

RENATA RODRIGUES MOREIRA

***Mismatch negativity*: análise dos efeitos da hipotermia
e do treinamento auditivo a partir de um modelo de
estudo experimental**

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

Área de Concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Renata Rodrigues

Mismatch negativity : análise dos efeitos da hipotermia e do treinamento auditivo a partir de um modelo de estudo experimental / Renata Rodrigues Moreira. -- São Paulo, 2008.

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

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Irineu Tadeu Velasco.

Descritores: 1.Potencias evocados/fisiologia 2.Plasticidade neuronal 3.Isquemia encefálica 4.Hipotermia 5.Gerbillinae

USP/FM/SBD-055/08

Dedico este estudo,

*ao meu marido Daniel, pelo seu amor e pela compreensão nos
vários momentos da minha ausência;*

ao meu pai, por ter me mostrado o ser humano valoroso que é;

à minha mãe (em memória), por ter me ensinado a amar;

à minha irmã, pelo carinho, preocupação, amizade e apoio;

*à minha sobrinha Carolina, que desde tão pequena me mostrou
como transpor os obstáculos da vida;*

Obrigada por dividirem esta conquista comigo.

***Creio que a vida não é feita das decisões que você não toma,
ou das atitudes que você não teve, mas sim, daquilo que foi feito.
Se bom ou não, penso, é melhor viver do futuro que do passado.***

Luiz Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

Professor Doutor Irineu Tadeu Velasco, **pela oportunidade de realizar este estudo, pela atenção e pela orientação;**

Professora Doutora Eliane Schochat, **pela oportunidade, pela colaboração em todos os momentos desta pesquisa, e pela sua amizade;**

Mestre e bióloga Suely K. K. Ariga, **pela imensurável contribuição na realização deste estudo, pela realização da cirurgia experimental, e pela amizade;**

Fátima Abatepaulo, **pela disponibilidade, atenção e pela confecção do material histológico utilizado neste estudo;**

Professora Doutora Carla Gentile Matas, **pelo exemplo de ser humano, pela amizade, pela contribuição científica no exame de Qualificação, e pela ajuda com o equipamento utilizado neste estudo;**

Professor Doutor Francisco Garcia Soriano, **pela atenção e disponibilidade, e pela contribuição científica desde o exame de Qualificação;**

Professor Doutor Heraldo Possolo de Souza, **pelos ensinamentos científicos passados no exame de Qualificação;**

todo o pessoal do LIM 51: Kelly, Hermes, Denise e Geraldo, pela amizade, apoio e contribuição direta ou indireta;

Sr. Angelo, **pela confecção da caixa de esquiva utilizada neste estudo;**

Fernanda Takeyama **pela incansável ajuda na coleta de dados deste estudo;**

Carolina Colin **também pela ajuda na coleta dos dados;**

Professor Doutor Luís Marcelo Inaco Cirino, **diretor do Departamento Médico do Hospital Universitário da USP, pela compreensão e apoio durante toda a pós-graduação;**

Professor Daniel Pio Soares, **pela correção ortográfica da Língua Portuguesa à qual este estudo foi submetido;**

amigas e fonoaudiólogas Ivone, Lorena, Camila, Cristina, Maria Fernanda e Tatiane, pela amizade pessoal e pela cumplicidade durante a realização deste trabalho;

amiga Sílvia Carvalho, sempre disponível a me ouvir quando das minhas angústias, e pelas risadas que sempre damos juntas;

fonoaudiólogas Seisse Gabriela G. Sanches e Ivone Ferreira Neves, pela compreensão quando da minha ausência nos estágios dos alunos;

todos que, direta ou indiretamente, participaram ou contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
3. OBJETIVOS	29
4. MÉTODOS	31
4.1 Ética	32
4.2 Instituição	32
4.3 Caracterização do estudo	32
4.4 Amostra	33
4.5 Critérios de inclusão	33
4.6 Delineamento experimental: divisão em estudos	34

4.6.1 Estudo 1

4.6.1.1 Material	34
4.6.1.2 Registro dos potenciais evocados antes da isquemia	35
4.6.1.3 Cirurgia experimental – isquemia cerebral	38
4.6.1.4 Registro dos potenciais evocados após a isquemia	41
4.6.1.5 Análise dos resultados	
4.6.1.5.1 Potencial evocado de tronco encefálico - PEATE.....	42
4.6.1.5.2 <i>Mismatch negativity</i> – <i>MMN</i>	43
4.6.1.6 Análise estatística	44

4.6.2 Estudo 2

4.6.2.1 Material	45
4.6.2.2 Registro dos potenciais evocados antes da isquemia; cirurgia experimental; registro dos potenciais evocados após a isquemia	45
4.6.2.3 Confecção da caixa de esQUIVA	45
4.6.2.4 Treinamento auditivo	46

4.6.2.5 Registro dos potenciais evocados após o treinamento auditivo	47
4.6.2.6 Análise dos resultados	48
4.6.2.7 Análise estatística	48
4.6.3 Estudo 3	
4.6.3.1 Material	49
4.6.3.2 Registro dos potenciais evocados antes da isquemia; cirurgia experimental; registro dos potenciais evocados após a isquemia	50
4.6.3.3 Perfusão e análise morfológica	50
4.6.3.4 Análise dos resultados	52
4.6.3.5 Análise estatística	52
5. RESULTADOS	54
5.1 Estudo 1	
5.1.1 Análise do <i>MMN</i> : presença do potencial	55
5.1.2 Análise do <i>MMN</i> : comparação entre os grupos.....	56
5.2 Estudo 2	
5.2.1 Análise do <i>MMN</i> : latências	58
5.2.2 Análise do <i>MMN</i> : latências antes e depois do treinamento	59

5.3 Estudo 3	
5.3.1 Análise morfológica: número de células sobreviventes	60
5.3.2 Análise morfológica: comparação entre os grupos	62
5.3.3 Análise do <i>MMN</i> : latências	63
5.3.4 Correlação entre o número de células e latências do <i>MMN</i>	63
6. DISCUSSÃO	65
6.1 Estudo 1	66
6.2 Estudo 2	70
6.3 Estudo 3	73
7. CONCLUSÕES	75
8. ANEXO	77
9. REFERÊNCIAS	79

Lista de abreviaturas

et al.	e outros
ms	milisegundos
N	número de animais
p	nível de significância
p.	página

Lista de símbolos

et al.	e outros
ms	milisegundos
N	número de animais
p	nível de significância
p.	página
<	menor que

Lista de siglas

PEATE	Potencial evocado auditivo de tronco encefálico
<i>MMN</i>	<i>Mismatch negativity</i>
HIPO	HIPOTÉRMICO
SHAM	grupo controle
NORMO	NORMOTÉRMICO
HIPER	HIPERTÉRMICO

Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Porcentagem de presença do *MMN* por grupo em cada momento do estudo, e N correspondente..... 56
- Tabela 2** - Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* por grupo em todos os momentos do estudo..... 56
- Tabela 3** - Nível de significância a partir da comparação intergrupos das médias das latências do *MMN* em cada momento do estudo, a partir do Teste t..... 57
- Tabela 4** - Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* em cada momento do estudo..... 58
- Tabela 5** - Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* no momento 24 horas após a isquemia (“pós1”) no pós 5 (24 horas após o treinamento auditivo), e o nível de significância entre ambos (p), a partir do Teste t..... 59
- Tabela 6** - Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* no momento “pós1” e no “pós 6” (48 horas após o treinamento auditivo), e o nível de significância entre ambos (p), a partir do Teste t..... 59

Tabela 7 - Média das porcentagens \pm desvio padrão (DP) do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo de cada hemisfério cerebral de acordo com o grupo..... 60

Tabela 8 - Nível de significância a partir da comparação intergrupos entre a média do percentual do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo a partir do Teste t..... 62

Tabela 9 - Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* por grupo em todos os momentos do estudo..... 63

Tabela 10 - Coeficiente de correlação entre o número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo e a latência do *MMN* em todos os animais e em cada momento do estudo..... 64

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema da cascata enzimática envolvendo lesão neuronal a partir da isquemia cerebral; adaptado de Siegel et al. (1999).....	14
Figura 2 - Esquema da produção de radicais livres e lesão gerada pela reperfusão (adaptado de Granger et al., 1986).....	16
Figura 3 - Procedimento de captação dos potenciais evocados.....	36
Figura 4 - Esquema da posição dos eletrodos para a captação dos potenciais evocados; o círculo vermelho mostra duas das posições utilizadas neste estudo.....	36
Figura 5 - Procedimento de isquemia cerebral.....	39
Figura 6 - Procedimento de isquemia cerebral.....	39
Figura 7 - Procedimento de manutenção da temperatura do animal durante isquemia cerebral	40
Figura 8 - Modelo de traçado do PEATE em gerbil.....	43
Figura 9 - Modelo de traçado do <i>MMN</i> em gerbil	43

Figura 10 - Esquema das áreas analisadas da região CA1 do hipocampo (A) e corte da região CA1 do hipocampo de gerbil com aumento de 50 vezes (B)..... 53

Figura 11 - Cortes da região CA1 do hipocampo de gerbil de acordo com o grupo: Hipertérmico (A), Normotérmico (B), Hipotérmico (C) e SHAM (D)..... 61

Lista de Quadros

- Quadro 1** - Descrição dos grupos do estudo 1 de acordo com as temperatura corporal e da cabeça, e oclusão da carótida..... 38
- Quadro 2** - Descrição dos procedimentos realizados no estudo 1..... 42
- Quadro 3** - Descrição dos procedimentos realizados no estudo 2, por dia de avaliação..... 48
- Quadro 4** - Descrição dos procedimentos por dia de avaliação no estudo 3..... 51

Moreira, RR. *Mismatch negativity: análise dos efeitos da hipotermia e do treinamento auditivo a partir de um modelo de estudo experimental [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

INTRODUÇÃO: Lesões cerebrais isquêmicas ocorrem em índices bastante significativos, podendo levar a alterações cognitivas de graus variados, cujas repercussões clínicas podem ser de extrema gravidade para os pacientes acometidos. Para avaliar as consequências destas lesões nos aspectos funcionais, pode-se utilizar um dos componentes dos potenciais evocados auditivos relacionados a eventos, o *Mismatch Negativity (MMN)*. **OBJETIVOS:** verificar se o *MMN* é capaz de detectar mudanças eletrofisiológicas em gerbils submetidos à isquemia cerebral e a hipotermia; verificar se o treinamento auditivo pode gerar mudanças eletrofisiológicas detectáveis pelo *MMN*, e comparar as latências do potencial com as células sobreviventes do hipocampo de gerbils submetidos à isquemia e a hipotermia. **MÉTODOS:** Estudo 1: 44 gerbils (*Meriones Unguiculatus*) adultos foram anestesiados com halotano e submetidos à isquemia cerebral através da oclusão bilateral das carótidas por sete minutos, e à captação do *MMN*. Os animais foram divididos nos grupos SHAM, HIPO, NORMO e HIPER, de acordo com a temperatura a que foram submetidos. Estudo 2: 28 gerbils foram submetidos a uma sessão de treinamento auditivo com duração de 300 segundos em caixa de esQUIVA com gerador de eletrochoque, e ao registro do *MMN*. Estudo 3: foi captado o *MMN* de 27 gerbils e, após terem sido sacrificados, foi realizada a quantificação de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo através de cortes histológicos. **RESULTADOS:** Estudo 1: houve 100% de presença do *MMN* no grupo HIPO, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos SHAM e HIPO. Estudo 2: não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências do *MMN* antes e depois do treinamento auditivo. Estudo 3: observou-se maior número de células sobreviventes no hipocampo nos animais do grupo HIPO, e foi detectada baixa correlação entre o número de células sobreviventes e a latência do *MMN*. **CONCLUSÕES:** o *MMN* detectou as mudanças eletrofisiológicas geradas pelo efeito neuroprotetor da hipotermia, porém, o protocolo do treinamento auditivo utilizado neste estudo não gerou mudanças neurais nos animais que pudessem ser detectadas pelo *MMN*, e foi observada baixa correlação entre a latência do *MMN* e o número de células sobreviventes na região CA1 do hipocampo de gerbils submetidos à isquemia e a hipotermia.

Descritores: potencial evocado relacionado a eventos, plasticidade neuronal, isquemia, hipotermia.

Moreira, RR.: Mismatch Negativity: analysis of temperature and auditory training effects from an experimental study model. [Thesis]. São Paulo: Medicine Faculty, University of São Paulo; 2008.

INTRODUCTION: Significant ischemic cerebral lesions may result in cognitive disorders of varying degrees, with clinical repercussions that could be extremely severe for the affected patients. In order to evaluate the consequences of such lesions upon functional aspects, one of the components of event-related auditory evoked potentials, the Mismatch Negativity (MMN), may be used. **AIM:** to verify whether the MMN is able to identify electrophysiological changes in gerbils submitted to cerebral ischemia and hypothermia; to verify if auditory training may generate electrophysiological changes detectable by MMN, and to compare the potential's latencies with the surviving cells of the hippocampus of gerbils submitted to cerebral ischemia and hypothermia. **METHODS:** Study 1: 44 adult gerbils (*Meriones Unguiculatus*) were sedated with halothane and underwent cerebral ischemia through bilateral occlusion of the carotids for seven minutes, and the MMN was registered. Animals were divided in four groups, SHAM, HIPO, NORMO and HIPER, according to the temperature they were exposed. Study 2: 28 gerbils underwent a session of auditory training of 300 seconds in a passive shuttle box with an electroshock generator, and the MMN was registered. Study 3: the MMN of 27 gerbils were registered and after their scarifice, the amount of surviving cells in the CA1 region of the hippocampus was quantified through histological cuts. **RESULTS:** Study 1: the MMN was 100% present in the HIPO group, there was no significant statistical difference between groups SHAM and HIPO. Study 2: there was no significant statistical difference between the MMN latencies before and after the auditory training. Study 3: a greater number of surviving cells was observed in the hippocampus of animals from group HIPO, and a low correlation between the number of surviving cells and the MMN latency was detected. **CONCLUSIONS:** MMN detected electrophysiological changes generated by the neuroprotector effect of hypothermia, nevertheless the auditory training protocol used in this study did not generate neural changes in the animals that could be detected by MMN, and a low correlation between the MMN latency and the number of surviving cells in the CA1 region of the hippocampus of gerbils submitted to ischemia and hypothermia was observed.

Descriptors: event-related evoked potential, neuronal plasticity, ischemia, hypothermia.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças cerebrovasculares são patologias com elevada incidência, tanto na população brasileira, quanto na mundial, e que podem acarretar prejuízos nas habilidades cognitivas do indivíduo, como memória e linguagem, exercendo impacto negativo em sua qualidade de vida.

A isquemia cerebral é uma das doenças mais comuns nos serviços de emergência no Brasil, com altos índices de morbidade e de comprometimento funcional dos indivíduos que permanecem vivos após o evento isquêmico (Hilbig e Coutinho, 1993).

