



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

AILTON TELES FONTENELE FILHO

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO POR
ESTRESSE DE CONTENSÃO SOBRE A LESÃO INDUZIDO POR
BREVE MUDANÇA SUBCRÍTICA ISQUÊMICA: PAPEL DOS
RECEPTORES A₁ DA ADENOSINA**

FORTALEZA

2009

AILTON TELES FONTENELE FILHO

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO POR ESTRESSE DE
CONTENSÃO SOBRE A LESÃO INDUZIDO POR BREVE MUDANÇA
SUBCRÍTICA ISQUÊMICA: PAPEL DOS RECEPTORES A₁ DA ADENOSINA.**

**Dissertação submetida à Coordenação do
Programa de Pós Graduação em
Farmacologia do Departamento de
Fisiologia e Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia.**

**Orientador (a): Profa. Dra. Geanne Matos
de Andrade**

FORTALEZA

2009

F763e

Fontenele Filho, Ailton Teles

Efeito neuroprotetor do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a lesão induzida por breve mudança subcrítica isquêmica: papel dos receptores A₁ da adenosina / Ailton Teles Fontenele Filho. – Fortaleza, 2009.

104 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2009

1. Ataque isquêmico transitório 2. Adenosina 3. Estresse
4. Cafeína 5. Memória I. Andrade, Geanne Matos de (orient.)
II. Título

CDD: 616.81

AILTON TELES FONTENELE FILHO

**EFEITO NEUROPROTETOR DO PRÉ-CONDICIONAMENTO POR ESTRESSE DE
CONTENSÃO SOBRE A LESÃO INDUZIDO POR BREVE MUDANÇA
SUBCRÍTICA ISQUÊMICA: PAPEL DOS RECEPTORES A₁ DA ADENOSINA.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Dissertação aprovada em: 18 / 02 / 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Francisca Cléa Florêncio de Sousa
Universidade Federal do Ceará

Prof Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará

*Aos meus pais Ailton e Nilce, ao meu irmão Kepler e a
minha irmã Brenda.*

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Ailton Teles Fontenele e Maria Nilce Gomes Fontenele, por terem me dado força nos momentos de fraqueza, por terem sempre acreditado na capacidade de seu filho caçula e não ter me deixado perder o foco nessa grande empreitada.

À minha irmã, Brenda Fontenele, exemplo de obstinação e garra frente aos estudos e aos desafios profissionais.

Ao meu irmão, Kepler Fontenele, que mesmo há tanto tempo distante sempre torceu por mim, e por ser exemplo na busca por seu sonho.

À Ivana Nogueira Fernandes Dantas, por ter me incentivado ao ingresso na pós-graduação de referência que é a Farmacologia da UFC, por ter dedicado horas ininterruptas de estudo ao meu lado me levando ao ingresso no referido curso.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por desempenhar papel fundamental na expansão e consolidação da pós-graduação *stricto sensu* (mestrado e doutorado) em todos os estados da Federação, além de fornecer suporte financeiro durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

À minha orientadora Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade, que, desde primeiro contato, sempre se mostrou solícita aos meus pedidos, paciente aos meus questionamentos e principalmente otimista frente aos meus contratempos.

Às Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana e Francisca Cléa Florenço de Sousa, por terem disponibilizado toda a estrutura laboratorial que construíram com muito esmero ao longo desses anos.

Aos Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo e Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa por abrirem as portas de seus laboratórios para minha tentativa primeira de trabalhar com cultura neuronal.

Aos colegas de laboratório, Dayse, Carol, Dani, Flávio e Monique, que me auxiliaram de todas as formas possíveis para a consecução deste trabalho e por colaborarem ativamente nessa pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental, por serem sempre tão receptivos e companheiros no trato diário;

Aos colegas da Neurofarmacologia, por terem colaborado na minha pesquisa científica, em especial a **Vilani**.

Aos amigos Alisson e Michel, por suportarem tantas noites de questionamentos filosóficos quanto ao rumo da ciência em minha vida.

Aos amigos Danúbio Ilo, Júlio César, Lemuel Almeida, Filipe Lino, Bruno Araripe, Carlos Marn, Samuel Ramos, Cleixon Clésio e Filipe Aguiar por serem pacientes com minha ausência em momentos festivos em prol da pesquisa.

À **Secretária** do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, **Aura Rhanes Farias Nogueira Yida**, que sempre esteve disposta a me ajudar no que fosse preciso e que certamente lerá o título desse trabalho sem titubear.

“O Todo é Mente; o Universo é Mental. ”
(O Caibalion)

RESUMO

O acidente vascular cerebral, doença incapacitante e terceira causa de morte em países desenvolvidos é caracterizada pela interrupção ou redução do fluxo sanguíneo para o cérebro capaz de causar alteração na função cerebral. Sabe-se que o receptor A₁ da adenosina possui um papel chave na neuroproteção devido à diminuição da liberação de glutamato e hiperpolarização neuronal. O objetivo desse trabalho foi determinar os efeitos do pré-condicionamento por estresse de contensão em ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT) por oclusão bilateral das carótidas e a participação dos receptores A₁ da adenosina nesse processo. Inicialmente, ratos Wistar machos, entre 200-240g, foram submetidos ao estresse de contensão (ST) em cilindros por 2h e imediatamente depois submetidos à ICT pela oclusão de ambas as artérias carótidas durante 30min. Um dos grupos dos animais foi pré-tratado com o antagonista do receptor A₁ da adenosina, DPCPX, antes do estresse de contensão nas doses de 0,1mg/kg ou 1mg/kg. A temperatura retal foi monitorada e mantida a 37°C através de uma luz incandescente. Vinte e quatro horas depois do término da ICT os animais foram sacrificados, tiveram seus cérebros dissecados, seccionados e imersos em solução de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) a 1% por 30 min. para análise da viabilidade do tecido cerebral. Os testes comportamentais foram efetuados 72h após a ICT e consistiram em Teste do Campo Aberto para a atividade locomotora, Labirinto em Y para a memória operacional ou de procedimento e Esquiva Passiva para aferição da memória aversiva de curta e longa duração. Os animais submetidos à ICT tiveram dano no tecido cerebral (FO= 10,36 ± 0,75%; ISQ= 18,52 ± 2,62%) além de diminuição no comportamento exploratório de *rearing* (nº de eventos: FO= 5,00± 1,23; ISQ= 1,50 ± 0,72) e déficit da memória aversiva de longa duração (FO= 271,2 ± 17,61s; ISQ= 108,4± 67,64s). Nenhuma diferença significativa foi encontrada no número de cruzamentos em Campo Aberto (FO= 15,71± 2,02; ISQ= 11,00± 2,13), na memória de procedimento (FO= 70,16 ± 5,77; ISQ= 71,37 ± 7,94), ou na memória aversiva de curta duração (FO= 145,9 ± 42,75; ISQ= 113,1 ± 64,97). Os animais pré-condicionados por estresse tiveram uma redução na taxa de infarto cerebral (FO= 10,36 ± 0,75%; ISQ= 18,52 ± 2,62%; ISQ+ST= 12,59 ± 0,87%) e um retorno aos níveis normais do comportamento de *rearing* observado no teste do campo aberto (FO= 5,00± 1,23; ISQ= 1,50± 0,72; ISQ+ST= 6,091± 1,443). No teste de esquiva passiva, observamos uma tendência à melhora da memória aversiva de longa duração (FO= 271,2 ± 17,61s; ISQ= 108,4± 67,64s; ISQ+ST= 156,1±45,81s). Quando tratados com o DPCPX na dose de 1mg/kg, os animais tiveram um bloqueio da neuroproteção obtida com o pré-condicionamento (ISQ= 18,52 ± 2,62%; ISQ+ST= 12,59 ± 0,87%; ISQ+ST+DPCPX 1= 19,95 ± 3,38%), aumento no número de *rearings* que havia sido normalizada pela contensão (ISQ= 1,50± 0,72; ISQ+ST= 6,091± 1,443; ISQ+ST+DPCPX 1= 3,20± 0,90) e uma tendência à reversão dos efeitos do pré-condicionamento na memória aversiva de longa duração (ISQ= 108,4± 67,64s; ISQ+ST= 156,1±45,81s; ISQ+ST+DPCPX 1= 88,61± 38,83s). O estresse de contensão conferiu neuroproteção aos animais submetidos à ICT e tal neuroproteção foi perdida pelo tratamento prévio com DPCPX. Esses achados apontam para a participação do receptor A₁ da adenosina na proteção conferida por estresse de contensão por mecanismos que ainda precisam ser esclarecidos.

Palavras-chave: Ataque isquêmico transitório. Adenosina. Estresse. Cafeína. Memória.

ABSTRACT

Stroke, as a disabling disease and as a third cause of death in developed countries, is characterized by the interruption of cerebral blood flow capable of causing alterations in brain functions. It is well established that the activation of A₁ adenosine receptors confers neuroprotection against acute noxious brain stimuli. The aim of this study was to investigate the effects of preconditioning by restraint stress on rats subjected to transient cerebral ischemia (TCI) and the participation of A₁ receptors in this process. Firstly, Wistar male rats weighing 200-240g were exposed to immobilization stress for 2 hours followed by TCI by occlusion of both carotid arteries for 30 minutes. Groups of animals were pretreated with A₁ receptor antagonist DPCPX (0.1mg/kg or 1 mg/kg, i.p.) before immobilization stress. Rectal temperature was monitored and 37°C was maintained during the surgical procedure using a heating light. Infarct size was determined by TTC staining 24h after TCI and behavioral tests were performed after 72 hours. Open field tests were used to assess locomotor activity, Y-maze test for working memory and passive avoidance test to assess short and long term memory evaluation. Our results showed that TCI caused damage to brain tissue (sham operated = 10.36 ± 0.75%; ISC = 18.52 ± 2.62%), decreased the vertical exploratory behavior (number of events: sham = 5.00 ± 1.23; ISC = 1.50 ± 0.72) and deficit on long term aversive memory (sham = 271.2 ± 17.61s; ISC = 108.4 ± 67.64s). No differences were found on the crossing behavior (sham = 15.71 ± 2.02; ISC = 11.00 ± 2.13), working memory (sham = 70.16 ± 5.77; ISC = 71.37 ± 7.94) neither short term memory (sham = 145.9 ± 42.75; ISC = 113.1 ± 64.97). The infarct volume rates on the restraint stress (RS) group were significantly less than the ischemic (ISC) group (sham = 10.36 ± 0.75%; ISC = 18.52 ± 2.62%; RS = 12.59 ± 0.87%) while the number of rearing was significantly higher (sham = 5.00 ± 1.23; ISC = 1.50 ± 0.72; RS = 6.091 ± 1.443). On the passive avoidance test, restraint stress tended to impair the ischemic damage on long term memory (sham = 271.2 ± 17.61s; ISC = 108.4 ± 67.64s; RS = 156.1 ± 45.81s). When treated with DPCPX (1mg/kg) the infarct size showed an increase (ISC = 18.52 ± 2.62%; RS = 12.59 ± 0.87%; DPCPX = 19.95 ± 3.38%) suggesting a blockade of neuroprotection action achieved by restraint stress. DPCPX also decreased the number of rearing on the open field test (ISC = 1.50 ± 0.72; RS = 6.091 ± 1.443; DPCPX = 3.20 ± 0.90) and tended to reverse the improvement of long term aversive memory accessed by restraint stress (ISC = 108.4 ± 67.64s; RS = 156.1 ± 45.81s; DPCPX = 88.61 ± 38.83s). This work showed a neuroprotection of preconditioning restraint stress against cerebral ischemia and the blockade of this action by a previous administration of DPCPX, A₁ adenosine antagonist. These findings point to the involvement of the A₁ adenosine receptor in the protection conferred by restraint stress by mechanisms that still need to be clarified.

Keywords: Ischemic Attack, Transient. Adenosine. Stress. Caffeine. Memory.

LISTA DE FIGURAS

1	Principais processos e mediadores envolvidos na isquêmica cerebral focal	18
2	Receptor NMDA.....	20
3	Localização das artérias vertebrais e artérias carótidas internas.....	25
4	Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração.....	28
5	Representação do Sistema Límbico	29
6	Receptores da adenosina	32
7	Estrutura química do 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina ou DPCPX	35
8	Animais submetidos a estresse de contensão	40
9	Arena do Teste do Campo Aberto	42
10	Labirinto em Y.....	43
11	Aparelho de Esquiva Passiva.....	44
12	Efeito da isquemia sobre o dano cerebral.....	46
13	Efeito da isquemia sobre a atividade locomotora.....	47
14	Efeito da isquemia sobre a memória operacional.....	48
15	Efeito da isquemia sobre a memória de curto prazo.....	49
16	Efeito da isquemia sobre a memória de longo prazo.....	50
17	Efeito do estresse de contensão sobre a viabilidade neuronal.....	51
18	Efeito neuroprotetor do estresse de contensão sobre o dano cerebral isquêmico.....	52
19	Efeito do pré-condicionamento sobre a atividade locomotora.....	53
20	Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a atividade locomotora em animais isquemiados.....	54
21	Efeito do pré-condicionamento sobre a memória operacional.....	55
22	Efeito do pré-condicionamento sobre a memória de curto prazo.....	56
23	Efeito do estresse sobre a memória de longo prazo.....	57
24	Efeito do pré-condicionamento na memória aversiva de longa duração em animais isquemiados.....	58
25	Efeito do tratamento com DPCPX sobre o dano cerebral.....	59
26	Efeito do DPCPX na neuroproteção do estresse de contensão.....	60
27	Efeito do tratamento com DPCPX e estresse de contensão sobre a viabilidade neuronal.....	61
28	Área hipocampal afetada pela isquemia e efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão e do DPCPX.....	62
29	Área estriatal afetada pela isquemia e efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão e do DPCPX.....	63
30	Efeito do DPCPX sobre a atividade locomotora.....	64
31	Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a atividade locomotora de animais isquemiados.....	65
32	Efeito do DPCPX sobre a memória operacional.....	66
33	Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória operacional de animais isquemiados.....	67
34	Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de curto prazo.....	68
35	Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória de curto prazo de animais isquemiados.....	69
36	Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de longo prazo.....	70
37	Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória aversiva de longo prazo de animais isquemiados.....	71

LISTA DE TABELAS

1	Distribuição dos procedimentos dentre os grupos.....	38
---	------------------------------------------------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem
®	Produto registrado
°C	Graus Celsius
2-VO	Oclusão de dois vasos
4-VO	Oclusão de quatro vasos
A ₁	Receptor da adenosina tipo 1
A _{2a}	Receptor da adenosina tipo 2a
A _{2b}	Receptor da adenosina tipo 2b
A ₃	Receptor da adenosina tipo 3
A ₄	Receptor da adenosina tipo 4
AAE	Aminoácidos excitatórios
ADP	difosfato de adenosina
AMP _c	Adenosina mono fosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>Analysis of Variance</i>
ATP	trifosfato de adenosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Ca ²⁺	Íon cálcio
CA1	Região 1 da subdivisão do hipocampo
cm	Centímetros
CMAO	oclusão da artéria cerebral média, do inglês <i>cerebral middle artery occlusion</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
D ₂	Receptor da Dopamina tipo 2 <i>similar</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPCPX	1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina
EPM	erro padrão da média
ERs	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas do oxigênio

EUA	Estados Unidos da América
FO	Falso operado
g	Gramma
G _i	Proteína G inibitória
G _s	Proteína G estimulatória
GABA	ácido gama-aminobutírico
h	hora
iNOS	Oxido nítrico induzida
ISQ	Submetidos a isquemia
K ⁺	Íon potássio
kg	Quilograma
mA	Miliampère ou Miliamper
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por Quilograma de peso do animal
mm	Milímetros
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazol
n	Número
Na ⁺	Íon sódio
Na ⁺ /K ⁺ -	Bomba de sódio e potássio dependente de ATP
ATPase	
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NO	Óxido Nítrico
NMDA	N-metil-D-Aspartato
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RLs	Radicais livres
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	superóxido dismutase
ST	Estresse
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol
UEFS	choque-elétrico aleatório, do ingles <i>unpredicted eletric foot shock</i>
Vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
1.1 Isquemia Cerebral	
1.1.1 Conceituação.....	16
1.1.2 Patofisiologia da isquemia	17
1.1.3 Papel do cálcio, glutamato e sódio.....	19
1.1.4 Apoptose.....	21
1.1.5 Espécies reativas do oxigênio (EROs) e Poli(ADP-ribose) Polimerase (PARP).....	22
1.1.6 Mecanismos de neuroproteção durante a isquemia cerebral.....	24
1.1.7 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral in vivo.....	24
1.2 Memória.....	27
1.3 Estresse e isquemia.....	30
1.4 A adenosina e seus receptores.....	31
1.5 Pré-condicionamento e a adenosina.....	33
1.6 O DPCPX.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS	
3.1 Geral.....	37
3.2 Específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Animais.....	38
4.2 Protocolo experimental.....	38
4.3 Tratamento com DPCPX.....	39
4.4 Estresse de Imobilização.....	39
4.5 Isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas.....	40
4.6 Avaliação da lesão isquêmica através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC).....	41
4.7 Teste de atividade locomotora.....	41
4.8 Labirinto em Y.....	43
4.9 Esquiva passiva (passive avoidance test)	44
4.10 Análise Estatística.....	45

5 RESULTADOS

5.1 Isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas

5.1.1 Avaliação da lesão isquêmica através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC).....	46
5.1.2 Efeito da isquemia sobre a atividade locomotora.....	47
5.1.3 Efeito da isquemia sobre a memória operacional (working memory)	48
5.1.4 Efeito da isquemia sobre a memória aversiva de curto prazo.....	49
5.1.5 Efeito da isquemia sobre a memória aversiva de longa duração.....	50

5.2 Pré-condicionamento por estresse de contensão

5.2.1 Efeito do estresse de contensão sobre a viabilidade neuronal em ratos.....	51
5.2.2 Avaliação da neuroproteção induzida por estresse de contensão através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC)	52
5.2.3 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a atividade locomotora em ratos	53
5.2.4 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a atividade locomotora de animais isquemiados.....	54
5.2.5 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a memória operacional (working memory).....	55
5.2.6 Efeito do pré-condicionamento condicionamento por estresse de contensão sobre a memória aversiva de curto prazo.....	56
5.2.7 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a memória aversiva de longa duração.....	57
5.2.8 Efeito do pré-condicionamento sobre a memória aversiva de longa duração em animais isquemiados.....	58

