Fábio Teixeira Macri

**Estudo do efeito neuroprotetor da estimulação
magnética transcraniana e hipotermia em
modelo de isquemia cerebral induzida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos
de Desenvolvimento e Metabolismo

Orientador: Irineu Tadeu Velasco

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Macri, Fábio Teixeira

Estudo do efeito neuroprotetor da estimulação magnética transcraniana e hipotermia em modelo de isquemia cerebral induzida / Fábio Teixeira Macri. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientador: Irineu Tadeu Velasco.

Descritores: 1.Isquemia cerebral 2.Estimulação magnética transcraniana
3.Agentes neuroproterores 4.Hipotermia 5.Gerbillinae

USP/FM/DBD-176/11

Dedico este estudo,

*ao meu pai que me ensinou sobre os valores da vida
dando bons exemplos,*

*á minha mãe que sempre foi meu ponto de apoio nos
momentos de indecisão e insegurança,*

aos meus irmãos pelo companheirismo,

*aos meus sobrinhos que resgataram dentro de mim uma
criança cheia de sonhos e esperança,*

*á minha tia Marisa e minha avó Leontina que sempre me
acolheram,*

*e àquelas pessoas que estiveram ao meu lado em algum
período desta caminhada.*

A todos vocês meus mais sinceros agradecimentos.

Agradecimentos Especiais

Professor Doutor Marco Antonio Marcolin, que me contagiou com seu entusiasmo, inspirou a realização deste estudo e pela orientação.

Professor Doutor Irineu Tadeu Velasco que me aceitou em sua disciplina, tornou viável a realização desta pesquisa que dispôs de tantos recursos e pela orientação.

Professor Doutor Manoel Jacobsen Teixeira que me abriu as portas desta faculdade de medicina e me introduziu a esta área de pesquisa.

Mestre e Bióloga Suely K.K. Ariga pela contribuição em vários aspectos desta pesquisa, que foram fundamentais na execução do experimento e que certamente foram além do seu compromisso profissional.

Agradecimentos

Fátima Abatepaulo pela confecção do material histológico utilizado neste estudo.

Antonio dos Santos Filho, responsável pelo biotério que forneceu os animais utilizados na pesquisa, dando a estes animais um cuidado digno, eles que tiveram toda a sua existência dedicada a ciência.

Geraldo Gomes Sobrinho, contribuiu com a penosa tarefa de aplicar estimulação magnética nos animais principalmente nos finais de semana, deixando sua família para comparecer no laboratório.

Professor Doutor Francisco Garcia Soriano, pela contribuição científica no exame de qualificação e pela amizade.

Professor Doutor Heraldo Possolo de Souza, pela contribuição científica no exame de qualificação e pela amizade.

Professor Doutor Sérgio Paulo Rigonatti, pela contribuição científica no exame de qualificação, tendo aceitado o convite prontamente com muita simpatia.

Todo pessoal do **LIM 51: Kelly, Hermes, Denise, Thais**, pela amizade, apoio e contribuição direta ou indireta.

Meus colegas de trabalho de Jundiaí, os Neurocirurgiões **Sebastião Carlos Duarte, Claudio de Mattos e Marcos Rogério Gregorini**, que tornaram possível eu me ausentar nos horários em que me dedicava à realização deste estudo.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors(Vancouver)*.

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva Souza e Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de siglas e termos estrangeiros

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Summary

1	Introdução	1
2	Revisão da literatura	5
3	Objetivos	17
4	Métodos.....	19
4.1	Aspectos Éticos.....	20
4.2	Instituição	20
4.3	Caracterização do estudo	20
4.4	Modelo Animal	21
4.5	Modelo de Isquemia- cirurgia experimental	22
4.6	Hipotermia.....	24
4.7	Estimulação Magnética Transcraniana	25
4.8	Avaliação de Comportamento	26
4.9	Análise Histológica.....	27
4.10	Divisão de Experimentos	32
4.11	Análises estatísticas.....	34
5	Resultados	35
5.1	EMTr Pós Isquemia.....	38
5.2	EMTr Prévia a Isquemia.....	41
5.3	Isquemia Durante Hipotermia.....	45
6	Discussão.....	50
7	Conclusões.....	55
8	Referencias	57

Lista de Siglas

rTMS ou EMTr	Estimulação Magnética Transcraniana de repetição
HIPO	Indução de isquemia cerebral em regime de hipotermia
NORMO	Indução de isquemia cerebral em temperatura normal
POS	Estimulação Magnética Trans craniana de repetição após a indução de isquemia cerebral
PRE	Estimulação Magnética Trans craniana de repetição prévia a indução de isquemia cerebral
ISQ	Indução de isquemia cerebral sem Estimulação Magnética Trans craniana de repetição
PLA	Estimulação Magnética com bobina Placebo
HE	Coloração por Hematoxilina e Eosina
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	ácido amino-hidroxi-metil-propiónico
ATP	Adenosina tri fosfato

Termos Estrangeiros

rTMS	Repetitive Transcranial Magnetic Estimulation
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling
MAP-2	Microtubule associated protein-2

Lista de abreviaturas

et al.	e outros
ms	milissegundos
s	segundos
min	minutos
h	horas
N	número de animais
p	nível de significância
p.	página
Fig.	figura
graf.	gráfico

Lista de Figuras

Figura 1:	Meriones unguiculatus	21
Figura 2:	Polígono de Willis incompleto, com agenesia das artérias comunicantes posteriores	22
Figura 3:	Aparato anestésico que utiliza Halotano, Óxido nitroso e Oxigênio.....	23
Figura 4:	Imagem dos fios de silicones laçando as artérias carótidas	23
Figura 5:	Sensores de temperatura mostrando a diferença entre a temperatura retal e a cefálica.....	24
Figura 6:	Aparelho neuroestimulador Neuro-MS Neurosoft	25
Figura 7:	Animal contido com bobina posicionada sobre a cabeça	26
Figura 8:	Aparato para realização de teste da esquiva	27
Figura 9:	Imagem da tela do software analisador, onde o retângulo representa a área de análise, a região com coloração avermelhada esta sendo quantificada, e os resultados são expressos na tabela exposta na porção inferior.....	31
Figura 10:	Esquema de divisão de áreas para análise	31
Figura 11:	Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, corados com Hematoxilina e Eosina. A: POS, B: PLA POS, C: ISQ	39
Figura 12:	Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de TUNEL. Cada imagem referente a um grupo; A: POS, B: PLA POS, C: ISQ.	40
Figura 13:	Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de Caspase. Cada imagem referente a um grupo; A: POS, B: PLA POS, C: ISQ. A marcação demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente em todas as amostras	41

- Figura 14:** Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, corados com Hematoxilina e Eosina. A : PRE, B: PLA PRE, C: ISQ43
- Figura 15:** Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de TUNEL. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE, B: PLA PRE, C: ISQ.....44
- Figura 16:** Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de Caspase. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE, B: PLA PRE, C: ISQ.....45
- Figura 17:** Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia durante hipotermia aumento de 400X, corados com Hematoxilina e Eosina. A : PRE HIP, B: PLA PRE HIP, C: HIP47
- Figura 18:** Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia durante hipotermia, aumento de 400X, marcação de TUNEL. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE HIP, B: PLA PRE HIP, C: HIP.48
- Figura 19:** Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de Caspase. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE HIP, B: PLA PRE HIP, C: HIP.49

Lista de Gráficos

Gráfico 1:	Tempo de Latência de animais submetidos a isquemia.	37
Gráfico 2:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia.....	37
Gráfico 3:	Tempo de Latência de animais submetidos a EMTr posterior a isquemia	38
Gráfico 4:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos EMTr posterior a isquemia. Coloração hematoxilina eosina	39
Gráfico 5:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos EMTr posterior a isquemia. Marcação TUNEL	40
Gráfico 6:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos EMTr posterior a isquemia. Marcação Caspase.....	41
Gráfico 7:	Tempo de Latência de animais submetidos a EMTr anterior a isquemia	42
Gráfico 8:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a EMTr prévia a isquemia. Coloração hematoxilina eosina	43
Gráfico 9:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a EMTr prévia a isquemia. Marcação TUNEL	44
Gráfico 10:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a EMTr prévia a isquemia. Marcação Caspase.....	45
Gráfico 11:	Tempo de Latência de animais submetidos a EMTr anterior a isquemia em regime de hipotermia.....	46
Gráfico 12:	Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a EMTr prévia a isquemia em regime de hipotermia, coloração hematoxilina eosina	47

Gráfico 13: Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a EMTr prévia a isquemia em regime de hipotermia. Marcação TUNEL.....	48
Gráfico 14: Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a EMTr prévia a isquemia em regime de hipotermia. Marcação Caspase	49

Resumo

Macri FT. *Estudo do efeito neuroprotetor da estimulação magnética transcraniana e hipotermia em modelo de isquemia cerebral induzida* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 64p.