Estudos que se baseiem em como prevenir, diagnosticar e prever os danos que esta patologia pode causar são imprescindíveis. Nesta perspectiva, surgem, então, os estudos experimentais envolvendo doenças de alta incidência na população, utilizando-se uma espécie animal que apresente características compatíveis com o objetivo destes estudos.

Os testes eletrofisiológicos vêm sendo utilizados como uma técnica objetiva na obtenção de respostas sobre a atividade neural, auxiliando no diagnóstico funcional do Sistema Nervoso Central. Dentre estes testes, está um dos componentes dos potenciais evocados relacionados a eventos, o *Mismatch Negativity*, que surge como um instrumento promissor para fins desta avaliação, pois abrange as regiões cerebrais acometidas por lesões isquêmicas, e não depende da atenção de quem está sendo avaliado (Näätänen et al., 1978).

Outra técnica de avaliação dos efeitos da isquemia cerebral em animais é a análise morfológica, realizada, por exemplo, através da contagem de células da região lesada, após a morte do animal. Modelos de isquemia cerebral *in vivo* que utilizaram esta técnica em gerbils (Baena et al., 1997) demonstraram sua eficiência na análise da preservação da população original de neurônios.

O conhecimento de técnicas de avaliação funcional e morfológica do Sistema Nervoso, associado ao uso de terapias que bloqueiem o processo fisiopatológico de morte neuronal, constitui um caminho promissor em direção à neuroproteção. Portanto, é necessário verificar-se a eficácia de métodos terapêuticos que preservem as habilidades cognitivas do indivíduo, ou que, pelo menos, minimizem os efeitos da lesão cerebral. É importante, também, que as novas propostas de tratamentos avaliadas possam ser aplicadas em modelos experimentais, e, posteriormente, em pacientes, promovendo o laço de integração entre a pesquisa básica e a aplicada (Price, 1999).

Dentre estas propostas de tratamento estão a manutenção de baixas temperaturas cerebrais, a hipotermia, e uma das formas de estimulação ambiental, o treinamento auditivo. Vários estudos, como por exemplo, o de Baena et al. (2001) e o de Ariga (2005), já demonstraram que a hipotermia exerce efeito neuroprotetor em gerbils; porém, técnicas como as que envolvem o treinamento auditivo ainda precisam ter seu potencial terapêutico investigado, visto que há poucos estudos sobre este tema

realizados com esta espécie animal (Ohl e Scheich, 1996; Ohl e Scheich, 1997).

Assim, este estudo foi realizado com o intuito de verificar se a hipotermia e o treinamento auditivo podem melhorar as conexões neurais, e se esta melhora pode ser detectada pelo *Mismatch Negativity*, em associação à análise morfológica do hipocampo de gerbils, ou seja, se este potencial evocado pode ser utilizado como um instrumento de avaliação dos déficits cognitivos e da evolução da recuperação dos pacientes acometidos pela isquemia cerebral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neurociência é a ciência que tem como objetivo compreender os processos cerebrais pelos quais agimos, aprendemos, percebemos o ambiente, e nos lembramos, entre outras habilidades. Sua tarefa é explicar o comportamento em termos de atividades neurais, ou seja, como o sistema nervoso organiza suas células para gerar determinados comportamentos.

Um dos ramos da Neurociência mais estudado na atualidade é a Neurociência Cognitiva, campo de pesquisa interdisciplinar, o qual agrega áreas como a Neurofisiologia, Bioquímica, Anatomia, entre outras, e cujo foco de estudo concentra-se nas habilidades cognitivas.

As cinco principais áreas da Neurociência Cognitiva são percepção, ação, emoção, linguagem e memória; constituem processos complexos, os quais requerem a integração da informação de várias áreas corticais, áreas estas que associam a informação sensorial e ainda elaboram a resposta do indivíduo a partir destes estímulos (Kandel, 2003).

A Neurociência Cognitiva tem enfatizado a importância de se compreender os mecanismos do processamento das informações sensoriais, como por exemplo a memória, a qual constitui-se em pré-requisito para a cognição.

Pode-se definir memória como um conjunto de processos neurobiológicos e neuropsicológicos que permitem a aprendizagem, sendo eles: aquisição, seleção, retenção, consolidação e evocação; pode-se dizer,

também, que memória é o processo de arquivamento seletivo de novas informações através do qual podemos evocá-las (Kandel e Pittenger, 1999).

Memória pode ser classificada em tipos, de acordo com o tempo de retenção da informação, e quanto à natureza do processo; em relação ao tempo, tem-se a memória ultra-rápida, com duração de alguns segundos, a memória de curto prazo, retida por minutos ou horas, e finalmente, a memória de longo prazo, a qual estabelece engramas duradouros, pois a informação é retida por dias, semanas ou anos.

Se classificarmos a memória de acordo com a natureza do processo envolvido, observa-se a memória descritiva, a não descritiva, e a operacional, sendo que o primeiro tipo refere-se ao que pode ser evocado por meio de palavras; a não descritiva reúne o que é evocado por representações perceptuais; e a operacional, ou de trabalho, diz respeito ao armazenamento temporário de informações úteis somente em um determinado momento (Baddeley, 1994).

Memória de trabalho ou memória operacional consiste em um armazenamento temporário da informação, utilizado para guiar ações, sendo caracterizada pela manutenção ativa de informações relevantes para um comportamento que esteja ocorrendo; atividades do cotidiano dependem de um mecanismo de memória de curto prazo, o qual integra, momento a momento, as percepções ao longo do tempo, repete-as e as combina, acessando, simultaneamente, o arquivo de informações armazenadas (Watson et al., 2007).

Qualquer alteração na memória de trabalho pode fazer com que problemas no sistema de processamento da informação afetem processos cognitivos como a atenção, a leitura e a aprendizagem (Fry e Hale, 2000).

No cérebro, a superfície enrugada, formada por giros e sulcos, é o córtex cerebral. Em nível microscópico, têm-se as unidades estruturais e funcionais do Sistema Nervoso Central, sendo compostas por neurônios e também por células gliais. Os neurônios produzem e transmitem sinais elétricos, gerando informações capazes de codificar as sensações; as células gliais também lidam com sinais, porém, sinais de outra natureza, como por exemplo, o sinal de orientação do crescimento e da migração de neurônios durante o desenvolvimento, de comunicação entre eles durante a vida adulta, de defesa e reconhecimento de situações patológicas, entre outros (Lent, 2005).

As operações neurais responsáveis pelas habilidades cognitivas ocorrem, essencialmente, no córtex cerebral, resultante das conexões entre várias regiões funcionais, ou seja, uma única habilidade apresenta diferentes componentes, os quais são processados em regiões diferentes do encéfalo (Kandel, 2003).

Além de outras regiões do cérebro, o lobo temporal e suas estruturas mais profundas - o hipocampo e a amígdala - estão bastante relacionados aos aspectos de aprendizagem e memória, funções cognitivas extremamente complexas do ponto de vista neurofisiológico.

O hipocampo, importante estrutura envolvida no processo de consolidação dos engramas da memória, mantém abundantes conexões

com as demais regiões, como o lobo temporal medial, e, através desta região, com o córtex pré-frontal, córtex parietal e regiões anteriores e laterais do lobo temporal (Lent, 2005). Izquierdo et al. (2004) afirmaram que a consolidação da memória requer a integridade funcional do hipocampo e a ativação de diferentes receptores para remodelar a sinapse e para proporcionar mudanças morfológicas.

Os neurônios do hipocampo são do tipo piramidais, de característica predominantemente excitatória, e usam o aminoácido glutamato como neuromediador.

O hipocampo é formado pelas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4, além do giro denteado, sendo que as duas principais regiões são CA1 e CA3; os neurônios destas duas regiões têm duas árvores dendríticas ao invés de somente uma; alguns neurocientistas apontam para o fato de que o grande número de dendritos e axônios, que caracterizam este tipo de célula, 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 às lesões do que a região CA3, e do que o giro denteado, o que sugere uma vulnerabilidade diferente de cada região do cérebro. 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 à isquemia e a excitotoxinas, descrevendo a participação das proteínas de choque térmico (*HSP - Heat Shock Protein*) no processo de resistência do giro denteado, visto que estas

são capazes de bloquear a morte celular. Assim, apesar de ocorrer morte das células piramidais no hipocampo, após algum tipo de lesão, as células gliais podem sobreviver, mantendo condições para que possa ocorrer plasticidade cerebral (Schmidt-Kastner e Freund, 1991).

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

Este fenômeno pode durar horas ou até mesmo dias, sendo necessário um mecanismo que prolongue a liberação de glutamato; então, entra em ação o óxido nítrico, produzido pela célula pós-sináptica, o qual, por ser um gás, tem trânsito livre para sair e entrar da membrana celular, gerando um mecanismo retrógrado de aumento da síntese do mediador e, conseqüentemente, um aumento de sua liberação pelo terminal pré-sináptico. Esta cascata de eventos sinápticos pode ser denominada de

potenciação de longa duração (*long-term potentiation - LTP*), processo correspondente à formação da memória relacionada a paradigmas de estímulos do tipo freqüente/raro (Lisman et al., 1998), o que sugere que o hipocampo e estruturas adjacentes do lobo temporal têm importante papel, tanto na memória de trabalho de curto prazo, quanto na de longo prazo (Karlsgodt et al., 2005).

Processos cognitivos complexos como a memória, assim como as patologias que causam alterações neste processo, podem ser estudados através de experimentos realizados 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.

Dentre as patologias cerebrais que podem alterar os processos cognitivos, estão as lesões isquêmicas, bastante estudadas há vários anos; estima-se que este tipo de alteração atinja cerca de 85% dos pacientes acometidos por lesões cerebrovasculares em geral (Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares, 2002).

A isquemia cerebral é caracterizada pela ausência, ou pela redução acentuada, na oferta 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 do tipo NMDA nesta região (Choi e Rothan, 1990), podendo ocorrer perda de neurônios nestas áreas (Kirino, 1982; Herguido et al., 1999).

O Sistema Nervoso Central pode ser acometido por lesões isquêmicas globais e focais, e, para ambas as situações, há modelos de estudos contemplados na literatura (Colli et al., 1998; Martins e Chadi, 2001; Tardini et al., 2003). Sabe-se que isquemia com duração de pelo menos cinco minutos seguida de reperfusão já pode levar a anormalidades dendríticas no hipocampo (Yamamoto et al., 1986).

Períodos de bloqueio do fluxo sangüíneo para o tecido neuronal, seja devido a uma parada cardíaca, seja a uma lesão cerebral direta, sempre resultam em neurotoxicidade, pois a privação de oxigênio desencadeia uma diminuição dos estoques de energia, conseqüente liberação de radicais livres e morte neuronal (Siegel et al., 1999). Assim, a lesão isquêmica leva a uma redução de oxigênio, glicose e neurotrofinas, o que gera 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; o primeiro refere-se a um processo ativo, e a necrose a um mecanismo passivo; a apoptose está ligada à idéia de morte celular programada, essencial para a manutenção do funcionamento dos órgãos e sistemas corporais; porém, patologias como as doenças neurodegenerativas podem causar uma desregulação do mecanismo de apoptose, gerando morte celular indesejada (Buja et al., 1993).

De maneira mais específica, após a cessação dos estoques de energia (adenosina tri-fosfato ou ATP), o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização; os canais de cálcio dependentes de

voltagem são ativados e os aminoácidos excitatórios (glutamato) são liberados no meio extracelular; os receptores de glutamato do tipo NMDA são ativados, promovendo a abertura dos canais de cálcio, e aumentando a entrada deste íon no meio intracelular; há a formação de radicais livres e dano celular (De Keyser et al., 1999).

Em suma, a liberação excessiva de glutamato (excitotoxicidade) e o aumento de cálcio intracelular são eventos cruciais para a morte celular por lesão isquêmica (Bradford e Ward, 1987).

A excitotoxicidade refere-se à participação do glutamato na lesão neuronal isquêmica, pois este neuromediador estimula o receptor do tipo NMDA, permitindo o influxo de volumes exagerados de cálcio, o que desencadeia eventos de cascatas enzimáticas (Figura 1), e que culminam na morte neuronal (Rothman e Olney, 1987).

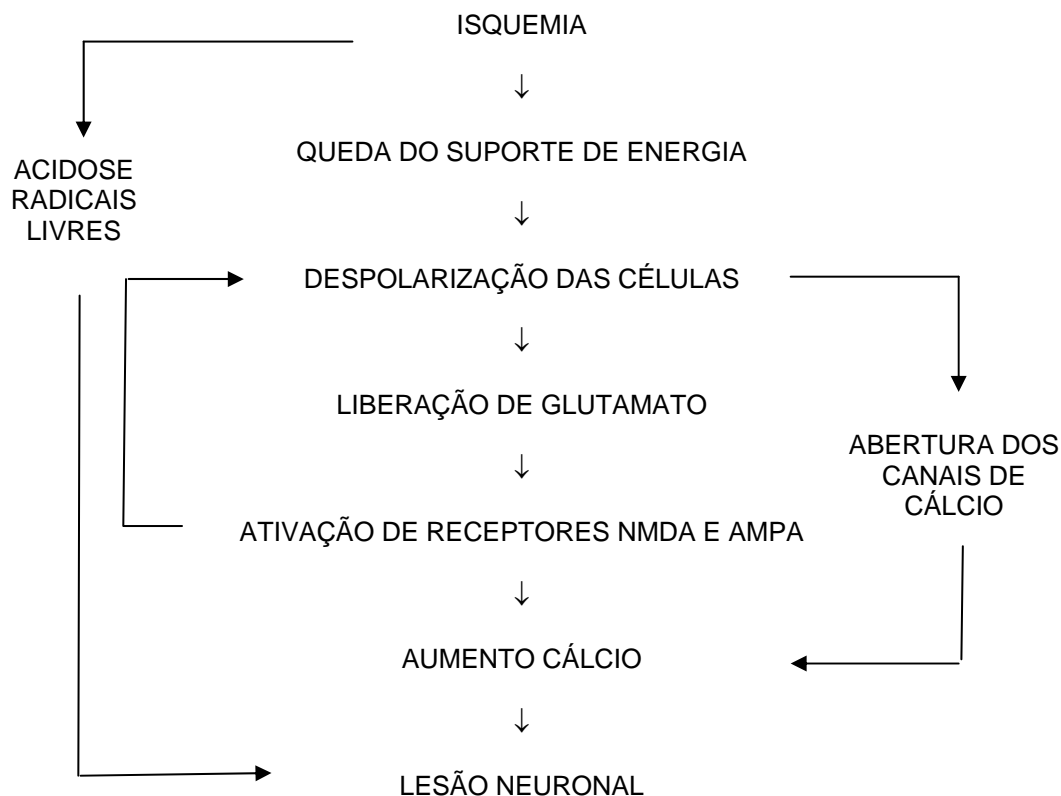


Figura 1 – Esquema da cascata enzimática envolvendo lesão neuronal a partir da isquemia cerebral; adaptado de Siegel et al. (1999)

A maior tarefa dos transportadores de glutamato é limitar a livre concentração deste neuromediador no meio extracelular, prevenindo, assim, a estimulação excessiva de seus receptores, pois, como já foi citado por Rothman e Olney (1987), acúmulo de glutamato no espaço extracelular e a conseqüente ativação excessiva dos receptores podem resultar em morte celular (Siegel et al., 1999).