5.3 Ação do DPCPX, antagonista do receptor A₁ da adenosina

5.3.1 Avaliação efeito do DPCPX sobre a viabilidade neuronal em ratos através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC).....	59
5.3.2 Reversão da neuroproteção induzida por estresse de contensão pelo DPCPX.....	60

5.3.3. Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a viabilidade neuronal.....	61
5.3.4. Áreas cerebrais afetadas pela isquemia e efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão e do DPCPX.....	62
5.3.5 Efeito do DPCPX sobre a atividade locomotora.....	64
5.3.6 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento na atividade locomotora de animais isquemiados.....	65
5.3.7 Efeito do DPCPX sobre a memória operacional (working memory).....	66
5.3.8 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória operacional (working memory) de animais isquemiados.....	67
5.3.9 Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de curto prazo.....	68
5.3.10 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória aversiva de curto prazo de animais isquemiados.....	69
5.3.11 Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de longa duração.....	70
5.3.12 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória aversiva de longa duração de animais isquemiados.....	71
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONCLUSÃO.....	82
REFERENCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Isquemia Cerebral

1.1.1 Conceituação

No estudo da patofisiologia do processo isquêmico é importante observar alguns conceitos básicos. Assim, o acidente vascular cerebral (AVC) é definido como a consequência da interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro capaz de causar isquemia (ABC DA SAÚDE, 2008). Já a isquemia cerebral é caracterizada pela redução ou interrupção do fluxo sanguíneo capaz de alterar a função cerebral (SMITH, 2004). No sentido mais genérico, isquemia é a redução do fluxo sanguíneo, geralmente como consequência de uma obstrução arterial, queda catastrófica da pressão arterial ou da perda de sangue. Complementarmente da hipóxia, que se refere a qualquer estado em que existe uma redução do oxigênio disponível, na isquemia há também o comprometimento da distribuição de substrato para a glicólise (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A depender da sua intensidade, a isquemia pode causar lesões reparáveis e as células atingidas podem se recuperar caso o oxigênio e os substratos metabólicos sejam disponibilizados pela restauração do fluxo sanguíneo. Entretanto, nos casos em que o insulto persiste a estrutura celular do tecido isquemiado continua a se deteriorar devido à extensão progressiva dos mecanismos lesionais. Com o tempo, os mecanismos energéticos da célula – a cadeia oxidativa mitocondrial e a via glicolítica – são irreversivelmente danificados e a restauração do fluxo sanguíneo, conhecido como reperfusão, não consegue recuperar a célula danificada. Nessa situação, mesmo que o mecanismo energético celular permaneça intacto, a lesão irreparável ao genoma ou às membranas celulares leva à morte celular independente da reperfusão (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Outro conceito fundamental é o de isquemia-reperfusão. Em determinadas circunstâncias, quando o fluxo sanguíneo é restaurado para células previamente isquêmicas, mas que não morreram, a lesão é paradoxalmente exacerbada e continua de maneira acelerada. Como consequência, os tecidos reperfundidos podem perder mais células além das que estavam irremediavelmente danificadas ao final da isquemia (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A morte dessas células se dá por dois mecanismos conhecidos: a necrose e a apoptose. A necrose, morte celular caracterizada por edema celular, picnose, cariorréxis,

cariólise, lesão na membrana plasmática, digestão enzimática, inflamação adjacente presente e invariavelmente patológica, ocorre na região central afetada pela isquemia, o núcleo da lesão.

A penumbra isquêmica é definida como a zona de tecido adjacente ao núcleo do infarto isquêmico (HAKIM, 1987; GINSBERG; PULSINELLI, 1994). Na zona central, como já citado, a morte se dá principalmente por necrose, ao passo que na penumbra, região que contém neurônios eletricamente silentes, com seus gradientes iônicos intactos e com neurônios que podem ter suas membranas despolarizadas se o fluxo sanguíneo for restaurado a tempo (HOGAN; HAKIM, 1992), a morte se dá geralmente por apoptose (LIPTON, 1999). A intensidade da lesão tecidual está diretamente relacionada à diminuição do fluxo sanguíneo que nutre tal tecido. Assim, o fluxo sanguíneo cerebral no encéfalo humano normal é de aproximadamente 55mL/100g/min e com uma redução para 30 a 35mL/100g/min o aumento da concentração de íons H^+ já é observada. Redução mais severa (20mL/100g/min) levam a abolição dos potenciais evocados e o exame eletroencefalograma a tornar-se isoeletrico. Por continuidade, na redução do fluxo para 15mL/100g/min pode-se observar o aumento do fluxo iônico, aumento do potássio extracelular e queda extracelular dos níveis de cálcio resultando na despolarização da membrana celular. Atingindo o limiar para a falha das bombas iônicas de 8mL/100g/min já ocorre a morte celular. Na região da penumbra isquêmica, o fluxo sanguíneo também se encontra reduzido com valores aproximadamente entre 15 a 25mL/100g/min.

Essa distinção entre núcleo e penumbra não é absoluta, ocorrendo também necrose na penumbra e apoptose no núcleo, mas o fato é que à medida que se interioriza na direção mais afetada, mais células morrem por necrose e menos por apoptose (LIPTON, 1999). Com o transcorrer do tempo, a zona de infarto tende a se estender em tamanho levando a mais células da penumbra a serem consideradas da zona central. O período de tempo deste processo de recrutamento constitui um período crítico, em que a onda de tecido necrótico pode ser bloqueada pela intervenção farmacológica. Esta janela terapêutica corresponde as primeiras 2 a 4 horas que se segue à isquemia, após as quais a eficácia da terapêutica decresce rapidamente (GINSBERG; PULSINELLI, 1994).

1.1.2 Patofisiologia da isquemia

A morte das células cerebrais tem início com a diminuição do suprimento sanguíneo durante o processo isquêmico. As células deixam de receber, ou recebem em menor

quantidade, o oxigênio e a glicose carreados pelo sangue. A ordem dos eventos a partir daí é constantemente debatida (SMITH, 2004) (ver Figura 1).

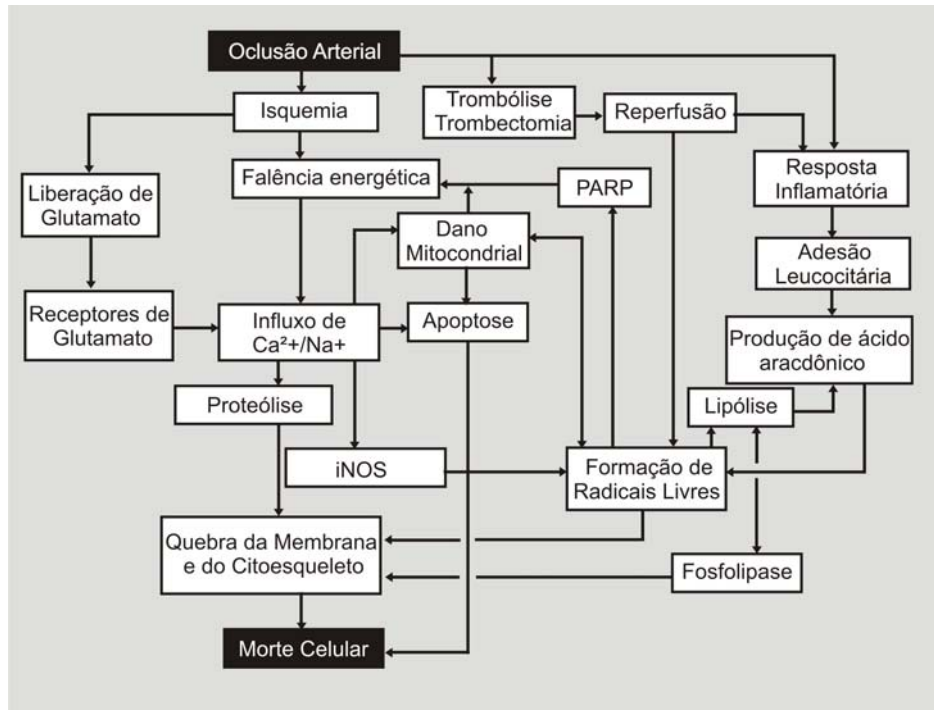


Figura 1 - Principais processos e mediadores envolvidos na isquêmica cerebral focal. Ver texto para maiores explicações. PARP = poli (ADP-ribose) polimerase; iNOS= Oxido nítrico induzida
Fonte: Adaptado de Smith (2004)

A hipóxia acarreta às células a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e conseqüente falência energética (Figura 1). O fosfato de alta energia, na forma de ATP, é necessário para vários processos sintéticos e de degradação da célula. Eles incluem transporte pela membrana, síntese protéica, lipogênese e reações de deacilação-reacilação, necessárias para as alterações que ocorrem com os fosfolípidos. O ATP é produzido de duas maneiras. A principal via nas células dos mamíferos é a fosforilação oxidativa do difosfato de adenosina (ADP) em uma reação que resulta na redução de oxigênio pelo sistema de transferência de elétrons da mitocôndria. A segunda é a via glicolítica, que pode gerar ATP na ausência de oxigênio usando glicose derivada de fluidos corporais ou da hidrólise de glicogênio (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Em um primeiro momento, apenas a via da fosforilação oxidativa é afetada, haja vista que os níveis de glicogênio e glicose, mas não de oxigênio permanecem inalterados. A redução do ATP celular e o aumento associado do monofostato de adenosina estimulam a

atividade da fosfofrutocinase e da fosforilase, que são enzimas glicolíticas, que permitem a mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). O ATP advindo da via metabólica anaeróbica, via glicolítica, passa a suprir a demanda de ATP, porém acarretando a diminuição do pH celular devido o acúmulo de ácidos gerados (SMITH, 2004), como os ácidos graxos e fosfatos inorgânicos devido à hidrólise dos ésteres de fosfato (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). A diminuição do pH intracelular leva a diminuição de atividade de muitas enzimas.

Por um curto período de tempo, a via metabólica anaeróbica mantém os níveis de ATP, depletando a glicose e glicogênio restante com uma produção bem inferior de energia (YOSHIDA, 2002). A falta de energia celular acarreta diversas conseqüências, dentre as principais está à falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) dependente de ATP. A Na^+/K^+ -ATPase, em condições normais bombeia sódio para o meio extracelular e potássio para o meio intracelular. Devido à falência da bomba, o acúmulo de Na^+ intracelular (Figura 1) e a perda de K^+ favorece o gradiente osmótico para que mais água se acumule na célula com conseqüente edema celular e de suas organelas, dentre elas o retículo endoplasmático (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). A persistente despolarização resultante do desequilíbrio iônico leva ao aumento Ca^{2+} intracelular. O cálcio encontrado advém de dois eventos distintos, porém relacionados: do influxo de Ca^{2+} por meio da membrana plasmática (SMITH, 2004) e de estoques intracelulares (LIPTON, 1999).

1.1.3 Papel do cálcio, glutamato e sódio

O aumento inicial do cálcio citosólico, nos primeiros minutos após o início da isquemia, parece estar relacionado à ativação dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos ativados por N-metil-D-Aspartato (NMDA) (BENVENISTE *et al.*, 1988 *apud* LIPTON, 1999) (ver Figura 2) que realizam o simporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e antiporte de K^+ e a canais voltagem-dependente. Em um segundo momento, o cálcio que aumenta a concentração citoplasmática advém de estoques intracelulares (LIPTON, 1999).

Os níveis de cálcio intracelular são modulados pelas ATPases de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mas como as células isquêmicas têm a síntese de ATP gravemente prejudicada essa modulação é incapaz de regular o cálcio ao nível normal (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). O aumento de cálcio, por sua vez, ativa várias enzimas que possuem efeitos deletérios

em potencial, dentre elas estão as ATPases que acentuam a diminuição de ATP devido o seu consumo; as fosfolipases que danificam as membranas; as proteases responsáveis pela degradação de proteínas; as endonucleases que são responsáveis pela degradação de DNA e da cromatina; ativação de segundos mensageiros, com mudanças na expressão gênica e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente na zona da penumbra (MORLEY; HOGAN; HAKIM, 1994; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

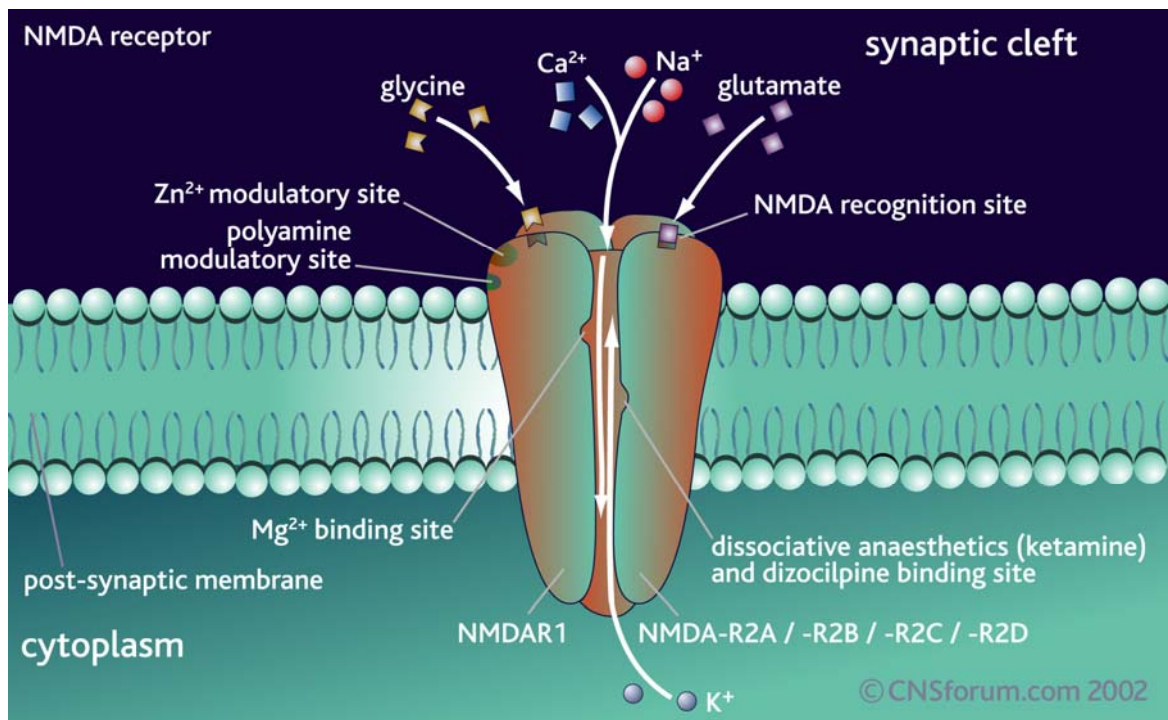


Figura 2 – Receptor NMDA, responsável pelo simporte de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e antiporte de K^+ , que tem como agonista o aminoácido glutamato

Fonte: CNSforum.com (2002)

Nota-se também que os receptores NMDA promovem a entrada de sódio por simporte com o cálcio (Figura 2). Esse aumento de sódio intracelular é um dos responsáveis pela despolarização da célula e conseqüente disparo neuronal como também pelo aumento de consumo do ATP já escasso (LIPTON, 1999). Esse mecanismo de migração do sódio, durante a chamada despolarização anóxica, se dá por falha da bomba Na^+/K^+ -ATPase. O disparo neuronal, devido à despolarização, acaba por liberar uma grande quantidade de glutamato que por sua vez promove a ativação de mais receptores NMDA. A ativação dos receptores NMDA, como visto anteriormente, causa mais influxo de cálcio, agravando assim a situação.

Esse ciclo vicioso glutamato- $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ parece ter a influência do glutamato apenas nos primeiros momentos, visto que bloqueadores NMDA não tem ação protetora quando utilizados tardiamente, assim o sódio parece perpetuar suas próprias ações (CATSICAS *et al.*, 1992 *apud* LIPTON, 1999).

O L-glutamato é o principal transmissor excitatório ubíquo no sistema nervoso central (SNC) (COTMAN *et al.*, 1995 *apud* RANGE; DALE; RITTER, 1999). O glutamato tem uma distribuição ampla e bastante uniforme no SNC, onde sua concentração é muito maior que a observada em outros tecidos. Este neurotransmissor, nos neurônios, provém principalmente da glicose, através do ciclo de Krebs, ou da glutamina, que é sintetizada por células da glia e captada pelos neurônios. A ação do glutamato é interrompida principalmente pela recaptação mediada por transportadores nas terminações nervosas e células da glia. Em algumas circunstâncias, esse transporte pode operar de modo inverso, constituindo uma fonte de liberação de glutamato (TAKAHASHI *et al.*, 1997 *apud* RANGE; DALE; RITTER, 1999); este processo por ocorrer em condições patológicas, como a isquemia cerebral.

1.1.4 Apoptose

Até recentemente, os cientistas acreditavam que as células só morriam quando agredidas por fatores externos, pelo processo denominado necrose. Agora, sabe-se que existe outra forma: o suicídio celular programado, necessário para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Esse fenômeno biológico, batizado de apoptose, tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças e sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos.

Apoptose, no seu conceito mais puro, é entendido como um dos processos pelo qual a célula morre, em resposta a um estímulo fisiológico normal (LIPTON, 1999), sendo assim considerado uma morte “programada”. Células com essa programação morrem com algumas características distintas da morte por necrose, como por exemplo, a formação de agregados de cromática esféricos ou de formato lunar que posteriormente dão origem aos corpos apoptóticos e aumento do volume mitocondrial.

Na última década, muito progresso tem sido feito para elucidar as várias vias de transdução de sinal que podem levar à morte celular. Assim, muitas cascatas apoptóticas têm sido descritas e classificadas como vias intrínsecas, extrínsecas, caspases-dependentes e

independentes. Tem se tornado aparente, portanto, que a apoptose não é uma série de vias claramente definidas, mas uma gama de vias interconectadas, altamente reguladas e convergentes resultando nas alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (ASHE; BERRY, 2003). Já está claro que o processo de apoptose está intimamente relacionado a várias doenças agudas, inclusive no mecanismo envolvido na isquemia e reperfusão de órgãos.

Existem evidências para a ativação de um tipo de caspase, a caspase 3 dentro de algumas horas após um episódio de isquemia cerebral (BLOMGREN *et al.* 1999; NAMURA *et al.*, 1998) e que inibidores de caspases reduzem o lesão tecidual em modelos de derrame em ratos (HARA *et al.*, 1997). A ocorrência de apoptose na zona isquêmica se dá predominantemente na zona de penumbra (LOVE, 2003). Existe evidência, especialmente em modelos animais indicando que alguma morte neuronal pós-isquemia é mediada pela ação de caspases (SCHULZ; WELLER; MOSKOWITZ, 1999). As caspases são sintetizadas como pro-enzimas inativas (pro-caspases). Em episódios isquêmicos em humanos, a morte neuronal devido à oclusão arterial trombótica mostra uma expressão acentuada de pro-caspase 3 e rápido desaparecimento de algumas proteínas de reparo do DNA (LOVE *et al.*, 2000).