Introdução: Muitos estudos veem sendo realizados com a finalidade de identificar agentes que possam ter efeito benéfico no tratamento ou prevenção das lesões causadas nos neurônios devido à isquemia. A hipotermia já demonstrou resultados consistentes em estudos experimentais e a Estimulação Magnética Transcraniana (EMTr) já foi usada visando reduzir danos em neurônios hipocâmpais de animais submetidos a isquemia cerebral. Com a propriedade de aumentar ou diminuir a excitabilidade cortical a partir do estímulo magnético, estima-se que ocorra uma interferência na produção de alguns neurotransmissores e receptores de membrana, que promoveriam efeito protetor a estas células. Neste estudo avaliamos a capacidade da EMTr de proteger os neurônios de uma lesão por hipóxia, e sua possível interferência no efeito protetor da hipotermia, tentando identificar alguns mecanismos que possivelmente estariam envolvidos neste fenômeno. **Métodos:** Como modelo de isquemia, foram utilizados Gerbils previamente submetidos a uma avaliação de comportamento e memória por meio do teste de esquiva. O protocolo de EMTr foi a partir de sessões diárias com 25 séries de 5 segundo a 25Hz, com um intervalo de 45 segundos entre as séries, por sete dias consecutivos, com um total de 21 875 pulsos com uma intensidade de 100% do limiar motor, e sendo realizada a indução da isquemia logo após o término da última sessão, ou na isquemia após a EMTr, em sessões diárias com 25 séries de 5 segundos a 25Hz, com um intervalo de 45 segundos entre as séries, durante 3 dias consecutivos, começando imediatamente após a cirurgia. Foi mantida a temperatura de 36 °C durante o período de oclusão do vaso e os 30 minutos consecutivos, ou 31 a 32 ° C quando em hipotermia. O preparo das lâminas teve cortes envolvendo a região do hipocampo, corados com hematoxilina e eosina, além de outros preparos, a marcação de TUNEL e Caspase, que visam evidenciar a ocorrência de apoptose. **Resultados:** Embora sem significância estatística, os animais que receberam EMTr aparentemente tiveram uma melhor performance no teste da esquiva, principalmente se aplicado após a indução da isquemia. A hipotermia demonstrou uma eficiência significativa, tanto na análise histológica quanto no teste da esquiva, associado ou não à EMTr, e nestes animais submetidos a isquemia durante a hipotermia, os que receberam EMTr tiveram área de sobrevida no hipocampo significativamente maior na análise histológica com hematoxilina e eosina. Nos animais

submetidos à isquemia durante a temperatura normal, a EMTr não demonstrou aumentar a área de sobrevivência das células do hipocampo.

Conclusões: A EMTr (ativa ou placebo, prévia ou posterior à isquemia) pareceu ter um efeito positivo no teste de esquila. O procedimento de estimulação pareceu bastante traumático e estressante para os animais, tendo ocorrido alguns óbitos durante a imobilização, provavelmente por asfixia. A EMTr apresentou efeito protetor significativo apenas nos animais submetidos a isquemia durante hipotermia.

Descritores: 1.Isquemia cerebral 2.Estimulação magnética transcraniana
3.Agentes neuroproterores 4.Hipotermia 5.Gerbillinae

Summary

Macri FT. *Study of the neuroprotective effect of the Transcranial Magnetic Stimulation and hypothermia in a animal model of induced cerebral ischemia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 64p.

Introduction: Over the time many researches have been conducted with the aim of identifying agents that may have beneficial effects in the treatment or prevention of cerebral ischemia, hypothermia has shown consistent results in experimental trials and Repetitive Trans Cranial Magnetic Stimulation (rTMS) has been used in a study attempting to reduce damage in hippocampal neurons. With the property to increase or decrease cortical excitability from the repetitive magnetic stimulus, it is estimated that an interference occurs in the production of some neurotransmitters and receptors of neuronal membrane, which therefore protects these cells from hypoxia. In this study we evaluated the ability of rTMS to protect neurons from injury due to hypoxia, and its possible interference in the protective effect of hypothermia and we tried to identify some mechanisms that possibly are involved in this phenomenon. **Methods:** Ischemia model was performed using Gerbil that was subsequently submitted to an evaluation of behavior and memory through passive avoidance task. The rTMS protocol was daily sessions with 25 series of 5 seconds at 25Hz with an interval of 45 seconds between series, for 7 consecutive days, with a total of 21 875 pulses with an intensity of 100% of motor threshold, and being carried through the induction of ischemia soon after the end of the last session, or rTMS after ischemia, in daily sessions with 25 series of 5 seconds at 25Hz with an interval of 45 seconds between series, for 3 consecutive days, starting immediately after surgery. The temperature of 36 ° C was maintained during the period of vessel occlusion and subsequent 30 minutes, or 31 ° C to 32 ° C when in hypothermia. The preparation of the slices had sections of the region involving the hippocampus, stained with hematoxylin and eosin in addition to other preparations, TUNEL and caspase, which aim to evidence the occurrence of apoptosis. **Results:** Although not statistically significant, animals that received rTMS, apparently had better performance in passive avoidance task especially when applied after ischemia. The hypothermia demonstrated a significant efficiency, both in the histological analysis and in the passive avoidance task, associated or not to applications of rTMS and, in these animals undergoing ischemia during hypothermia, the ones who received rTMS had survival area in hippocampus significantly higher in histological analysis with hematoxylin and eosin. In animals undergone to ischemia during normal temperature, the rTMS has not shown to increase the area of hippocampal cell survival.

Conclusions: rTMS (placebo or active, after or before the ischemia) seems to have a positive effect on passive avoidance task. The stimulation procedure appeared to be very traumatic and stressful for the animal, in which a few deaths occurred during the procedure, probably from asphyxiation due to restraint. The rTMS had a significant protective effect only in animals undergoing ischemia during hypothermia, as demonstrated in the histological analysis with hematoxylin and eosin.

Descriptors: 1.Cerebral ischemia 2.Transcranial magnetic stimulation
3.Neuroprotective agents 4. Hypothermia 5.Gerbillinae

1 Introdução

Na prática clínica a isquemia cerebral demonstra ser uma condição muito frequente, sendo uma das mais frequentes causas de morte entre as patologias clínicas e uma das principais causas de morbidade entre as doenças neurológicas. As lesões cerebrais isquêmicas podem ser focais, decorrentes da perda de circulação no território de um único vaso, que determina quadro clínico e sequelar específico do vaso acometido, como déficit motor localizado, alteração da fala ou visão; a lesão também pode ser generalizada, decorrente de perda do fluxo em todo o cérebro, com quadro caracterizado por demência e tetra espasticidade; múltiplos focos de lesão isquêmica pode gerar o quadro de demência além de déficit focal .

O estudo de agentes neuroprotetores tem como objetivo o desenvolvimento de medidas que possam auxiliar na diminuição da extensão e severidade da lesão tecidual causada pela isquemia cerebral, proporcionando uma melhor recuperação do tecido parcialmente lesado, ou então possa prevenir o dano tecidual em situações em que a hipóxia era esperada, e assim poder contribuir para a melhora na qualidade de vida destes pacientes. Ao longo do tempo muitas pesquisas veem sendo realizadas com intuito de identificar agentes que possam vir a fazer parte do grupo de recursos já com efeitos benéficos consagrados na terapêutica ou prevenção da isquemia cerebral. O principal foco de pesquisa são agentes farmacológicos onde alguns deles têm demonstrado efeito significativo. A hipotermia também já vem sendo foco de estudos e demonstrou resultados

consistentes em ensaios experimentais de isquemia cerebral utilizando gerbils (Colbourn F, Corbett, 1994, Baena et al. 2001 e Ariga 2005) e em pacientes pós reanimação cardíaca (Eisenburger et al, 2001) e durante procedimentos cirúrgicos neurovasculares (Murthy HS,2005).

A Estimulação Magnética Trans Craniana de Repetição (EMTr) já foi utilizada em um estudo tentando diminuir danos em neurônios hipocampais causados pela isquemia quando aplicados 2 a 5 dias antes da oclusão temporária bilateral da artéria carótida comum em estudo utilizando Gerbil (Fujiki M et al.,2003). Os mecanismos pelos quais estes fenômenos aparentes neuroprotetores ocorrem, ainda não estão bem estabelecidos. Com a propriedade de aumentar ou diminuir a excitabilidade cortical a partir do estímulo magnético de repetição estima-se que ocorra uma interferência na produção de alguns neurotransmissores e receptores de membrana neuronal, que conseqüentemente protegeriam estas células da hipóxia, dando a elas condições de sobreviver a situações de baixa oferta de oxigênio.

A Estimulação Magnética Transcraniana (EMT) é baseada no princípio de indução eletromagnética, descoberto por Michael Faraday em 1838. Uma bobina pequena que recebe uma corrente elétrica alternada extremamente potente é colocada sobre o crânio humano na região do córtex cerebral a ser estimulada (Pascual-Leone, 2002).

A EMTr com baixa frequência (1Hz) pode diminuir a excitabilidade na área cortical, a EMTr com alta frequência (maior que 1 Hz) pode, por outro lado, aumentar a excitabilidade cortical, sendo que duração dos efeitos da aplicação do EMTr pode se estender além do período da aplicação.

Os mecanismos responsáveis por essas alterações ainda não estão completamente elucidados, porém há evidências de que ocorram mudanças na atividade elétrica intracortical ou cortico-cortical (Chen et al., 1997; Romero et al., 2002).

Este estudo foi realizado com o intuito de verificar se a realização da EMTr exerce efeito protetor sobre neurônios hipocampais de gerbils submetidos a isquemia cerebral, e se pode oferecer efeito protetor adicional a hipotermia. Sendo assim esta pesquisa foi idealizada baseada na possibilidade de futuramente ser utilizado EMTr em humanos na redução de danos cerebrais ocasionados por uma isquemia prévia recente ou prevenir danos em situações onde a hipóxia já era prevista.

2 Revisão da literatura

Neurociência é a ciência que estuda os processos cerebrais tendo como objetivo explicar o comportamento a partir da atividade neural, sendo um de seus ramos que tem sido mais estudado na atualidade a Neurociência Cognitiva. Esta, por sua vez agrega áreas como a Neurofisiologia, Bioquímica e Anatomia, e o foco do estudo concentra-se sempre nas habilidades cognitivas.

A Neurociência cognitiva tem enfatizado a importância dos mecanismos de processamento das informações sensoriais, tendo a memória como pré-requisito para a cognição. Define-se memória como um conjunto de processos biológicos e psicológicos que permitem o aprendizado, divididos em: aquisição, seleção, retenção, consolidação, e evocação. Segundo Kandel e Pittenger, 1999, memória é o processo de arquivamento seletivo de novas informações através do qual podemos evocá-las.

Operações neurais responsáveis pela habilidade cognitiva ocorrem essencialmente no córtex cerebral, resultante das conexões entre várias regiões funcionais, ou seja, uma única habilidade apresenta diferentes componentes que são processados em regiões diferentes do cérebro. (Kandel, 2003).