Assim, o glutamato, principal neuromediador do hipocampo, pode ser uma excitotoxina, especialmente quando o metabolismo de energia está comprometido, como no caso de lesão isquêmica, pois a neurodegeneração pode envolver um aumento patológico do fenômeno de *LTP*.

Com o intuito de reverter o estado isquêmico, faz-se necessária a restauração do fluxo sanguíneo; contudo, o suprimento vascular ao tecido pode ser, paradoxalmente, responsável por lesões mais graves do que aquelas já geradas pelo evento isquêmico (Campos e Yoshida, 2004).

A lesão gerada pela reperfusão deve-se à perda da integridade celular decorrente da formação de radicais livres na reoxigenação (Castro e Silva Júnior et al., 2002).

Granger et al. (1986) descreveram o processo de formação de radicais livres gerados a partir da reperfusão: durante o período de isquemia, o ATP é degradado até o substrato hipoxantina, o qual se acumula nos tecidos; o resultado deste estado de baixa energia é a diminuição total da homeostase celular, caracterizado pela perda do gradiente iônico através da membrana celular, permitindo o influxo de cálcio para as células, o qual, por sua vez, ativa a protease a converter a xantina desidrogenase em xantina oxidase. A hipoxantina é o primeiro substrato necessário para que ocorra a oxidação pela xantina oxidase, o que acontece quando o segundo substrato, o oxigênio, é fornecido na reperfusão, formando as espécies reativas do metabolismo do oxigênio, os radicais livres (Figura 2).

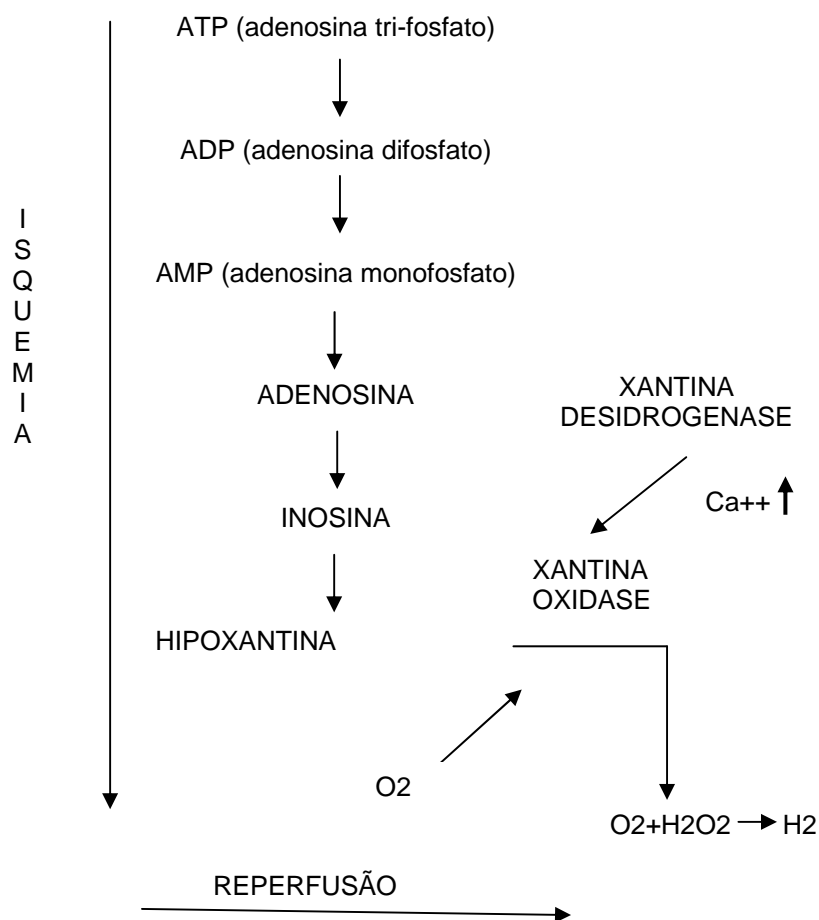


Figura 2 - Esquema da produção de radicais livres e lesão gerada pela reperfusão (adaptado de Granger et al., 1986)

Siegel et al. (1999) também apontaram para o fato de que, apesar da revascularização sangüínea ser essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, a reperfusão pode agravar ainda mais as lesões produzidas na fase isquêmica, ou seja, quando o fluxo sangüíneo é restaurado, a disponibilidade de oxigênio aumenta, bem como as reações bioquímicas que geram radicais livres.

Em resumo, as lesões cerebrais na isquemia surgem de uma interação de eventos moleculares causados pela isquemia e por eventos

patológicos associados à restauração do fluxo sanguíneo cerebral. Em relação ao prognóstico dos efeitos da isquemia-reperfusão, este é sensível ao tempo, ou seja, as intervenções terapêuticas são críticas em relação a quando são iniciadas, e dependem da fase em que se encontra a lesão (Krieger e Yenari, 2004).

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

Tal fato foi constatado quando Levine e Payan (1966) realizaram os primeiros experimentos utilizando gerbils, e observaram que estes animais eram bastante propensos a desenvolver sinais de alterações neurológicas após oclusão da artéria carótida comum. Esta susceptibilidade deve-se ao fato de que, nesta espécie animal, há a ausência do Polígono de Willis, complexo arterial que fornece suprimento sanguíneo para os hemisférios cerebrais; assim, nos gerbils, praticamente não há a possibilidade de circulação alternativa ou colateral (Levine e Shon, 1969), garantindo que, em estudos experimentais, haverá sucesso na obtenção do evento isquêmico induzido nestes animais.

Desta forma, estudos experimentais que utilizem esta espécie de animal podem ser considerados de grande validade, pois é possível controlar, efetivamente, o impacto da lesão isquêmica para a análise de diversos aspectos que envolvem tal patologia.

Em um estudo com gerbils, Kenneth (1972) observou alterações como edema no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida comum, e

palidez da massa encefálica, alterações estas que regrediram nas primeiras 24 horas seguintes à oclusão.

Em um estudo sobre lesões isquêmicas e de reperfusão em gerbils, Muniz et al. (2004) verificaram alterações mais significativas nos primeiros minutos de reperfusão, desencadeadas pela mobilização e consumo de substratos, caracterizando a lesão de reperfusão.

Oliveira (2005) submeteu gerbils à isquemia através da oclusão da artéria carótida esquerda; a avaliação morfológica mostrou que as áreas do hipocampo acometidas pela lesão apresentavam palidez, presença de macrófagos, edema e alterações necróticas em neurônios e células gliais.

Frente aos danos gerados pela lesão isquêmica, é necessário analisar algumas técnicas de reabilitação que promovam proteção ao tecido cerebral lesado.

Assim, o objetivo da terapia de neuroproteção consiste em interceptar os mecanismos complexos associados aos danos gerados pela isquemia-reperfusão (Pérez de La Ossa e Dávalos, 2007).

Muitos estudos têm mostrado a ação de fármacos na neuroproteção cerebral pós-isquemia em animais avaliados em laboratórios de pesquisa; entretanto, outro importante procedimento de neuroproteção, utilizado em estudos experimentais, é a hipotermia. Trata-se de um método bastante difundido no que se refere à indução de neuroproteção frente a lesões isquêmicas.

Há dados que comprovam que a hipotermia altera uma grande variedade de efeitos gerados pela isquemia cerebral, incluindo a redução da

atividade metabólica e enzimática da região lesada, a diminuição da síntese de glutamato e sua recapturação, e a redução da inflamação local (Krieger e Yenari, 2004).

Nakashima e Todd (1996) sugeriram que a hipotermia reduz a síntese de glutamato, assim como a inflamação, e, conseqüentemente, a formação de radicais livres.

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

Shah et al. (2007) chamaram a atenção para os possíveis mecanismos de ação da hipotermia, os quais incluem a redução da demanda do metabolismo neuronal, redução do acúmulo de toxinas e prevenção da apoptose.

A ação neuroprotetora deste tipo de intervenção já vem sendo evidenciada há alguns anos, em vários estudos, já que estes demonstraram que a hipotermia pode reduzir a infiltração leucocitária nas áreas isquêmicas (Falavigna et al., 2002; Prandini et al., 2005).

Em relação às temperaturas utilizadas para promover a neuroproteção através da hipotermia, Maier et al. (1998) demonstraram, em seu estudo, que os efeitos neuroprotetores deste procedimento, em roedores, foram observados utilizando-se temperaturas inferiores a 35°C.

Do ponto de vista do momento em que a hipotermia deve ser administrada, Krieger e Yenari (2004) concluíram, em seu estudo, que, para

ser efetiva, ela deve ser realizada em até três horas após o início da isquemia.

Já em estudo realizado por Ikonomidou et al. (1989), a hipotermia iniciada cinco minutos após a isquemia global protegeu neurônios corticais e do hipocampo; além disso, os autores concluíram, em seu estudo, que a hipotermia iniciada 30 minutos após o evento isquêmico não foi efetiva.

Dong et al. (2001) submeteram gerbils a cinco minutos de isquemia através da oclusão bilateral da artéria carótida comum, e trataram os animais com hipotermia, uma hora após a cirurgia; os autores observaram que houve aproximadamente 95% de perda neuronal nos animais não tratados, enquanto que os animais submetidos à hipotermia tiveram o número de células sobreviventes similar ao do grupo controle, o qual não havia sido submetido à isquemia; assim, concluíram que a hipotermia pós-isquemia preserva funcionalmente a eletrofisiologia das células da região CA1 do hipocampo.

Coimbra e Cavalheiro (1990) submeteram gerbils a cinco minutos de oclusão bilateral da artéria carótida comum; dois grupos foram formados, de acordo com a temperatura a que foram submetidos, ou seja, um grupo em normotermia (37 a 37,5°C) e o outro em hipotermia (29 a 29,5°C); após sete dias, o hipocampo dos animais foram analisados, histologicamente, e os autores observaram lesão mais intensa na região CA1 dos animais não submetidos à hipotermia; assim, os resultados deste estudo sugeriram que a hipotermia moderada, induzida precocemente, protege o cérebro contra os danos gerados pela lesão de isquemia-reperfusão.

Baena et al. (2001) realizaram um estudo submetendo gerbils a sete minutos de isquemia, dividindo os animais em quatro grupos, de acordo com a temperatura a que foram submetidos: normotermia (37°C), hipotermia (31°C), hipertermia (38°C), e sham; os autores realizaram a contagem de células sobreviventes na região CA1 do hipocampo, e confirmaram a grande vulnerabilidade desta região frente a lesões isquêmicas, além de terem observado o efeito de neuroproteção da hipotermia para este tipo de lesão.

Ariga (2005) realizou um estudo utilizando cultura de células neuronais de camundongos albinos, visando verificar a modulação da lesão isquêmica pela temperatura, e concluiu que a hipotermia exerce função de neuroproteção, uma vez que diminui a ativação de processos envolvidos na morte celular por apoptose.

A partir dos estudos descritos, pode-se concluir que vários laboratórios por todo o mundo têm demonstrado, através de suas pesquisas, que a hipotermia reduz a extensão do dano neurológico, constituindo um procedimento com um grande potencial para o uso clínico.

Um outro tipo de intervenção, envolvendo o paciente acometido pela lesão cerebral isquêmica, é a reabilitação através do treinamento das habilidades cognitivas, pois estudos recentes com animais e seres humanos têm indicado que o cérebro adulto é capaz de se reorganizar, e o termo neuroplasticidade tem sido utilizado para descrever esta habilidade.

A reorganização cerebral pode ser controlada através do *input* de estímulos apropriados, o que vem trazendo novas perspectivas sobre a

reabilitação dos pacientes acometidos por lesões cerebrais (Young e Kong, 2007).

O conceito de neuroplasticidade refere-se à capacidade de ocorrerem mudanças moleculares, morfológicas e funcionais no sistema nervoso (Feres e Cairasco, 2001), e também a como as células nervosas se reorganizam frente às influências do ambiente, sempre acompanhadas de uma mudança comportamental (Musiek et al., 2002). Já são conhecidas evidências de que a superestimulação pode causar uma reorganização estrutural no sistema nervoso central (Szczepaniak e Moller, 1996).

A neuroplasticidade baseia-se no fato de que as células nervosas têm uma capacidade potencial de se regenerar, ou de se diferenciar, passando a realizar funções antes desempenhadas por células que tenham sido lesadas. Alguns mecanismos envolvidos na neuroplasticidade podem ser os seguintes: entrada em atividade de circuitos previamente existentes, antes não ativados; estabilização de conexões transitórias que desapareceriam em condições normais; brotamento colateral de axônios vizinhos às regiões lesadas, e diferentes combinações das possibilidades anteriores (Stein et al., 1995).

As neurotrofinas (ou fatores tróficos), tradicionalmente vistas como proteínas envolvidas na diferenciação e na sobrevivência neuronal, têm, recentemente, emergido como uma nova classe de neuromoduladores para a transmissão e plasticidade sináptica no sistema nervoso central, contribuindo também para que ocorra o processo de neuroplasticidade (Lu et al., 2003).

Dentre as principais neurotrofinas, encontra-se o Fator de Crescimento Neural (*NGF – Nerve Growth Factor*), o qual é secretado pelos neurônios do hipocampo, e tem papel fundamental na modulação da memória de curto prazo e de longo prazo, pois estas moléculas agem nos receptores de membrana celular, fazendo com que novos canais sejam produzidos, melhorando a performance das sinapses (Walz et al., 2005).

Uma das maneiras de estimulação da neuroplasticidade consiste no treinamento auditivo, o qual pode gerar mudanças nas respostas neurofisiológicas do sistema nervoso auditivo central em humanos; em muitos estudos, pesquisadores têm observado que, após o treinamento auditivo, a magnitude das respostas neurofisiológicas aumenta, assim como há uma melhora na percepção auditiva (Tremblay et al., 1997; Tremblay et al., 2001; Kujala et al., 2001).

Kraus et al. (1995) realizaram treinamento auditivo para discriminação de fonemas em humanos, submetendo os sujeitos da pesquisa a seis sessões de uma hora cada, e encontraram melhora na resposta do *MMN*.

Em outro estudo, no qual o treinamento auditivo foi aplicado, Tremblay et al. (1998) avaliaram 10 indivíduos adultos ao longo de quatro dias de treino auditivo; utilizando o *MMN* para avaliar as mudanças neurofisiológicas, observaram que a melhora na resposta ocorreu imediatamente após o primeiro dia de treino.

