898–910, 2011.

ALBUQUERQUE, W. C.; COSTA, R. P. B.; FERNANDES, T. S.; PORTO, A. L. F. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 121, p. 26–28, 2016.

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**, v. 69, p. 242–275, 2008.

AMIRIA, S.; HAJ-MIRZAIANA, A.; AMINI-KHOEIA, H.; MOMENY, M.; SHIRZADIANA, A.; BALAEID, M. R.; ZARRINRAD, G.; GHAZI-KHANSARIA, M.; AZIZIA, R.; DEHPOURA, A. R.; MEHR, S. E. NMDA receptor antagonists attenuate the proconvulsant effect of juvenile social isolation in male mice. **Brain Research Bulletin**, v. 121, p. 158–168, 2016.

AREAL, L.B.; RODRIGUES, L.C.; ANDRICH, F.; MORAES, L.S.; CICILINI, M.A.; MENDONÇA, J.B.; PELIÇÃO, F.S.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M.; MARTINS-SILVA, C.; PIRES, R.G. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. **Behav Brain Res**, v. 290, p.8-16, 2015.

ARIDA, R.M.; SCORZA, C.A.; DA SILVA, A.V.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the

staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neuroscience Letters**, v. 364, p. 135-138, 2004.

ARROYO-GARCÍA, L.E.; VÁZQUEZ-ROQUE, R.A.; DÍAZ, A.; TREVIÑO, S.; DE LA CRUZ, F.; FLORES, G.; RODRÍGUEZ-MORENO, A. The Effects of Non-selective Dopamine Receptor Activation by Apomorphine in the Mouse Hippocampus. **Molecular Neurobiology**, 2018.

ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioral Pharmacology**, v.8, p. 533- 557, 1997.

AUSTIN, M.W.; PLOUGHMAN, M.; GLYNN, L.; CORBETT, D. Aerobic exercise effects on neuroprotection and brain repair following stroke: a systematic review and perspective. **Neuroscience Research**, v. 87, p.8-15, 2014.

AYTON, S.; GEORGE, J.L.; ADLARD, P.A.; BUSH, A.I.; CHERNY, R.A.; FINKELSTEIN, D.I. The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. **Neurosci Lett.**, v. 543, p. 105-9, 2013.

BABCOCK, D.F.; BOSMA, M.M.; BATTAGLIA, D.E.; DARSZON, A. Early persistent activation of sperm K⁺ channels by the egg peptide speract. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 89, p. 6001-6005, 2012.

BARBEAU, A.; MARS, H.; BOTEZ, M. I.; JOUBERT, M. Levodopa combined with peripheral decarboxylase inhibition in Parkinson's disease. **Can. Med. Assoc. J.**, v.106, p.1169–1174, 1972.

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 process of tissue reparation in Wistar rats. **Archives Dermatological Research**, v. 298, p. 121–126, 2006.

BERTOLINO, G. **Efeitos Comportamentais e neuronais produzidos pela exposição ao campo magnético contínuo pós-isquemia encefálica bilateral em gerbilos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ortopedia, traumatologia e Reabilitação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

BERTOLINO, G. **Efeitos Comportamentais e Neurônais Crônicos Induzidos pelo Campo Magnético contínuo em um Modelo Experimental de Parkinson Induzido pela Neurotoxina 6-Hidroxidopamina em Ratos Wistar**. 2013. Tese (Doutorado em Reabilitação e Desempenho Funcional) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

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**, v.1, p. 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**, v. 32, p. 527-535, 2013b.

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

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 25, p. 205-218, 2001.

BOUROUROU, M.; HEURTEAUX, C.; BLONDEAU, N. Alpha-linolenic acid given as enteral or parenteral nutritional intervention against sensorimotor and cognitive deficits in a mouse model of ischemic stroke. **Neuropharmacology**, v.108, p. 60-72, 2016.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17(3), p. 295–303, 2015.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIERE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCOET, M. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, p. 567–574, 2007.

BRANDÃO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDOSSIO, J. E.; De ARAUJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v. 23 (6), p. 863-75, 1999.

BRANNAN, T.; WEINBERGER, J.; KNOTT, P.; TAFF, I.; KAUFMANN, H.; TOGASAKI, D.; NIEVES-ROSA, J.H. Make. Direct evidence of acute, massive striatal dopamine release in gerbils with unilateral strokes. **Stroke**, v. 18, p. 108-110, 1987.

BRITO, R.C. **Alterações comportamentais induzidas por Pentilenotetrazol e por Alprazolam em animais submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado e estimulados por campo magnético estático**. 2016. 114f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016

BROOKS, S.P.; DUNNETT, S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 519-29, 2009.