O lobo temporal e suas estruturas mais profundas, hipocampo e amígdala, estão bastante relacionados com processos de memória e aprendizagem. O hipocampo, importante no processo de consolidação da memória mantendo abundantes conexões com demais regiões do lobo

temporal, córtex pré-frontal e córtex parietal (Lent, 2005). Izquierdo et al (2004) afirmaram que a consolidação da memória requer a integridade funcional do hipocampo.

O hipocampo é formado pelas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4, além do giro denteado, sendo a CA1 e CA3 as principais, os neurônios destas regiões têm grande quantidade de dendritos o que deve contribuir para a complexidade do processamento da informação nesta região do cérebro. (Foster e Wilson, 2006).

A região CA1 do hipocampo parece ser menos resistente a lesões que a CA3 e o giro denteado, o que sugere diferente vulnerabilidade nas várias regiões cerebrais. Horn 2004, Investigou as proteínas envolvidas na vulnerabilidade seletiva do hipocampo, através de um estudo com ratos Wistar, e concluiu que o giro denteado consiste na região do hipocampo mais resistente a isquemia e a excitotoxinas, descrevendo a participação das HSP (Heat Shock Protein) como capazes de bloquear a morte celular.

As células pós-sinápticas do hipocampo possuem três tipos de receptores glutamatérgicos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido amino-hidroximetil-propiónico (AMPA) e metabotrópico. Os receptores do tipo AMPA respondem ao glutamato liberado na fenda sináptica, logo após os primeiros potenciais de ação, ocorrendo uma abertura dos canais de sódio e potássio, provocando uma despolarização da membrana pós sináptica, ao atingir um certo nível, esta despolarização remove o íon magnésio que estava bloqueando o canal tipo NMDA, fazendo com que este se abra, e por ele passe grande quantidade de cálcio do extra para o intracelular; outros canais de

cálcio dependentes de voltagem, e não ligadas ao receptor NMDA, também se abrem, amplificando o efeito; neste momento, os receptores de glutamato do tipo metabotrópico são ativados e aumentam a liberação de cálcio.

Processos cognitivos complexos como a memória, assim como patologias que causam alterações neste processo, podem ser estudados através de experimentos com animais, estabelecendo-se parâmetros controlados de avaliação, sendo que a vantagem em se realizar este tipo de estudo reside no fato de haver uma padronização do modelo experimental a ser estudado.

A isquemia é caracterizada pela ausência, ou redução acentuada, de oxigênio e de outros substratos ao cérebro devido ao bloqueio do fluxo sanguíneo (Duarte et al. , 2003). A região CA1 do hipocampo e as áreas adjacentes apresentam particular vulnerabilidade a este tipo de lesão, talvez pelo grande número de receptores NMDA presentes nesta região (Choi e Rothan, 1990), podendo haver perda de neurônios nestas áreas (Kirino, 1982; Herguido et al., 1999).

O Sistema Nervoso Central pode ser acometido por lesões isquêmicas focais e globais, e para ambas as situações, há modelos de estudos contemplados na literatura (Coli et al., 1996; Martins e Chadi, 2001; Tardini et al., 2003). Sabe-se que isquemia com duração de pelo menos cinco minutos seguido de reperfusão já pode levar a anormalidades dendríticas no hipocampo (Yamamoto et al., 1986).

Períodos de bloqueio do fluxo sanguíneo para o tecido neuronal, seja devido a uma parada cardíaca, ou seja por lesão vascular, sempre resultam

em neurotoxicidade, pois a privação do oxigênio desencadeia uma diminuição dos estoques de energia, conseqüente liberação de radicais livres e morte neuronal (Siegel et al., 1999). Assim, a isquemia leva a redução de oxigênio, glicose e neurotrofinas, provocando alterações biodinâmicas, bioquímicas e moleculares, ativando os processos de morte celular (Vaagenes et al., 1996).

Os dois mecanismos mais importantes relacionados à morte celular são a apoptose e a necrose; a primeira refere-se a um processo ativo, a segunda a um processo passivo.

A necrose é um processo de desorganização celular caracterizado por alteração da permeabilidade da membrana, edema e conseqüente morte celular, geralmente decorrente de processo patológico, como: infecção, inflamação e traumatismo (Gerschenson; Rotello, 1992; Kumar et al., 1994). A liberação excessiva de glutamato (excitotoxicidade) e o aumento do cálcio intracelular são eventos cruciais para a morte celular por isquemia (Bradford e Ward, 1987). Após a cessação dos estoques de energia (adenosina tri- fosfato), o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização; os canais de cálcio dependentes de voltagem são ativados e abertos; e os aminoácidos excitatórios (glutamato) são liberados no meio extracelular, os receptores de glutamato tipo NMDA são ativados, e também promovem abertura dos canais de cálcio, aumentando a entrada do íon no meio intracelular; há a formação de radicais livres e dano celular (De Keyser et al. 1999). O glutamato é o principal neuromediador do

hipocampo podendo ser uma excitotoxina, especialmente quando o metabolismo de energia esta comprometido.

A apoptose está ligada a idéia de morte celular programada, essencial para funcionamento dos órgãos e sistemas, porém, algumas patologias podem desregular o controle deste mecanismo, gerando morte celular indesejada (Buja et al. 1993). Este termo foi sugerido por Kerr et al., 1972, que significa perda das folhas das arvores no outono. Ele é essencial no desenvolvimento embrionário, no sistema imunológico e na manutenção da homeostase do organismo multicelular (Ashkenazi; Dixit, 1998; Geske ; Gerschenson, 2001).

A formação de radicais livres durante a reoxigenação provoca lesão celular de reperfusão (Castro e Silva Junior ET AL. 2002), podendo gerar lesão mais grave que aquela gerada pela própria isquemia (Campos e Yoshida, 2004).

Estudos experimentais com modelos de isquemia cerebral global de pequenos roedores também sugeriram a participação dos diferentes processos de morte celular (Choi, 1996; Honkaniemi et al., 1996; Hara et al. 1999; Graham, Chen 2001, Niwa et al., 2001). Alguns autores sugerem o processo apoptótico para explicar fenômenos tardios (Gerschenson, Rotello, 1992; Ayara et al., 1998; Neumar 2000; Wei et al. 2003).

Dentre os roedores utilizados no estudo da isquemia cerebral experimental, o gerbil da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) é um dos mais suscetíveis a este tipo de lesão.

Tal fato foi constatado quando Levine e Payan (1996) realizaram os primeiros experimentos utilizando gerbils, e observaram que estes animais eram bastante propensos a desenvolver sinais de alterações neurológicas após a oclusão das artérias carótidas. Esta suscetibilidade deve-se ao fato de que nesta espécie, não há a composição completa do Polígono de Willis (complexo vascular responsável pela irrigação dos hemisférios cerebrais), não existindo a presença das artérias comunicantes posteriores, dessa forma a circulação anterior do cérebro que é proveniente das carótidas, não se comunica com a circulação posterior que é proveniente das artérias vertebrais, não havendo possibilidade de circulação colateral durante a oclusão das carótidas (Levine e Shon, 1969).

O objetivo da terapia de neuroproteção consiste em interceptar os mecanismos complexos associados aos danos gerados pela isquemia e reperfusão. Muitos estudos têm mostrado a ação de fármacos e da hipotermia na proteção cerebral a lesões isquêmicas em animais avaliados em laboratório de pesquisa.

Há dados que comprovam que a hipotermia interfere nos efeitos gerados pela isquemia cerebral, incluindo a redução da atividade enzimática e metabólica da região lesada, a redução da síntese de glutamato e sua recapturação, e a redução da inflamação local (Krieger e Yenari, 2004).

Eberspacher et AL. (2005) apontaram para o fato que a hipotermia diminui a taxa metabólica, limita a formação de edema e interrompe o processo de necrose e apoptose.

Vários estudos já evidenciaram que a hipotermia pode reduzir a infiltração leucocitária nas áreas isquêmicas (Falavigna et al., 2002; Prandini et al., 2005).

Maier et al. em 1998 observaram que os efeitos neuroprotetores em roedores foram obtidos quando utilizado temperaturas inferiores a 35°C.

Coimbra e Cavalheiro (1990) submeteram dois grupos de gerbils a cinco minutos de oclusão carotídea bilateral, um grupo a em temperatura entre 37 e 37,5°C e outro grupo entre 29 e 29,5°C, após sete dias foi observado lesão mais intensa na região de CA1 dos animais submetidos a isquemia em temperatura normal (37 a 37,5°C) sugerindo que a hipotermia induzida precocemente protege o cérebro das lesões geradas pela isquemia e reperfusão.

Baena et al. (2001) realizaram estudo submetendo gerbils a sete minutos de isquemia, e realizando contagem de células sobreviventes na região de CA1 do hipocampo, confirmaram a grande vulnerabilidade desta região frente a lesões isquêmicas, além de observar o efeito da neuroproteção da hipotermia para este tipo de lesão.

Ariga (2005) cultivou células neuronais de camundongos albinos, e concluiu que a hipotermia exerce função de neuroproteção uma vez que diminui a ativação de processos envolvidos na morte celular por apoptose.

A EMTr é baseada no princípio de indução eletromagnética, descoberto por Michael Faraday em 1838. Uma bobina pequena que recebe uma corrente elétrica alternada extremamente potente é colocada sobre o crânio humano na região do córtex cerebral a ser estimulada (Pascual-Leone, 2002).

A constante alternância da orientação da corrente elétrica dentro da bobina produz um campo magnético capaz de atravessar alguns materiais isolantes, como a pele e os ossos, praticamente inalterado. Ao atravessar as barreiras, o campo magnético gera uma corrente elétrica focalizada e restrita a pequenas áreas no encéfalo dependendo da geometria e forma da bobina (Hallett, 2000).