1.1.5 Espécies reativas do oxigênio (EROs) e Poli(ADP-ribose) Polimerase (PARP)

As EROs são um dos diversos tipos de radicais livres celulares. Definem-se radicais livres (RLs) ou espécies reativas (ERs), espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados (CLARK, 2002). A presença de elétrons não pareados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química, por tenderem a acoplar o elétron não pareado com outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons. Os RLs podem ser eletricamente neutros, terem carga positiva ou negativa. O oxigênio é o principal fornecedor de RLs. Além deste, são exemplos de RLs: o superóxido, os radicais hidroxila, do óxido nítrico e do ácido hipoclorito. Dentre os fatores que contribuem para a sua liberação, o ácido aracdônico (Figura 1), os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária podem ser citados (HALLIWELL, 1997). Os radicais livres são lesivos através de vários mecanismos. Como exemplo, podemos citar: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidríla e inativação de várias enzimas; 3) alterações do DNA, inibição

da síntese de ATP e consumo das reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; 4) inativação direta do óxido nítrico (NO) com comprometimento do relaxamento vascular dependente do endotélio; 5) formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico; 6) ativação de citocinas como a interleucina-1.

A evidência para um papel patofisiológico das EROs na degeneração neuronal induzida pelo derrame foi demonstrada por Hall (1993). Muita desta lesão é mediada pelo radical hidroxil, com a produção de peróxidos lipídicos. As mudanças conformacionais nos ácidos graxos resultantes da peroxidação lipídica, alteraram a permeabilidade e fluidez da membrana, prejudicando as funções dos receptores, canais iônicos e outras proteínas que fazem parte da membrana (FREEMAN; CRAPO, 1982). Os ácidos graxos livres e em particular, o ácido aracdônico, são liberados durante a isquemia cerebral, como consequência da atividade da fosfolipase C e A₂ (DRENTH *et al.*, 1976; MOSKOWITZ *et al.*, 1984), e elevadas concentrações destes ácidos graxos persistem após reperfusão (UMEMURA 1990) podendo ser a maior fonte de ânion superóxido ($^{\circ}\text{O}_2^-$).

A Poli(ADP-ribose) polimerase ou PARP foi primeiramente relacionada à literatura isquêmica quando ratos PARP knock-out exibiram profunda diminuição do tamanho do infarto quando comparado com animais selvagens (ELIASSON; HUANG; FERRANTE, 1997). Essa proteína é sintetizada a partir de NAD e ativada em resposta a dano no DNA como mecanismo de reparo. Todavia, sua ativação causa depleção de NAD e ATP o que potencialmente exacerba o dano isquêmico, sendo mais um fator a contribuir com a falência energética celular (Figura 1). Os radicais livres gerados com a isquemia também promovem um fenômeno conhecido por lipólise (Figura 1). Devido sua alta reatividade, os RLs reagem com lipídeos insaturados presentes nas células e os tornam também radicais livres que peroxidam mais lipídeos presentes na membrana plasmática perpetuando a geração de mais radicais livres. A peroxidação lipídica por sua vez ativa fosfolipases, como a fosfolipase A₂, que degrada a membrana plasmática celular levando ao seu rompimento e perda de fluidos (SMITH, 2004). A perda de fluidos, lise e morte celular desencadeiam respostas inflamatórias no organismo afetado pela isquemia, onde as reações das células do sistema imunológico danificam ainda mais as células já combatidas pelo processo isquêmico (Figura 1).

1.1.6 Mecanismos de neuroproteção durante a isquemia cerebral

Vários eventos são essenciais para a recuperação dos neurônios após a isquemia. Primeiro, os níveis de ATP devem ser mantidos e isto requer a imediata reperfusão da zona de penumbra (HOSSMANN, 1994). Deve-se também impedir o aumento massivo de cálcio e prevenir a formação das EROs. Já foi demonstrado que a hipotermia moderada (33°C) é neuroprotetora, pois diminui a liberação de glutamato (YAGER; TOWFIGHI; VANNUCCI, 1993). Os neurotransmissores inibitórios tais como GABA (TRAVAGLI; ULIVI; WOJCIK, 1991) e adenosina (SCIOTTI *et al.*, 1992) também podem inibir a liberação de glutamato, provavelmente por inibição do canal de cálcio ou por hiperpolarização da membrana neuronal.

A reperfusão restaura nutrientes e oxigênio aos tecidos, mas também ocasiona um aumento na produção de EROs e na peroxidação lipídica, pois os neurônios vulneráveis têm pequena capacidade de eliminar as EROs (TRUELOVE *et al.*, 1994).

1.1.7 Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral *in vivo*

Os modelos experimentais de isquemia cerebral *in vivo* estão relacionados ao tipo de isquemia (temporária ou permanente), ao seu tempo de duração, ao tempo de reperfusão, às artérias ocluídas no experimento (vertebrais ou carótidas) (ver Figura 3) e aos animais utilizados (TARDINI; YOSHIDA, 2003).

O modelo de Levine, onde a hipóxia é combinada com a oclusão unilateral da artéria carótida (ver Figura 3) (LEVINE, 1960), surgido em meados de 1960, foi ponto de referência para estudos por Brown e cols. (BRIERLY, 1996; BROWN; BRIERLY, 1968; MCGEE-RUSSELL; BROWN; BRIERLY, 1970) e criou as bases para o estudo sistêmico do dano cerebral em roedores. Muito dos modelos *in vivo* utilizam a oclusão dos vasos que predominantemente afetam o cérebro, desenvolvido entre o final de 1970 e início de 1980 (FOX *et al.*, 1993; GINSBERG; BUSTO, 1989; HOSSMANN, 1993). Esses modelos são geralmente divididos em duas categorias: isquemia global e focal. Mas uma modificação no modelo de Levine (isquemia/hipóxia) têm algumas propriedades de ambos os modelos.

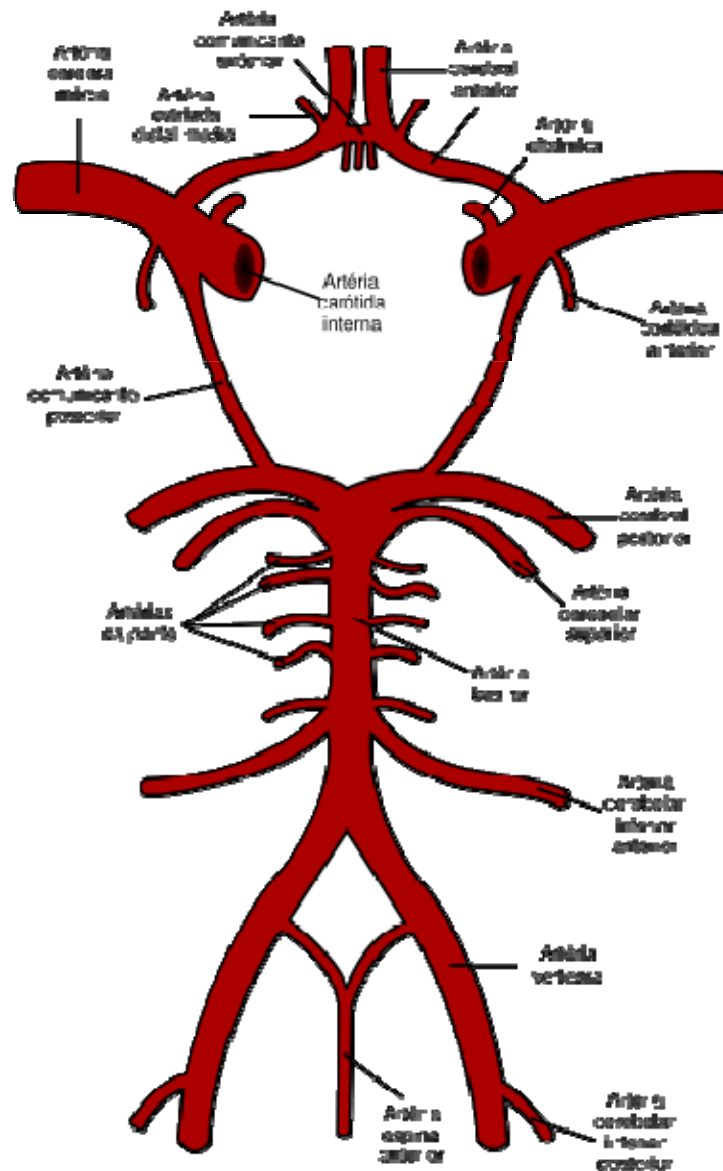


Figura 3 - Localização das artérias vertebrais e artérias carótidas internas e sua comunicação através do polígono de Willis

Fonte: (WIKIMIDIA COMMONS, 2008)

Os danos da isquemia global são mais comumente produzidos pela oclusão dos vasos, e menos comum pela completa interrupção da circulação cerebral. Embora os modelos usados não sejam atualmente globais, uma grande porção do cérebro é completamente afetada de forma uniforme. A isquemia cerebral completa, geralmente alcançada pelo fechamento das artérias cervicais (DIETRICH *et al.*, 1987; ELEFF *et al.*, 1991; LJUNGGREN; SCHUTZ; SIESJO, 1974), parada cardíaca (CRUMRINE; LAMANNA, 1991; EKHOLM; ASPUND; SIESJO, 1992), ou pelo ligamento ou obstrução de todas as artérias do coração (KAWAI *et*

al., 1992; PLUTA *et al.*, 1991) acarreta diminuição do fluxo sanguíneo para todo o cérebro. De acordo com Eleff *et al.* (1991), esses níveis chegam a zero ou a menos de 1%. Existe controvérsia se a isquemia completa ou global é mais danosa. A queda do pH e o aumento na formação dos radicais livres durante a isquemia global, devido à oferta de oxigênio proveniente do fluxo sanguíneo residual, sugerem que este modelo pode ser mais lesivo. Porém, a isquemia completa por 10 minutos em ratos, sem a manutenção da temperatura, causa completa destruição das células piramidais da região CA1 após sete dias (CRUMRINE; LAMANNA, 1997). Este dano é certamente mais severo que no modelo de isquemia global.

Os três modelos de isquemia global extensamente utilizados são: oclusão dos 4 vasos (4-OV), oclusão dos 2 vasos (2-OV) combinados com hipotensão nos ratos, e a oclusão dos 2 vasos em gerbils. A produção de ratos transgênicos tem possibilitado o uso da 2-OV em experimentos com rato (KITAGAWA; MATSUMOTO; YANG, 1998; STRIJBOS; LEACH; GARTHWAITE, 1996). Os resultados mostram um efeito similar para ambos os animais (KITAGAWA; MATSUMOTO; YANG, 1998).

A oclusão dos 4 vasos em ratos (4-VO) envolve a coagulação permanente das artérias vertebrais, que não tem efeito deletério (ver Figura 3), e a ligação temporária de ambas às artérias carótidas (ver Figura 3). A ligação temporária reduz o fluxo de forma eficaz (PULSINELLI; BRIERLY, 1979; PULSINELLI; BUCHAN, 1988). Em ratos Wistar, o fluxo sanguíneo é diminuído à 3% em relação aos valores do controle no hipocampo, estriato e neocortex (PULSINELLI; BRIERLY; PLUM, 1982).

A 2-OV em ratos consiste somente na ligação de ambas as artérias carótidas (ver Figura 3), junto com a redução da pressão sanguínea em torno 50 mmHg, e tem efeitos levemente mais profundos que a 4-OV. O fluxo sanguíneo diminui a 1/3 do total no hipocampo, neocórtex e corpo estriado (SMITH *et al.*, 1984).

A 2-OV em gerbils é induzida pelo ligamento temporário das artérias carótidas (ver Figura 3) produzindo uma profunda isquemia cerebral (KIRINO; TAMURA; SANO, 1985). Nos gerbils não existem artérias comunicantes posterior e por esse motivo não é necessário redução da pressão sanguínea.

1.2 Memória

Memória é a capacidade de reter e recuperar informações, um processo que produz alteração no nosso comportamento, permitindo que o indivíduo se situe no presente, considerando o passado e o futuro. Ela fornece as bases para todos os nossos conhecimentos, habilidade, sonhos, planos e anseios. Assim, o conhecimento de sua natureza e bases biológicas é essencial para se entender a psique humana e desenvolver terapias relacionadas com as doenças cognitivas.

Existem várias formas de aprendizagem e memória, envolvendo diferentes sistemas neuronais (Figura 4). Muitos trabalhos distinguem entre memória “declarativa” e “não declarativa”, “implícita” ou “de procedimento” (*procedural*). A **memória declarativa** refere-se à memória explícita e está relacionado às experiências próprias, reconhecimento de cenas e de objetos familiares. Grosso modo, a memória declarativa armazena o “saber que” algo se deu ou a capacidade de recordar um fato verbalizável envolvendo a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos (WIKIPÉDIA, 2008). Já a memória **não declarativa** engloba todos os gostos e desgostos, todos os hábitos e habilidades (p.ex. dirigir, nadar, andar de bicicleta), resumidamente é o “como fazer”. A memória não declarativa pode incluir o fenômeno de identificação ou *priming*, que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo com o resultado de uma exposição prévia (GEORGOTAS *et al.*, 1987). Este tipo de memória inclui também o condicionamento clássico, habilidades, e é em grande parte inconsciente. As regiões responsáveis pela memória não declarativa parecem ser o núcleo estriado, cerebelo e diencefalo (SQUIRE; ZOLA, 1996; IZQUIERDO *et al.*, 1993; SQUIRE, 1987).

A memória declarativa é dividida em memória imediata, memória de curto prazo ou de curta duração e memória a longo prazo ou de longa duração. A **memória imediata** tem duração de frações a poucos segundos e pode ser ilustrada como a memória de um número de telefone que consultamos na lista telefônica, e que geralmente esquecemos logo após tê-lo digitado. Este tipo de memória não deixa “traços” ou não forma “arquivos”; e parece depender da atividade elétrica de células do córtex pré-frontal. Já a **memória de curto prazo** é a recuperação imediata de eventos que ocorrem em curso ou eventos recentes de segundo, horas ou dias. A memória de curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este

tempo, a memória à curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias remotas são extremamente resistentes e persistem na presença de grave lesão cerebral (SQUIRE; ZOLA, 1996).

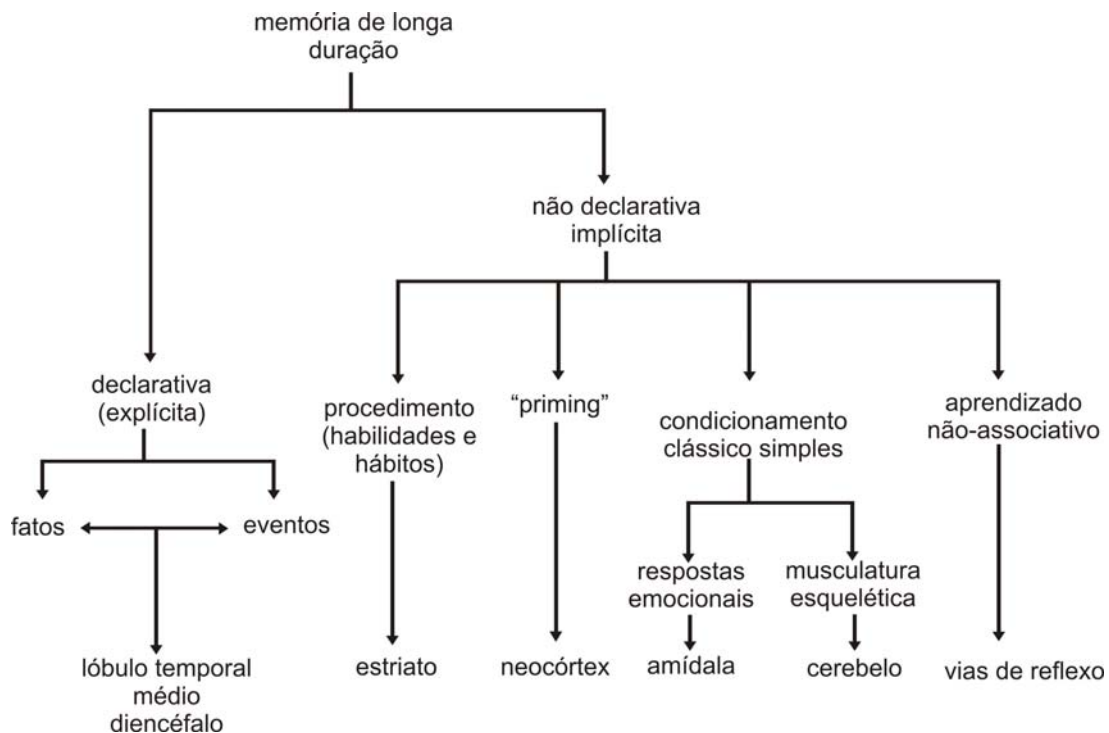


Figura 4 - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração associado às estruturas cerebrais específicas envolvidas em cada sistema

Fonte: Adaptado de Squire e Zola (1996)

Um aspecto da memória de curto prazo é a memória operacional ou *working memory*, um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Em animais, a memória operacional, ou pelo menos sua recuperação, é impedida com inibição da síntese protéica logo após o aprendizado, fato não observado se esta inibição for tardia. (SQUIRE; ZOLA, 1996). A memória operacional parece ter envolvimento do septo medial e o hipocampo (BRIONI, 1993).

Já o processo de codificação que converte memórias de curto prazo em memórias de longo prazo no homem e em outros primatas envolve o hipocampo e as porções adjacentes entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial (ver Figura 5). Enquanto o processo de decodificação para a memória de curto prazo envolve o hipocampo, as de longo prazo estão armazenadas no neocórtex (SQUIRE; ZOLA, 1996). No homem, a destruição bilateral do hipocampo ventral ou processos patológicos que destroem seus neurônios na área CA₁ causa defeitos acentuados na memória recente. Humanos com esta destruição mantêm

intacta a memória imediata e a remota, mas não podem constituir novas memórias de longo prazo.



Figura 5 - Representação do Sistema Límbico (em laranja), grupo de estruturas que inclui hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, corpos mamilares e o giro do cíngulo. Todas estas áreas são importantes para a emoção e reações emocionais. O hipocampo também é importante para a memória e o aprendizado

Fonte: Machado (2000).