CANISTRO, D.; AFFATATO, A.A.; SOLETI, A.; MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; SCULCO, F.; SACCO, I.; VISALLI, V.; BONAMASSA, B.; MARTANO, M.; IANNONE, M.; SAPONE, A.; PAOLINI, M. The novel radical scavenger IAC

is effective in preventing and protecting against post-ischemic brain damage in Mongolian gerbils. **Journal of Neurologic Science**, v. 290, p. 90-95, 2010.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety – like behavior: the elevated plus - maze model 20 years on. **Neuroscience Biobehavior Reviews**, v.29, p. 1193–1205, 2005.

CAREY, R.J.; DEPALMA, G.; DAMIANOPOULOS, E.; HOPKINS, A.; SHANAHAN, A.; MÜLLER, C.P.; et al. Dopaminergic and serotonergic autoreceptor stimulation effects are equivalent and additive in the suppression of spontaneous and cocaine induced locomotor activity. **Brain Res**, v.1019, p.134 - 43, 2004.

CARTER, A. J.; FEENEY, W. E.; MARSHALL, H. H.; COWLISHAW, G.; HEINSOHN, R. Animal personality: What are behavioural ecologists measuring? **Biological Reviews**, v.88, p. 465-475, 2013.

CARVALHO-NETTO, E. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. I. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 148, p. 119–132, 2004.

CASTRO,O.W.; FURTADO, M.A.; TILELLI, C.Q.; FERNANDES, A.; PAJOLLA, G.P.; GARCIA-CAIRASCO, N. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **BRAIN RESEARCH**, v.1374, p.43 – 55, 2011.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, p. 512–518, 2009.

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

CHEAL, M. L. Disruption of selective attention by apomorphine, but not amphetamine, in the Mongolian gerbil. **Psychopharmacology**, v.69 (1), p.93-100, 1980.

CHINDO, B. A.; KAHL, E.; TRZECZAK, D.; DEHMEL, P.; BECKER, A.; FENDT, M. Standardized extract of *Ficus platyphylla* reverses apomorphine-induced changes in prepulse inhibition and locomotor activity in rats. **Behav Brain Res**, v. 293, p.74-80, 2015.

CHIONNA, A.; DWIKAT, M.; PANZARINI E.; TENUZZO, B.; CARLÀ, 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**, v. 47, p. 299–308, 2003.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 235-260, 2001.

CORDA, M. G.; ORLANDI, M.; LECCA, D.; GIORGI, O. Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 262 (2), p. 792-800, 1992.

COSQUER, B.; GALANI, R.; KUSTER, N.; CASSEL, J-C. Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. **Behavioural Brain Research**, v. 156, p. 65–74, 2005.

CRUSIO, W. E. Genetic dissection of mouse exploratory behavior. *Behavioural Brain Research*, v.125, p. 127-132, 2001.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, p. 171–176, 1994.

CRUZ, A. P. M.; PINHEIRO, G.; ALVES, S. H.; FERREIRA, G.; MENDES, M.; FARIA, L.; MACEDO, C. E.; MOTTA, V.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 182 (3), p. 345-354, 2005.

CUI Y.; LIU X.; YANG T.; MEI, Y. A.; HU, C. Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields inhibits T-type calcium channels via AA/LTE4 signaling pathway. **Cell Calcium**, v. 55, p. 48–58, 2014.

DAVIS, H.P.; MIZUMORI, S.Y.J.; ALLEN, H.; ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E. L.; TENFORDE, T.S. Behavioral studies with mice exposed to DC and 60-Hz magnetic fields. **Bioelectromagnetics**, v. 5, p.147–164, 1984.

DE ARAUJO, F.L.B.; BERTOLINO, G.; FUNAYAMA, C.A.R.; COIMBRA, N.C.; DE ARAUJO, J.E. Influence of treadmill training on motor performance and organization of exploratory behavior in Meriones Unguiculatus with unilateral ischemic stroke: Histological correlates in hippocampal CA1 region and the neostriatum. **Neuroscience Letters**, v. 431, p. 179-183, 2008.

De ARAUJO, F. L. B; BERTOLINO, G; GONÇALVE, R. B; MARINI, L. C; COIMBRA, N. C; De ARAUJO, J. E . Neuropathology and behavioral impairments after three types of global ischemia surgery in Meriones unguiculatus: Evidence in motor cortex, hippocampal CA1 region and the neostriatum. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 312, p.73–78, 2012.

De ARAUJO, J. E.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. **European Journal of Pharmacology**, v. 432, p. 43-51, 2001.

De ARAUJO, J. E.; SILVA, R. C. B.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray? **Peptides** (New York), v. 20, p. 1437-1443, 1999.