Os pulsos de corrente que atravessam a bobina do estimulador devem ser, necessariamente, de alta intensidade (milhares de ampères) e curta duração (microsegundos). A corrente induzida pode despolarizar neurônios que estão em uma orientação apropriada ao campo magnético e, conseqüentemente, gerar potenciais de ação (Pascual-Leone, 2002).

Resultados de vários estudos mostram que sessões repetidas de EMTr podem modular a atividade elétrica cortical (Pascual-Leone et al., 1999). Durante a aplicação de EMTr ocorre um bloqueio da atividade elétrica cortical, na região que está sendo estimulada, relacionado com a intensidade e a frequência de estimulação.

Após uma sessão de aplicação, entretanto, observa-se o efeito prolongado, no aumento ou na diminuição na atividade elétrica cortical, da EMTr por vários minutos. Os efeitos da EMTr podem variar desde completa supressão à uma intensa facilitação na área estimulada, dependendo dos parâmetros utilizados (Chen et al., 1997; Maeda et al., 2000; Pascual-Leone et al., 1998).

Estimulação magnética transcraniana com baixa frequência (1Hz) pode diminuir a excitabilidade na área cortical e resultar em mudanças dos

parâmetros comportamentais, como a diminuição no limiar motor (Chen et al., 1997; Maeda et al., 2000), inibição na atividade do lobo parietal (Hilgetag et al., 2001), inibição na função visual (Kosslyn et al., 1999), diminuição no fluxo sanguíneo cerebral (Mottaghy et al., 2002) e uma inibição na função do lobo cerebelar (Hilgetag et al., 2001).

A EMTr com alta frequência (maior que 1 Hz) pode, por outro lado, aumentar a excitabilidade cortical, demonstrada, experimentalmente, pelo aumento na amplitude do potencial evocado motor e, pelo aumento no fluxo sanguíneo cerebral visualizado nos exames de neuroimagem, (Gangitano et al., 2002; Pascual-Leone et al., 1999).

A duração dos efeitos da aplicação do EMTr pode se estender além do período da aplicação. Clinicamente, a melhora observada na depressão após repetidas sessões de EMTr pode durar de três (Triggs et al., 1999) a seis meses (Dannon et al., 2002). Os mecanismos responsáveis por essas alterações ainda não estão completamente elucidados. Há evidências de que ocorram mudanças na atividade elétrica intracortical ou cortico-cortical (Chen et al., 1997; Romero et al., 2002).

Apesar de estarem bem estabelecidos os princípios da aplicação da EMTr e de ser uma técnica utilizada para o tratamento de algumas patologias psiquiátricas, seus mecanismos de ação ainda são apenas parcialmente conhecidos. Uma hipótese plausível é que os efeitos ocorram devido às modificações induzidas pela corrente elétrica sobre a excitabilidade cortical (Romero, 2003). Porém outros dados sugerem que possa haver outros mecanismos envolvidos.

Outras alterações relacionadas com aplicações de EMTr foram encontradas, como a indução da produção de uma substância química com propriedades anti epilépticas de efeito mais difuso, que foi sugerida após coleta de líquido de um paciente submetido a EMTr com 1Hz (Anschel, 2003), porém a EMTr não alterou a expressão de RNAm de mediadores inflamatórios em modelos experimentais, tornando pouco provável o envolvimento direto desses mediadores na indução dos efeitos da EMTr (Kasumasa, 2002).

A Estimulação Magnética Trans Craniana de Repetição (EMTr) já foi utilizada em um estudo tentando diminuir danos em neurônios hipocampais causados pela isquemia quando aplicados 2 dias antes da oclusão temporária bilateral da artéria carótida comum, onde três gerbils submetidos a isquemia precedidos de EMTr mantiveram tecido viável na proporção de 86.01% do tecido normal, contra três gerbils, que foram submetidos somente a isquemia e mantiveram tecido viável na proporção de 4.36% do normal (Fujiki M et al., 2003).

Gao F et al. realizou terapia com EMTr após a indução de isquemia cerebral em ratos e constatou que volume total de infarto, foi significativamente menor no grupo que recebeu EMTr em relação ao grupo controle. Imagens de FDG-18F microPET (Tomografia por Emissão de Positrons de animais pequenos) mostrou maiores valores de metabolismo de glicose no córtex e estriado no grupo EMTr em relação ao grupo controle. O número de células positivas para caspase-3 foi significativamente menor no grupo de EMTr em relação ao grupo controle, concluindo que a

EMTr aumentou o metabolismo da glicose e inibiu apoptose no hemisfério cerebral que sofreu isquemia.

Feng HL (2008) demonstrou que a EMTr induziu aumento significativo da quantidade do ATP (adenosina tri fosfato) e expressão MAP-2 (microtubule associated protein-2) na área lesada do cérebro, sugerindo que a presença destes elementos, pode fazer parte dos mecanismos biológicos do efeito da EMTr na recuperação do tecido nervoso após injúria isquêmica.

Fica patente pelas evidências apresentadas nesta breve revisão, o grande potencial de aplicabilidade clínica e experimental da EMTr. Apesar do crescente número de publicações a respeito, permanecem inúmeras lacunas no conhecimento. Torna-se, portanto, de fundamental importância a elaboração de estudos que provejam novos dados e possibilitem melhor compreensão dos mecanismos neurais implicados na geração dos efeitos da EMTr.

Embora o modelo animal apresente algumas limitações quanto a aplicabilidade clínica imediata de seus resultados, ele é ainda o melhor análogo para se estudar as condições encontradas nos seres humanos. Tais modelos provêm meios para se estudar um procedimento em particular e fornecer condições para se estabelecer terapias satisfatórias no intuito de melhorar as condições dos pacientes que sofrem de determinada doença.

A utilização de modelos experimentais no presente estudo, possibilitará analisar as características morfológicas associadas a aplicação de EMTr, podendo contribuir, dessa forma, para uma melhor compreensão da patologia e de seu tratamento.

3 Objetivos

Procurou-se, através deste estudo analisar se a Estimulação Magnética Transcraniana exerce algum efeito sobre os neurônios hipocampais de gerbils no sentido de proteger do insulto isquêmico, o que seria promissor no sentido do desenvolvimento de um método neuroprotetor para aqueles pacientes que seriam expostos a uma situação de hipóxia cerebral.

Para isso foi aplicado um modelo de estudo experimental com gerbils submetidos a isquemia cerebral em regime de hipotermia e normotermia tendo recebido sessões de EMTr previamente ou posteriormente, usando como avaliação a análise morfológica e prova de esquiva.

Então os objetivos específicos deste estudo foram:

- desenvolver método de aplicação de EMTr em animais de laboratório
- provocar isquemia cerebral em gerbils
- analisar o efeito da hipotermia durante a indução de isquemia cerebral e gerbils
- analisar o efeito da EMTr aplicada previamente a indução de isquemia cerebral em gerbils
- analisar o efeito da EMTr aplicada após a indução de isquemia cerebral em gerbils
- analisar se há interferência da EMTr no efeito da hipotermia na isquemia cerebral em gerbils

4 Métodos

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP em 23/10/2003, sob registro número 834/03. O estudo foi conduzido de acordo com os requerimentos do Comitê de Ética do HC-FMUSP.

4.2 Instituição

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Investigação Médica em Emergências Clínicas (LIM 51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.3 Caracterização do estudo

Este estudo caracteriza-se como experimental, prospectivo, controlado e duplo-cego tendo em vista a realização de procedimento cirúrgico em animais de laboratório e observado resultado de intervenção terapêutica, onde resultados de prova de comportamento e histologia foram analisados por pessoa não sabia qual protocolo aquele animal tinha sido

submetido, sendo que alguns receberam a terapia proposta, outros receberam terapia placebo e outros não receberam terapia.

4.4 Modelo Animal

Para a realização deste trabalho utilizamos gerbils adultos (*Meriones unguiculatus*), peso médio entre 60 e 70 gramas, machos, provenientes do biotério do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aclimatados com ciclo claro/escuro (12:12) com água e alimentação *ad libitum*.

Figura 1: *Meriones unguiculatus*

Estes animais são preferencialmente utilizados em modelos de isquemia devido a característica anatômica que facilita a técnica de indução; trata-se da hipoplasia das artérias comunicantes posteriores tendo como consequência o isolamento da circulação carotídea da vertebral (Levine and Sohn 1969) sendo possível a indução de uma isquemia global a partir da oclusão bilateral da

carótida, sendo nesta condição o fluxo sanguíneo cerebral reduzido a quase zero na maioria dos animais (Crockard et al. 1980, Osbourne and Halsey 1975); neste modelo a oclusão carotídea bilateral por cinco minutos resulta em injúria e morte de neurônios hipocámpais CA1 (Kirino 1982).

Figura 2: Polígono de Willis incompleto, com agenesia das artérias comunicantes posteriores

4.5 Modelo de Isquemia- cirurgia experimental

Os animais foram anestesiados através da inalação de halotano 3% em mistura gasosa de oxigênio 30% e protóxido 70% e submetidos a cervicotomia mediana; com auxílio de lupa cirúrgica é realizada dissecação e isolamento da artéria carótida comum bilateral sendo então o vaso laçado com fio de silicone conectado a um cateter de duplo lúmen, o animal é colocado em decúbito ventral sendo monitorizada a temperatura através de dois sensores, um retal que informa a temperatura do corpo e outro inserido

no músculo temporal que informa a temperatura da cabeça; quando o animal atinge a temperatura de 36°C o fio de silicone é tracionado com conseqüente oclusão vaso que é mantido por período de 7 minutos.

Figura 3: Aparato anestésico que utiliza Halotano, Óxido nitroso e Oxigênio

Figura 4: Imagem dos fios de silicones laçando as artérias carótidas

A temperatura de 36°C é mantida com auxílio de aquecedor elétrico e é controlada durante o período de oclusão do vaso e nos 30 minutos subseqüentes.