A memória certamente não é formada ou consolidada somente em uma região (DA CUNHA *et al.*, 1992). O local ou locais envolvidos nesta estocagem varia grandemente com a natureza da informação e provavelmente muda com o tempo (ZANATTA *et al.*, 1996). O estudo das influências dos sistemas modulatórios na cadeia bioquímica de eventos durante a plasticidade cerebral e memória pode abrir caminho não somente para um melhor conhecimento da memória, mas também para o tratamento de suas desordens e de uma variedade de doenças cerebrais que são acompanhadas de distúrbios de cognição.

Todas essas categorias de memória não são excludentes e quando um organismo aprende alguma coisa importante vários desses sistemas de memória podem ser empregados. Esses tipos de memória são processados em partes diferentes do cérebro, mas podem ser interconvertidos. Por exemplo, a memória da esquiva inibitória depende do hipocampo, amígdala, septo medial (IZQUIERDO; MEDINA, 1995), córtex entorrinal (IZQUIERDO *et al.*, 1993; ZOLA-MORGAN *et al.*, 1989) e o córtex parietal posterior (ZANATTA *et al.*,

1996). Já a memória da habituação e trabalho espacial depende somente do hipocampo (IZQUIERDO *et al.*, 1993) e córtex entorrinal (ZOLA-MORGAN *et al.*, 1989). A memória de estímulo condicionado (DAVIS; RAINNIE; CASSELL, 1994) por susto ou esquiva da água motivada pelo choque (CAHIL; MCGAUGH, 1990) depende da amígdala. A amígdala (BRIONI, 1993; IZQUIERDO *et al.*, 1992) e por extensão o septo medial (IZQUIERDO; MEDINA, 1991; IZQUIERDO *et al.*, 1993) lidam com a memória de alerta, ansiedade ou aversividade. O hipocampo também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em humanos (BRIONI, 1993; IZQUIERDO, 1994; IZQUIERDO *et al.*, 1993).

Alguns dados sugerem que o papel principal da amígdala pode ser realmente modular memórias estabelecidas no hipocampo e outros locais, particularmente no núcleo caudato (CAHIL; MCGAUGH, 1996; MCGAUGH, 1989). O córtex entorrinal e parietal parecem estar envolvidos nos processos tardios de uma variedade de memórias, possivelmente como integrador de dados previamente processados pelo hipocampo, amígdala e septo medial (ZANATTA *et al.*, 1996).

1.3 Estresse e isquemia

A influência das desordens do humor, como depressão e estresse psicológico, sobre o desenrolar da isquêmica têm se tornado um campo de recente interesse dos pesquisadores (MADRIGAL *et al.*, 2003). Enquanto vários estudos epidemiológicos têm encontrado uma associação positiva entre sintomas depressivos e estresse psicológico sobre o risco de AVC (EVERSON *et al.*, 2001 *apud* MADRIGAL *et al.*, 2003), poucos estudos têm examinado a influência do estresse psicológico sobre o desenrolar da doença isquêmica. Esses resultados tem sido controversos. Enquanto DeVries *et al.* (2001) mostraram a exacerbação do AVC por estresse social, assim como Sugo e seu grupo (2002) mostraram o mesmo sobre a isquemia focal, alguns trabalhos, como o de Thoresen *et al.* (1996), relata a redução da lesão cerebral por estresse de contensão em ratos com 7 dias de nascidos após lesão hipóxica-isquêmica (MADRIGAL *et al.*, 2003).

Madrighal *et al.* (2003), mostraram os efeitos do condicionamento por estresse de contensão sobre a lesão isquêmica em ratos. Os efeitos do estresse subcrônico por contensão diária de 1 hora por 7 dias exacerbaram a área infartada por oclusão arterial

cerebral média (MCAO). Interessantemente, o mesmo estresse, quando aplicado de modo crônico (por 6 horas, 21 dias consecutivo), diminuiu a área de infarto.

1.4 A adenosina e seus receptores

A adenosina é um nucleosídeo (OZACMAK; SAVAN, 2007) formado por uma porção purínica (adenina) e o açúcar ribose (WIKIPÉDIA, 2008). Sua ação endógena foi primeiramente descrita ao exercer um potente efeito depressor na atividade neuronal (DUNWIDDIE, 1985). Essa atividade, sabe-se hoje, teve sua ação nos receptores A_1 , entretanto, em baixa concentração a adenosina já foi relatada como excitatória (ação sobre os receptores A_{2a}) (OKADA; SAKURAI; MORI, 1992).

Em um evento isquêmico, um dos eventos celulares observados é o aumento do consumo de ATP e o acúmulo de seu subproduto, adenosina e sua elevação extracelular (OZACMAK; SAVAN, 2007). Acredita-se que o acúmulo de adenosina tem papel citoprotetor sobre o tecido isquemiado (BAXTER, 2002). A adenosina exerce seus efeitos sobre receptores classificados em cinco tipos distintos: A_1 , A_{2a} , A_{2b} , A_3 e A_4 (KADOWAKI *et al.*, 2000) (Figura 6). Todos os subtipos de receptores da adenosina pertencem a família das proteínas G rodopsina-símile.

Formado por 326 aminoácidos e com 90-95% de similaridade entre mamíferos e aves (MOREAU; HUBER, 1999), o receptor A_1 está acoplado à proteína G_{i1-3} e sua ativação inibe a adenilil ciclase (via subunidade α e $\beta\gamma$) com diminuição do AMP_c . A estimulação desse receptor também causa a ativação de vários tipos de canais de K, inativação de alguns canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem (GREENE; HAAS, 1991), como também a ativação da fosfolipase C com subsequente ativação de proteína quinase C e aumento de cálcio intracelular (FREDHOLM *et al.*, 2005). Além disso, existem efeitos em canais de cloro e expressão gênica, que podem, em parte, serem secundários as ações mencionadas acima. Esse tipo de receptor está amplamente distribuído no SNC com alta expressão em áreas ricas em receptores glicocorticóides como hipocampo e córtex cerebral e cerebelar (GOODMAN; SNYDER, 1982; FASTBOM *et al.*, 1987 *apud* SVENNINGSSON; FREDHOLM, 1996).

Os dois subtipos de receptor A_2 (A_{2a} e A_{2b}) são acoplados à proteína G estimulatória (G_s) e ativam a adenilil ciclase com aumento de AMP_c . O receptor A_{2b} está localizado em todo SNC, porém não em microglia, e sua cadeia de 332 aminoácidos possui

aproximadamente 45% de similaridade com os receptores A_1 e A_{2a} (MOREAU; HUBER, 1999).

O receptor A_{2A} tem sua expressão em neurônios e microglias (mas não em astrócitos) pelas as várias regiões do cérebro como: hipocampo, amígdala e córtex, porém sua maior concentração está no *striatum*, núcleo *accumbens*, caudato, putâmen (regiões ricas em dopamina) e tubérculos olfatórios (SVENNINGSSON; FREDHOLM, 1996). Sua expressão em regiões ricas em dopamina não ocorre por acaso, os receptores A_{2A} interagem de forma antagônica com os receptores D_2 uma vez que quando estimulados pela adenosina diminui a afinidade dos receptores D_2 pelo seu agonista (MOREAU; HUBER, 1999).

O receptor A_3 humano já menos conservado, por possuir apenas 72% e 85% de similaridade com o mesmo receptor de ratos e ovelhas, respectivamente, (SALTATORE *et al.*, 1993) está presente no córtex cerebral, *striatum* e bulbo olfatório. Este receptor está envolvido na degranulação de mastócitos (RAMKURMAR *et al.*, 1993).

O receptor A_4 foi identificado no *striatum* (CORNFIELD *et al.*, 1992) e supõe-se que ele esteja ligado a canais de K^+ nas células musculares da aorta.

A cafeína, teofilina e outros derivados das xantinas são inibidores dos receptores A_1 , A_{2a} e A_{2b} , mas inibidores fracos dos receptores A_3 e A_4 (VON LUBITZ, 1999).

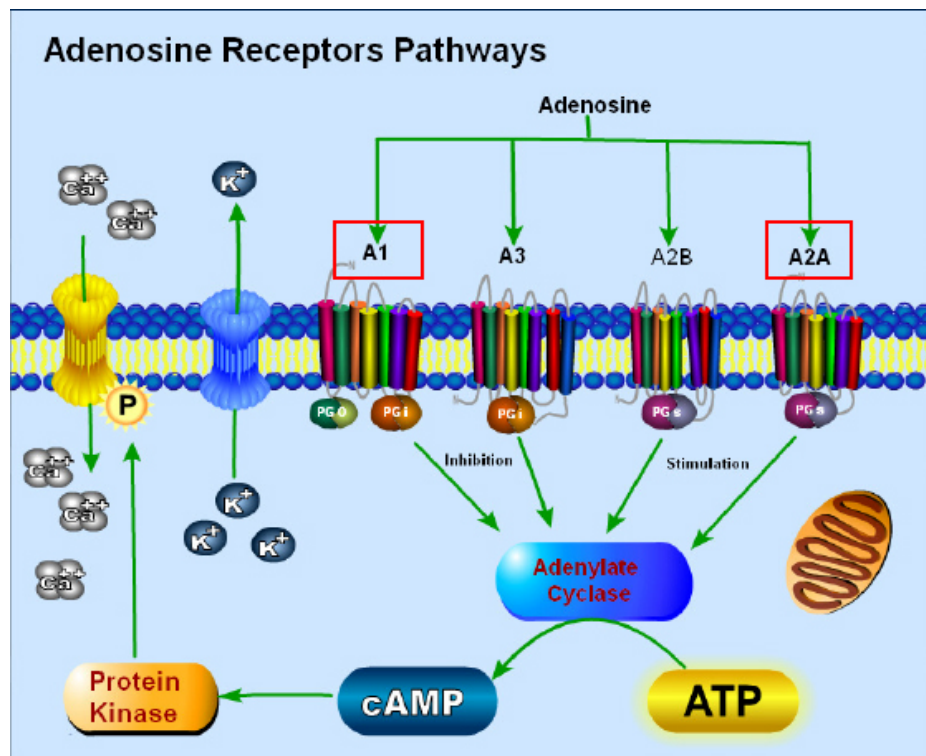


Figura 6 - Receptores da adenosina pertencentes a família das proteínas G rodopsina-símile que transpassam a membrana plasmática por 7 vezes

Nota: Reparem quem os receptores A_1 e A_3 são ligados a proteína G inibitória, ao passo que os receptores A_{2B} e A_{2A} são acoplados a proteínas G estimulatórias da adenilato ciclase.

A redução do fluxo sanguíneo e suprimento de oxigênio resulta em um aumento da adenosina extracelular, em parte pela quebra de ATP quando os suprimentos de energia são depletados (RUDOLPHI *et al.*, 1992). Concomitantemente, ocorre uma grande liberação dos aminoácidos excitatórios (AAE) glutamato e aspartato. Este aumento na disponibilidade de adenosina pode inibir a liberação dos AAEs e bloquear suas ações tóxicas. A co-localização dos receptores de adenosina do tipo A₁ e receptores NMDA na região hipocampal CA₁, uma área especialmente vulnerável a lesão isquêmica, suporta uma relação funcional entre a adenosina e os AAE.

O mecanismo exato desta citoproteção não está claro. Seus efeitos tais como vasodilatação (PHILLIS, 1989), inibição do fluxo de cálcio e da liberação de glutamato (RUDOLPHI *et al.*, 1992), ativação de canais de K⁺ pré-sinápticos (HEURTEAUX *et al.*, 1995) e aumento na produção de energia, através do transporte de glicose, podem contribuir para os efeitos benéficos da adenosina. Hori (1991), demonstrou que a ação citoprotetora da adenosina pode ser explicada pelo aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), uma enzima antioxidante que metaboliza os ânions superóxidos que são espécies reativas de oxigênio (EROS).

1.5 Pré-condicionamento e a adenosina

O conceito de pré-condicionamento isquêmico foi introduzido no fim da década de 80. Este parte do princípio de que um breve período de isquemia pode mobilizar mecanismos protetores intrínsecos, o qual aumenta a tolerância contra um período crítico posterior de isquemia (STEIGER; HÄNGGI, 2007). Os tecidos mais sensíveis à isquemia como miocárdio e cérebro apresentam-se como um alvo promissor para a aplicação terapêutica do pré-condicionamento.

Durante os últimos anos, os mecanismos de proteção do pré-condicionamento foram estudados e podem ser divididos em iniciais e tardios, dependendo do tempo de manifestação após o estresse (AKAIWA *et al.*, 2006). Em geral, os efeitos agudos podem ser ligados à adaptação dos receptores de membrana enquanto os tardios são resultados de expressão gênica. A isquemia não é o único fator que pode acionar o pré-condicionamento. Além da isquemia (BARONE *et al.*, 1998; NAKAMURA *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2004) hipóxia (BALLANYI, 2004; CENTENO *et al.*, 1999; PEREZ-PINZON; BORN, 1999),

ácidos graxos poliinsaturados, lipopolissacarídeos (ROSENZWEIG *et al.*, 2004), eletroacupuntura (WANG *et al.*, 2005), hipertermia (XU; AIBIKI; NAGIYA, 2002), hipotermia (NISHIO *et al.*, 2000; YUNOKI *et al.*, 2003), isoflurano e outros estressores já foram relatados como pré-condicionantes.

A ativação dos receptores da adenosina é parte da defesa endógena contra hipóxia e isquemia. O efeito agudo, mas não o tardio parece estar associado com uma *up-regulation* dos receptores A₃ (VON ARNIM *et al.*, 2000). Agonistas A₃ tem demonstrado ser protetores de miocárdio de ratos e coelhos submetidos à isquemia, (LASLEY *et al.*, 2001). Alguns trabalhos também mostram que a adenosina pode induzir uma neuroproteção aguda via ativação de receptores A₁ (PLAMONDON *et al.*, 1999). A infusão de adenosina antes da isquemia tem demonstrado ser capaz de reduzir os danos reversíveis e irreversíveis dos modelos de isquemia-reperfusão miocárdica em diferentes espécies. A maioria das evidencias tem implicado o subtipo A₁ como mediador desses efeitos, pelo menos à nível de miócitos (LASLEY; SMART, 2001).

Boulenger *et al.* (1984), mostraram que estímulos estressores, que sabe-se afetar os níveis de glicocorticóides, podem influenciar os receptores A₁ da adenosina no sistema nervoso central (SVENNINGSSON; FREDHOLM, 1996).

Akaiwa *et al.* (2006) relataram que uma oclusão vascular moderada (por 40min) produziu efeito protetor do tipo rápido em ratos posteriormente submetidos à isquemia e que os benefícios obtidos foram atenuados com a administração do antagonista do receptor A₁, o DPCPX.

1.6 O DPCPX

O 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina ou DPCPX (Figura 7) é um derivado sintético da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) antagonista do receptor de adenosina, utilizado, principalmente em pesquisas fármaco-fisiológicas. Estudos com radioligantes mostraram que o DPCPX possui uma seletividade 700 vezes maior para os receptores A₁ em relação aos receptores A₂(LOHSE *et al.*, 2004). Devido sua ação antagonista, o DPCPX é capaz de inibir a atividade da adenilato ciclase inibitória via bloqueio dos receptores A₁ (LOHSE *et al.*, 2004).

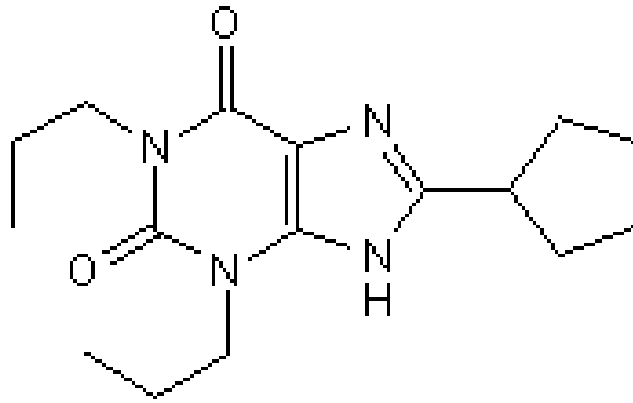


Figura 7 - Estrutura química do 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina ou DPCPX, um potente e seletivo antagonista de receptores da adenosina A₁ com ações tanto *in vitro* como *in vivo*
Fonte: Bruns *et al.* (1987)

2 JUSTIFICATIVA

Poucos dados epidemiológicos estão disponíveis no Brasil acerca da incidência de AVC, mas segundo dados do National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) o AVC é uma das principais causas de incapacidade e a terceira causa de morte nos Estados Unidos. O peso social dessa enfermidade é grande como mostra os números a seguir, além de doloroso, por levar, na maioria das vezes, os acometidos à incapacidade permanente. Em 2007, cerca de 700.000 americanos sofrem de AVC, destes 200.000 foram AVC recorrentes. Em 2008, a incidência de AVC passou a 780.000, sendo 180.000 AVC recorrentes (ROSAMOND *et al.*, 2008). Cento e sessenta mil pessoas morrem de AVC por ano nos Estados Unidos (CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). Três milhões de americanos são permanentemente incapacitados devido ao AVC. Os custos diretos e indiretos do AVC em 1998 nos Estados Unidos foram estimados em 43,3 bilhões e sempre ascendentes, chegando em 2005 à cifra de 57,8 bilhões de dólares (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005). Além disso, dos 70.000 pacientes, por ano, que sofrem de ataque cardíaco com ressuscitação cardiopulmonar 60% destes pacientes, no mínimo, morrem no hospital devido à lesão cerebral extensa e somente 3-10% destes pacientes ficam hábeis para reassumir suas vidas normalmente (KRAUSE *et al.*, 1986). Estima-se que em 2002, 5,4 milhões de pessoas sobreviveram a um AVC, sendo que 15-30% destas ficaram permanentemente incapacitadas (HOWARD, 2005).

Por outro lado, o entendimento da patogênese da isquemia ainda não mostrou significativos frutos no tratamento dessa enfermidade. Diferentes vias bioquímicas foram desvendadas, receptores estruturalmente mapeados e proteínas isoladas, porém pouco dessa ciência básica chegou à realidade do enfermo em seu leito. Na compilação feita por Smith (2004), dos 26 compostos comprovadamente eficientes no tratamento da isquemia, 4 encontram-se em testes de fase I, 6 em fase II e apenas 4 em fase III.