De ARRUDA, E. J.; KITAMURA, J. H.; CHAVES, T. P.; Da SILVA, C. A.; MASCARIM, A. L. Exploratory and Anxiolytic Behavior of Rats Submitted do Somatosensory Stimulation. **Rev Bras Terap e Saúde**, v.2, p. 7-12, 2011.

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**, v.141, p. 48-57, 2005.

DELEU D., NORTHWAY M.G., HANSSENS Y. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease. **Clin. Pharmacokinet.** v.41, p.261-309, 2002.

DESILLES, J.P.; LOYAU, S.; SYVANNARATH, V.; VALCARCEL, J.G.; CANTIER, M.; LOUEDEC, L.; LAPERGUE, B.; AMARENCO, P.; AJZENBERG, N.; PERRUS, M.J.; MICHEL, J.B.; NOE, B.H.T.; MAZIGHI, M. Alteplase Reduces Downstream Microvascular Thrombosis and Improves the Benefit of Large Artery Recanalization in Stroke. **Stroke**, v. 46, p. 3241-3248, 2015.

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**, v.23, p. 398- 405, 2002.

DITTMAR, M.D.; SPRUSS, T.; SCHUIERER, G.; HORN, M. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke**, v. 34, p. 2252-2257, 2003.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association** (Baltimore), v. 46, p. 208–9, 1947.

EDWARDS, M. J.; TALELLI, P.; ROTHWELL, J. C. Clinical applications of transcranial magnetic stimulation in patients with movement disorders. **The Lancet Neurology**, v. 7, p.827- 40, 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**, v. 13, p. 95–102, 1999.

FEIGIN, V.L.; LAWES, C.M.; BENNETT, D.A.; BARKER-COLLO, S.L.; PARAG, V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. **Lancet Neurol**. v. 8, p. 355–369, 2009.

FEYISSA, D.D.; AHER, Y.D.; ENGIDAWORK, E.; HÖGER, H.; LUBEC, G.; KORZ, V. Individual Differences in Male Rats in a Behavioral Test Battery: A Multivariate Statistical Approach. **Front. Behav. Neurosci**, 2017.

FOURNIER, N. M.; MACH, Q. H.; WHISSELL, P. D.; PERSINGER, M. A. Neurodevelopmental anomalies of the hippocampus in rats exposed to weak intensity complex magnetic fields throughout gestation. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, p. 427-33, 2012.

FLURI, F.; SCHUHMANN, M.K.; KLEINSCHNITZ, C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Journal of Drug**

Design, Development and Therapy, Drug Des Devel Ther, v. 9, p. 3445-3454, 2015.

FRASER, L. M.; BROWN, R. E.; HUSSIN, A.; FONTANA, M.; WHITTAKER, A.; O'LEARY, T. P.; LEDERLE, L.; HOLMES, A.; RAMOS, A. Measuring anxiety- and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. **Psychopharmacology**, v. 211, p. 99–112, 2010.

GARCIA, A. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. The effects of pentylenetetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behavioural Brain Research**, v. 217, p. 171-177, 2011.

GERRIETS, T.; LI, F.; SILVA, M.D.; MENG, X.; BREVARD, M.; SOTACK, C.H.; FISCHER, M. The macrosphere model: evaluation of new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 122, p. 201-211, 2003.

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

GIORGETTO, C.; SILVA, M. C. E.; KITABATAKE, T. T.; BERTOLINO, G.; De ARAUJO, J. E. Behavioural profile of Wistar rats with unilateral striatal lesion by quinolinic acid (animal model of Huntington disease) post-injection of apomorphine and exposure to static magnetic field. **Experimental Brain Research**, v. 233, p. 1455–1462, 2015.

GMITROV J.; OHKUBO C.; OKANO H. Effect of 0.25 T static magnetic field on microcirculation in rabbits. **Bioelectromagnetics**, v. 23, p. 224–229, 2002.

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

GORMAN, A. M.; MCGOWAN, A.; O'NEILL, C.; COTTER, T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. **J. Neurol. Sci**, v. 139, p. 45-52, 1996.

GRALLERT, S. M.; TAVARES, L. C.; De ARAÚJO, E. B. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 243-257, 2003.

GYIRES, C.; ZADORI, Z. S.; RACZ, B.; LASZLO, J. Pharmacological Analysis of Inhomogeneous Static Magnetic Field-Induced Antinociceptive Action in the Mouse. **Bioelectromagnetics**, v. 29, p. 456-462, 2008.

HAKAN, A.Y.; ARSAVA, E.M.; JOHNSTON, S.C.; VANGEL, M.; SCHWAMM, L.H.; FURIE, K.L.; KOROSHETZ, W.J.; SORENSEN, A.G. Clinical- and Imaging-Based Prediction of Stroke Risk After Transient Ischemic Attack. **Stroke**, v.40, p.181–186, 2008.