4.6 Hipotermia

Os animais submetidos a isquemia em regime de hipotermia seguem o mesmo protocolo descrito acima porem a temperatura da cabeça durante a isquemia e os 30 minutos subsequentes deve ser mantida entre 31°C a 32°C. Uma vez que o efeito do anestésico e o próprio procedimento já tendem a reduzir a temperatura corpórea, a simples utilização de compressa fria já é suficiente para redução da temperatura na cabeça e o aquecedor elétrico era acionado sempre que a temperatura fosse abaixo dos 31°C, sendo que o corpo permanece na temperatura normal com auxilio de outro aquecedor elétrico acionado com temperatura retal abaixo de 36°C.

Figura 5: Sensores de temperatura mostrando a diferença entre a temperatura retal e a cefálica

4.7 Estimulação Magnética Transcraniana

Foi utilizado o aparelho **Estimulador Magnético Neuro-MS Neurosoft**.

Figura 6: Aparelho neuroestimulador Neuro-MS Neurosoft

O protocolo de estimulação foi realizada com sessões diárias com 25 series de 5 segundos a 25Hz com intervalo de 45 segundos entre as series, por 7 dias consecutivos, com total de 21.875 pulsos com intensidade de 100% do limiar motor, e foi realizada a indução da isquemia 24 horas após o termino da ultima sessão. O grupo que recebe a EMTr após a isquemia, recebe sessões diárias com 25 series de 5 segundos a 25Hz com intervalo de 45 segundos entre as series, por 3 dias consecutivos, iniciadas logo após o procedimento cirúrgico.

Para realizar as sessões de estimulação foi desenvolvido uma câmara para contenção do animal, confeccionado a partir de uma pequena caixa plástica com dimensões próximas ao tamanho do animal, que permanecia praticamente imobilizado durante o procedimento;

foi necessário sedação com Halotano inalatório para posicionar o animal neste dispositivo de imobilização.

Figura 7: Animal contido com bobina posicionada sobre a cabeça

4.8 Avaliação de Comportamento

A avaliação do comportamento dos animais tem o objetivo de quantificar a perda de capacidade funcional do encéfalo, estão envolvidos neste teste, a avaliação do aprendizado e memória. Os gerbils são treinados em um aparato convencional para este teste, sendo uma câmara dividida em grade metálica e área segura. A câmara experimental (50x25x25 cm) é feita de fibra acrílica; no piso uma grade metálica e onde é gerado um choque de 4 mA, produzido por um gerador de corrente contínua e uma área segura (25x9,5x5cm) feita de madeira, e fixa em um dos lados da gaiola. O treinamento do animal é feito três dias antes da indução da isquemia. O animal é colocado na área segura, e quando ele desce o degrau e toca a grade metálica, recebe um choque na pata. Embora os animais tendam a subir e descer repetidamente, eles aprendem a permanecer na plataforma segura.

Esta sessão de treinamento tem duração de 300 segundos. Um teste é realizado após 24 horas do treinamento para confirmar que houve a aprendizagem, aqueles animais aprovados são submetidos a isquemia cerebral. Após a isquemia, são feitos testes após 24 e 48 horas. No teste o animal é deixado na área segura e é medido o tempo de latência (intervalo de tempo do animal descer da plataforma em direção à grade metálica). Se o gerbil não descer o degrau em 300 segundos ele recebe a pontuação máxima.

Figura 8: Aparato para realização de teste da esquila

4.9 Análise Histológica

No quarto dia após o procedimento cirúrgico de indução da isquemia, é induzida a parada cardio-respiratória com a utilização de halotano por via inalatória quando então é feita uma craniotomia para coletar o encéfalo para a análise histológica.

Os encéfalos são colocados em solução de formol 10% durante 12-24 horas e posteriormente incluído em parafina para a realização de preparo de

lamina em cortes de histológicos da região que envolva tecido referente ao hipocampo, sendo então corados com hematoxilina e eosina; esta técnica consiste de um corante que se liga aos ácidos nucleicos (a hematoxilina) que apresenta a condensação e segregação da cromatina das células, e outro corante (a eosina) que identifica citoplasmas acidófilos, sendo então possível identificar aspectos morfológicos da morte celular, e tendo como parâmetro de análise quantitativa da perda ou diminuição do tecido, apresentando a severidade da lesão isquêmica.

Nos cortes histológicos foram feitos preparos para evidenciar a ocorrência do processo de apoptose, utilizado a técnica de TUNEL, se obtiveram cortes com 5µm de espessura que foram montadas em lâminas silanizadas e submetidas à coloração histoquímica segundo protocolo sugerido pelo fabricante (In Situ Cell Death Detection Kit, POD®, Roche Applied Science, Mannheim Alemanha). Nesse processo os cortes foram desparafinizados por meio de imersão em baterias de xilol, álcool absoluto, álcool 95%, álcool 70% seguida de lavagem em PBS (salina fosfatada tamponada). Em seguida, as amostras foram tratadas com Proteinase K (20µg/mL) à temperatura ambiente por oito minutos. Após lavagem em água destilada, procedeu-se à inativação da peroxidase endógena com solução de água oxigenada a 3%. Enxaguaram-se as lâminas em PBS e depois se aplicou um tampão de equilíbrio do kit. As lâminas foram incubadas a 37°C com a enzima TdT (terminal deoxinucleotidil transferase) e nucleotídeos por três horas em câmara úmida. A reação foi interrompida com tampão de parada do kit e procedeu-se à incubação com anticorpo conjugado em

câmara úmida por uma hora. Após lavagem em PBS, foi feita a aplicação de DAB (diaminobenzidina) e água oxigenada por quatro minutos à temperatura ambiente para a revelação das marcações e em seguida, a contra-coloração com Hematoxilina.

Para a marcação da Caspase, foram obtidos cortes com 5µm de espessura que foram montadas em lâminas silanizadas (Sigma, A-3648), desengorduradas e preparadas com adesivo a base de aminopropiltiexisilano a 5% em álcool absoluto. Os cortes histológicos foram reidratados em cadeia descendente de etanol (etanol absoluto - 3x, seguido de etanol 95% - 2x e 70% - 1x por 30 segundos cada). E lavados em água destilada corrente. No próximo passo as lâminas foram acondicionadas em berço de vidro para manter distância entre elas de cerca de 4 mm. O bloqueio da peroxidase endógena tecidual foi feita através de encubações de cinco minutos cada em peróxido de hidrogênio a 3% (10x). Em seguida as lâminas foram lavadas em TBS, três banhos de cinco minutos. Foi realizado o procedimento de recuperação com solução citrato 10mM PH 6.0 em panela vapor (Steamer –pv) por 40 minutos, resfriado por 20 minutos até atingir temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas novamente em TBS, três banhos de 5 minutos banhado em Avidina, espera de 20 minutos, banhado em Biotina com espera de mais 20 minutos, e lavagem co TBS (3x), então os cortes foram incubados com caseína por 30 minutos, depois foram incubadas com anticorpos primários policlonais desenvolvidos em coelhos e diluído em tampão PBS/albumina 1% (Sigma, A9647), por 16-18 horas a 4°C, em camara úmida. Utilizado o anticorpo Caspase -3 (H277): sc-7148.

Após período de incubação, os cortes foram lavados suavemente com TBS e removeu-se o excesso de umidade, e a seguir, os espécimes foram incubados com anticorpo secundário anti coelho (VECTASIN Elite ABC Kit: Rabbit IgG Vector PK-6101) durante uma hora e meia em temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas TBS, três banhos de 5 minutos. A revelação das reações foi feita pela incubação das lâminas no substrato DAB (3,3 Diaminobenzidina tetrahydroclorídrico, Sigma, D-5637) 1 mg/ml PBS, 25µ de H₂O₂ 3%/ ml. Em seguida foram revelados por 3-10 min, controlando ao microscópio a positividade acastanhada. Os cortes foram lavados com água por 10 min. Os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris, por 20 segundos, lavados em água corrente e passagem em álcool 70% (1x), 95% (2x), 100% (3x) 3 xilol (4x) 30 segundos cada. As lâminas foram cobertas com lamínula de vidro, utilizando meio de montagem Entellam.

A apoptose é de um mecanismo de morte celular programada, sendo que quanto maior a proporção da área evidenciada no preparo indica maior atividade apoptótica, que por sua vez representa maior severidade da isquemia.

As quantificações foram realizadas em um sistema de análise de imagens NIKON, onde a imagem digitalizada da lâmina é analisada com auxílio de um software que reconhece a cor de cada ponto da imagem, e quantifica a área com a coloração escolhida, expressando o resultado em porcentagem de área marcada pelo determinado corante. As imagens dos cortes foram adquiridas através de um microscópio LEICA em aumento de 400X.

Figura 9: Imagem da tela do software analisador, onde o retângulo representa a área de análise, a região com coloração avermelhada esta sendo quantificada, e os resultados são expressos na tabela exposta na porção inferior

Foram analisados cortes envolvendo a região de CA1 do hipocampo dos animais, sendo que o hipocampo de cada lado foi dividido em três áreas (medial, intermediária e lateral) e cada destas áreas teve sua imagem analisada separadamente.

Figura 10: Esquema de divisão de áreas para análise

4.10 Divisão de Experimentos

Os animais foram divididos em oito protocolos experimentais como descritos a seguir.

Protocolo 1

Grupo constituído por 20 animais os quais foram submetidos a indução de isquemia cerebral e posteriormente submetido a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 2

Grupo constituído por 20 animais os quais foram submetidos a indução de isquemia cerebral seguido de EMTr ativa e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 3

Grupo constituído por 10 animais os quais foram submetidos a indução de isquemia cerebral seguido de EMTr placebo e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 4

Grupo constituído por 20 animais os quais foram submetidos a EMTr ativa seguido de indução de isquemia cerebral e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 5

Grupo constituído por 20 animais os quais foram submetidos a EMTr placebo seguido de indução de isquemia cerebral e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 6

Grupo constituído por 20 animais os quais forma submetidos de isquemia cerebral durante hipotermia e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 7

Grupo constituído por 20 animais os quais serão submetidos a EMTr ativa seguido de indução de isquemia cerebral durante hipotermia e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

Protocolo 8

Grupo constituído por 10 animais os quais serão submetidos a EMTr placebo seguido de indução de isquemia cerebral durante hipotermia e posteriormente a prova de avaliação de comportamento e histologia.