Assim, todo esforço no sentido de minimizar esse mal mundial é válido. Somando a isso está os estudos com pré-condicionamento que, desatrelados da visão reducionista do uso de um único fármaco no tratamento de algo tão complexo, aposta no arcabouço bioquímico do próprio organismo que por vezes se mostra capaz de proteger suas células. Nessa linha de raciocínio este trabalho foi desenvolvido, com o intuito de agregar mais uma arma nessa guerra invisível do homem moderno.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Elucidar, *in vivo*, o efeito neuroprotetor do estresse de contensão agudo na isquemia cerebral global transitória e a participação do receptor A₁ da adenosina neste processo.

3.2 Específicos

Avaliar o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento por estresse de contensão agudo de acordo com os seguintes aspectos:

- 1 Dano neuronal;
- 2 Atividade locomotora;
- 3 Memória declarativa de curto e longo prazo e memória operacional.

Avaliar a participação do sistema da adenosina através do uso do antagonista do receptor A₁ da adenosina, o DPCPX, na neuroproteção por pré-condicionamento por estresse de contensão agudo de acordo com os seguintes aspectos:

- 1 Dano neuronal;
- 2 Atividade locomotora;
- 3 Memória declarativa de curto prazo e longo prazo e memória operacional.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (200–240g) provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Ceará. Os animais foram mantidos a 23-25 °C com ciclo claro/escuro de 12h/12h, e alimentados com dieta padrão e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética local em um macroprojeto o qual inclui o projeto aqui apresentado e todo cuidado foi feito para minimizar o sofrimento dos animais.

4.2 Protocolo experimental

Os animais foram divididos em grupos (n=10), como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos procedimentos dentre os grupos

	Tratamento com DPCPX <i>-2h 15min</i>	Pré-condicionamento por Estresse de contensão <i>-2h</i>	Isquemia/Reperusão <i>0h à 30min</i>
FO			
ISQ			
FO+ST			
ISQ+ST			
FO+DPCPX			
ISQ+DPCPX			
FO+ST+DPCPX			
ISQ+ST+DPCPX			

Nota: Em azul, os grupos submetidos a pré-tratamento com DPCPX (0,1mg/kg e 1mg/kg);em verde, os grupos pré-condicionados por estresse de contensão (2 h); em vermelho, os grupos submetidos à isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas por 30 min. Considera-se o tempo zero (0:00h) o momento imediato da oclusão dos vasos no procedimento isquêmico.

4.3 Tratamento com DPCPX

O DPCPX foi diluído em solução salina com 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e aplicado pela via intraperitoneal nos ratos em duas doses: 0,1mg/kg e 1mg/kg. Os animais foram pré-tratados com DPCPX ou veículo, quinze minutos antes de serem submetidos ao estresse de contensão, depois sofreram 30 min de isquemia cerebral global transitória, por oclusão bilateral das carótidas.

4.4 Estresse de Imobilização (LUINE *et al.*, 1994)

O pré-condicionamento foi feito por estresse de imobilização do tipo agudo baseado no estresse de imobilização subcrônico (LUINE *et al.*, 1994). Neste tipo de estresse os animais são colocados em contensores cilíndricos de acrílico de 22cm de comprimento, por 8,5cm de largura e 5cm de raio perfurados para ventilação por 2h, em temperatura ambiente entre os períodos de 8 e 10 horas conforme mostra Figura 8. Os animais dos grupos que não sofreram pré-condicionamento foram apenas manipulados, entrando e imediatamente saindo do cilindro contensor.



Figura 8 - Animais submetidos a estresse de contensão

4.5 Isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas (ULRICH *et al.*, 1998)

Ao término do estresse de contensão, os animais foram imediatamente anestesiados com Ketamina (Francotar® – Virbac, Brasil, 90 mg/kg) e Cloridrato de xilazina a 2% (Rompum® - Bayer, Brasil, 10 mg/kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) e imobilizados para o procedimento cirúrgico.

Inicialmente, um corte vertical foi feito na altura da traquéia, para exposição das carótidas em ambos os lados do pescoço do animal. Após separação do nervo vago das artérias, estas foram pinçadas com pinça buldogue e submetidas à isquemia cerebral transitória durante 30 minutos. A temperatura retal foi monitorada e mantida em torno de 37°C por meio de luz incandescente. Após esse período, os buldogues foram removidos restabelecendo o fluxo sanguíneo, o local da incisão suturado e os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperação com livre acesso a água e comida. Os grupos falso-operados foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico, sem o clampeamento das artérias carótidas.

4.6 Avaliação da lesão isquêmica através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (GOLDLUST *et al.*, 1996)

Vinte e quatro horas (24h) após a cirurgia, os animais foram anestesiados, decapitados e seus cérebros retirados para análise de viabilidade celular. O método de análise de viabilidade celular foi a coloração com TTC, sal derivado do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazol) que ao ser oxidado pelas as mitocôndria viáveis adquire coloração avermelhada. Conservados em salina gelada até o momento dos cortes, os cérebro foram fatiados na espessura aproximada de 1 mm e imersos em solução de 1% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida tiveram suas imagens digitalizadas em alta resolução em Escaner Lexmark-X 1195 e analisadas as áreas de edema e áreas totais e a respectiva percentagem de área atingida em relação à área total. Tal metragem foi realizada utilizando-se o software gráfico Adobe Photoshop CS3 através da contagem de “pixels” brancos sobre a quantidade de “pixels” totais.

4.7 Teste de atividade locomotora (*open field* – campo aberto) (BROADHURST, 1957)

Para verificar se a cirurgia ou tratamento não acarretou alteração da atividade locomotora, o que prejudicaria a realização dos testes de memória, foi feito o teste de atividade locomotora usando o modelo de Campo Aberto (*Open Field*). O teste foi realizado 72h após a isquemia.

O campo aberto consiste de uma arena quadrada (50 x 50 cm), iluminada com luz vermelha. O piso da arena é dividido em 4 quadrados iguais. No teste, o animal foi colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por um minuto. Após este período foi registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal e o número de *rearings* (levantar as patas - exploração vertical), durante um tempo de três (03) minutos. A arena foi limpa com álcool 20% após cada animal ser retirado, para evitar interferência do cheiro de urina e fezes no teste.

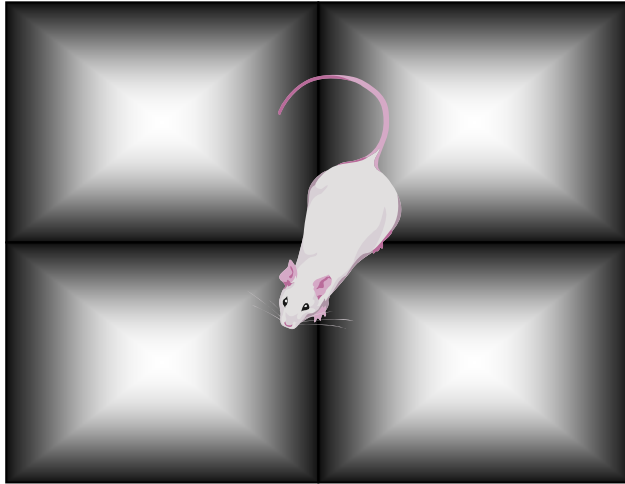
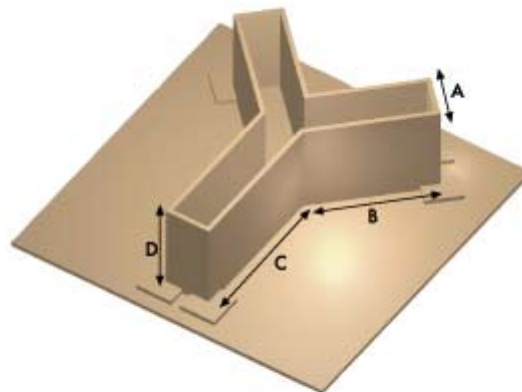


Figura 9 - Arena do Teste do Campo Aberto dividido em quatro quadrantes iguais.

4.8 Labirinto em Y (Y-maze) (STONE; BAKHTIARI, 1956)

O labirinto em Y consiste em uma caixa acrílica no formato de Y (ver Figura 10) com 2mm de espessura, altura de 34,5cm, com cada braço medindo 75,5cm de comprimento e 11,7cm de largura. Esse teste avalia a memória de trabalho ou operacional (working memory). Todas as entradas em cada braço são sequencialmente anotadas por 8 minutos, assim o número total de entradas em cada braço, bem como a seqüência de entradas é registrada. Considera-se entrada apenas a entrada do animal com as 4 patas um braço do labirinto. Os dados foram expressos como a percentagem de alternância nos braços sem repetição. O animal normal deve explorar espontaneamente entre os braços, de forma alternada, quando colocado no labirinto. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE; BAKHTIARI, 1956). Entre cada sessão, o labirinto é higienizado com uma solução de álcool 20% e secado com toalhas de papel.



Note: Drawing used for illustration purposes.

Figura 10 - Labirinto em Y. Dimensões: A= 11,7cm, B=C= 75,5cm e D= 34,5cm.

4.9 Esquiva passiva (passive avoidance test) (baseado em DE NOBLE *et al.*, 1986)

Setenta e duas horas (72h) após o protocolo de isquemia, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva UGO BASILE 21025 ® (Figura 11) por 1 minuto. O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22)cm, dividida em dois compartimentos iguais conectados por uma pequena entrada. Um compartimento branco, iluminado e piso com isolante e um compartimento preto, escuro e com piso eletrificado.

O animal é introduzido no aparelho sempre pelo compartimento iluminado. Após 30 segundos da habituação, o animal é retirado e após 30 segundos é colocado novamente no compartimento iluminado. O animal ao passar do compartimento claro para o compartimento escuro, por procurar instintivamente local mais escuro, recebe um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo. O tempo que o animal levou para adentrar o compartimento escuro (latência) é computado até um limite máximo de 300 segundos. Os animais são então retirados do aparelho (alguns animais saem espontaneamente após o choque). Transcorridos 15 minutos do condicionamento por choque, este mesmo animal é colocado novamente no compartimento iluminado a fim de se avaliar a retenção da memória recente. O tempo até sua entrada no compartimento escuro é registrado novamente. A retenção da memória tardia também é verificada. 24h horas após o condicionamento por choque, os animais foram colocados novamente no compartimento iluminado e o tempo de latência registrado.

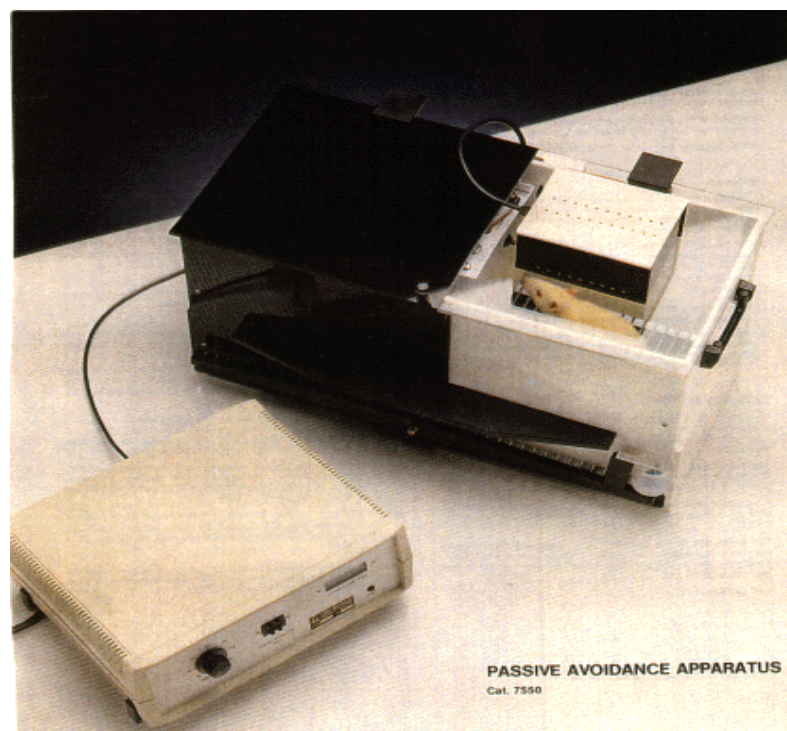


Figura 11 - Aparelho de esquiva passiva UGO BASILE 21025 ®.

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (epm). Os experimentos que obtiveram uma distribuição gaussiana foram submetidos ao teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. Os experimentos com distribuição não gaussiana foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. Comparações entre duas amostras foram realizadas utilizando-se o teste t não pareado para dados paramétricos e teste Mann-Whitney para dados não paramétricos. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas e produção de figuras foram realizadas no Graph Pad Prism® 3.0.

5 RESULTADOS

5.1 Isquemia cerebral transitória por oclusão bilateral das carótidas

5.1.1 Avaliação da lesão isquêmica através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC)

A fim de se constatar a eficácia do método isquêmico utilizado, comparamos a percentagem da lesão cerebral encontrada entre os animais falsos operados (FO) com os animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas (ISQ). Observamos uma lesão isquêmica significativo ($p < 0,05$) nos animais que submetidos à isquemia em relação ao controle (% de dano: FO= $10,36 \pm 0,75$; ISQ= $18,52 \pm 2,62$) (Figura 12).

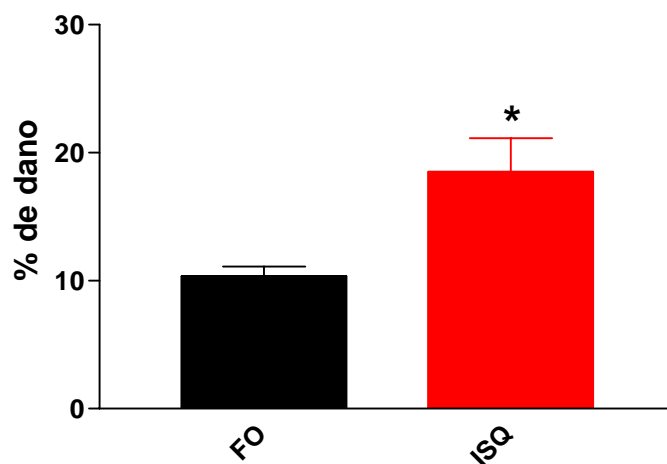


Figura 12 – Efeito da isquemia sobre o dano cerebral

Nota: Os animais foram submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 minutos e 24h depois tiveram seus cérebros seccionados e corados por TTC. O cálculo da percentagem do dano considerou a área não corada (isquemiada) sobre a área total da seção. * versus FO; $p < 0,05$. Teste t não pareado.

5.1.2 Efeito da isquemia sobre a atividade locomotora

A fim de se avaliar a repercussão do procedimento isquêmico na atividade locomotora dos animais, comparamos a atividade exploratória horizontal (*crossing*) e vertical (*rearings*) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas (ISQ). Não observamos diferença significativa no comportamento de *crossing* (nº de eventos: FO= 15,71± 2,02; ISQ= 11,00± 2,13). Entretanto, observamos diferença significativa ($p<0,05$) do número de *rearings* entre os animais falso operados e isquemiados (nº de eventos: FO= 5,00± 1,23; ISQ= 1,50± 0,72) (Figura 13).

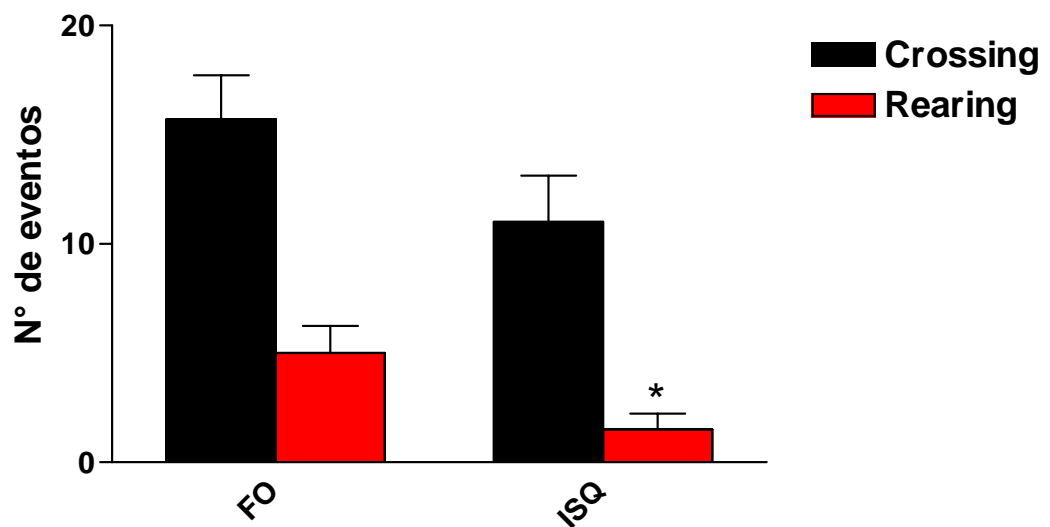


Figura 13 – Efeito da isquemia sobre a atividade locomotora

Nota: Os animais foram submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 minutos e 72h depois ao teste do campo aberto por 3 min. O número de cruzamentos (*crossings*) e *rearings* foi computado. * versus FO; $p<0,05$. Teste t não pareado.

5.1.3 Efeito da isquemia sobre a memória operacional (*working memory*)

A fim de se avaliar o comprometimento da memória operacional dos animais submetidos à isquemia, comparamos a percentagem de alterações espontâneas dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas (ISQ). Não observamos diferença significativa na memória de trabalho entre o grupo falso operado e isquemiado (FO= $70,16 \pm 5,77\%$; ISQ= $71,37 \pm 7,94\%$) (Figura 14).

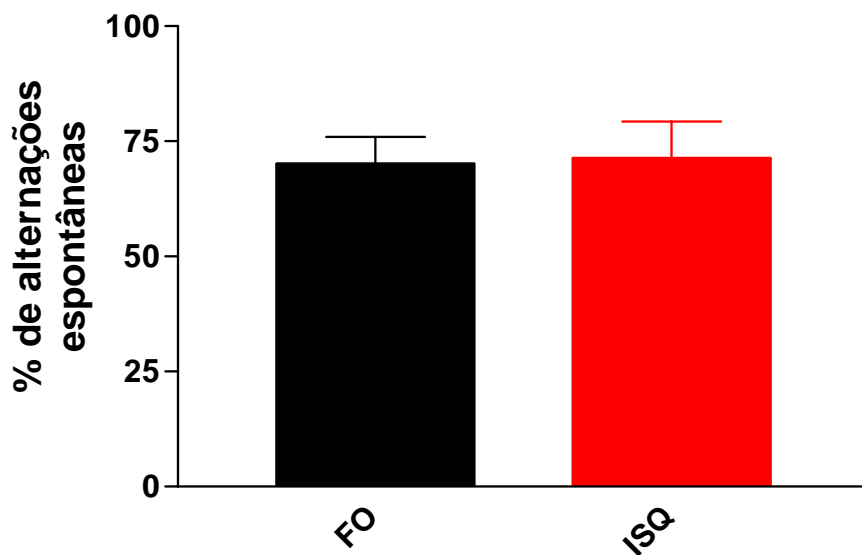


Figura 14 – Efeito da isquemia sobre a memória operacional

Nota: Os animais foram submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 minutos e 72h depois ao teste do labirinto em Y por 8 min. A percentagem de alterações espontâneas no labirinto foi analisada.