HALL, C., & BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, 1932.

HALEEM, D. J.; FARHAN, M. Inhibition of apomorphine-induced behavioral sensitization in rats pretreated with fluoxetine. **Behavioural Pharmacology**, v. 26, p.159–166, 2015.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1–5, 1984.

HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety-modulating drugs. **Journal of Pharmacology Toxicology**, v. 29, p. 129-138, 1993.

HANSEN, S. L.; SPERLING, B. B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsivant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, p. 105–113, 2004.

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**, v. 56, p. 77- 85, 2004.

HINCH, R.; LINDSAY, K. A.; NOBLE, D.; ROSENBERG, J. R. The effects of static magnetic field on action potential propagation and excitation recovery in nerve. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 87, p. 321–328, 2005.

HINCH, R.; LINDSAY, K.; NOBLE, D.; ROSENBERG, J.R. The effects of static magnetic field on action potential propagation and excitation in nerve. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 87, p.321 – 328, 2004.

SHIOTSUKIA, H.; YOSHIMI, K.; SHIMO, Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning, **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, p.180-185, 2010.

HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; DUARTE, F.S.; LEME, L.R.; COSTA, A.A.R.; SANTOS, E.C.S.; PIERIA, C.H.; SANTOS, A.A.; NAIME, A.A.; FARINA, M.; LIMA, T.C.M. GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. **Brain Research**, v. 1532, p. 21–31, 2013.

HOFFMANN, P.; THORÉN, P.; ELY, D. Effect of voluntary exercise on open-field behavior and on aggression in the spontaneously hypertensive rat (SHR). **Behavioral and Neural Biology**, v. 47, p. 346-55, 1987.

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

IKRAM, H.; AHMAD, S.; HALEEM, D.J. Effects of apomorphine on locomotive activity and monoamine metabolism: a dose related study. **Pak J Pharm Sci**, v. 24, p. 315-21, 2011.

JELENKOVIC, A.; JANAC, B.; PESIC, V.; JOVANOVIC, D. M.; VASILJEVIC, I.; PROLIC, Z. Effects of extremely low-frequency magnetic field in the brain of rats. **Brain Research Bulletin**, v. 68, p. 355–360, 2006.

JI, W.; HUANG, H.; DENG, A.; PAN, C. Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. **Micron**, v. 40, p. 894-898, 2009.

JIANG, Y.; LI, L.; TAN, X.; LIU, B.; ZHANG, Y.; LI, C. miR-210 mediates vagus nerve stimulation-induced antioxidant stress and anti-apoptosis reactions following cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **J. Neurochem**, v. 134, p. 173–181, 2015.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentilenotetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 429–39, 2002.

KALUEFF, A. V. Neurobiology of Memory an Anxiety: from genes to behavior. **Neural Plasticity**, v. 78, p. 171-183, 2007a.

KITABATAKE, Takae Tamy. **Alterações morfológicas e comportamentais em gerbilos isquêmicos induzidas pela exposição à nicotina e treino de marcha forçada contínua em esteira**. 2016. Dissertação (Mestrado em

Fisioterapia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

KITABATAKE, T.T.; MARINI, L.C.; GONÇALVES, R.C.; BERTOLINO, G.; DE SOUZA, H.C.D.; DE ARAUJO, J.E. Behavioral effects and neural changes induced by continuous and not continuous treadmill training, post bilateral cerebral ischemia ingerbils. **Behavioural Brain Research**, v. 291, p. 20-25, 2015.

KLIETHERMES, C. L.; FINN, D. A.; CRABBE, J. C. Validation of a modified mirrored chamber sensitive to anxiolytics and anxiogenics in mice. **Psychopharmacology**, v. 169, p. 190–197, 2003.

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**, v.23, p. 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**, v.24, p. 395-402, 2003.

KORPI, E. R.; GRÜNDER, G.; LÜDDENS, H. Drug interactions at GABAA and receptors. **Progress Neurobiology**, v. 67, p. 113-159, 2002.

KORTE, S. M.; BOER, S .F. A robust animal model of state anxiety: fear potentiated behavior in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 163–75, 2003.

KHODAPARAST, N.; HAYS, S. A.; SLOAM, A.M.; FAYYAZ, T.; HULSEY, D.R.; ND, R.R; KILGARD, M.P. Vagus nerve stimulation delivered during motor rehabilitation improves recovery in a rat model of stroke. **Neurorehabilit. Neural Repair**, v. 28, p. 698–706, 2014.