4.11 Análises estatísticas

Na prova de comportamento foram comparadas as medias dos tempos de latência dos animais de cada grupo em 24 e 48h após a indução da isquemia.

Na analise histológica foram comparadas as médias dos percentuais de área corada por Hematoxilina e Eosina em cada grupo de animais.

Os dados desta pesquisa foram comparados utilizando análise de variância ANOVA com auxílio do software INSTAT , considerando-se o nível de significância de 5 % (p menor do que, ou igual a, 0,05).

5 Resultados

No teste de esquiva, foram comparados os tempos de latência de cada grupo nos períodos de 24h e 48 horas após a isquemia.

Os animais que sofreram a isquemia durante hipotermia, com ou sem estimulação, tiveram performance superior aos demais.

Os animais que não foram estimulados tiveram pior performance quando comparados a seus respectivos grupos estimulados, seja estimulação ativa ou placebo.

Em quase todos os grupos, a performance dos animais em 48h foi melhor que em 24h, com exceção do grupo que recebeu estimulação placebo e isquemia em hipotermia.

Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo, foi feita a partir da comparação da média da porcentagem de área corada em cada um dos grupos, sendo que quanto maior a área corada, maior a área de tecido viável. Observou-se que os animais que foram submetidos a isquemia em hipotermia tiveram médias bastante superiores aos demais, e dentre eles, o grupo que registrou maior área preservada (43,6%) foi aquele que recebeu EMTr.

Os grupos que sofreram isquemia em temperatura normal tiveram valores muito próximos nas médias de área do tecido viável, sendo que o melhor resultado (17,6%) foi no grupo que recebeu EMTr após a isquemia.

Gráfico 1: Teste de esQUIVA, as barras azuis representam o tempo de latência 24h após a isquemia, as barras vermelhas 48h. Os animais que sofreram a isquemia durante hipotermia, tiveram performance superior aos demais, já que não foram estimulados tiveram a pior performance. Em quase todos os grupos, a performance em 48h foi melhor que em 24h

Gráfico 2: Análise Histológica de cortes da região CA1 do hipocampo, a barra representa a média da porcentagem de área corada em cada um dos grupos, sendo que os animais que foram submetidos a isquemia em hipotermia tiveram médias bastante superiores aos demais.

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

TMS POS: Estimulação Magnética posterior a isquemia

PLA POS: Estimulação Magnética Placebo posterior a isquemia

TMS PRE: Estimulação Magnética prévia a isquemia

PLA PRE: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia

HIP: Indução de Isquemia durante hipotermia sem Estimulação Magnética

TMS HIP: Estimulação Magnética prévia a isquemia durante hipotermia

PLA HIP: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia durante hipotermia

5.1 EMTr Pós Isquemia

A média do tempo de Latência de animais submetidos a EMTr posterior a isquemia, demonstrou que os grupos que receberam estimulação (ativa ou placebo) tiveram performance superior que o grupo não estimulado.

A melhor performance foi obtida pelo grupo que recebeu EMTr ativa, com média do tempo de latência de 219s no teste após 24h e 268s após 48h, ao passo que os animais não estimulados tiveram médias de 121 e 199 s em 24 e 48h respectivamente, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Gráfico 3: Tempo de Latência de animais submetidos a EMTr posterior a isquemia, onde os grupos que receberam estimulação tiveram performance superior, sendo o melhor deles o grupo que recebeu EMTr ativa, com média do tempo de latência de 219s no teste após 24h e 268s após 48h

EMTr Pós Isquemia – Teste de Esquiva

TMS POS: Estimulação Magnética posterior a isquemia

PLA POS: Estimulação Magnética Placebo posterior a isquemia

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Gráfico 4: Coloração hematoxilina eosina onde as médias de área de sobrevivência foram 17,6 % nos animais que receberam EMTr ativa, 16,7% EMTr inativa e 12,9% naqueles que não receberam EMTr

EMTr Pós Isquemia – Análise Histológica

TMS POS: Estimulação Magnética posterior a isquemia
PLA POS: Estimulação Magnética Placebo posterior a isquemia
ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Na análise morfológica com hematoxilina e eosina, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de área corada dos grupos.

Ao analisar as laminas foi observado sinais de lesão tecidual caracterizado por retração de núcleos e vacuolização de citoplasma, presente em todas as amostras.

Figura 11: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, corados com Hematoxilina e Eosina. A: POS, B: PLA POS, C: ISQ. Nota-se retração do núcleo e vacuolização do citoplasma em todas as amostras

De cada grupo de animais, foram escolhidos cinco cortes que apresentavam boa preservação da arquitetura celular para realização destes preparos, e tem o intuito de ilustrar a ocorrência do processo de apoptose, não sendo feito análise quantitativa.

Os animais do grupo que recebeu EMTr ativa aparentou ter maior área de evidencia de processo apoptótico nos dois preparos.

Gráfico 5: Marcação TUNEL

EMTr Pós Isquemia

TMS POS: Estimulação Magnética posterior a isquemia
PLA POS: Estimulação Magnética Placebo posterior a isquemia
ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Figura 12: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de TUNEL. Cada imagem referente a um grupo; A: POS, B: PLA POS, C: ISQ. A marcação em cor acastanhada demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente em todas as amostras

Gráfico 6: Marcação Caspase

TMS POS: Estimulação Magnética posterior a isquemia

PLA POS: Estimulação Magnética Placebo posterior a isquemia

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Figura 13: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de Caspase. Cada imagem referente a um grupo; A: POS, B: PLA POS, C: ISQ. A marcação demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente em todas as amostras

5.2 EMTr Prévia a Isquemia

A média do tempo de Latência de animais submetidos a EMTr anterior a isquemia, demonstrou que os grupos que receberam estimulação (ativa ou placebo) tiveram performance superior que o grupo não estimulado.

A melhor performance no teste após 24h foi obtida pelo grupo que recebeu EMTr ativa, com média do tempo de latência de 197s, ao passo que no teste após 48h os animais que receberam EMTr placebo tiveram média superior, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa em nenhuma comparação.

Gráfico 7: Tempo de Latência de animais submetidos a EMTr anterior a isquemia, onde os grupos que receberam estimulação tiveram performance superior, sendo ela EMTr ativa ou placebo

EMTr Prévia a Isquemia – Teste de Esquiva

TMS PRE: Estimulação Magnética prévia a isquemia

PLA PRE: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Na análise morfológica com hematoxilina e eosina, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de área corada dos grupos.

Ao analisar as laminas foi observado sinais de lesão tecidual caracterizado por retração de núcleos e vacuolização de citoplasma, presente em todas as amostras.

Gráfico 8: Coloração hematoxilina eosina onde as médias de área de sobrevivência foram 16,4 % nos animais que receberam EMTr ativa, 15,3% EMTr inativa e 12,9% naqueles que não receberam EMTr

EMTr Prévia a Isquemia – Análise Histológica

TMS PRE: Estimulação Magnética prévia a isquemia

PLA PRE: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Figura 14: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, corados com Hematoxilina e Eosina. A : PRE, B: PLA PRE, C: ISQ . Nota-se retração do núcleo e vacuolização do citoplasma em todas as amostras

De cada grupo de animais, foram escolhidos cinco cortes que apresentavam boa preservação da arquitetura celular para realização destes preparos, e tem o intuito de ilustrar a ocorrência do processo de apoptose, não sendo feito análise quantitativa.

Os animais do grupo que recebeu EMTr ativa aparentou ter menor área de evidencia de processo apoptótico na marcação de TUNEL.

Gráfico 9: Marcação TUNEL

EMTr Prévia a Isquemia – Analise Histológica

TMS PRE: Estimulação Magnética prévia a isquemia

PLA PRE: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Figura 15: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de TUNEL. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE, B: PLA PRE, C: ISQ. A marcação em cor acastanhada demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente em todas as amostras

Gráfico 10: Marcação Caspase

TMS PRE: Estimulação Magnética prévia a isquemia

PLA PRE: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia

ISQ: Indução de Isquemia sem Estimulação Magnética

Figura 16: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de Caspase. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE, B: PLA PRE, C: ISQ. A marcação demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente em todas as amostras

5.3 Isquemia Durante Hipotermia

A média do tempo de Latência de animais submetidos a EMTr anterior a isquemia, demonstrou que os grupos que receberam estimulação (ativa ou placebo) tiveram performance superior que o grupo não estimulado.

A melhor performance no teste após 48h foi obtida pelo grupo que recebeu EMTr ativa, com média do tempo de latência de 293s, ao passo que no teste após 24h os animais que receberam EMTr placebo tiveram média de 300s uma vez que todos os animais testados atingiram a pontuação máxima, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa em nenhuma comparação.

Gráfico 11: Tempo de Latência de animais submetidos a EMTr anterior a isquemia em regime de hipotermia, onde os grupos que receberam estimulação tiveram performance superior, sendo ela EMTr ativa ou placebo

Isquemia durante Hipotermia – Teste de Esquiva

TMS HIP: Estimulação Magnética prévia a isquemia durante hipotermia
PLA HIP: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia durante hipotermia
HIP: Indução de Isquemia durante hipotermia sem Estimulação Magnética

Nos grupos que sofreram isquemia durante hipotermia, a morte celular foi estatisticamente menor no grupo que recebeu Estimulação Magnética quando comparado com o que não recebeu estimulação, na coloração por Hematoxilina e Eosina ($P=0,0625$).