5.1.4 Efeito da isquemia sobre a memória aversiva de curto prazo

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de curto prazo dos animais submetidos à isquemia, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas (ISQ). Não observamos diferença significativa na memória de curto prazo entre o grupo falso operado e isquemiado (FO= $145,9 \pm 42,75s$; ISQ= $113,1 \pm 64,97s$) (Figura 15).

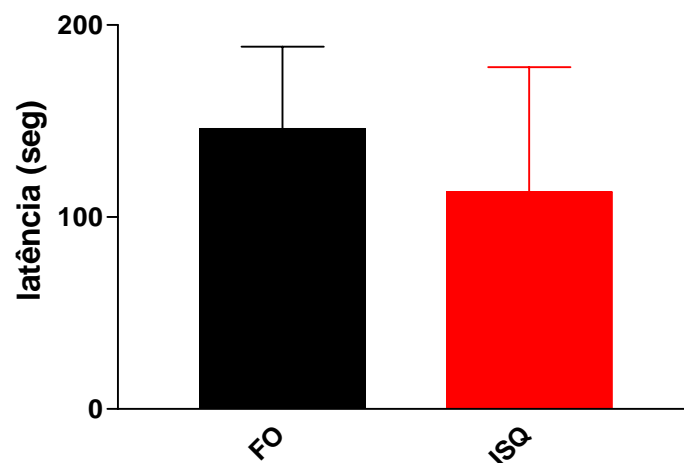


Figura 15 – Efeito da isquemia sobre a memória de curto prazo

Nota: Os animais foram submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 minutos e 72h depois ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um treino foi computado.

5.1.5 Efeito da isquemia sobre a memória aversiva de longa duração

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de longa duração dos animais submetidos à isquemia, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos à oclusão bilateral das carótidas (ISQ). Observamos um déficit significativo ($p < 0,05$) na memória de longa duração entre o grupo falso operado e isquemiado (FO= $271,2 \pm 17,61s$; ISQ= $108,4 \pm 67,64s$) (Figura 16).

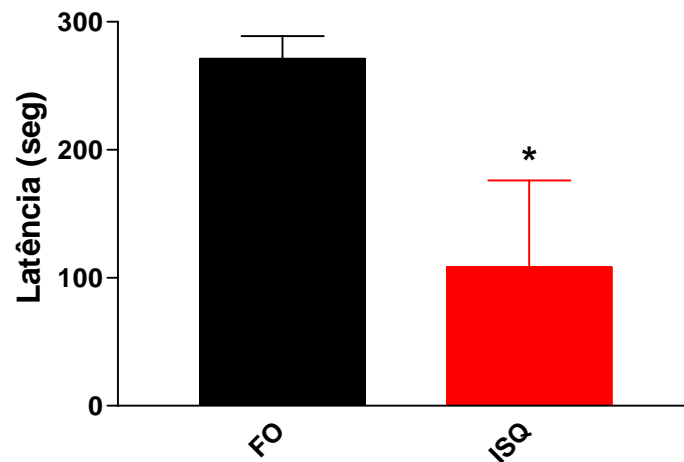


Figura 16 – Efeito da isquemia sobre a memória de longo prazo

Nota: Os animais foram submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 minutos e 72h depois ao teste da esquiva passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um condicionamento prévio (24h antes) foi computado. * versus FO; $p < 0,05$. Teste t não pareado.

5.2 Pré-condicionamento por estresse de contensão

5.2.1 Efeito do estresse de contensão sobre a viabilidade neuronal em ratos

Verificando se o estresse de imobilização, por si só, causa dano cerebral, avaliamos a percentagem do dano do grupo falso operado submetido ao estresse de contensão (FO+ST) e o grupo falso operado (FO). Como era esperado, não foi observada diferença significativa entre os grupos (% de dano: FO= $10,36 \pm 0,75\%$; FO+ST= $12,02 \pm 0,69\%$) (Figura 17).

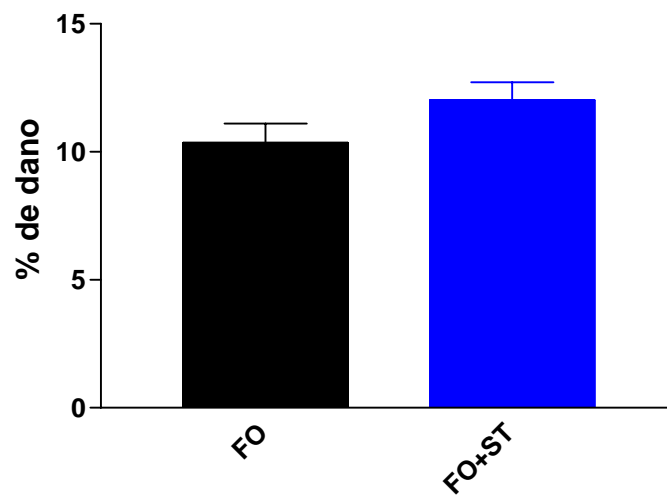


Figura 17 – Efeito do estresse de contensão sobre a viabilidade neuronal

Nota: Os animais foram submetidos ao estresse de imobilização por 2h e 24h depois tiveram seus cérebros seccionados e corados por TTC. O cálculo da percentagem do dano considera a área não corada (isquemiada) sobre a área total da seção.

5.2.2 Avaliação da neuroproteção induzida por estresse de contensão em ratos submetidos á isquemia cerebral transitória

A fim de se avaliar a neuroproteção do estresse de contensão na isquemia cerebral, avaliamos a percentagem do dano do grupo isquemiado (ISQ) e isquemiado pré-condicionado (ISQ+ST). Observamos uma inibição do dano isquêmico ($p < 0,05$) nos animais pré-condicionados (% de dano: FO= $10,36 \pm 0,75\%$; ISQ= $18,52 \pm 2,62\%$; ISQ+ST= $12,59 \pm 0,87\%$) (Figura 18).

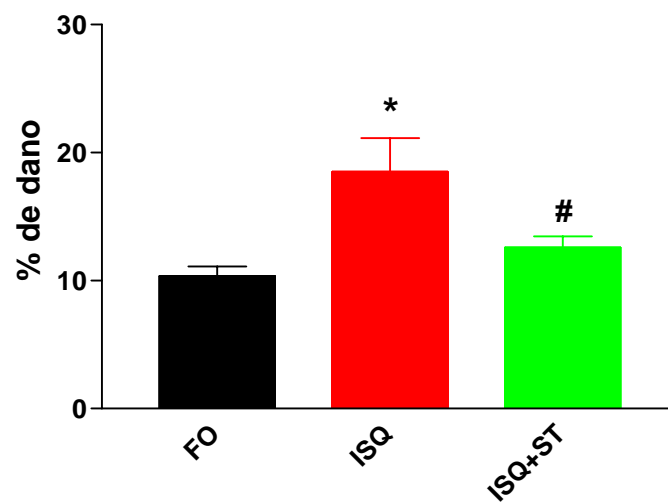


Figura 18 – Efeito neuroprotetor do estresse de contensão sobre o dano cerebral isquêmico

Nota: Os animais foram submetidos ao estresse de imobilização por 2h seguida de oclusão bilateral das carótidas do 30 min. 24h depois tiveram seus cérebros seccionados e corados por TTC. O cálculo da percentagem do dano considera a área não corada (isquemiada) sobre a área total da seção. * *versus* FO; # *versus* ISQ. $p < 0,05$. ANOVA e teste de Tukey.

5.2.3 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a atividade locomotora em ratos

A fim de se avaliar a repercussão do pré-condicionamento na atividade locomotora dos animais, comparamos a atividade exploratória horizontal (*crossing*) e vertical (*rearings*) dos animais falsos operados (FO) com os animais pré-condicionados (FO+ST). Não observamos diferença significativa nos comportamento de *crossing* (n° de eventos: FO= $15,71 \pm 2,02$; FO+ST= $16,22 \pm 2,79$) e *rearing* (n° de eventos: FO= $5,00 \pm 1,23$; FO+ST= $9,67 \pm 1,87$) (Figura 19).

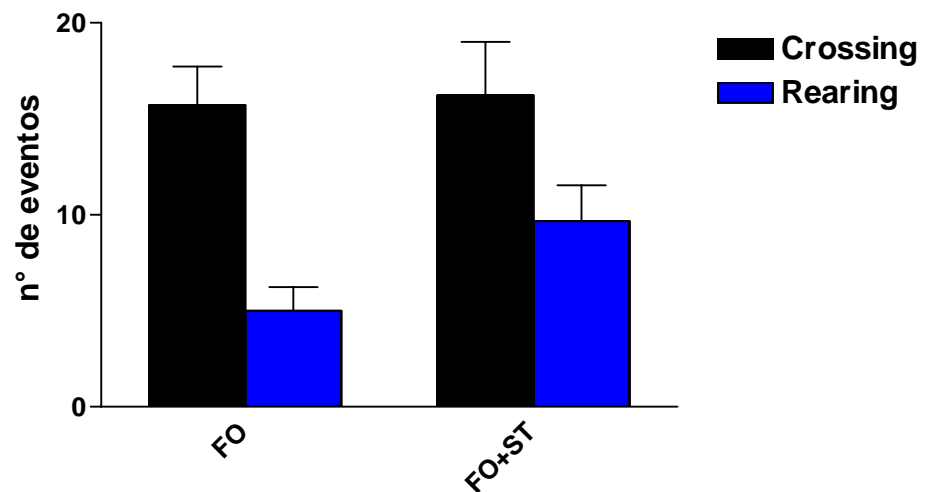


Figura 19 – Efeito do pré-condicionamento sobre a atividade locomotora

Nota: Os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 2h. 72h depois foram submetidos ao teste do campo aberto por 3 min. O número de cruzamentos e *rearings* foi avaliado.

5.2.4 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a atividade locomotora de animais isquemiados.

Uma vez constatado a alteração do comportamento de *rearing* nos animais isquemiados (Figura 13) comparamos a atividade exploratória horizontal (*crossing*) e vertical (*rearings*) dos animais falsos operados (FO), com os animais isquemiados (ISQ) e os animais pré-condicionados e isquemiados (ISQ+ST). Não observamos diferença significativa no comportamento de *crossing* (nº de eventos: FO= 15,71± 2,02; ISQ= 11,00± 2,13; ISQ+ST= 14,09±2,22). Entretanto, observamos que o estresse de contensão normalizou a diminuição do comportamento de *rearing* nos animais submetidos à isquemia (nº de eventos: FO= 5,00± 1,23; ISQ= 1,50± 0,72; ISQ+ST= 6,091± 1,443) (Figura 20).

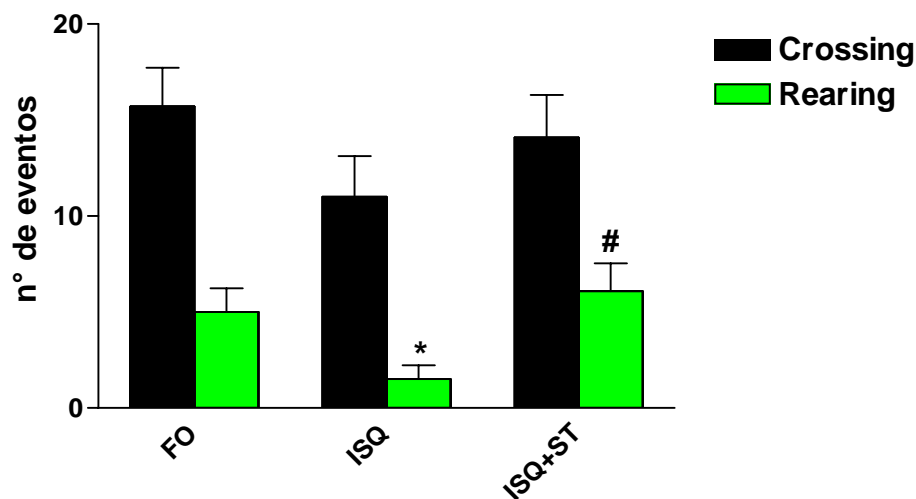


Figura 20 – Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a atividade locomotora em animais isquemiados

Nota: Os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 min. 72h depois foram submetidos ao teste do campo aberto por 3 min. O número de cruzamentos (*crossings*) e *rearings* foi avaliado. * *versus* FO; # *versus* ISQ, $p < 0,05$, ANOVA e teste de Tukey.

5.2.5 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a memória operacional (*working memory*)

A fim de se avaliar o comprometimento da memória operacional dos animais submetidos apenas ao pré-condicionamento, comparamos a porcentagem de alterações espontâneas dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos ao pré-condicionamento (FO+ST). Não observamos diferença significativa na memória de trabalho entre o grupo falso operado e isquemiado (FO= $70,16 \pm 5,77\%$; FO+ST = $69,17 \pm 2,67\%$) (Figura 21).

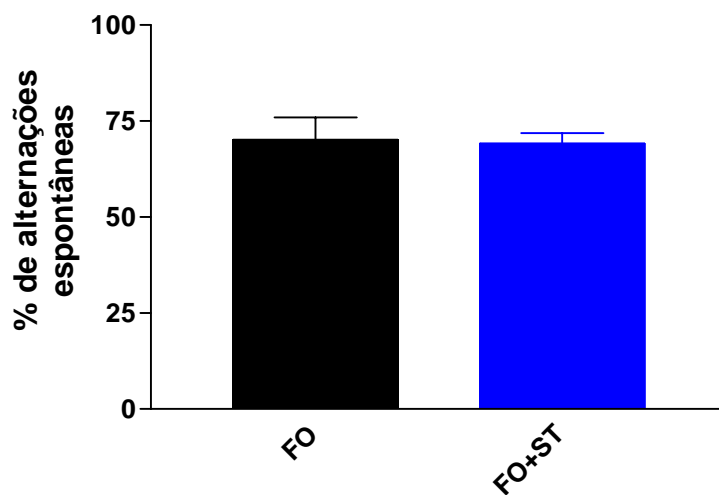


Figura 21 – Efeito do pré-condicionamento sobre a memória operacional

Nota: Os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e falso operados posteriormente. 72h depois foram submetidos ao teste do labirinto em Y por 8 min. O número de entradas em cada braço do labirinto foi computado.

5.2.6 Efeito do pré-condicionamento condicionamento por estresse de contensão sobre a memória aversiva de curto prazo

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de curto prazo dos animais submetidos ao pré-condicionamento, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos ao pré-condicionamento por estresse de contensão (FO+ST). Não observamos diferença significativa na memória de curto prazo entre o grupo falso operado e pré-condicionado (FO= $145,9 \pm 42,75s$; ISQ= $142,8 \pm 42,52s$) (Figura 22).

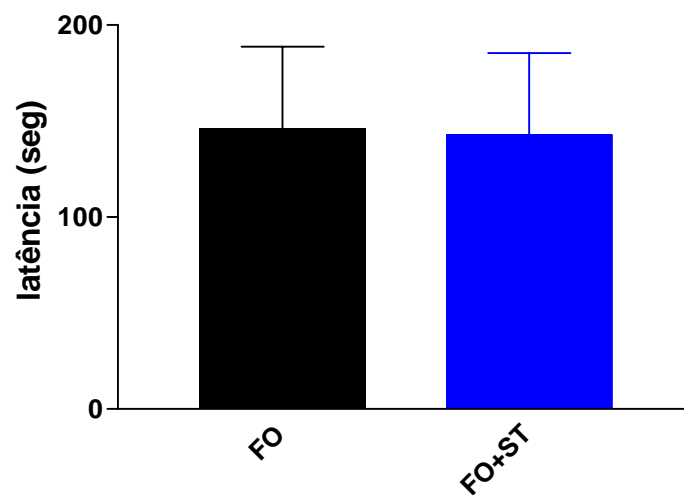


Figura 22 – Efeito do pré-condicionamento sobre a memória de curto prazo

Nota: Os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e falso operados posteriormente. 72h depois foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um treino foi avaliado.

5.2.7 Efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão sobre a memória aversiva de longa duração

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de longa duração dos animais submetidos apenas ao pré-condicionamento, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos ao pré-condicionamento (FO+ST). Não observamos diferença significativa na memória de longa duração entre o grupo falso operado e pré-condicionado (FO= $271,2 \pm 17,61$; FO+ST = $203,7 \pm 39,54$) (Figura 23).

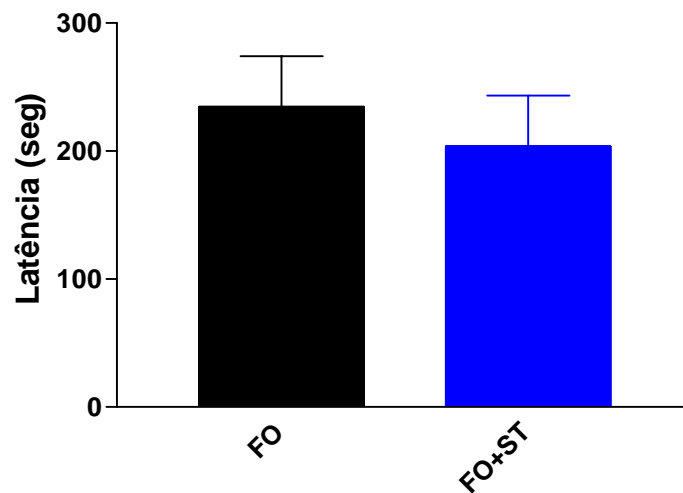


Figura 23 – Efeito do estresse sobre a memória de longo prazo

Nota: Os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 2h. 72h depois foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um condicionamento prévio (24h antes) foi avaliado.

5.2.8 Efeito do pré-condicionamento sobre a memória aversiva de longa duração em animais isquemiados

Considerando que a isquemia causa danos na memória aversiva de longa duração (Figura 16) avaliamos a ação do estresse sobre a isquemia comparando o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais isquemiados (ISQ) e os submetidos ao pré-condicionamento (ISQ+ST). Observamos uma tendência, porém não significativa, à melhora da memória aversiva no grupo pré-condicionado (FO= $271,2 \pm 17,61s$; ISQ= $108,4 \pm 67,64s$; ISQ+ST= $156,1 \pm 45,81s$) (Figura 24).