KOWALCZUK, C. I.; SIENKIEWICZ, Z. J.; SAUNDERS, R. D. Biological Effects of Exposure to Non-Ionising Electromagnetic Fields and Radiation. **Static Electric and Magnetic Fields**, v. 45, p. 62–66, 1991.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, p. 175–183, 2013.

LaHoste G, D Ruskin, J Marshall. Cerebrocortical Fos expression following dopaminergic stimulation: D1/D2 synergism and its breakdown. **Brain Res.**, v.728, p. 97–104, 1996.

LAI H.; CARINO, M. A.; HORITA, A.; GUY, A. W. Single vs. repeated microwave exposure: effects on benzodiazepine receptors in the brain of the rat. **Bioelectromagnetics**, v. 13, p. 57–66, 1992.

LAITL-KOBIERSKA, A. L.; CIESLAR, G.; SIERON, A.; GRZYBEK, H. K. **Bioelectromagnetics**, v. 23, p. 49-58, 2002.

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, p. 7-97, 2009.

LÁSZLÓ, J.; TÍMÁR, J.; GYARMATI, Z.; FÜRST, Z.; GYIRES, K. Pain-inhibiting inhomogeneous static magnetic field fails to influence locomotor activity and anxiety behavior in mice: No interference between magnetic field- and morphine-treatment. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 316–321, 2009.

LEE, C.H.; YOO, K.Y.; CHOI, J.H.; PARK, O.K.; HWANG, I.K.; KIM, S.K.; KANG, I.J.; KIM, Y.M.; WON, M.H. Neuronal damage is much delayed and microgliosis is more severe in the aged hippocampus induced by transient cerebral ischemia compared to the adult hippocampus. **Journal of Neurology Science**, v. 294, p. 1-6, 2010.

LEVINE, R. L.; BLUNI, T. D. Magnetic Field Effects on Spatial Discrimination Learning in Mice. **Physiology & Behavior**, v. 55, p. 465-467, 1994.

LEVINE, S.; SOHN, D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils; relation to incomplete circle of Willis. **Archives of Pathology Arch Pathol**, v. 87, p. 315-317, 1969.

LIEB, K.; ANDRAE, J.; REISERT, C.I. Pilgrim Neurotoxicity of dopamine and protective effects of the NMDA receptor antagonist AP-5 differ between male and female dopaminergic neurons. **Exp. Neurol.**, 134 (1995), pp. 222-229.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**. Physiol Ver, v. 79, p. 1431-56, 1999.

LISTER, R. The use of Plus-Maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LJUNGBERG, T. and 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**, v.46, p.41-50, 1977.

LOGHMANNIA, J.; HEIDAR, B.; ROZATI, S. A.; KAZEMI, S. The physiological responses of the Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) fry to the static magnetic fields with different intensities during acute and subacute exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 215–219, 2015.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia Funcional. 2ª edição. São Paulo. Editora Atheneu, 2000.

MARTÍN, A., GOMEZ-VALLEJO, V., SAN SEBASTIAN, E., PADRO, D., MARKU ERKIAGA, I., LLARENA, I., et al. In vivo imaging of dopaminergic neurotransmission after transient focal ischemia in rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v.33, p. 244–252, 2013.

MCBEAN, D.E.; KELLY, P.A. Rodent Models of Global Cerebral Ischemia: A Comparison of Two-Vessel Occlusion and Four-Vessel Occlusion. **General Pharmacology: The Vascular System**, v.30, p. 431-434, 1998.

McCREARY, C. R.; DIXON, S. J.; FRAHER, L. J.; CARSON, J. J.; PRATO, F. S. Real-time measurement of cytosolic free calcium concentration in Jurkat cells during ELF magnetic field exposure and evaluation of the role of cell cycle. **Bioelectromagnetics**, v. 27, p. 354–364, 2006.

MIAO, Y.; ZHAO, S.; GAO, Y.; WANG, R.; WU, Q.; WU, H.; LUO, T. Curcumin pretreatment attenuates inflammation and mitochondrial dysfunction in experimental stroke: the possible role of Sirt1 signaling. **Brain Res. Bull.**, v.121, 2015.

MICHALSKI, D.; HÄRTIG, W.; KRUEGER, M.; HOBOHM, C.; KÄS, J.A.; FUHS, T. A novel approach for mechanical tissue characterization indicates decreased elastic strength in brain areas affected by experimental thromboembolic stroke. **Neuroreport**, v. 26, p. 583-587, 2015.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress Neurobiology**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MIYAKOSHI, J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 87, p. 213–223, 2005.

MORELLI, M., COZZOLINO, A.; PINNA, A.; FENU, A.; DI CHIARA, G. I-Dopa stimulates c-fos expression in dopamine denervated striatum by combined activation of D-1 and D-2 receptors. **Brain Res**, v. 623, p. 334–336, 1993.