Ao analisar as laminas foi observado discretos sinais de lesão tecidual caracterizado por retração de citoplasma, mais evidente na amostra do animal que não recebeu estimulação.

Gráfico 12: Coloração hematoxilina eosina em animais que sofreram isquemia durante hipotermia, onde as médias de área de sobrevivência foram 43 % nos animais que receberam EMTr ativa, 38% EMTr inativa e 34% naqueles que não receberam EMTr

Isquemia durante Hipotermia – Análise Histológica

TMS HIP: Estimulação Magnética prévia a isquemia durante hipotermia
PLA HIP: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia durante hipotermia
HIP: Indução de Isquemia durante hipotermia sem Estimulação Magnética

Figura 17: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia durante hipotermia aumento de 400X, corados com Hematoxilina e Eosina. A : PRE HIP, B: PLA PRE HIP, C: HIP . Nota-se retração do citoplasma discreta, mais evidente na amostra do animal que não recebeu estimulação

De cada grupo de animais, foram escolhidos cinco cortes que apresentavam boa preservação da arquitetura celular para realização destes preparos, e tem o intuito de ilustrar a ocorrência do processo de apoptose, não sendo feito análise quantitativa.

Em todos os grupos foi evidenciada a presença de processo apoptótico, porém bem mais evidente na marcação de TUNEL que evidencia a fase final da apoptose, e foi praticamente inexistente na marcação de Caspase, demonstrando pouca apoptose em fase inicial.

Gráfico 13: Marcação TUNEL

Isquemia durante Hipotermia – Análise Histológica

TMS HIP: Estimulação Magnética prévia a isquemia durante hipotermia
PLA HIP: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia durante hipotermia
HIP: Indução de Isquemia durante hipotermia sem Estimulação Magnética

Figura 18: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia durante hipotermia, aumento de 400X, marcação de TUNEL. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE HIP, B: PLA PRE HIP, C: HIP. A marcação em cor acastanhada demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente em todas as amostras

Gráfico 14: Marcação Caspase

TMS HIP: Estimulação Magnética prévia a isquemia durante hipotermia

PLA HIP: Estimulação Magnética Placebo prévia a isquemia durante hipotermia

HIP: Indução de Isquemia durante hipotermia sem Estimulação Magnética

Figura 19: Imagens dos cortes histológicos da região CA1 do hipocampo de animais submetidos a isquemia, aumento de 400X, marcação de Caspase. Cada imagem referente a um grupo; A: PRE HIP, B: PLA PRE HIP, C: HIP. A marcação demonstra ocorrência de processo de apoptose, presente discretamente em todas as amostras

6 Discussão

Estimulação

O procedimento de estimulação pareceu ser bastante traumático e estressante para os animais que foram desenvolvendo comportamento agitado e até agressivo no decorrer das sessões. Acreditamos que seja principalmente decorrente do período de restrição, considerando-se o fato de que este comportamento foi observado nos animais que receberam EMTr tanto ativa como placebo. Para que o dispositivo de imobilização seja eficiente seu volume interno deve ser muito próximo ao volume corporal do animal, pois o animal se agita bastante durante o procedimento, e pode sair da posição desejada, com isso ele sai da área de estimulação e também pode se colocar em postura que restringe o movimento do tórax dificultando a respiração, alguns óbitos ocorreram durante o procedimento provavelmente por asfixia.

A cirurgia

A metodologia empregada na realização deste tipo de procedimento cirúrgico parece muito bem estabelecida. O procedimento anestésico inalatório é eficiente com rápida recuperação. A técnica cirúrgica é segura com poucos casos de complicações intra ou pós-operatórias, tendo sucesso baseado na ampla dissecção cervical com boa exposição das carótidas. A complicação mais frequente foi a ruptura da carótida no momento de retirar o laço após os minutos de oclusão, provavelmente por aderência do fio ao

vaso, levando a hemorragia maciça e óbito em minutos; também ocorreu único caso de animal que evolui com hemiplegia no pós operatório imediato e óbito no dia seguinte, acreditamos que tenha ocorrido delaminação da carótida seguido de obstrução, levando a infarto cerebral hemisférico.

Teste de Esquiva

Notou-se que desempenho dos animais no teste realizado após 48h foi melhor que em 24h em praticamente todos os grupos, possivelmente por conta da recuperação do procedimento cirúrgico e edema cerebral pós-isquemia. Com isso acreditamos que a comparação dos dados do teste de memória realizada após 48h da intervenção cirúrgica é mais precisa para avaliar a lesão cerebral definitiva, do que a realizada mais precocemente que sofre maior interferência dos efeitos agudos do procedimento.

A EMTr parece ter melhorado o desempenho dos animais na prova de memória principalmente quando aplicada posteriormente a isquemia, embora sem significância estatística. Considerando o fato de que os animais que receberam estimulação placebo também apresentaram melhora, acreditamos que este resultado seja decorrente de estado de agitação e stress, levando a ativação da memória, lembrando que estes animais encontravam-se agitados e agressivos como citado acima.

A análise estatística dos dados colhidos com este teste apenas confirmou os resultados da literatura onde a hipotermia exerce efeito protetor sobre a função cerebral, o que confirma a eficiência do nosso método realizado. Em nossas análises os animais que receberam EMTr não tiveram

melhor performance quando comparados aos grupos de controle com estimulação placebo.

Análise histológica

A análise histológica foi realizada com utilização de software analisador de imagens e que quantifica a proporção de área corada, a análise estatística foi feita sobre as imagens dos cortes corados com Hematoxilina e Eosina, onde foi demonstrada a preservação significativa do tecido naqueles animais submetidos a isquemia durante hipotermia, que mantiveram proporção de área corada muito próximo de tecido normal, este resultado pode ser facilmente confirmado com análise convencional das amostras, onde se nota que nestes animais o tecido permaneceu quase intacto, sem sinais de retração ou vacuolização do citoplasma ou mesmo retração do núcleo. Quando comparadas as análises de tecidos dos grupos com seus respectivos grupos de controle, observou-se que a EMTr teve efeito protetor significativo apenas nos animais que sofreram isquemia em hipotermia, incrementado seu efeito positivo. Neste modelo não foi testado a aplicação da EMTr após a isquemia.

Em nosso experimento não reproduzimos o resultado obtido por Fujiki et al. em 2003, no seu melhor resultado quando foi realizado apenas uma sessão de estimulação de 128 segundos dois dias antes da isquemia; uma possibilidade é que efeito excitatório estimulação tenha sido excessivo e aumentado o metabolismo celular tornado-a mais sensível a isquemia e anulando o efeito protetor gerado através de outras alterações bioquímicas

locais, o que explicaria o fato de a EMTr exercer efeito positivo durante a hipotermia, onde a baixa temperatura reduziu o metabolismo sem interferir nos outros mecanismos.

Foram selecionados alguns cortes com boa preservação da citoarquitetura e realizado marcação de TUNEL e Caspase para ilustração da ocorrência de morte celular através do processo de apoptose. Nesta lamina, foi observado que nos animais que foram submetidos a isquemia durante hipotermia tiveram grande área corada na marcação de TUNEL e não de Caspase, que indica que, as células que se encontravam no processo de apoptose estavam na sua fase final. Nos demais animais, a marcação foi bem evidente em ambos os preparos, sendo que a marcação de Caspase indica apoptose em fase inicial; então se a análise morfológica fosse realizada mais tardiamente, provavelmente mais morte celular teria ocorrido naqueles animais que sofreram isquemia em temperatura normal e não naqueles submetidos a isquemia em hipotermia.

7 Conclusões

- Pudemos desenvolver um método eficiente de imobilização do animal, que permitiu realizar a Estimulação Magnética de maneira efetiva, apesar de ter aparentado ser bastante estressante para o animal, tendo provocado comportamento agitado e agressivo e também alguns óbitos.
- O modelo de cirurgia experimental aplicado neste estudo mostrou-se eficiente pois produziu lesão cerebral suficiente para possibilitar a análise e comparação de seus efeitos.
- A hipotermia é um método eficiente de proteção neuronal, tendo sido comprovado em teste funcional e morfológico.
- A EMTr teve efeito protetor significativo apenas nos animais que sofreram isquemia em hipotermia, demonstrados na análise histológica com hematoxilina e eosina.

8 Referencias

Anschel, David J.; Pascual-Leone, Alvaro; Holmes, Gregory L. Anti-kindling effect of slow repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *Neuroscience Letters* 351:9-12. 2003.

Ariga SKK. *Modulação termica da lesão isquêmica : estudo in vitro*. (dissertação) São Paulo : Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Ashkenazi A; Dixit VM. Death Receptor: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381):1305-8

Ayara R, Uehara T, Nomura Y. Hypoxia induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-MC cells by caspase activation accompanying cytochrome c from mitochondria. *FEBS Lett.* 1998; 439(1-2): 168-72.

Baena RC, Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD. Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia. *Neurology.* 1997; 48(3): 768-73

Baena RC, Kubo SK. Temperature modulates apoptosis in the gerbils hippocampus following global ischemia. *XIV Reunião da FeSBE 2001* ; Caxambu.

Bradford HF, Ward H, Glutamine: a major substrate for nerve endings. *J Neurochem.* 1987;30:1453-56

Buja LM, Eigenbrodt RH. Apoptosis and Necrosis: basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* 1993; 117(12):1208-14

Campos EBP, Yoshida WB. The role of free radicals in the pathophysiology of ischemia and reperfusion in skin flaps: experimental models and treatment strategies. *J Vasc Br.* 2004; 3(4): 357-66

Castro e Silva Junior O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveria AF, DAI Sasso K, Aspectos básicos da lesão isquêmica e reperfusão do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir Bras.* 2002;17:96-100.