Menning et al. (2000) realizaram um estudo em que foram avaliados 10 indivíduos adultos que teriam que discriminar dois estímulos do tipo tom puro com variação de frequência (estímulo raro 1020 Hz e estímulo

freqüente 1000 Hz), antes e depois de 15 sessões diárias de treinamento auditivo, durante três semanas; os autores observaram melhora na discriminação auditiva dos sujeitos avaliados.

Desta forma, procedimentos que promovem neuroproteção, como a hipotermia e a neuroplasticidade, associados ao treinamento auditivo, surgem como métodos promissores no que se refere à reabilitação dos pacientes acometidos por lesões cerebrovasculares, como a isquemia, e à conseqüente melhora em sua qualidade de vida.

Para avaliar a evolução do processo de reabilitação do paciente acometido pela lesão isquêmica, existem vários métodos, como por exemplo, os que avaliam os aspectos funcionais das células do hipocampo.

Os potenciais evocados relacionados a eventos são testes objetivos, não invasivos, e que avaliam as habilidades perceptuais relacionadas a processos cognitivos, gerados, predominantemente, no córtex cerebral (Eggermont e Ponton, 2002).

Hood, em 1999, fez uma revisão dos métodos eletrofisiológicos que avaliam a função das vias auditivas neurais; a autora evidenciou, nesta revisão, que estes métodos são sensíveis, objetivos e menos variáveis para acessar distúrbios ou patologias neurais, se comparadas às medidas comportamentais.

Os potenciais evocados relacionados a eventos refletem a atividade eletrofisiológica cortical envolvida nas habilidades de atenção, discriminação, memória, integração e capacidade de decisão. Estes potenciais podem ser divididos em potenciais evocados exógenos, que são influenciados,

principalmente, pelas características físicas do estímulo (intensidade, frequência e duração), ou endógenos, influenciados por eventos internos relacionados à função cognitiva do indivíduo (McPherson, 1996).

Os componentes dos potenciais evocados relacionados a eventos mais estudados são: N1, P2, P300 e *Mismatch Negativity (MMN)* (Purdy et al., 2001).

Em humanos, a onda formada pelo componente N1 é negativa e aparece comumente entre 80 e 110 milissegundos, enquanto que a resposta P2, caracterizada por uma onda positiva, surge entre 150 e 200 milissegundos. O P300 é uma onda de maior amplitude do que o P2 e surge por volta de 300 milissegundos após a detecção do estímulo. Vale ressaltar que, tanto o N1, quanto P2 e o P300, surgem a partir da atenção do indivíduo para um estímulo raro que é detectado entre vários estímulos de mesma característica (*paradigma oddball*).

O *MMN* foi descrito, inicialmente, por Näätänen et al. (1978), pesquisadores que integram um grupo de estudiosos finlandeses, e que vêm conduzindo estudos envolvendo este componente dos potenciais evocados relacionados a eventos.

Caracterizado como uma deflexão negativa, a qual ocorre após a resposta P2, o *MMN* é geralmente observado, em humanos, entre 100 e 200 milissegundos após a detecção do estímulo raro (Alho, 1995; Picton et al., 2000).

O *Mismatch Negativity* é uma resposta automática de detecção de mudança do estímulo auditivo, a qual depende da experiência auditiva

armazenada na memória (Näätänen et al., 1997; Shtyrov e Pulvermüller, 2002).

Sams et al. (1985) descreveram que os centros geradores do *MMN* são o córtex auditivo primário e as áreas imediatamente adjacentes a estas.

De acordo com Näätänen (2000), *MMN* é uma resposta cerebral elétrica desencadeada por qualquer mudança discriminável em algum aspecto repetitivo da estimulação auditiva. É gerado a partir de um "conflito" entre a representação ativa neural desenvolvida pelo estímulo freqüente na memória e a entrada sensorial de um estímulo diferente (raro); o sistema auditivo habitua-se a ouvir o estímulo freqüente, e, portanto, menos neurônios desencadeiam sinapses em resposta a esse estímulo; em relação ao estímulo raro, por ser ouvido menos vezes, faz com que ocorram mais sinapses, gerando, portanto, uma onda de maior amplitude; assim, subtraindo-se o estímulo raro do freqüente, obtém-se o *MMN* (Schochat, 2003). Morr et al. (2002) também definiram o *MMN* como sendo derivado da subtração do potencial obtido para o estímulo freqüente menos o potencial obtido para o estímulo raro.

As características deste potencial podem indicar de que maneira as mudanças do estímulo são efetivamente percebidas a partir do estoque de informação da memória (Novitski et al., 2004); assim, o *MMN* parece estar associado aos mecanismos de detecção de mudanças e à função da memória auditiva de curto prazo (Ceponiene et al., 1999). Ponton et al. (2000) também evidenciaram que o *MMN* fornece uma medida dos processos de memória auditiva de curto prazo, bem como da capacidade de

estocar e discriminar diferenças na entrada do estímulo sensorial auditivo. Ritter et al. (1995) afirmaram que o *MMN* também pode ser útil para avaliar os fatores que influenciam a incorporação da informação sensorial no armazenamento de longo prazo.

Musiek e Lee (2001) descreveram que o *MMN* é um indicador sensível da integridade fisiológica da via auditiva aferente, e que fornece dados objetivos na avaliação de pacientes cujas condições cognitivas, ou físicas, impedem as avaliações tradicionais baseadas na resposta comportamental do indivíduo, uma vez que o surgimento da resposta do *MMN* ocorre sem a atenção do indivíduo. Assim, a captação do *MMN* mostra-se como um meio bastante preciso e objetivo na análise da discriminação e da memória auditiva (Ponton et al., 2000), inclusive para a avaliação de pacientes em coma (Näätänen, 2001; Pulvermüller et al., 2001).

Os estímulos auditivos utilizados na aplicação do *MMN* podem variar quanto às suas características, como por exemplo, frequência, duração ou intensidade, localização espacial, omissão parcial, ou ainda, diferenças fonêmicas.

O *MMN* pode ser utilizado em pesquisas clínicas realizadas em humanos, ou em estudos experimentais que utilizem animais sob efeito de anestésicos.

Alguns estudos já foram realizados em algumas espécies de mamíferos, como gatos (Csépe et al., 1987), porcos (Kraus et al. 1994), macacos (Javitt et al., 1992), e ratos (descritos a seguir), mas as variações

entre os protocolos de pesquisa são enormes, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos.

Uma das pesquisas envolvendo ratos foi realizada por Ruusuvirta et al. (1998), quando estes avaliaram nove roedores da raça Wistar, e concluíram que o estímulo do tipo *oddball* pode ser neurofisiologicamente discriminado por ratos anestesiados, tendo encontrado latências do *MMN* entre 63 e 246 milisegundos.

Lazar e Metherate (2003) aplicaram *MMN* em ratos anestesiados, variando o estímulo auditivo quanto à frequência, e observaram que a resposta varia de acordo com o intervalo espectral entre o estímulo padrão e o raro.

Outro estudo realizado com roedores foi desenvolvido por Astikainen et al. (2006); os pesquisadores avaliaram sete ratos Wistar, e as latências do *MMN* encontradas situaram-se entre 76 e 108 milisegundos.

Ruusuvirta et al. (2007) realizaram estudo com ratos Wistar anestesiados, e aplicaram o potencial evocado relacionado a eventos utilizando tons; os resultados mostraram que os animais apresentaram resposta ao estímulo diferente do padrão na latência entre 106 e 136 milisegundos.

Desta forma, a partir dos vários estudos que vêm sendo realizados com animais, têm-se evidências da ocorrência do *MMN*, ainda que sob efeito de anestésicos; além disso, o *MMN* parece ser um instrumento válido para refletir o processo de discriminação auditiva pré-atencional (Rosburg et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Procurou-se, através deste estudo, analisar se o *Mismatch Negativity* é um bom instrumento para avaliar as alterações cognitivas geradas pela isquemia cerebral; além disso, investigou-se se este é um teste que pode indicar a evolução da recuperação dos pacientes acometidos por esta patologia.

Para tanto, foi aplicado um modelo de estudo experimental com gerbils submetidos a isquemia cerebral, à hipotermia e ao treinamento auditivo.

Desta forma, os objetivos específicos deste estudo foram:

- provocar isquemia cerebral em gerbils;
- analisar o efeito da hipotermia na presença/ausência e na latência do *MMN*;
- analisar o efeito do treinamento auditivo na latência do *MMN*;
- comparar as latências do *MMN* com o número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (parecer nº 088/05 – Anexo), de acordo com os princípios éticos seguidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, padrões internacionais para uso de animais em pesquisa, e princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

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, controlado, prospectivo e duplo cego, tendo em vista que a pessoa que realizou a

captação e a análise dos potenciais evocados não tinha conhecimento prévio sobre o grupo ao qual cada animal pertencia.

4.4 Amostra

Foram utilizados 64 gerbils (*Meriones Unguiculatus*) machos, com idade entre 2 e 4 meses, criados no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esta espécie de animal foi escolhida por não apresentar o Polígono de Willis, o que possibilitou garantia de obtenção da isquemia cerebral.

Os animais foram mantidos, um a um, separadamente em gaiolas de polipropileno forradas com serragem; ração e água foram oferecidos à vontade a todos os animais, e foi respeitando o ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.5 Critérios de inclusão

Foram incluídos, neste estudo, somente os animais que apresentaram respostas na captação do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) no primeiro dia de experimento, uma vez que a presença deste potencial sugere integridade da via auditiva no tronco encefálico (Matas et al., 1998).

4.6 Delineamento experimental: divisão em estudos

Optou-se em dividir o presente trabalho em três estudos, devido às suas diferentes abordagens:

- Estudo 1: análise do efeito da temperatura na presença/ausência, e na latência do *MMN*;
- Estudo 2: análise do efeito do treinamento auditivo na latência do *MMN*;
- Estudo 3: análise morfológica a partir do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo.

4.6.1 Estudo 1

Os procedimentos realizados foram: registro dos potenciais evocados, cirurgia experimental de isquemia, e registro dos potenciais após a isquemia.

4.6.1.1 Material

- anestésico halotano
- mistura de gases oxigênio a 30% e óxido nitroso a 70%

- sistema de anestesia marca Matrix Medical Inc.
- respirador para pequenos animais
- lâmpadas infra-vermelho de 250W Sylvania
- solução salina
- *probes* para controle da temperatura corporal e da cabeça
- sistema de controle de temperatura marca Physitemp
- medidor de potenciais evocados auditivos marca Intelligent Hearing Systems, modelo Smart EP
- eletrodos de superfície
- pasta eletrolítica
- equipo para cirurgia de oclusão das carótidas
- tubo de polietileno P-10 Intramedic
- tubo de duplo lúmem fixado com *clamps* vasculares

4.6.1.2 Registro dos potenciais evocados antes da isquemia

No primeiro dia de procedimentos, o animal foi anestesiado com halotano 3% para a indução, e 2% para manutenção, em mistura gasosa de oxigênio 30% e protóxido 70%, e conectado a um respirador para pequenos animais. Foi realizada tricotomia nas regiões onde foram colocados os eletrodos de captação dos potenciais: Cz na porção superior da cabeça (vértex), A1 na mastóide esquerda, e A na coxa direita (terra) (Figura 3).



Figura 3 – Procedimento de captação dos potenciais evocados

A disposição dos eletrodos seguiu as normas do Sistema Internacional 10-20 de colocação de eletrodos (Figura 4), descrita pela Federação Internacional de Eletroencefalografia e Neurofisiologia Clínica (Jasper, 1958).

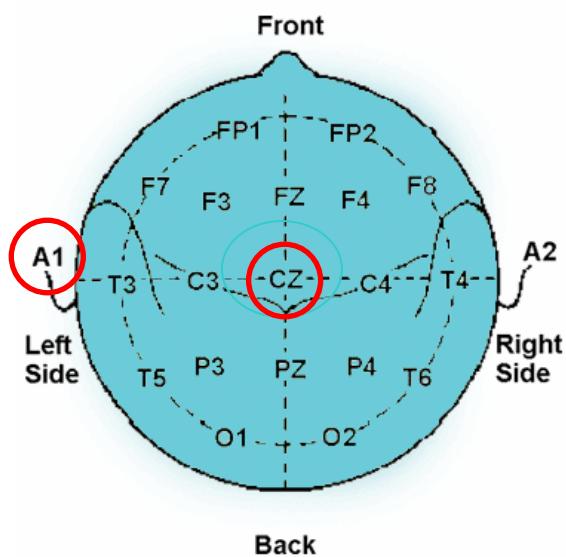


Figura 4 – Esquema da posição dos eletrodos para a captação dos potenciais evocados; o círculo vermelho mostra duas das posições utilizadas neste estudo.

Em seguida, foram registrados o potencial evocado auditivo de tronco encefálico - PEATE, e o potencial evocado auditivo relacionado a eventos - *Mismatch Negativity (MMN)*. Durante os registros, o animal permaneceu anestesiado e em uma situação de escuta passiva.

Para a captação do PEATE, foram utilizados 1024 estímulos do tipo *click* com polaridade rarefeita e velocidade de apresentação de 21.1 estímulos por segundo, a 80 dB NA, através do fone de inserção, estímulo este que chegou à orelha externa do animal a 70 dB NA; foi utilizado filtro passa-baixo de 100, e passa-alto de 3000 Hz; a captação deste potencial foi realizada duas vezes para garantir a reprodutibilidade da resposta. Vale ressaltar que o estímulo tipo *click* foi escolhido, pois avalia a resposta auditiva para as freqüências mais altas, por volta de 3000 a 6000 Hz, e os limiares auditivos do gerbil encontram-se, aproximadamente, entre 1 e 20 kHz (Ryan, 1976).

Já para registrar o *MMN*, foi utilizado protocolo constituído de, aproximadamente, 248 estímulos padrão (80%) e 62 estímulos raros (20%), totalizando cerca de 310 estímulos, já que foram apresentados de maneira randômica, a 80 dB NA, chegando à orelha externa do animal a 70 dB NA; o estímulo padrão utilizado foi o tom puro na freqüência de 4000 Hz, e o estímulo raro foi o tom puro na freqüência de 7000 Hz; o *MMN* também foi obtido duas vezes para garantir a reprodutibilidade das respostas. Estes estímulos foram escolhidos por estarem dentro da faixa de freqüência audível pelo gerbil.

4.6.1.3 Cirurgia experimental - isquemia cerebral

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos para a realização de um modelo experimental de isquemia cerebral global transitória, a partir da oclusão bilateral da artéria carótida comum, seguida do período de reperfusão.

Esta divisão foi realizada de acordo com a temperatura corporal e da cabeça às quais os animais foram submetidos; a caracterização de cada um dos grupos pode ser observada no Quadro 1.

Quadro 1: descrição dos grupos do estudo 1 de acordo com as temperatura corporal e da cabeça, e oclusão da carótida.