MU, Q., JOHNSON, K., MORGAN, P. S., GRENESEKO, E. L., MOLNAR, C. E., ANDERSON, B., ET AL. A single 20mg dose of the full D1 dopamine agonist dihydrexidine (DAR-0100) increases prefrontal perfusion in schizophrenia. **Schizophr.Res.** 94, 332–341, 2007.

MURPHY, T.H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 861-872, 2009.

NELSON, L., TABET, N. Slowing the progression of Alzheimer's disease; what works? **Ageing Research Reviews**, v. 23, p. 193-209, 2015.

NEMEROFF, C. B. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 37, p. 133-146, 2003.

OKANO, H.; OHKUBO, C. Anti-pressor effects of whole body exposure to static magnetic field on pharmacologically induced hypertension in conscious rabbits. **Bioelectromagnetics**, v. 24, p. 139–147, 2003.

PAGNUSSAT, A.S.; SIMAO, F.; ANASTACIO, J.R.; MESTRINER, R.G.; MICHAELSEN, S.M.; CASTRO, C.C.; SALBEGO, C.; NETTO, C.A. Effects of skilled and unskilled training on functional recovery and brain plasticity after focal ischemia in adult rats. **Brain Research**, v. 1486, p. 53-61, 2012.

PATEL, J.C.; ROSSIGNOL, E.; RICE, M.E.; MACHOLD, R.P. Opposing regulation of dopaminergic activity and exploratory motor behavior by forebrain and brainstem cholinergic circuits. **Nat Commun**, v. 3, p.1172, 2012.

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, PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. 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, p. 149–167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Can Anti-Panic Drugs Antagonise the Anxiety Produced in the Rat by Drugs Acting at the GABA-Benzodiazepine Receptor Complex? **Neuropsychobiology**, v. 17, p. 60–65, 1987.

PICTON, H. D. Some responses of drosophila to weak magnetic and electrostatic fields. **Nature**, v. 211, p. 303 – 304, 1966.

PINTO, W. B. V. de R.; KO, G. M. Teste de Rotarod: Contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extapiramidais e das ataxias cerebelares. **RESBCAL**, São Paulo, v.1 n.2, p. 202-212, 2012.

POLITIS, M.; PAVESE, N.; TAI, Y.F.; KIFERLE, L.; MASON S.L.; BROOKS, D.J. Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: a multimodal imaging study. **Hum Brain Mapp**, v. 32, p.258–270, 2011.

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. **Physiol. Behav**, v. 66, p. 355- 363, 1999.

PRESTI, M. F.; POWELL, S. B.; LEWIS, M. H. Dissociation between spontaneously emitted and apomorphine- induced stereotypy in *Peromyscus maniculatus bairdii*. **Physiol. Behav**, v. 75, p.347- 353, 2002.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? **J. Clin. Invest**, v. 111, p. 3 -10, 2003.

REITER, R. J. Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure: reported effects on the circadian production of melatonin. **Journal Cell Biochemistry**, v. 51, p. 394–403, 1993.

RIBEIRO, R. M.; RODRIGUES, C. D. S.; BERTOLIN, D. C.; RIBEIRO, R. C. H. M.; CESARINO, C. B.; KUSUMOTO, L.; FANTINI, J. F. A. **Arq. Ciênc. Saúde**, v.23, p. 78-82, 2016.

RÉUS, G. Z.; SANTOS, M. B.; ABELAIRA, H. M.; QUEVEDO, J. Animal models of social anxiety disorder and their validity criteria. **Life Sciences**, v. 114, p. 1–3, 2014.

RICHARDS, D. A.; OBRENOVITCH, T.P.; JOHONSON-MORA, A.; ISLEKEL, S.; SYMON, L.; CURZON, G. Effect of global ischaemia under simulated penumbral conditions on brain monoamine neurochemistry and subsequent neurological and histological deficits. **J. Neurochem**, v. 61, p. 1801-1807, 1993.

RIBEIRO, R. L.; ANDREATINI, R.; WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MEDINA, J. H.; Da CUNHA, C. The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, p. 78-94, 1999.

RODRIGUES, E.S.R.; CASTRO, K.A.B.; REZENDE, A.A.B.; HERRERA, A.D. C.C.; PEREIRA, A.M.P.; TANAKADA, J.A.P. Fatores de risco cardiovascular em pacientes com acidente vascular cerebral. **Revista Amazônia**, v. 1, p. 21-28, 2013.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289-304, 1997a.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWA, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 41-50, 1996.

ROSEN, A. D. Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na⁺ channels in GH3 cells. **Bioelectromagnetics**, v. 24, p. 517-23, 2003b.