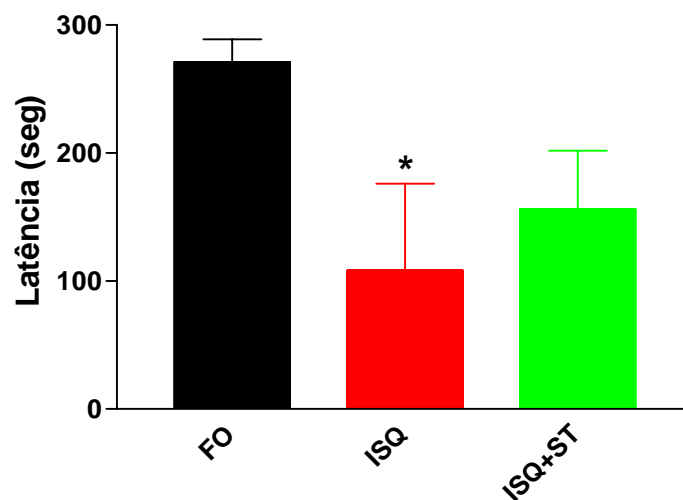


Figura 24 – Efeito do pré-condicionamento na memória aversiva de longa duração em animais isquemiados

Nota: Os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e operados posteriormente. 72h depois foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um condicionamento prévio (24h antes) foi avaliado, $p < 0,05$, Teste t de Student não pareado.

5.3 Ação do DPCPX, antagonista do receptor A₁ da adenosina

5.3.1 Avaliação efeito do DPCPX sobre a viabilidade neuronal em ratos através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC)

A fim de constatar se o DPCPX, por si só, causa dano cerebral, comparamos a percentagem de dano encontrado dentre os animais falsos operados (FO) com os animais submetidos ao pré-tratamento com DPCPX, nas doses de 0,1 e 1 mg/kg (FO+DPCPX 0,1; FO+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa entre os animais controle e as duas doses de DPCPX (FO= $10,36 \pm 0,75\%$; FO+DPCPX 0,1= $9,38 \pm 1,00\%$; FO+DPCPX 1= $10,26 \pm 0,66\%$) (Figura 25).

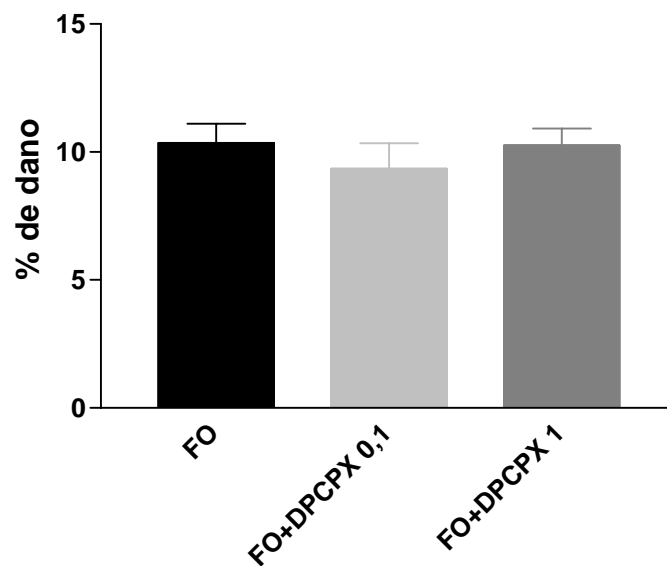


Figura 25 – Efeito do tratamento com DPCPX sobre o dano cerebral

Nota: Os animais foram pré-tratados com DPCPX nas doses de 0,1 e 1 mg/kg intraperitonealmente e 24h depois tiveram seus cérebros seccionados e corados por TTC. O cálculo da percentagem do dano foi feito considerando-se a área não corada (isquemiada) sobre a área total da seção.

5.3.2 Reversão da neuroproteção induzida por estresse de contensão pelo DPCPX

A fim de avaliar se a neuroproteção induzida por estresse de contensão está relacionada à ativação dos receptores A₁ da adenosina, utilizamos o antagonista A₁, DPCPX para bloquear este efeito. Não observamos alteração com a menor dose (0,1mg/kg), entretanto foi verificado um bloqueio significativo deste efeito neuroprotetor no grupo pré-tratado com DPCPX na dose de 1mg/kg (FO= 10,36±0,75%; ISQ= 18,52 ± 2,62%; ISQ+ST= 12,59 ± 0,87%; ISQ+ST+DPCPX 0,1 = 7,36 ± 2,03% e ISQ+ST+DPCPX 1= 19,95 ± 3,38%) (Figura 26).

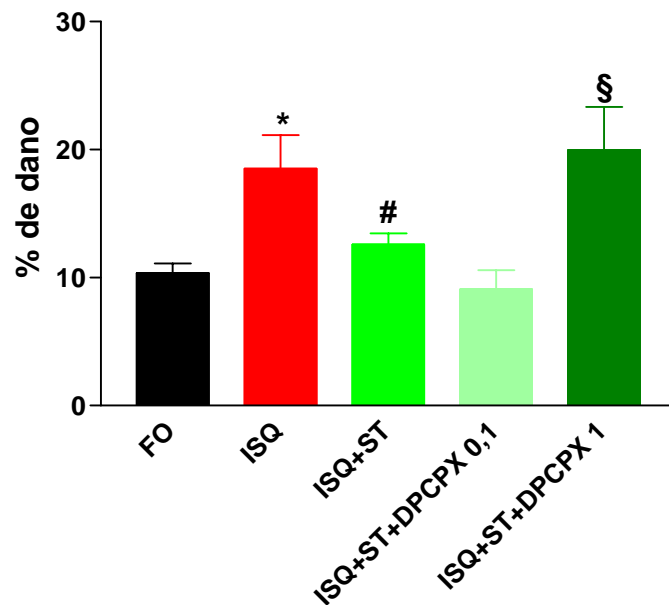


Figura 26 – Efeito do DPCPX na neuroproteção do estresse de contensão

Nota: Os animais foram pré-tratado com DPCPX intraperitoneal nas doses de 0,1 e 1 mg/kg, submetidos ao estresse de imobilização por 2h seguida de oclusão bilateral das carótidas por 30 min. 24h depois tiveram seus cérebros seccionados e corados por TTC. O cálculo da percentagem do dano considera a área não corada (isquemiada) sobre a área total da seção. * *versus* FO; # *versus* ISQ, § *versus* ISQ+ST, p<0,05. ANOVA e teste de Tukey

5.3.3. Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a viabilidade neuronal

A fim de constatar se a administração de DPCPX junto com o estresse de contensão, causam dano cerebral, mascarando os resultados obtidos no subitem anterior (Figura 26) comparamos a percentagem de dano encontrado dentre os animais falsos operados (FO) com os animais submetidos ao pré-tratamento com DPCPX nas doses de 0,1 e 1 mg/kg e pré-condicionados (FO+ST+DPCPX 0,1; FO+ST+DPCPX 1). Não foi observada diferença significativa entre os grupos (FO= $10,36 \pm 0,75\%$; FO+ST+DPCPX 0,1 = $9,56 \pm 1,75$; FO+ST+DPCPX 1= $12,24 \pm 0,88$) (Figura 27).

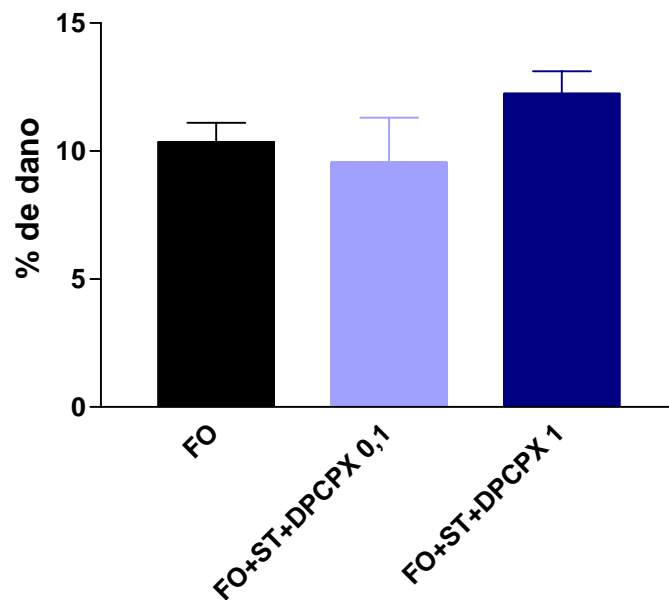


Figura 27 – Efeito do tratamento com DPCPX e estresse de contensão sobre a viabilidade neuronal

Nota: Os animais foram pré-tratados com DPCPX nas doses de 0,1 e 1 mg/kg intraperitonealmente e em seguida submetidos ao estresse de imobilização por 2h. 24h depois tiveram seus cérebros seccionados e corados por TTC. O cálculo da percentagem do dano foi feito considerando-se a área não corada (isquemiada) sobre a área total da seção.

5.3.4. Áreas cerebrais afetadas pela isquemia e efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão e do DPCPX

Os danos cerebrais desse modelo isquêmico aconteceram principalmente no córtex, hipocampo e estriato. O efeito protetor do pré-condicionamento por estresse de contensão e a reversão dessa proteção por DPCPX na dose de 1mg/kg ocorreram mais pronunciadamente à nível de hipocampo(Figura 28) que do estriato (Figura 29).

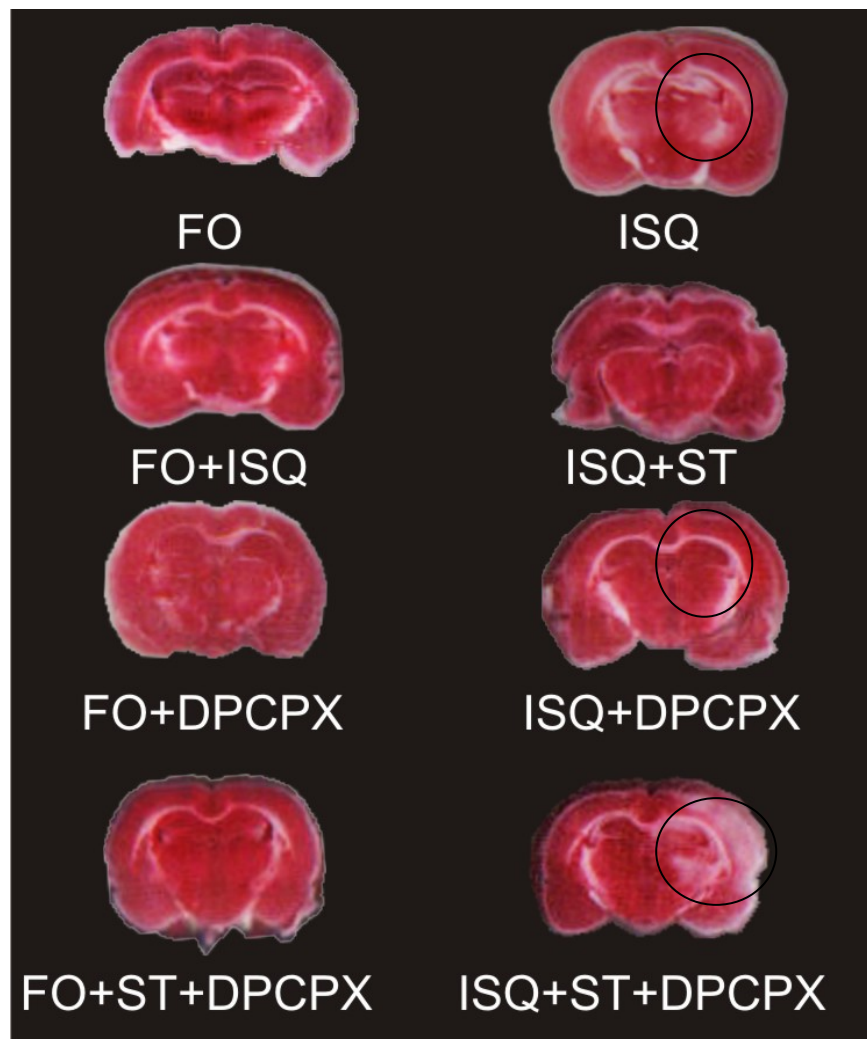


Figura 28 – Área hipocampal afetada pela isquemia e efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão e do DPCPX

Nota: Quantificação do dano isquêmico através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC). Corte à nível do hipocampo. Tratamento com DPCPX na dose de 1mg/kg.

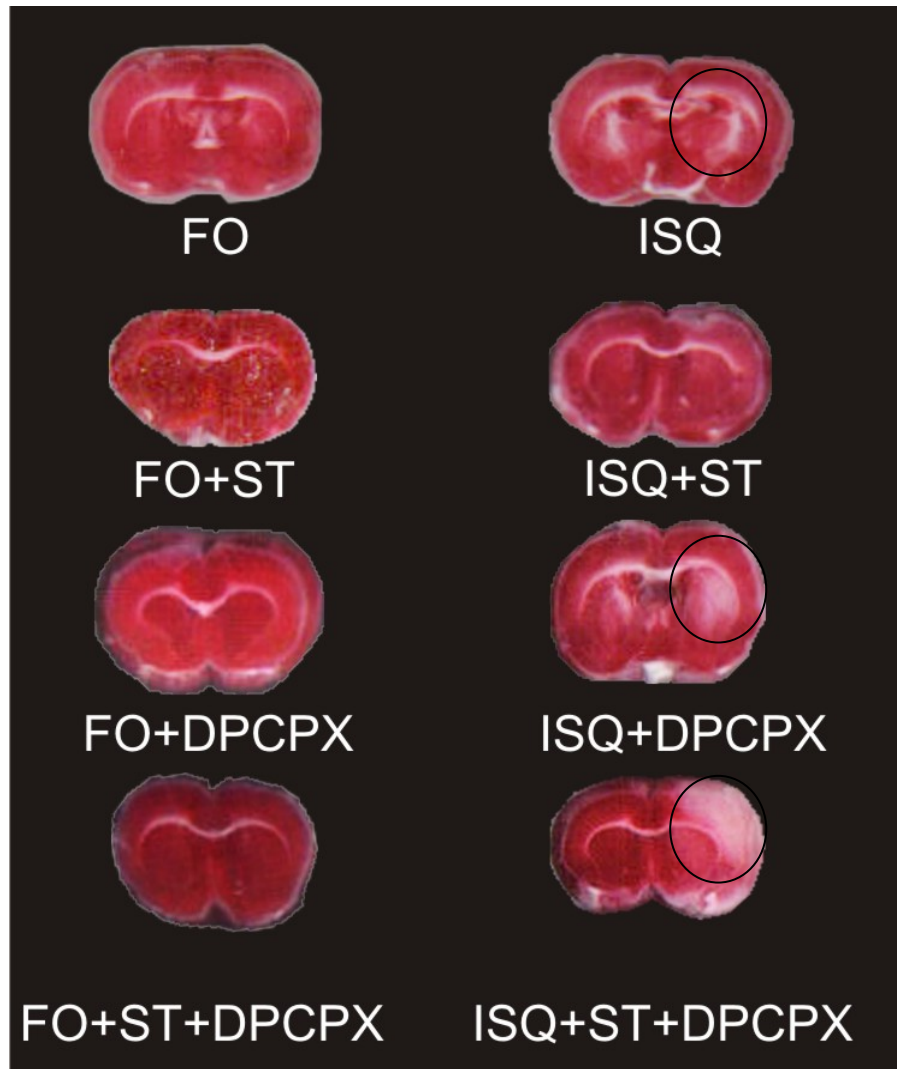


Figura 29 - Área estriatal afetada pela isquemia e efeito do pré-condicionamento por estresse de contensão e do DPCPX

Nota: Quantificação do dano isquêmico através da coloração com Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC). Corte à nível do estriato. Tratamento com DPCPX na dose de 1mg/kg.

5.3.5 Efeito do DPCPX sobre a atividade locomotora

A fim de se avaliar a consequência da administração de DPCPX na atividade locomotora dos animais, comparamos a atividade exploratória horizontal (*crossing*) e vertical (*rearings*) dos animais falsos operados (FO) com os animais pré-tratados na dose de 1mg/kg (FO+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa nos comportamento de *crossing* (nº de eventos: FO= $15,71 \pm 2,02$; FO+DPCPX 1= $17,67 \pm 2,375$) e *rearing* (nº de eventos: FO= $5,00 \pm 1,23$; FO+DPCPX 1= $8,55 \pm 1,65$) (Figura 30).

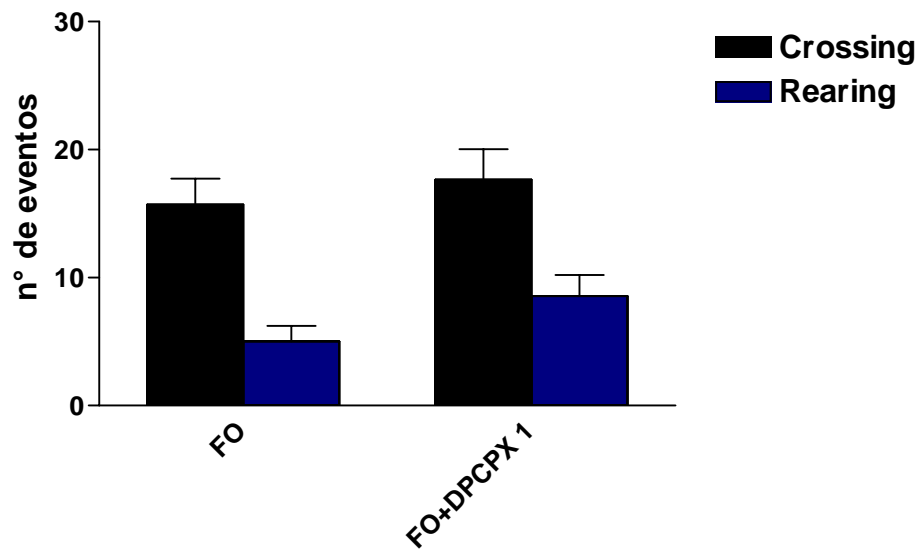


Figura 30 – Efeito do DPCPX sobre a atividade locomotora

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal. 72h depois foram submetidos ao teste do campo aberto por 3 min. O número de cruzamentos (*crossings*) e *rearings* foi avaliado.