GRUPO	TEMPERATURA CORPORAL	TEMPERATURA CABEÇA	OCCLUSÃO CARÓTIDA
SHAM	36 ~ 36,5°C	36 ~ 36,5°C	NÃO
HIPO	36 ~ 36,5°C	30 ~ 31°C	SIM
NORMO	36 ~ 36,5°C	36 ~ 36,5°C	SIM
HIPER	36 ~ 36,5°C	38 ~ 38,5°C	SIM

Tiveram início os procedimentos de oclusão bilateral da carótida comum, lembrando que os animais foram mantidos em jejum de 12 horas antes da cirurgia.

Os gerbils foram anestesiados seguindo-se os mesmos procedimentos utilizados para a captação dos potenciais evocados auditivos; passaram, então, por tricotomia, para que fosse realizada a incisão na linha

mediana da face anterior do pescoço (cervicotomia mediana longitudinal anterior), com dissecação da musculatura local. Através desta incisão, a artéria carótida direita e a esquerda foram localizadas e expostas, utilizando-se um tubo de polietileno (Figuras 5 e 6); o animal foi submetido à isquemia cerebral global por sete minutos, a partir da oclusão bilateral das carótidas por pinçamento, através de um tubo de duplo lúmen fixado com *clamps* vasculares.



Figura 5 – Procedimento de isquemia cerebral



Figura 6 – Procedimento de isquemia cerebral

Durante este procedimento, foi utilizado um *probe* retal, e outro *probe* introduzido no músculo temporal para monitorar a temperatura corporal e a temperatura da cabeça, respectivamente; os *probes* estavam conectados a um sistema de auto-controle, o qual, ao atingir a temperatura desejada, desliga a lâmpada automaticamente, voltando a acendê-la quando a temperatura diminui.

Nos grupos em que a temperatura corporal e da cabeça foram diferentes uma da outra, os animais foram colocados sobre uma plataforma, na qual foi fixada uma placa de acrílico perpendicular ao animal na região cervical, para manter as temperaturas desejadas, tanto corporal, quanto da cabeça, evitando a interferência de uma na outra. Desta forma, para atingir as temperaturas desejadas nos grupos SHAM, NORMOTÉRMICO E HIPERTÉRMICO, os animais receberam a incidência de uma luz infravermelho de 250W na região da cabeça, e outra sobre o tronco do animal (Figura 7).

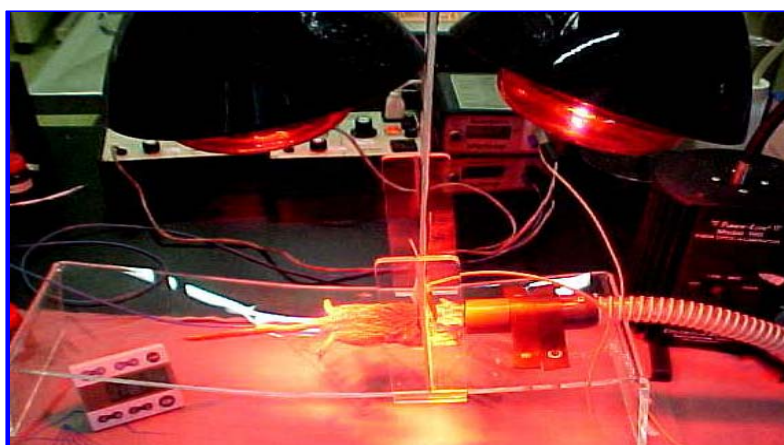


Figura 7 – Procedimento de manutenção da temperatura do animal durante isquemia cerebral

No grupo HIPOTÉRMICO, os animais também receberam a incidência de luz infra-vermelho de 250W sobre o corpo do animal e um jato de ar resfriado na cabeça.

Os animais do grupo SHAM foram submetidos aos mesmos procedimentos, exceto à isquemia cerebral global, permanecendo por sete minutos com as carótidas expostas, porém, sem terem sido ocluídas.

4.6.1.4 Registro dos potenciais evocados após a isquemia

Foi realizada novamente a captação do PEATE e do *MMN* após a isquemia, períodos que foram denominados de "pós1", "pós2", "pós3" e "pós4", sempre com o animal anestesiado. Não foram realizados procedimentos no sexto e sétimo dias de experimento.

No Quadro 2, pode-se observar todos os procedimentos que foram realizados no estudo 1, de acordo com o dia em que foram aplicados.

Quadro 2: Descrição dos procedimentos realizados no estudo 1.

DIA	PROCEDIMENTO
1º	PEA PRÉ
2º	ISQUEMIA
3º	PEA PÓS 1 - 24 horas
4º	PEA PÓS 2 - 48 horas
5º	PEA PÓS 3 - 72 horas
6º e 7º	-----
8º	PEA PÓS 4 - 120 horas

PEA= potenciais evocados auditivos (PEATE e *MMN*)
 PRÉ= período pré isquemia; PÓS= período pós isquemia

4.6.1.5 Análise dos resultados

4.6.1.5.1 Potencial evocado de tronco encefálico - PEATE

Para a análise do PEATE, foram consideradas a presença, reprodutibilidade e latência da onda V (Figura 8).

O registro deste potencial foi realizado, exclusivamente, com o objetivo de verificar a integridade da via auditiva, sendo utilizado para determinar a inclusão do animal no estudo.

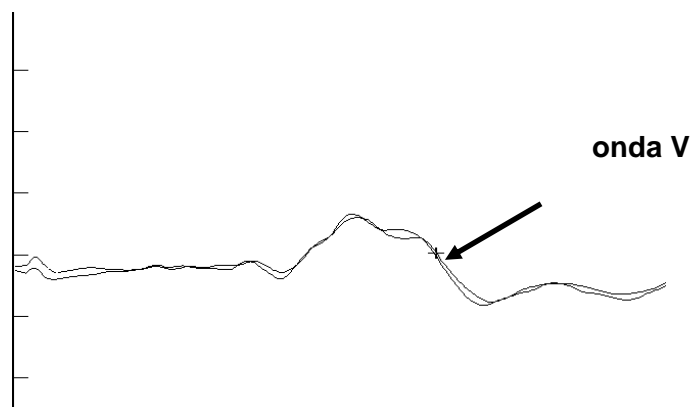


Figura 8 – Modelo de traçado do PEATE em gerbil

4.6.1.5.2 Mismatch negativity - MMN

Para analisar o *MMN*, subtraiu-se a onda gerada pelo estímulo raro daquela gerada pelo freqüente, e o valor da latência foi estipulado considerando-se o ponto em que a negatividade foi diferente de zero (Figura 9).

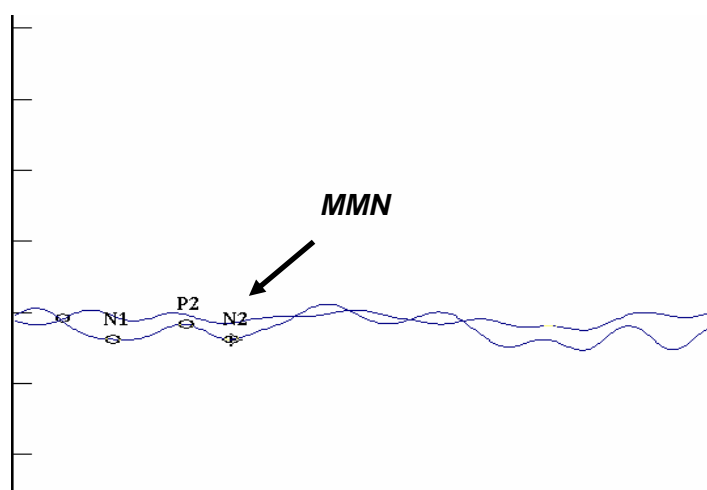


Figura 9 – Modelo de traçado do *MMN* em gerbil

4.6.1.6 Análise estatística

Foram calculadas as porcentagens de presença do *MMN* por grupo, além das médias das latências e o desvio-padrão; o Teste t de Student foi utilizado para verificar o nível de significância entre as médias das latências do *MMN* intergrupos; para este teste foram consideradas significantes as diferenças inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

4.6.2 Estudo 2

Este estudo abrangeu os procedimentos realizados no estudo 1, acrescidos do treinamento auditivo e do registro dos potenciais evocados após o treinamento; foram avaliados o total de 28 animais.

4.6.2.1 Material

Além dos materiais utilizados no estudo 1 (item 4.6.1.1), foi utilizada uma caixa de esquiva para o treinamento auditivo.

4.6.2.2 Registro dos potenciais evocados antes da isquemia; cirurgia experimental; registro dos potenciais evocados após a isquemia

Todos estes procedimentos foram realizados da mesma forma como foram aplicados no estudo 1 (itens 4.6.1.2, 4.6.1.3 e 4.6.1.4).

4.6.2.3 Confecção da caixa de esquiva

Para que fosse realizado o treinamento auditivo, foi confeccionada uma caixa baseada em princípios de um equipamento de esquiva passiva.

A caixa é composta por um compartimento contendo chão em barras de aço inoxidável com espaçamento de 12,5 mm e área interna de 200 mm x 75 mm, porta e frente em acrílico transparente, bandeja coletora de dejetos e urina. Este equipamento contém um microprocessador eletrônico conectado a um gerador de eletro-choque, o qual é acionado a partir de um sinal de áudio; o software utilizado oferece a possibilidade de controle do início, duração e periodicidade do choque, assim como a variação dos padrões do estímulo auditivo gerador.

A caixa de esquiva utilizada neste estudo foi confeccionada a partir da colaboração de um engenheiro, que desenhou um equipamento compatível com os objetivos da pesquisa, o que pode vir a contribuir para a realização de outros estudos similares a este, visto que, até então, não havia pesquisas deste tipo realizados no Brasil.

4.6.2.4 Treinamento Auditivo

O protocolo utilizado neste estudo foi desenvolvido especificamente para esta pesquisa, visto que foram encontrados poucos trabalhos na literatura sobre treinamento auditivo envolvendo gerbils. O tempo de treinamento utilizado neste protocolo foi estipulado a partir de um teste realizado com cinco gerbils, para o qual foi observado o tempo médio que cada animal necessitou para diferenciar dois estímulos sonoros, esquivando-se do choque aplicado quando da exposição ao estímulo de 7000 Hz; o tempo médio apresentado foi de cinco minutos ou 300 segundos.

Seguindo este protocolo, cada animal foi submetido a uma sessão de treinamento auditivo de aproximadamente 120 horas após a isquemia; o treinamento teve duração de 300 segundos, colocando-se o animal acordado dentro da caixa de esquia passiva, e estimulando-o auditivamente com tons puros; as frequências utilizadas foram 4000 Hz e 7000 Hz apresentadas randomicamente a 80 dB NA, através do fone TDH 39 encostado na caixa; o tom de 4000 Hz foi apresentado 80% das vezes e o de 7000 Hz 20% das vezes (mesma padronização da captação do *MMN*); o gerador de eletro-choque de 0,4 mA (*mili ampère*) era acionado sempre que o equipamento gerasse o estímulo sonoro de tom puro na frequência de 7000 Hz.

4.6.2.5 Registro dos potenciais evocados após o treinamento auditivo

Após o treinamento auditivo, foi realizada nova captação do PEATE e do *MMN*, períodos que foram denominados de "pós5" e "pós6".

No Quadro 3, pode-se observar todos os procedimentos realizados no estudo 2, separados por dia de avaliação.

Quadro 3: Descrição dos procedimentos realizados no Estudo 2, por dia de avaliação.

DIA	PROCEDIMENTO
1º	PEA PRÉ
2º	ISQUEMIA
3º	PEA PÓS 1 - 24 horas
4º	PEA PÓS 2 - 48 horas
5º	PEA PÓS 3 - 72 horas
6º e 7º	-----
8º	PEA PÓS 4 - 120 horas E TREINO AUDITIVO
9º	PEA PÓS 5 - 144 horas
10º	PEA PÓS 6 - 168 horas

PEA= potenciais evocados auditivos (PEATE e *MMN*)
PRÉ= período pré isquemia; PÓS= período pós isquemia

4.6.2.6 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados seguindo-se os mesmos passos do estudo 1 (item 4.6.1.5).

4.6.2.7 Análise estatística

Foram calculadas as médias das latências do *MMN*, e também o desvio-padrão em cada momento do estudo; foi aplicado o Teste t de Student para verificar a presença de diferenças significantes entre as latências antes e depois do treinamento auditivo.

4.6.3 Estudo 3

Os animais foram submetidos ao registro dos potenciais evocados antes da isquemia, à cirurgia experimental com a variação de temperatura da cabeça do animal, ao registro dos potenciais após a isquemia (itens 4.6.1.2, 4.6.1.3, 4.6.1.4); também foi realizada análise morfológica através da contagem das células sobreviventes da região CA1 do hipocampo.

Neste estudo, foram analisados os resultados apresentados por 27 animais.

4.6.3.1 Material

Para este estudo, foram necessários os materiais utilizados no estudo 1, e, além destes, os seguintes itens:

- formol a 10%
- lâminas
- hematoxilina-eosina
- xilol
- analisador de imagens LEICA
- microscópio LEICA

4.6.3.2 Registro dos potenciais evocados antes da isquemia; cirurgia experimental; registro dos potenciais evocados após a isquemia.

Estes procedimentos foram realizados seguindo-se a mesma padronização do estudo 1 (itens 4.6.1.2, 4.6.1.3 e 4.6.1.4).

4.6.3.3 Perfusão e análise morfológica

No último dia de experimento, os animais foram anestesiados e seus cérebros perfundidos por via intra-cardíaca com solução salina a 0,9%, seguida de formol a 10% em tampão fosfato 0,1M.

Os tecidos cerebrais foram, então, processados e, a partir destes, produziu-se cortes histológicos de 5 μm (micrômetro) da região CA1 do hipocampo para que fosse realizada a contagem das células.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram fixadas com álcool (absoluto, 95° e 70°), lavadas com água corrente e incubadas com hematoxilina de Harris por um minuto para coloração de núcleos (hematoxilina-eosina - HE). Após lavagem com água corrente, as lamínulas foram submetidas a banho com diferenciador (HCl 1%), banho de água corrente, e banho de água amoniacal (hidróxido de amônia 1%), antes de nova lavagem com água corrente. Em seguida, as lamínulas foram submetidas à segunda desidratação com álcool 95° e incubadas com uma solução de eosina + floxina (composição em ml/L: eosina 1% 111,73; floxina 1% 11,17; álcool 95° 871,51; ácido acético glacial 5,59) por 35 segundos. A seguir, as lamínulas sofreram novas desidratações com álcool (três vezes com álcool 95° e quatro com absoluto) para, finalmente, passarem por lavagem com xilol (três vezes) e montagem em lâmina com resina sintética para fixação.

No Quadro 4, pode-se observar os todos os procedimentos que foram realizados neste estudo, separados por dia de avaliação.