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

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

ROSEN, A. D. Membrane response to static magnetic fields: effect of exposure duration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1148, p. 317-320, 1993.

ROSEN, A. D. Threshold and limits of magnetic field action at the presynaptic membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1193, p. 62-66, 1994.

SANTOS, B. G; CAREY, R. J. C; CARRERA, M.P. Post-trial induction of conditioned apomorphine stimulant and inhibitory response effects: Evidence for potent trace conditioning of drug effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 129, p.79–86, 2015.

SAUNDERS, R. Static magnetic fields: animal studies. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.87, p.225–239, 2005.

SADELLI, K.; STAMEGNA, J.C.; GIRARD, S.D.; BARIL, N.; ESCOFFIER, G.; BRUS, M.; VÉRON, A.D.; KHRESTCHATISKY, M.; ROMAN, F.S. Global cerebral ischemia in rats leads to amnesia due to selective neuronal death

followed by astroglial scar formation in the CA1 layer. **Neurobiology of Learning and Memory**. v.141, p.168-178, 2017.

SCHIRMACHER, A.; WINTERS, S.; FISCHER, S.; GOEKE, J.; GALLA, H. J.; KULLNICK, U.; RINGELSTEIN, E. B.; STÖGBAUER, F. Electromagnetic field (1.8 Ghz) increase the permeability to sucrose of blood-brain barrier in vitro. **Bioelectromagnetics**, v.21, p. 338-345, 2000.

SCHMUED, L. C.; STOWERS, C. C.; SCALLET, A. C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res**, v. 1035, p.24–31, 2005.

SHIOTSUKIA, H.; YOSHIMI, K.; SHIMO, Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, Y.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**. v.189, p.180-185, 2010.

SELVAMURUGAN, N.; KWOK, S.; VASILOV, A.; JEFcoat, S. C.; PARTRIDGE, N. C. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. **Journal of Orthopedic Research**, v. 25, p. 1213–122, 2007.

SERAFIM, K. R.; GIANLORENÇO, A. C. L.; DAHER, F. P.; MATTIOLI, R. H1-histamine receptors in the amygdala are involved in emotional memory but do not mediate anxiety-related behaviors in mice submitted to EPM testing. **Brain Research Bulletin**, v. 89, p. 1–7, 2012.

SHAHZAD, N.; AHMAD, J.; KHAN, W.; AL-GHAMDI, S.S.; AIN, M.R.; IBRAHIM, I.A.; AKHTAR, M.; KHANAM, R. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 117, p.79-84, 2014.

SPRAY, S.; EDVINSSON, L. Improved assessment of outcomes following transient global cerebral ischemia in mice. **Exp. Brain Res**, v. 234, p. 1925-1934, 2016.

SHAHZAD, N.; AHMAD, J.; KHAN, W.; AL-GHAMDI, S. S.; AIN, M. R.; IBRAHIM, I. A. A.; AKHTAR, M.; KHANAM, R. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 79–84, 2014.

SHIMIZU, H.; OHGOH, M.; IKEDA, M.; NISHIZAWA, Y.; OGURA, H. Caspase-3-like protease activity-independent apoptosis at the onset of neuronal cell death in the gerbil hippocampus after global ischemia. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1950-1953, 2007.

SILVA, L. F. A.; HOFFMANN, M. S.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; LIMA, F. D.; FURIAN, A. F.; OLIVEIRA, M. S.; FIGHERA, M. R.; ROYES, L. F. The involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 308, p. 35–40, 2011.

SILVEIRA, A.P.C.; KITABATAKE, T.T.; PANTALEO, V.M.; ZANGROSSI, J.H.; BERTOLINO, G.; DE OLIVEIRA, G.; ELAINE, C.; DUTRA DE SOUZA, H.C.; DE ARAUJO, J.E. Continuous and not continuous 2-week treadmill training enhances the performance in the passive avoidance test in ischemic gerbils. **Neuroscience Letters**, v. 665, p. 170-175, 2018.

SIMÓN, V. M.; PARRA, A.; MIÑARRO, J.; ARENAS, M. C.; VINADER-CAEROLS, C.; AGUILAR, M. A. Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 10, p.159 - 164, 2000.

SORREGOTTI, T.; MENDES-GOMES, J.; RICO, J. L.; RODGERS, R. J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behavioral Brain Research**, v. 246, p.76-85, 2013.

STOKES, P.R.; EGERTON, A.; WATSON, B.; REID, A.; BREEN, G.; LINGFORD-HUGHES, A.; ET AL. Significant decreases in frontal and temporal [11C]-raclopride binding after THC challenge. **Neuroimage**, v.52, p.1521–1527, 2010.