Chen R.; Classen, J.; Gerloff C.; Celnik P.; Wassermann E.M.; Hallett M.; Cohen L.G. Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 55(8):1398-1403.1997

Choi DW, Rothan SM, The glutamate neurotoxicity in hipoxic-ischemic neural death. *Ann Ver Neurosc.*1990; 13: 171-82

Choi DW. Ischemia induced neuronal apoptosis.*Curr Opin Neurobiol.* 1996;6(5): 667-72

Coimbra CG, Cavalheiro EA. Protective effect of short term post-ischemic hypothermia on the gerbil brain. *Braz J Med Biol Res.* 1990;23(6-7): 605-11.

Colbourn F.; Corbett D.; Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res.* 1994 654(2):265-72

Colli BO, Nunes M, Carlotti CG Jr. Isquemia cerebral experimental. In Castro e Silva O, Beer A, Zuccoloto S. *Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia.* São Paulo: Probel Editora; 1998: 646-62

Crockard A, Lanoti F., Hunstock AT, Smith RD,Harris RJ, Symon L. Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in the gerbil. *Stroke* 1980;11:494-498

Dannon P; Dolberg O; Schreiber S; Grunhaus L. Three and six-month outcome following courses of either ECT or rTMS in a population of severely depressed individuals-preliminary report. *Biol Psychiatry* 51:687-90.2002.

De Keyser J, Sulter G, Luiten PG, Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemia stroke: are doing the right thing? *Trends Neurosci.* 1999;22:535-40

Duarte SG, CamposAD, Colli B. Avaliação funcional da isquemia cerebral focal temporária em modelo experimental. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 2003; 61(3) 751-56.

Eberspacher E, Werner C, Engelhard K, Pape M, Laacke L, Winner D, Hollweck R, Hultzler P, Kochs E. Long-term effects of hypothermia on neuronal cell death and the concentration of apoptotic proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005; 49:477-87

Eisenburger P, Sters F; Holzer M; Zeiner A; Scheinecker W; Havel C; Losert H.; Therapeutic hypothermia after cardiac arrest; *Curr Opin Crit Care*. 2001; 7 (3):184-8

Falavigna A, Feraz FAP, Delazzeri L, Jorgani V. Uso da hipotermia o acidente vascular cerebral isquêmico: considerações atuais. *Rev Bras Neurol*. 2002; 38 (2-3):17-25

Feng HL, Yan L, Cui LY: Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on adenosine triphosphate content and microtubule associated protein-2 expression after cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Chin Med J (Engl)* 2008, 121:1307-1312.

Foster DJ, Wilson MA. Reverse Replay of behavioral sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 2006; 54 1-34.

Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Kamida T, Repetitive transcranial magnetic stimulation for protection against delayed neuronal death induced by transient ischemia. *J Neurosurg*. 2003 Dec;99(6):1063-9

Gangitano M.; Valero-Cabre A.; Tormos J.M.; Mottaghy F.M.; Romero J.R.; Pascual-Leone A. Modulation of input-output curves by low and high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. *Clin Neurophysiol* 113(8): 1249-57. 2002.

Gao F, Wang S, Guo Y, Wang J, Lou M, Wu J, Ding M, Tian M, Zhang H. Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of transient cerebral ischaemia: a microPET study. *European Journal Of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37 (5), 954-961. 2010

Gerschenson LE, Rotello. Apoptosis: A different type of cell death. *Faseb J*. 1992; 6(7): 2450-5

Geske FJ., Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Patol* 2001; 32(10): 1029-38

Grahan SH, Chen J. Programed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21(2): 99-109

Hara A, Niwa M, Iwai T., Nakashima M, Bunai Y, Uematsu T, Yoshimi N, Mori H. Neuronal apoptosis studied by a sequential TUNEL technique: a method for tract-tracing. *Brain Res Brain Res Protoc*; 1999, 42 (2): 140-6

Hallett, M. Transcranial Magnetic Stimulation and the human brain. *Nature*, 406(6792):147-50. 2002.

Herguido MJ, Carceler F, Roda JM, Avendano C. Hippocampal cell loss transient global cerebral ischemia in rats: a critical assessment. *Neurosci*. 1999; 93: 71-80

Hilgetag C.C.; Theoret H.; Pascual-Leone A.; Enhanced visual spatial attention ipsilateral to rTMS-induced 'virtual lesions' of human parietal cortex. *Nat Neurosci* 4(9):953-7.2001.

Honkaniemi J, Massa SM, Brekinhidge M, Sharp FR. Global ischemia induces apoptosis-associated genes in hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 42(1): 79-88

Horn AP. *Investigação de proteínas envolvidas na vulnerabilidade seletiva do hipocampo* (dissertação). Pouso Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Izquierdo I, Camarota M, Medina JH, Bevilaqua LR, Pharmacological findings on the biochemical bases of memory process. *A general view, Neural Past* 2004; 11: 159-89

kandel ER, Pittenger C, The past, the future and the biology of memory storage. *Biol. Sci.* 1999, 354: 2027-52

Kandel ER. O sistema nervoso e o comportamento. In Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Princípios da Neurociência*. Barueri SP, Manole, 2003 p 5-18.

Keer JF; Willie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26(4): 239-57

Kirino T. 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 239:57-69

Kosslyn S.M.; Pascual-Leone A.; Felician O.; Camposano S.; Keenan J.P.; Thompson W.L.; Ganis G.; Sukel K.E.; Alpert N.M. The role of area 17 in visual imagery: convergent evidence from PET and rTMS. *Science* 284(5411): 167-70. 1999.

Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: What do laboratory studies teach us? *Stroke*. 2004; 35(6): 1482-89

Kumar V, Coltran RS, Robbins SL. *Lesão e adaptação celular*. Patologia Básica. 5a. 1994: 3-20

Lent R. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais em Neurociências*. São Paulo SP Atheneu; 2005.

Levine S., Sohn D. 1969. Cerebral ischemia in infarct and adult gerbil: relation to incomplete Circle of Willis. *Arch Pathol*. 87:315-317

Levine S, Payan H, Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones Unguiculatus*). *Exp Neurol*. 1966; 16:255-62

Macleod MR; Johansson IM; Olsson T.; Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury. *Eur J Neurosci*. 2003; 17(8):1549-55

Maeda, F.; Keenan J.P.; Tormos J.M.; Topka H.; Pascual-Leone A. Interindividual variability of the modulatory effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cortical excitability. *Exp Brain Res* 133(4):425-30. 2000.

Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis and inflammation. *Stroke*. 1998; 29:2171-80

Martins EF, Chadi G.; Reação Glialdo hipocampo após isquemia global cardiogênica. *Acta Cir Bras*. 2001; 16(1) 5-14

Murthy HS, Chidanandaswamy MN, Rao GS, Kolluri S. Spontaneous intraoperative hypothermia and cerebral protection in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Middle East J Anesthesiol*. 2005 Jun;18(2):313-32.

Mottaghy F.M.; Keller C.E; Gangitano M.; Ly J.; Thall M.; Parker J.A.; Pascual-Leone A. Correlation of cerebral blood flow and treatment effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in depressed patients. *Psychiatry Res* 115(1-2):1-14. 2002.

Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *An Emerg.Med* 2000, 36(5):483-506

Niwa M,Hara A, Iwai T, Wang S, Hotta K,Mori H, Uematsu T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil Hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neuroscienc. Lett*. 2001; 300(2):103-6

Niwa M,Hara A, Iwai T, Nakashima M, Yano H, Yoshimi N, Mori H, Uematsu T. Relationship between magnitude of ischemia during hypothermia and preventive effect against post-ischemic DNA fragmentation in the gerbil hippocampus. *Brain Res* 1998, 794(2):338-42.

Osbourne RC,Halsey JH Jr. 1975.Cerebral blood flow. A predictor of recovery from ischemia in the gerbil. *Arch.Neurol*.32: 457-461

Pascual-Leone, A; Bartres-Faz D; Keenan J. Transcranial magnetic stimulation: studying the brain- behavior relationship by induction of 'virtual lesions'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 354:1229-1238. 1999.

Pascual-Leone, A. Handbook of Transcranial Magnetic Stimulation. London-New York. *Arnold-Oxford University Press distributor*, 2002.

Prandini MN, Neves Filho A, Lapa AJ, Stavale JN. A Hipotermia moderada reduz a infiltração na inflamação encefálica induzida. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2005; 63(3): 779-84

Romero J.R.; Anshel D.; Sparing R; Gangitano M.; Pascual-Leone A. Subthreshold low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation selectively decreases facilitation in the motor cortex. *Clin Neurophysiol*. 2002 Jan;113(1):101-7.

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Basic Neurochemistry. Philadelphia: *Lippincott-Raven*;1999

Tardini DMS, Yoshida WB, Novelli ELB, Siqueira JL. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. *Acta Cir Bras* 2003; 18 (6): 502-8

Triggs W.J.; McCoy L.J; Greer R.; Rossi F.; Bowers D.; Kortenkamp S.; Nadeau S.E.; Heilman K.M.; Goodman W.K. Effect of left frontal transcranial magnetic stimulation on depressed mood, cognition, and corticomotor threshold. *Biol Psychiatry* 45(11):1440-6.1999.

Vaagenes P, Ginsberg M, Ebmeyer U, Ernster L, Fisher M, Gisvold SE, Gurvitch A, Hossmann KA, Nemoto EM, Radovsky A, Severinghaus JW, Safar P, Schlichtig R, Sterz F, Tonnessen T, White RJ, Xiao F, Zhou Y. Cerebral resuscitation from cardiac arrest: pathophysiologic mechanisms. *Crit Care Med*. 1996; 24(2) (supl): S55-68

Yamamoto K, Morimoto K, Yanigihara T. Cerebral Ischemia in gerbil: transmission electron microscope and immunoelectron microscope investigation. *Brain Res*. 1986; 384: 1-10

Wey L, Yu SP, Gottron F, Snider BJ, Zipfel GJ, Choi DW. Potassium channel blockers attenuated hypoxia and ischemia induced neuronal death in vitro and in vivo. *Stroke* 2003; 34(5): 1281-6.