Quadro 4: Descrição dos procedimentos por dia de avaliação no estudo 3

DIA	PROCEDIMENTO
1º	PEA PRÉ
2º	ISQUEMIA
3º	PEA PÓS 1 - 24 horas
4º	PEA PÓS 2 - 48 horas
5º	PEA PÓS 3 - 72 horas
6º e 7º	-----
8º	PEA PÓS 4 - 120 horas
9º	PEA PÓS 5 - 144 horas
10º	PEA PÓS 6 - 168 horas
11º	PERFUSÃO E MORFOLOGIA

PEA= potenciais evocados auditivos (PEATE e *MMN*)

PRÉ= período pré isquemia; PÓS= período pós isquemia

4.6.3.4 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados seguindo-se os mesmos passos do estudo 1 (item 4.6.1.5.2).

Os cortes histológicos da região CA1 do hipocampo foram analisados estabelecendo-se o percentual de células sobreviventes em um analisador de imagens LEICA (QUANTIMET 520 - LEICA), adquiridas através de um microscópio LEICA com aumento de 400 vezes.

Foi calculada a porcentagem de núcleos das células piramidais presentes em relação à área total de $3.000 \mu\text{m}^2$, em 3 regiões determinadas (A, B e C) na área CA1 do hipocampo de cada hemisfério cerebral (Figura 10).

4.6.3.5 Análise Estatística

Foram calculados as médias das porcentagens das células sobreviventes da região CA1 do hipocampo e o desvio-padrão; para verificar o nível de significância entre as médias das porcentagens do número de células intergrupos foi utilizado o Teste t de Student; calculou-se também as médias das latências do *MMN* e o desvio-padrão para cada grupo. Para verificar a correlação entre o número de células sobreviventes e as latências do *MMN*, em cada grupo, foi utilizado o teste de correlação. Diferenças inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram consideradas significantes para o teste t, e os valores mais próximos de 1,00 foram tidos como aqueles com melhor correlação.

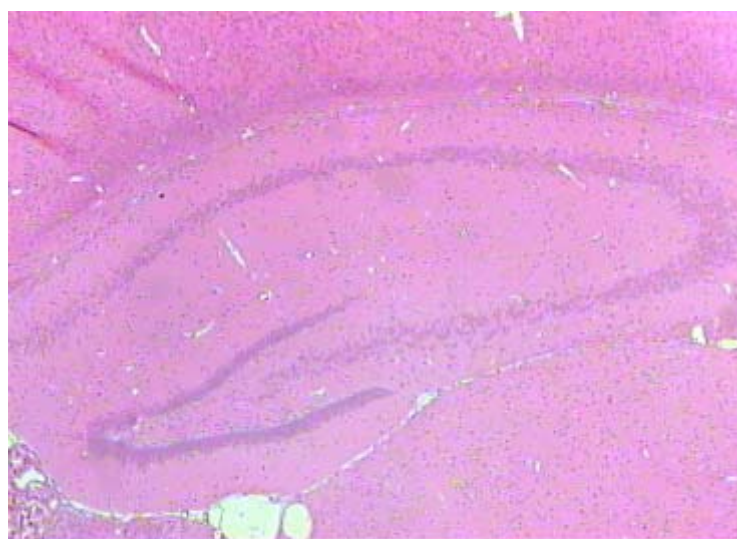
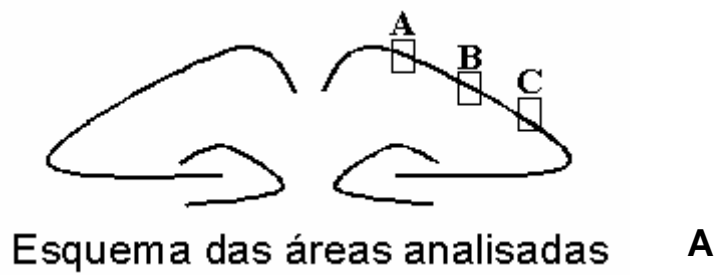


Figura 10 - Esquema das áreas analisadas da região CA1 do hipocampo (A) e corte da região CA1 do hipocampo de gerbil com aumento de 50 vezes (B).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Estudo 1

O estudo foi iniciado com uma amostra de 64 gerbils; foram descartados os resultados de 11 animais, pois não apresentaram o PEATE no início do estudo; outros nove animais também tiveram seus resultados descartados, pois tiveram óbito durante a pesquisa.

Portanto, serão descritos, a seguir, os resultados obtidos a partir da análise dos procedimentos realizados com 44 animais.

5.1.1 Análise do *MMN*: presença do potencial

Estão descritas, na Tabela 1, as porcentagens de presença do *MMN* em cada um dos momentos do estudo, analisando-se os resultados por grupo.

Anteriormente à isquemia, todos os grupos apresentaram porcentagem total de presença do *MMN*; após a isquemia, o grupo que apresentou a maior porcentagem foi o HIPO, em comparação com os demais, apresentando 100% de presença no momento “pós4”, assemelhando-se ao grupo SHAM.

Tabela 1: Porcentagem de presença do *MMN* por grupo em cada momento do estudo, e N correspondente.

<i>MMN</i>	SHAM (N=11) % - N	HIPER (N=8) % - N	NORMO (N=18) % - N	HIPO (N=7) % - N
PRÉ	100,0 - 7	100,0 - 8	100,0 - 16	100,0 - 6
PÓS1	71,4 - 5	87,5 - 7	56,2 - 9	100,0 - 6
PÓS2	57,1 - 4	37,5 - 3	56,2 - 9	83,3 - 5
PÓS3	85,7 - 6	75,0 - 6	68,7 - 11	100,0 - 6
PÓS4	100,0 - 7	75,0 - 6	75,0 - 12	100,0 - 6

5.1.2 Análise do *MMN*: comparação entre os grupos

A partir da comparação das médias das latências do *MMN* entre os grupos experimentais, pode-se observar, na Tabela 2, que, cerca de 96 horas após a isquemia (“pós4”), as menores médias pertencem aos grupos SHAM e HIPO, e as maiores médias referem-se aos grupos HIPER e NORMO.

Tabela 2: Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* por grupo em todos os momentos do estudo.

	SHAM(N=7)	HIPER(N=8)	NORMO(N=16)	HIPO(N=6)
PRÉ	95,82 \pm 29,95	81,75 \pm 29,82	97,47 \pm 40,02	80,43 \pm 25,81
POS1	115,36 \pm 92,57	109,25 \pm 81,12	192,00 \pm 108,06	80,57 \pm 20,74
POS2	158,45 \pm 92,91	224,88 \pm 104,01	171,53 \pm 91,36	110,14 \pm 85,72
POS3	112,09 \pm 70,59	138,88 \pm 103,66	195,60 \pm 91,36	75,86 \pm 20,37
POS4	84,55 \pm 18,39	123,75 \pm 110,12	171,07 \pm 98,07	87,43 \pm 21,08

A Tabela 3 apresenta os níveis de significância encontrados a partir da comparação intergrupos das médias das latências do *MMN* em cada momento do estudo; não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no momento “pré-isquemia”; porém, foram observadas diferenças estatisticamente significantes em alguns momentos do estudo entre os grupos HIPER e HIPO (“pós1” e “pós2”), entre os grupos HIPER e SHAM (“pós3”), NORMO e HIPO (“pós1”, “pós3” e “pós4”), e, finalmente, entre os grupos NORMO e SHAM no momento “pós4”. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos HIPER e NORMO, assim como quando foram comparados os grupo SHAM e HIPO, em nenhum momento do estudo.

Tabela 3. Nível de significância a partir da comparação intergrupos das médias das latências do *MMN* em cada momento do estudo, a partir do Teste t.

	PRÉ	POS1	POS2	POS3	POS4
HIPER X NORMO	NS	NS	NS	NS	NS
HIPER X HIPO	NS	0,05	0,03	NS	NS
HIPER X SHAM	NS	NS	NS	0,01	NS
NORMO X HIPO	NS	0,001	NS	0,0001	0,006
NORMO X SHAM	NS	NS	NS	NS	0,004
HIPO X SHAM	NS	NS	NS	NS	NS

NS = não houve diferença estatisticamente significativa

5.2 Estudo 2

Os dados que serão demonstrados a seguir foram obtidos a partir dos resultados da análise dos animais submetidos ao treinamento auditivo (N=28).

5.2.1 Análise do *MMN*: latências

A média e o desvio padrão das latências do *MMN* podem ser observados na Tabela 4 e no Gráfico 3; após a isquemia, a maior média encontra-se no momento “pós2”, e as menores médias estão nos momentos “pós4” (antes do treinamento) e “pós5” (24 horas após o treinamento).

Tabela 4: Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* em cada momento do estudo.

	MÉDIA \pm DP
PRÉ	95,04 \pm 39,28
PÓS1	140,32 \pm 95,14
PÓS2	174,64 \pm 107,66
PÓS3	138,60 \pm 89,20
PÓS4	127,88 \pm 81,08
PÓS5	127,88 \pm 90,82
PÓS6	128,12 \pm 92,14

5.2.2 Análise do *MMN*: latências antes e depois do treinamento auditivo

As Tabelas 5 e 6 referem-se à comparação das latências do *MMN* entre os momentos “pós1” (24 horas após a isquemia) e o “pós5” e o “pós6”, respectivamente, ou seja, foram comparadas as latências obtidas após a isquemia com aquelas obtidas após o treinamento auditivo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em ambas as comparações.

Tabela 5: Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* no momento 24 horas após a isquemia (“pós1”) no pós 5 (24 horas após o treinamento auditivo), e o nível de significância entre ambos (p), a partir do Teste t.

	PÓS1	PÓS5	p
MÉDIA \pm DP	140,32 \pm 95,14	127,88 \pm 90,82	NS

Tabela 6: Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* no momento “pós1” e no “pós 6” (48 horas após o treinamento auditivo), e o nível de significância entre ambos (p), a partir do Teste t.

	PÓS1	PÓS6	p
MÉDIA \pm DP	140,32 \pm 95,14	128,12 \pm 92,14	NS

5.3 Estudo 3

Serão apresentados os resultados da análise de 27 animais, pois houve perda de material de alguns animais durante o processamento dos tecidos.

5.3.1 Análise morfológica: número de células sobreviventes

Na Tabela 7, pode-se observar as médias das porcentagens e os respectivos desvios-padrão do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo de cada grupo. Nota-se que há uma porcentagem maior de células no grupo HIPO, valores muito próximos aos do grupo SHAM; já os menores valores são observados nos grupos NORMO e HIPER.

Tabela 7: Média das porcentagens \pm desvio padrão (DP) do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo de cada hemisfério cerebral de acordo com o grupo.

GRUPO (N)	MÉDIA % NÚMERO	MÉDIA % NÚMERO
	DE CÉLULAS \pm DP (HEMISFÉRIO ESQUERDO)	DE CÉLULAS \pm DP (HEMISFÉRIO DIREITO)
SHAM (N=4)	39,05 \pm 11,52	31,85 \pm 19,59
NORMO (N=13)	21,58 \pm 3,82	17,29 \pm 3,81
HIPER (N=6)	17,88 \pm 10,26	16,94 \pm 6,54
HIPO (N=4)	37,17 \pm 7,92	30,94 \pm 7,41

Na Figura 11 podem ser observados os cortes da região CA1 do hipocampo de gerbils, de acordo com os grupos estudados nesta pesquisa; os cortes mostram maior quantidade de células nos grupos SHAM e HIPO, e menor número destas nos grupos HIPER e NORMO. Além disso, pode-se observar maior integridade do tecido também nos grupos SHAM e HIPO.

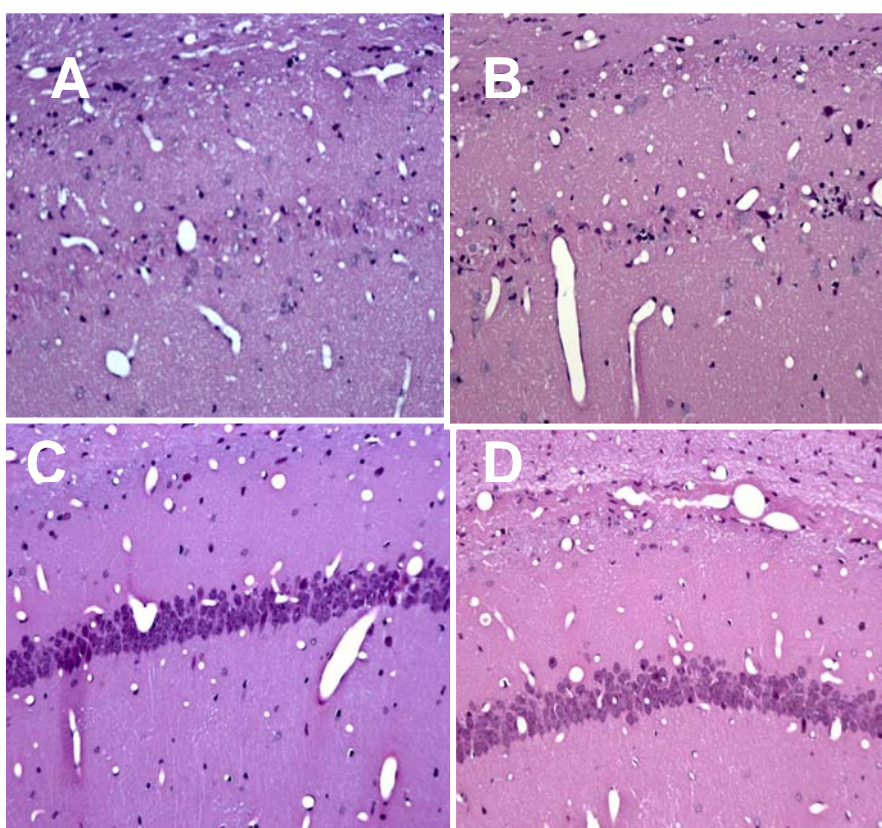


Figura 11: Cortes da região CA1 do hipocampo de gerbil de acordo com o grupo: Hipertérmico (A), Normotérmico (B), Hipotérmico (C) e SHAM (D).

5.3.2 Análise morfológica: comparação entre os grupos

Em relação à comparação do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo entre os grupos, observou-se diferença estatisticamente significativa quando o grupo NORMO foi comparado ao grupo SHAM e ao grupo HIPO, e quando foi realizada a comparação entre os grupos HIPO e HIPER; houve diferença também quando comparados os grupos SHAM e HIPER utilizando o Teste t (nível de significância $p < 0,05$) (Tabela 8).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes a partir da comparação entre os grupos NORMO e HIPER, e entre os grupos SHAM e HIPO.

Tabela 8. Nível de significância a partir da comparação intergrupos entre a média do percentual do número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo a partir do Teste t.