SPENCE, A. L.; GUERIN, G. F.; GOEDERS, N.E. The differential effects of alprazolam and oxazepam on methamphetamine self-administration in rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 166, p. 209–217, 2016.

STHAL, S. Psicofarmacologia: Base neurocientífica e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Medesi, 2º ed, p. 311, 2002.

STROOBANTS, S.; GANTOIS, I.; POOTERS, T.; D’HOOGE, R. Increased gait variability in mice with small cerebellar cortex lesions and normal rotarod performance. **Behavioural Brain Research**, v. 241, p. 32–37, 2013.

SUN, Z-C.; GE, J-I.; GUO, B.; GUO, J.; HAO, M.; WU, Y-C.; LIN, Y-A.; LA, T.; YAO, P-T.; MEI, Y-A.; FENG, Y; LEIXUE. Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Facilitate Vesicle Endocytosis by Increasing Presynaptic Calcium Channel Expression at a Central Synapse. **Scientific Reports**, p.1-11, 2016.

TEJADA, J.; BOSCO, G. G.; MORATO, S.; ROQUE, A. C. Characterization of the rat exploratory behavior in the elevated plus-maze with Markov chains. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 193, p. 288–295, 2010.

THIEL, C. M.; MULLER, C. P.; HUSTON, J. P.; SCHWARTING, R. K. High versus low reactivity to a novel environment: behavioral, pharmacological and neurochemical assessments. **Neuroscience**, v. 93, p. 243-51, 1999.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993.

UZHAY I. T.; LAL H. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester, 7-nitroindazole, and agmatine on pentylenetetrazol-induced discriminative stimulus in Long-Evans rats. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 567-73, 2002.

VARGAS, K. M.; Da CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Amphetamine and pentylenetetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, p. 1394–1402, 2006.

XUA, J.; KONG, X.; XIUC, H.; DOUA, Y.; WUA, Z.; SUNA, P. Combination of curcumin and vagus nerve stimulation attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced behavioral deficits. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 614–620, 2018.

WAHL, A.S.; SCHWAB, M.E. Finding an optimal rehabilitation paradigm after stroke: enhancing fiber growth and training of the brain at the right moment. **Frontiers**, v. 7, p. 1-13, 2014.

WANG, L.; LIU, Y.H.; HUANG, Y.G.; CHEN, L.W. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using fluoro-jade c staining. **Brain research**, 1241, 157-167, 2008.

WANG, Z.; HAO, F.; DING, C.; YANG, Z.; SHANG, P. Effects of static magnetic field on cell biomechanical property and membrane ultrastructure. **Bioelectromagnetics**, v. 35, p. 251-261, 2014.

WEISS, J.; HERRICK, R. C.; TABER, K. H.; CONTANT, C.; PLISHKER, G. A. Bio-Effects Of High Magnetic Fields: A Study Using A Simple Animal Model. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 10, p. 689-694, 1992.

WILLNER, P. AND MITCHELL, P.J. The validity of animal models of predisposition to depression. **Behav Pharmacol**, v.13, p.169-188, 2002.

WINTER, B.; BERT, B.; FINK, H.; DIRNAGL, U.; ENDRES, M. Dysexecutive syndrome after mildcerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. **Stroke**, v. 35, p. 191-195, 2004.

WOODRUFF, T.M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.C.; SOBEY, C.G.; TAYLOR, S.M.; ARUMUGAM, T. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, p.11, 2011.

WONG, Y.C.; ILKOVA, T.; VAN WIJK, R.C.; HARTMAN, R.; DE LANGE, E.C.M. Development of a population pharmacokinetic model to predict brain distribution and dopamine D2 receptor occupancy of raclopride in non-anesthetized rat. **Eur J Pharm Sci**, v.111, p. 514-525, 2018.

WIRTSHAFTER, D.; K, ASIN. Interactive effects of stimulation of D1 and D2 dopamine receptors on Fos-like immunoreactivity in the normosensitive rat striatum. **Brain Res. Bull**, v. 35, p. 85–91, 1994.

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

YANG, E.J.; CAI, M.; LEE, J. Neuroprotective effects of Electroacupuncture on an Animal Model of Bilateral Common Carotid Artery Occlusion. **Mol Neurobiol**, v.53, p.7228–7236, 2016.

YU, K.; WU, Y.; ZHANG, O.; XIE, H.; LIU, G.; GUO, Z.; LI, F.; JIA, J.; KUANG, S.; HU, R. Enriched environment induces angiogenesis and improves neural function outcomes in rat stroke model. **Journal of the Neurological Science**, v. 347, p. 275–280, 2014.

ZHANG, F.; JIA, J.; WU, Y.; HU, Y.; WANG, Y. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2658-2669, 2010.