GRUPOS COMPARADOS	p
SHAM X NORMO	0,03
SHAM X HIPER	0,01
SHAM X HIPO	NS
NORMO X HIPER	NS
NORMO X HIPO	0,04
HIPER X HIPO	0,03

NS = não houve diferença estatisticamente significativa

5.3.3 Análise do *MMN*: latências

Na Tabela 9, estão descritas as médias das latências do *MMN* de acordo com cada grupo.

Tabela 9: Média \pm desvio padrão (DP) das latências do *MMN* por grupo em todos os momentos do estudo.

	SHAM (N=5)	HIPER (N=4)	NORMO (N=13)	HIPO (N=5)
PRÉ	76,25 \pm 31,84	83,25 \pm 38,29	116,00 \pm 39,90	84,00 \pm 32,93
POS1	129,75 \pm 114,49	92,25 \pm 37,72	201,15 \pm 98,15	80,25 \pm 26,11
POS2	246,75 \pm 106,50	195,50 \pm 120,71	172,46 \pm 110,31	134,25 \pm 112,22
POS3	129,75 \pm 114,48	74,00 \pm 35,99	171,85 \pm 78,11	80,25 \pm 24,19
POS4	86,00 \pm 9,63	71,505 \pm 22,40	161,00 \pm 82,51	100,00 \pm 9,83
POS5	92,75 \pm 7,23	140,00 \pm 111,81	134,85 \pm 98,15	95,00 \pm 19,30
POS6	78,25 \pm 23,84	180,50 \pm 137,99	117,69 \pm 69,67	131,75 \pm 113,47

5.3.4 Correlação entre número de células e latências do *MMN*

Na análise da correlação entre o número de células sobreviventes e as latências do *MMN*, esperava-se um coeficiente de correlação negativo, pois a relação entre o número de células sobreviventes deveria ser inversamente proporcional à latência do *MMN*, ou seja, quanto menor o número de células, maior a latência do potencial.

Na Tabela 10, pode-se observar os coeficientes desta correlação, e o melhor deles está no grupo HIPER, no momento “pós3”, e o pior coeficiente foi detectado também no grupo HIPER, no “pós4”.

Tabela 10. Coeficiente de correlação entre o número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo e a latência do *MMN* em todos os animais e em cada momento do estudo.

	SHAM (N=4)	HIPER (N=4)	NORMO (N=13)	HIPO (N=4)
PRÉ	-0,22	0,39	-0,21	-0,34
PÓS1	-0,35	0,09	-0,20	-0,29
PÓS2	-0,83	-0,32	-0,07	0,67
PÓS3	-0,73	-0,87	0,30	-0,73
PÓS4	0,90	0,96	0,22	-0,81
PÓS5	-0,28	0,34	-0,26	0,92
PÓS6	-0,80	0,72	-0,30	0,68

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Estudo 1

O estudo 1 teve como objetivo analisar o efeito da temperatura na presença/ausência e na latência do *MMN* em gerbils submetidos a isquemia cerebral.

Primeiramente, foi necessário avaliar a integridade da via auditiva até o tronco encefálico, procedimento realizado através do registro do PEATE (Matas et al., 1998). Apesar deste potencial ter sido utilizado apenas como critério de inclusão dos animais na pesquisa, alguns aspectos referentes à sua aplicação devem ser relatados, como por exemplo, a relativa dificuldade em localizar as cinco ondas, geralmente identificadas neste potencial; porém, a onda V, a mais importante e proeminente, foi facilmente identificada e se reproduziu em todos os traçados.

Em relação ao *MMN*, houve certa dificuldade em visualizar este potencial, o que exigiu que a análise fosse realizada por duas pessoas com a finalidade de estabelecer concordância sobre a presença do potencial evocado e sobre os valores de latência.

Apesar do potencial não ter sido facilmente visualizado, foi possível, neste estudo, registrar e captar o *MMN* em gerbils anestesiados, cujas latências ocorreram entre 54 e 184 milissegundos, a partir da utilização de

estímulo sonoro do tipo tom puro, e que variou somente em relação à frequência.

Estes resultados vão ao encontro de achados obtidos em outros estudos que registraram *MMN* em roedores, como por exemplo, Ruusuvirta et al. (1998), que encontraram latências do potencial entre 63 e 246 ms; no estudo de Astikainen et al. (2006) as latências do *MMN* encontradas situaram-se entre 76 e 108 ms; e, em outro estudo de Ruusuvirta et al. (2007), o potencial foi detectado entre 106 e 136 ms.

Os resultados referentes ao *MMN* mostraram que, antes da isquemia, todos os animais apresentaram presença do potencial (Tabela 1), caracterizando-se como um grupo homogêneo.

Observando-se os grupos estudados, HIPO e SHAM apresentaram a mesma porcentagem de presença do *MMN* (100%) no momento “pós4” (Tabela 1), ou seja, todos animais do grupo HIPO apresentaram recuperação do potencial evocado, equiparando-se à condição dos animais do grupo SHAM, animais estes que não foram submetidos à isquemia.

Desta forma, pode-se traçar um paralelo entre estes resultados e aqueles apresentados em estudos que avaliaram o prognóstico de recuperação de pacientes em coma, pois, tais estudos revelaram que a presença do *MMN* sinaliza boas chances de melhora funcional cerebral nestes casos. Kane et al (1996) descreveram que a latência do *MMN* foi o melhor indicador na avaliação de pacientes que retornaram do coma, pois mostrou 100% de especificidade e 89,7% de sensibilidade. Fischer et al. (1999) relataram que o *MMN*, como instrumento de prognóstico na avaliação

da retomada da consciência após o coma, apresentou alta especificidade (90,9%), porém, com baixa sensibilidade (31,6%). Em outro estudo, Fischer et al. (2004) descreveram que o *MMN* foi detectado em 88,6% dos pacientes que retornaram do coma, e nenhum paciente, em que o potencial estava presente, permaneceu em coma.

Em relação à presença do *MMN* após a isquemia, o potencial foi detectado com maior frequência no momento “pós4”, ou seja, 120 horas (ou seis dias) após o evento isquêmico, e com menor frequência no “pós2” (48 horas após a isquemia) (Tabela 1). Este dado pode ser explicado pelo fato de que, após este período (120 horas - “pós4”), os efeitos da isquemia já tenham sido minimizados pela própria diminuição do edema do tecido lesado. Estes resultados corroboram o que foi descrito na literatura por Oliveira et al. (1995), já que, segundo estes autores, o edema cerebral instala-se dentro de minutos, tendo seu pico entre 24 e 96 horas após a isquemia.

A análise das latências do *MMN* também mostra semelhança entre todos os grupos estudados antes da isquemia (Tabela 2), o que também caracteriza sua homogeneidade; houve confirmação destes achados através do teste estatístico, o qual mostrou ausência de diferença estatisticamente significativa entre eles.

Considerando-se ainda as latências do *MMN*, observou-se que a menor média foi observada no grupo em que foi aplicada a hipotermia (HIPO), enquanto os grupos NORMO e HIPER apresentaram médias bastante elevadas comparativamente (Tabela 2), o que sugere que a

hipotermia exerceu o efeito de neuroproteção, preservando a atividade cerebral, e que este efeito pôde ser verificado a partir do *MMN*.

Assim, o potencial evocado *MMN* foi capaz de diferenciar os grupos que foram submetidos aos diferentes fatores térmicos. O fato de que as médias das latências encontradas no grupo HIPO não diferiram daquelas pertencentes ao grupo SHAM ($p < 0,05$) (Tabela 3), corroboram os achados de Dong et al. (2001), reafirmando o efeito da hipotermia na manutenção funcional cerebral, e confirmando novamente que, através do *MMN*, foi possível detectar o efeito da hipotermia nos animais estudados.

Para que ocorra a resposta eletrofisiológica que desencadeia o *MMN*, é necessário que áreas do hipocampo sejam ativadas, sendo responsáveis pela memória, especialmente a região CA1. Tendo em vista que esta área foi a mais atingida pela lesão causada nos animais deste estudo, os resultados obtidos confirmam o que foi descrito por Izquierdo et al. (2004), que afirmam que a consolidação da memória requer a integridade funcional do hipocampo, através da ativação de receptores que modelam as sinapses, e que, conseqüentemente, proporcionam mudanças morfológicas que podem ser captadas pelo *MMN*.

Em outra análise, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, quando as médias das latências apresentadas pelos grupos foram comparadas entre si, principalmente na comparação do grupo HIPO com os grupos HIPER e NORMO (Tabela 3), o que também fala a favor do efeito de neuroproteção causado pela hipotermia ter ocorrido nos animais deste estudo.

Outro resultado obtido neste estudo que confirmou este efeito foi a ausência de diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos SHAM e HIPO, em todos os momentos do estudo, dado este já encontrado quando foi analisada a presença do *MMN* nestes grupos.

Tais resultados também corroboram outros estudos que verificaram o efeito de neuroproteção da hipotermia (Krieger e Yenari, 2004; Nakashima e Todd, 1996; Eberspacher et al., 2005; Shah et al., 2007; Falavigna et al., 2002; Prandini et al., 2005; Krieger e Yenari, 2004; Ikonomidou et al., 1989).

Assim, os resultados desta pesquisa mostraram que o efeito da neuroproteção gerado pela hipotermia foi comprovado, além de terem demonstrado que este efeito pode ser detectado através do registro do *MMN*, tanto no que se refere à presença deste potencial, quanto à sua latência.

Pode-se dizer, então, que, a partir dos resultados deste estudo, o *MMN* pode ser utilizado para analisar o aspecto funcional durante a reabilitação de pacientes acometidos por isquemia cerebral, pois mostrou ser um teste com ótimo índice de especificidade.

6.2 Estudo 2

Analisar o efeito do treinamento auditivo sobre a latência do *MMN* foi o objetivo do estudo 2, o qual teve como hipótese a diminuição da latência do potencial evocado após a realização do treinamento.

A latência é a diferença de tempo entre o início do estímulo até o pico da resposta (Musiek e Lee, 2001), e indica, portanto, o tempo de processamento cerebral; sendo assim, quanto menor a latência, melhor o prognóstico do aspecto funcional.

Os primeiros resultados deste estudo foram obtidos a partir da análise das médias das latências do *MMN* registradas em cada momento da pesquisa (Tabela 4). Observou-se maior média no momento “pós2”, ou seja, 24 horas após a isquemia, a resposta eletrofisiológica não apresentou bons resultados; já as menores médias foram detectadas nos momentos “pós4” e “pós5”.

Da mesma maneira como foi observado no estudo 1, estes resultados também corroboram os achados de Oliveira et al. (1995), que descreveram o pico do edema cerebral ocorrendo entre 24 e 96 horas após a isquemia.

Analisando-se as latências do *MMN* depois do treinamento, esperava-se aumento da magnitude das respostas eletrofisiológicas (Tremblay et al., 1997; Tremblay et al., 2001 e Kujala et al., 2003) em relação àquelas obtidas logo após a isquemia. Porém, fazendo-se estas comparações, houve diminuição na média absoluta das latências após o treinamento auditivo, mas não a ponto de mostrar diferenças estatisticamente significantes entre elas (Tabelas 5 e 6). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que apenas um pequeno número de animais foi submetido ao treinamento auditivo (N=28), o que sugere que outros estudos devam ser realizados, utilizando-se um número maior de animais, para que se possa ter certeza do efeito do treinamento sobre os aspectos funcionais, já que este efeito

benéfico vem sendo citado por outros autores (Musiek et al., 2002; Szczepaniak e Moller, 1996; Kraus et al., 1995; Tremblay et al., 1998; Menning et al., 2000).

Outro fator que pode ter influenciado este resultado foi o protocolo de treinamento auditivo utilizado; a escolha deste protocolo baseou-se no tempo médio que os animais utilizaram para diferenciar dois estímulos sonoros, ou seja, cinco minutos ou 300 segundos. Entretanto, parece que somente o tempo desta aprendizagem não foi suficiente para promover a neuroplasticidade em gerbils detectável através do *MMN*.

A comparação intra-grupos também não resultou em diferença estatisticamente significativa, o que sugere que o treinamento auditivo aplicado neste estudo não provocou mudanças detectáveis no *MMN*, em termos de latência. O fato de que o treinamento tenha sido aplicado apenas no sexto dia após o evento isquêmico também pode ter colaborado para que não tenham sido encontradas estas diferenças, pois, neste período, a maioria dos animais já vinham apresentando recuperação do quadro isquêmico, pela diminuição do edema tecidual.

A partir destes resultados, não foi possível afirmar, então, que o *MMN* foi sensível para detectar mudanças funcionais em gerbils submetidos a este protocolo de treinamento auditivo.

Portanto, sugere-se que outros estudos sejam realizados utilizando-se um protocolo de treinamento auditivo que contenha maior número de sessões, para que se possa verificar se esta técnica de reabilitação pode promover neuroplasticidade em pacientes acometidos por isquemia cerebral.

Sugere-se, também, que sejam realizadas pesquisas que comparem dois protocolos diferentes de treinamento auditivo, para que seus efeitos possam ser avaliados, o que pode trazer grande contribuição para a reabilitação destes pacientes.

6.3 Estudo 3

O objetivo do estudo 3 foi comparar o número de células sobreviventes da região CA1 do hipocampo e as latências do *MMN*; assim, quanto mais células presentes, e quanto menor a latência do potencial, maior o efeito da neuroproteção nos animais estudados.

Os resultados deste estudo mostraram que, comparando-se os grupos estudados, houve um número maior de células sobreviventes na região CA1 do hipocampo dos animais do grupo HIPO; se comparados ao grupo SHAM, que não foi submetido à isquemia, estes números mostram-se muito próximos, o que sugere que a hipotermia atuou de maneira benéfica, pois houve preservação da população de células desta região (Tabela 7).

Quando comparados entre si, foram observadas diferenças estatisticamente significantes sempre que o grupo HIPO foi comparado aos demais, exceto com o SHAM, dados que também sugerem que houve o efeito de neuroproteção da hipotermia nestes animais (Tabela 8).

Além disso, o fato de não ter sido detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos NORMO e HIPER (Tabela 8) sugere certa semelhança entre eles, no que se refere à ausência de agente

neuroprotetor, pois o percentual de células sobreviventes foi baixo, se comparados aos grupos SHAM e HIPO, resultados que corroboram aqueles apresentados por Baena et al., 2001 e Ariga, 2006.

De maneira semelhante, todos os resultados deste estudo confirmaram os efeitos benéficos da hipotermia como agente neuroprotetor, corroborando os estudos acerca deste tema (Ikonomidou et al., 1989; Nakashima e Todd, 1996; Falavigna et al., 2002; Krieger e Yenari, 2004; Eberspacher et al., 2005; Prandini et al., 2005; Shah et al., 2007), além de sugerir que este modelo de estudo experimental mostrou-se sensível para detectar o efeito da hipotermia na região CA1 do hipocampo de gerbils,

Quando foi realizada a comparação entre o número de células sobreviventes do hipocampo e as latências do *MMN*, foram detectados poucos coeficientes com boa correlação (Tabela 10). Deve-se lembrar, entretanto, que as medidas eletrofisiológicas mais utilizadas para propósitos clínicos são as da latência (Musiek e Lee, 2001), e que a variabilidade destes valores costuma ser menor do que a da amplitude (Durrant, 1986). Porém, o parâmetro que melhor indica o número de células neurais ativas no processo de discriminação entre os estímulos auditivos é a amplitude do potencial, e, neste estudo, a correlação foi realizada utilizando-se a latência do *MMN*, pois o equipamento utilizado na sua captação não permitiu a análise da amplitude.

Desta forma, sugere-se que outros estudos sejam realizados analisando também a amplitude do *MMN*, correlacionando-a com o número de células sobreviventes do hipocampo para verificar esta correlação.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- o modelo experimental aplicado neste estudo mostrou-se efetivo, pois provocou isquemia cerebral nos animais estudados, o que possibilitou a análise dos efeitos da lesão;
- o efeito da neuroproteção gerado pela hipotermia foi comprovado; além disso, este efeito pôde ser detectado através do registro do *MMN*, tanto no que se refere à presença deste potencial, quanto às sua latência;
- houve diminuição na média absoluta das latências do *MMN* após o treinamento auditivo, mas não a ponto de mostrar diferenças estatisticamente significantes entre elas;
- a comparação entre o número de células sobreviventes do hipocampo e as latências do *MMN* não mostrou boa correlação neste estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alho, K. Cerebral generators of mismatch negativity (MMN) and its magnetic counterpart (MMNm) elicited by sound changes. *Ear Hear.* 1995;16:38-51.

Ariga SKK. *Modulação térmica da lesão isquêmica: estudo in vitro.* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Astikainen P, Ruusuvirta T, Wikgren J, Penttonen M. Memory-based detection of rare sound feature combinations in anesthetized rats. *Neuroreport.* 2006;17(14):1561-64.

Baddeley A. Working memory: the interface between memory and cognition. In: Schacter DL, Tulving E. *Memory systems.* Cambridge: Mit Press; 1994. p. 351-68.

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, Abatepaulo FMM. Temperature modulates apoptosis in the gerbil hippocampus following global ischemia. XVI 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 ML, Eigenbrodt EH. 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 Júnior O, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Dal Sasso K. Aspectos Básicos da lesão de isquemia e reperfusão do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir Bras.* 2002;17:96-100.

Ceponiene R, Service E, Kurjenluoma S, Cheour M, Näätänen R. Children's performance on pseudoword repetition depends on auditory trace quality: evidence from event-related potentials. *Dev Psychol.* 1999;35:709–20.

Choi DW, Rothman SM. The glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neural death. *Ann Rev Neurosc.* 1990;13:171-82.

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.

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.

Csépe V, Karmos G, Mólnar M. Evoked potential correlates of stimulus deviance during wakefulness and sleep in cat - animal model of mismatch negativity. *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1987;66:571-78.

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

Dong H, Moody-Corbett F, Colbourne F, Pittman Q, Corbett D. Electrophysiological properties of CA1 neurons protected by postischemic hypothermia in gerbils. *Stroke.* 2001;32:788-95.

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

Durrant JD. Combined EcochG-ABR versus conventional ABR recordings. *Semin Hear.* 1986;7:289-305.

Eberspacher E, Werner C, Engelhard K, Pape M, Laacke L, Winner D, Hollweck R, Hutzler 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.

Eggermont JJ, Ponton CW. The neurophysiology of auditory perception: from single units to evoked potentials. *Audiol Neurootol.* 2002;7(2):71-99.

Falavigna A, Feraz FAP, Delazzeri L, Jordani V. Uso da hipotermia no acidente vascular encefálico isquêmico: considerações atuais. *Rev Bras Neurol.* 2002; 38(2-3):17-25.

Feres MCLC, Cairasco NG. Plasticidade do sistema auditivo. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2001;67(5):716-20.

Fischer C, Morlet D, Bouchet P, Luauté J, Jourdan C, Salord F. Mismatch negativity and late auditory evoked potentials in comatose patients. *Clin Neurophysiol.* 1999;110(9):1601-10.

Fischer C, Luauté J, Adeleine P, Morlet D. Predictive value of sensory and cognitive evoked potentials for awakening from coma. *Neurology*. 2004;63:669-73.

Foster DJ, Wilson, MA. Reverse replay of behavioral sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature*. 2006;440(7084):680-83.

Fry AF, Hale S: Relationships among processing speed, working memory, and fluid intelligence in children. *Biol Psychol*. 2000;54:1–34.

Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand (suppl)*. 1986;548:47-63.

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

Hilbig A, Coutinho LMB. Fisiopatologia da isquemia cerebral. *Rev Pesq Med*. 1993;27:45-8.

Hood L. A review of objective methods of evaluating auditory neural pathways. *Laryngoscope*. 1999;109(11):1745-48.

Horn AP. *Investigação de proteínas envolvidas na vulnerabilidade seletiva do hipocampo*. [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.

Ikonomidou C, Mosinger JL, Olney JW. Hypothermia enhances protective effect of MK-801 against hypoxic/ischemic brain damage in infant rats. *Brain Res*. 1989;487:184-87.

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

Jasper HH. The ten twenty electrode system of the International Federation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1958;10:371-75.

Javitt DC, Steinschneider M, Schroeder CE, Vaughan HG, Arezzo JC. Demonstration of mismatch negativity in the monkey. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1992;83:87-90.

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, Jessell TM. *Princípios da Neurociência*. Berueri, SP: Manole; 2003. p.5-18.

Kane NM, Curry SH, Rowlands C A, Manara AR, Lewis T, Moss T. Event-related potentials: neurophysiological tools for predicting emergence and early outcome from traumatic coma. *J Intensive Care Medicine*. 1996;22(1):39-46.

Karlsgodt KH, Shirinyan D, Van Erp TG, Cohen MS, Cannon TD. Hippocampal activations during encoding and retrieval in a verbal working memory paradigm. *Neuroimage*. 2005;25:1224-31.

Kenneth K. The Course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology*. 1972;22:510-15.

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

Kraus N, McGee T, Carrell T, King C, Littman T, Nicol T. Discrimination of speech-like contrasts in the auditory thalamus and cortex. *J Acoust Soc Am*. 1994;96:2758-68.

Kraus N, McGee T, Carrel T. Central auditory system plasticity associated with speech discrimination training. *J Cogn Neurosci*. 1995;7:25-32.

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

Kujala T, Karma K, Ceponiene R, Belitz S, Turkkila P, Tervaniemi M, Näätänen R. *Plastic neural changes and reading improvement caused by audiovisual training in reading-impaired children*. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(18):10509-14.

Lazar R, Metherate R. Spectral interactions, but no mismatch negativity, in auditory cortex of anesthetized rat. *Hear Res*. 2003;181(1-2):51-6.

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

Levine S, Shon D. Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Arch Path*. 1969;87:315-17.

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.

Lisman JE, Fellous JM, Wang XJ. A Role for NMDA-receptor channels in working memory. *Nat Neurosci.* 1998;1:273-75.

Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol.* 2003;183(2):600-9.

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 glial no hipocampo após isquemia global cardiogênica. *Acta Cir Bras.* 2001;16(1):5-14.

Matas CG, Frazza MM, Munhoz MSL. Aplicação do potencial auditivo de tronco encefálico em audiologia pediátrica. In: Basseto MCA, Brock R, Wajnstein R. *Neonatologia: um convite à atuação fonoaudiológica.* São Paulo: Lovise; 1998. p. 301-10.

McPherson DL. *Late potentials of the auditory system.* London: Singular Publishing Group; 1996.

Menning H, Roberts LE, Pantev C. Plastic changes in the auditory cortex induced by intensive frequency discrimination training. *Neuroreport*. 2000;11(4):817-22.

Morr ML, Shafer VL, Kreuzer JÁ, Kurtzberg D. Maturation of mismatch negativity in typically developing infants and preschool children. *Ear Hear*. 2002;23(2):118-36.

Muniz LRF, Faria MHG, Vasconcelos PRL. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental. *Acta Cir Bras*. 2004;19(5):529-34.

Musiek FE, Lee WW. Potenciais auditivos de média e longa latência. In: Musiek FE, Rintelmann WF. *Perspectivas atuais em avaliação auditiva*. São Paulo: Manole; 2001. p. 239-67.

Musiek FE, Shinn J, Hare CMA. Plasticity, auditory training and auditory processing disorders. *Semin Hear*. 2002;23(4):263-75.

Näätänen R, Gaillard AW, Mäntysalo S. Early selective-attention effect on evoked potential reinterpreted. *Acta Psychol (Amst)*. 1978;42(4):313-29.

Näätänen R, Lehtokoski A, Lennes M, Cheour M, Huotilainen M, Iivonen A, Valio A, Alku P, Ilmoniemi R.J, Luuk A, Allik J, Sinkkonen J, Alho K.

Language-specific phoneme representations revealed by electric and magnetic brain responses. *Nature*. 1997;385:432–34.

Näätänen R. Mismatch negativity (MMN): perspectives for application. *Int J Psychophysiol*. 2000;37(1):3-10.

Näätänen, R. The perception of speech sounds by the human brain as reflected by the mismatch negativity (mmn) and its magnetic equivalent (MMNm). *Psychophysiology*. 2001;38:1-21.

Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rat excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke*. 1996;27:913-18.

Novitski N, Tervaniemi M, Huotilainen M, Näätänen R. Frequency discrimination at different frequency levels as indexed by electrophysiological and behavioral measures. *Cogn Brain Res*. 2004;20:26–36.

Ohl FW, Scheich H. Differential frequency conditioning enhances spectral contrast sensitivity of units in auditory cortex of the alert mongolian gerbil. *Eur J Neurosci*. 1996; 8(5):1001-17.

Ohl FW, Scheich H. Learning-induced dynamic receptive field changes in primary auditory cortex of the unaesthetized mongolian gerbil. *J Comp Physiol*. 1997;181(6):685-96.

Oliveira APR. *Avaliação clínico-comportamental e histológica do encéfalo de gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental induzida por oclusão permanente da artéria carótida*. [dissertação]. Franca: Universidade de Franca. Franca; 2005.

Pérez de La Ossa N, Dávalos A. Neuroprotection in cerebral infaction: the opportunity of new studies. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24(1):153-56.

Picton TW, Alain C, Otten L, Ritter W, Achim A. Mismatch negativity: different water in the same river. *Audiol Neurootol*. 2000;5:111-39.

Ponton CW, Eggermont JJ, Don M, Waring MD, Kwong B, Cunningham J, Tarutwein P. Maturation of the mismatch negativity: effects of profound deafness and cochlear implant use. *Audiol Neurootol*. 2000; 5(3-4):167-85.

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.

Price D. New order from neurological disorders. *Nature*. 1999; 399: A3-A5.

Pulvermüller F, Kujala T, Shtyrov Y, Simola J, Tiitinen H, Alku P, Alho K, Martinkauppi S, Ilmoniemi RJ, Näätänen R. Memory traces for words as revealed by the mismatch negativity. *Neuroimage*. 2001;14:607-16.

Purdy SC, Kelly A, Thorne P. Auditory evoked potentials as measure of plasticity in humans. *Audiol Neurootol*. 2001;6(4):211-15.

Ritter W, Deacon D, Gomes H, Javitt D, Vaughan H . The mismatch negativity of event-related potentials as a probe of transient auditory memory: a review. *Ear Hear*. 1995;16:52-67.

Rosburg T, Trautner P, Ludowig E, Schaller C, Kurther M, Elger CE, Boutros NN. Hippocampal event-related potentials to tone duration deviance in a passive oddball paradigm in humans. *Neuroimage*. 2007;37(1):274-81.

Rothman SM Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci*. 1987;10:299-302.

Ruusuvirta T, Penttonen M, Korhonen T. Auditory cortical event-related potentials to pitch deviances in rats. *Neurosci Lett*. 1998;248(1):45-8.

Ruusuvirta T, Koivisto K, Wikgren J, Astikainen P. Processing of melodic contours in urethane-anaesthetized rats. *Eur J Neurosci*. 2007;26(3):701-3.

Ryan A. Hearing sensitivity of the mongolian gerbil, *Meriones Unguiculatus*. *J Acoust Soc Am*. 1976: 59(5);1222-26.

Sams M, Hamalainen M, Antervo A, Kaukoranta E, Reinikainen K, Hari R. Cerebral neuromagnetic responses evoked by short auditory stimuli. *Eletroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1985;61:254-66.

Schmidt-Kastner R, Freund, TF. Selective vulnerability of the Hippocampus in Brain Ischemia. *Neuroscience*. 1991;4:599-636.

Schochat E. Potenciais evocados auditivos. In: Carvalho RMM. *Fonoaudiologia: informação para a formação*. São Paulo: Guanabara Koogan; 2003. p. 57-85.

Shah PS, Ohlsson A, Perlman M. Hypothermia to treat neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161(10):951-58.

Shtyrov Y., Pulvermüller F. Neurophysiological evidence of memory traces for words in the human brain. *Neuroreport*. 2002;13:521–25.

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

Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares. Primeiro Consenso Brasileiro para Trombólise no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo. *Arq Neuro-psiquiatr*. 2002;60(3):675-80.

Stein DG, Brailowsky S, Will B. *Brain repair*. New York and Oxford: University Press; 1995.

Szczepaniak WS, Moller AR. Evidence of neuronal plasticity within the inferior colliculus after noise exposure: a study of evoked potentials in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1996;100:158-64.

Tardini DMS, Yoshida WB, Novelli ELB, Sequeira 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.

Tremblay K, Kraus N, Carrel T, McGee T. Central auditory system plasticity: generalization to novel stimuli following listening training. *J Acoust Soc Am*. 1997;102:3762-73.

Tremblay K, Kraus N, McGee T. The time course of auditory perceptual learning: neurophysiological changes during speech-sound training. *Neuroreport*. 1998; 9(16):3556-60.

Tremblay K, Kraus N, McGee T, Ponton C, Otis B. Central auditory plasticity: changes in the N1-P1 complex after speech sound training. *Ear Hear*. 2001;22 (2):79-90.

Vaagenes P, Ginsberg M, Ebmeyer U, Ernster L, Fischer 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) (suppl):S57-68.

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

Young S, Kong, KH. Emerging therapies in stroke rehabilitation. *Ann Acad Med (Singapore).* 2007;36(1):58-61.

Walz R, Roesler R, Reinke A, Martins MR, Quevedo J, Izquierdo I. Short and long-term memory are differentially modulated by hippocampal nerve growth factor and fibroblast growth factor. *Neurochem Res.* 2005;30:185-90.

Watson DR, Titterington J, Henry A, Toner JG. Auditory sensory memory and working memory processes in children with normal hearing and cochlear implants. *Audiol Neurootol.* 2007;12 (2):65-76.