5.3.6 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento na atividade locomotora de animais isquemiados

Uma vez constatado a diminuição do comportamento de *rearing* nos animais isquemiados (Figura 13) e sua normalização pelo pré-condicionamento (Figura 20) comparamos a atividade exploratória horizontal (*crossing*) e vertical (*rearings*) dos animais pré-condicionados isquemiados não tratados (ISQ+ST) e tratados com DPCPX (ISQ+ST+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa no comportamento de *crossing* (FO= $15,71 \pm 2,02$; ISQ= $11,00 \pm 2,13$; ISQ+ST= $14,09 \pm 2,22$; ISQ+ST+DPCPX 1= $1,80 \pm 2,30$), no *rearing* observamos uma tendência ao bloqueio do efeito do pré-condicionamento, porém não significativa (nº de eventos: ISQ+ST= $6,091 \pm 1,443$; ISQ+ST+DPCPX 1= $3,20 \pm 0,90$) (Figura 31).

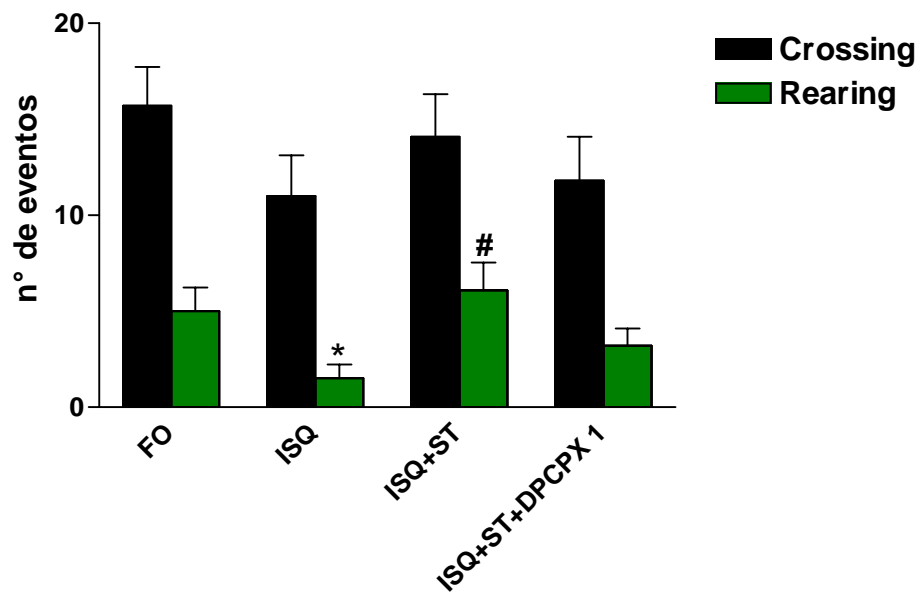


Figura 31 – Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a atividade locomotora de animais isquemiados

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal, pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 min. 72h depois foram submetidos ao teste do campo aberto por 3 min. O número de cruzamentos (*crossings*) e *rearings* foi avaliado. * *versus* FO, # *versus* ISQ, $p < 0,05$. ANOVA.e teste de Tukey.

5.3.7 Efeito do DPCPX sobre a memória operacional (*working memory*)

A fim de se avaliar o comprometimento da memória operacional dos animais tratados com DPCPX, comparamos a percentagem de alterações espontâneas dos animais falsos operados (FO) com os animais tratados com DPCPX (FO+DPCPX). Não observamos diferença significativa na memória de trabalho entre o grupo falso operado e isquemiado (FO= $70,16 \pm 5,77\%$; FO+DPCPX = $68,70 \pm 3,12\%$) (Figura 32).

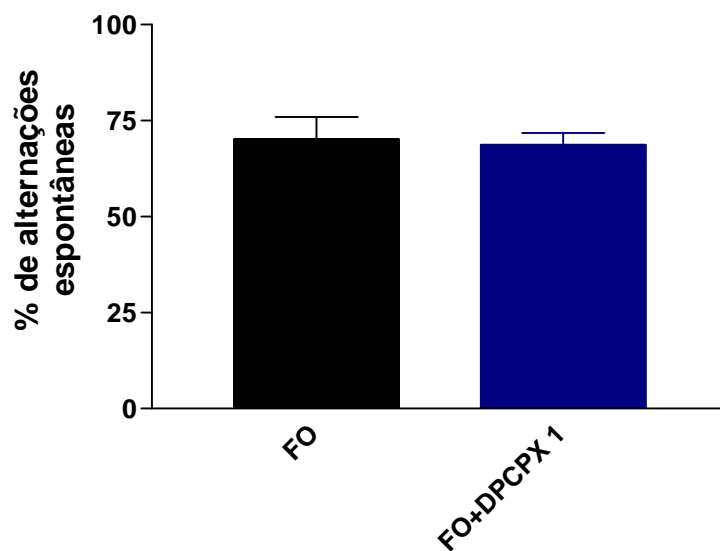


Figura 32 – Efeito do DPCPX sobre a memória operacional

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal.. 72h depois foram submetidos ao teste do labirinto em Y por 8 min. A percentagem de alterações espontâneas foi avaliada.

5.3.8 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória operacional (*working memory*) de animais isquemiados

A fim de se avaliar o comprometimento da memória operacional dos animais tratados com DPCPX e sua interação com o pré-condicionamento e a isquemia, comparamos a percentagem de alterações espontâneas dos animais falsos operados (FO), com animais isquemiados (ISQ), animais pré-condicionados isquemiados não tratados (ISQ+ST) e tratados com DPCPX (ISQ+ST+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa na memória de trabalho entre os grupos (FO= $70,16 \pm 5,77\%$; ISQ= $71,37 \pm 7,94\%$; ISQ+ST= $60,58 \pm 2,72\%$; ISQ+ST+DPCPX 1= $67,22 \pm 7,50\%$) (Figura 33).

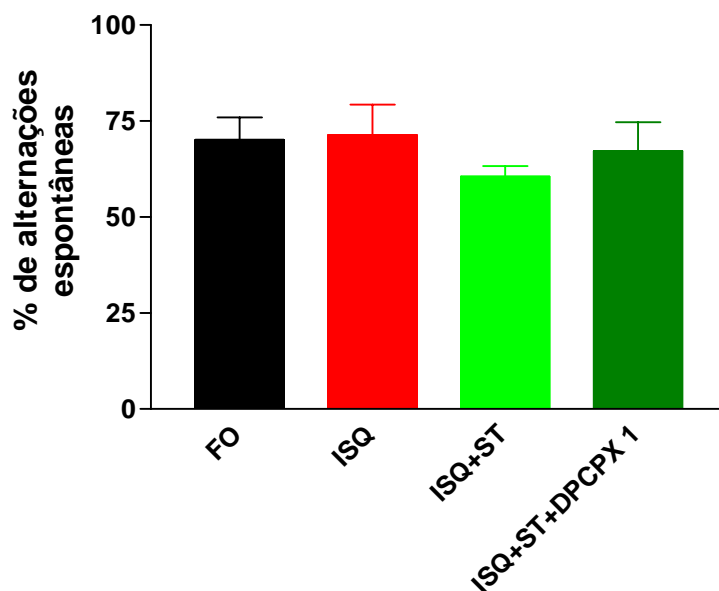


Figura 33 – Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória operacional de animais isquemiados

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal, pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 min. 72h depois foram submetidos ao teste do labirinto em Y por 8 min. A percentagem de alterações espontâneas foi avaliada.

5.3.9 Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de curto prazo

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de curto prazo dos animais tratados com DPCPX, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais pré-tratados com DPCPX (FO+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa na memória de curto prazo entre o grupo falso operado e isquemiado (FO= $145,9 \pm 42,75s$; FO+DPCPX 1= $81,88 \pm 41,30s$) (Figura 34).

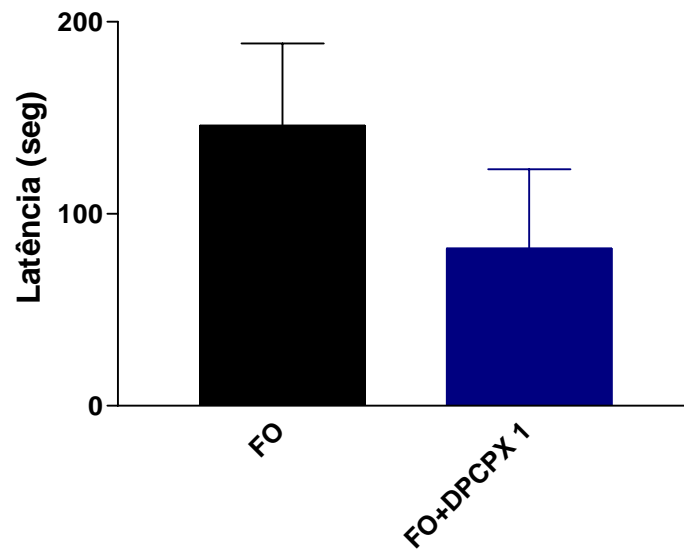


Figura 34 – Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de curto prazo

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal e falsos operados posteriormente. 72h depois foram submetidos ao teste da esquiiva passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um treino foi avaliado.

5.3.10 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória aversiva de curto prazo de animais isquemiados

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de curto prazo dos animais tratados com DPCPX e sua interação com o pré-condicionamento e a isquemia, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO), com animais isquemiados (ISQ), animais pré-condicionados isquemiados não tratados (ISQ+ST) e tratados com DPCPX (ISQ+ST+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa na memória de trabalho entre os grupos (FO= $145,90 \pm 42,75s$; ISQ= $113,1 \pm 64,97s$; ISQ+ST= $86,01 \pm 40,58s$; ISQ+ST+DPCPX 1= $143,8 \pm 47,47s$) (Figura 35).

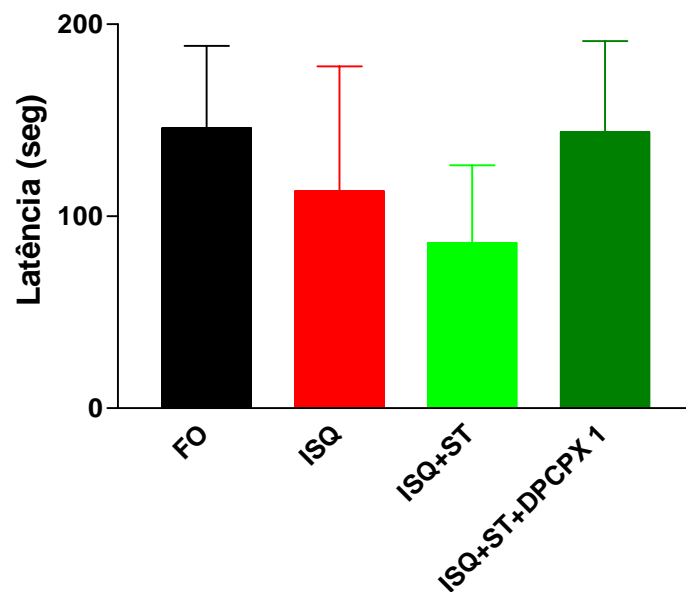


Figura 35 – Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória de curto prazo de animais isquemiados

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal, pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 min. 72h depois foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um treino foi avaliado.

5.3.11 Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de longa duração

A fim de se avaliar o comprometimento da memória aversiva de longa duração dos animais tratados com DPCPX, comparamos o tempo da entrada no compartimento escuro (latência) dos animais falsos operados (FO) com os animais submetidos ao tratamento com DPCPX na dose de 1mg/kg (FO+DPCPX 1). Não observamos diferença significativa na memória de longa duração entre o grupo falso operado e tratado (FO= $271,2 \pm 17,61s$; FO+DPCPX 1= $161,1 \pm 49,02s$) (Figura 36).

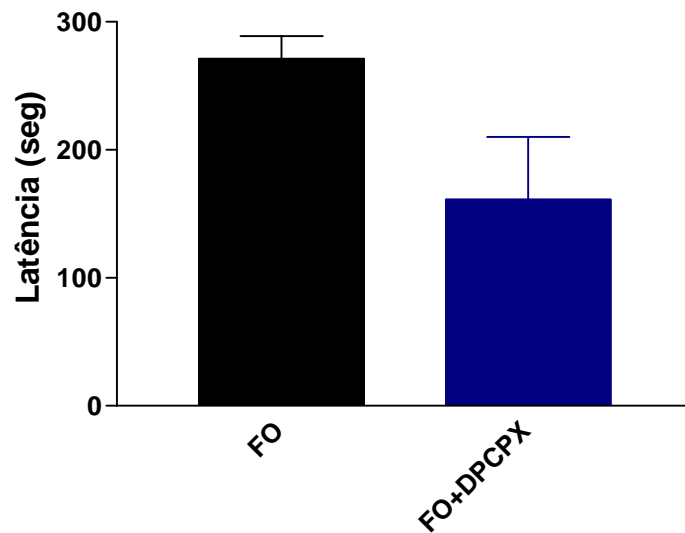


Figura 36 – Efeito do DPCPX sobre a memória aversiva de longo prazo

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal.. 72h depois foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um condicionamento prévio (24h antes) foi avaliado.

5.3.12 Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória aversiva de longa duração de animais isquemiados

A fim de se avaliar se os animais tratados com DPCPX apresentavam uma reversão nos efeitos do pré-condicionamento, comparamos o tempo da entrada do animal no compartimento escuro (latência) dos animais pré-condicionados isquemiados não tratados (ISQ+ST) e tratados com DPCPX (ISQ+ST+DPCPX 1). Já tínhamos observado que o pré-condicionamento tinha uma tendência a melhorar os déficits de memória nos animais isquemiados, neste caso, observamos também uma tendência à reversão dos efeitos do pré-condicionamento pelo DPCPX, mas esta diferença não foi significativa (FO= $271,2 \pm 17,61s$; ISQ= $108,4 \pm 67,64s$; ISQ+ST= $156,1 \pm 45,81s$; ISQ+ST+DPCPX 1= $88,61 \pm 38,83s$) (Figura 37).

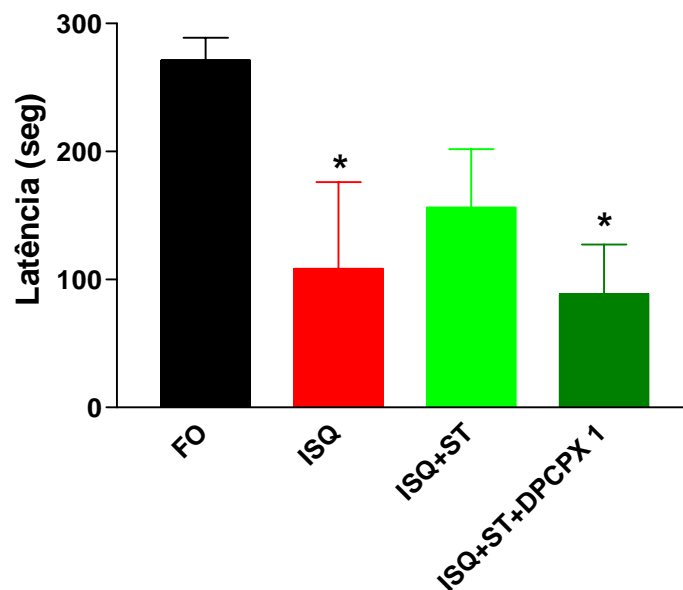


Figura 37 – Efeito do DPCPX e pré-condicionamento sobre a memória aversiva de longo prazo de animais isquemiados

Nota: Os animais foram pré-tratados com 1mg/kg de DPCPX intraperitoneal, pré-condicionados por estresse de contensão por 2h e submetidos à oclusão bilateral das carótidas por 30 min. 72h depois foram submetidos ao teste da esQUIVA passiva. O tempo da entrada do animal (latência) no compartimento escuro após um condicionamento prévio (24h antes) foi avaliado. * *versus* FO. $p < 0,05$. ANOVA e teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

O acidente vascular cerebral (AVC), doença incapacitante e terceira causa de morte em países desenvolvidos como os Estados Unidos, caracterizada pela interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro capaz de causar alteração na função cerebral, é uma enfermidade de grande peso social nos tempos modernos. O estudo dessa patologia busca através de todos os ramos das ciências biológicas meios de minimizar, reverter ou mesmo proteger das conseqüências danosas desse mal. A doença é classificada em dois principais grupos (isquêmico e hemorrágico). O AVC, no corrente ano, nos EUA, atingiu 780.000 pessoas e destas 170.000 pessoas foram a óbito (ROSAMOND *et al.*, 2008; CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). Longe de serem apenas números, as vítimas de AVC por vezes ficam incapacitadas, incapazes de desempenhar as atividades mais simples do dia a dia, como se alimentar ou tomar banho de forma independente. Algumas permanecem durante anos acamadas sob o diuturno cuidado de um familiar, o que leva, não apenas o enfermo, mas toda uma família a níveis lastimáveis de qualidade de vida. Estimativas de 2002 apontam que 5,4 milhões de pessoas sobreviveram a um AVC, entretanto 15 a 30% destas ficaram permanentemente incapacitadas (HOWARD, 2005). Assim, este trabalho objetivou trazer mais um esclarecimento no entendimento nos mecanismos envolvidos nesta patologia, particularmente para o tipo de AVC isquêmico.

O tecido cerebral é extremamente sensível à isquemia e até mesmo um breve evento isquêmico pode iniciar uma complexa seqüência de eventos que finalmente culmina na morte neuronal (SMITH, 2004). Os achados desse trabalho corroboram com a sensibilidade do tecido cerebral a isquemia, uma vez que o modelo utilizado de oclusão bilateral das carótidas (2-VO) com controle de temperatura por 30 minutos acarretou morte celular em aproximadamente 18,52% da área total cerebral. Utilizando o modelo de oclusão da artéria cerebral média (CMAO), Akaiwa *et al.* (2006), obtiveram 44,8% de taxa de infarto 72h após a isquemia enquanto que Rui Liu *et al.* (2008), obtiveram volume de infarto de 41,24%, 24h horas após 2h de isquemia.

O modelo de oclusão de 2 vasos (2-VO) proposto por Eklöf e Siesjö (1972) e modificado por Smith *et al.* (1984) sem indução de hipotensão sistêmica, o qual se baseou este trabalho, tem sido descrito como fraco redutor do fluxo sanguíneo cerebral e ineficaz para comprometer o *status* energético cerebral (ULRICH *et al.*, 1998). Nossos achados mostraram

pouco dano cerebral quando se compara com outros modelos mais agressivos como o CMAO ou 4-VO. O modelo, apesar de causar pouco dano cerebral, parecer ser viável para estudos crônicos por oferecer uma baixa taxa de mortalidade após a cirurgia (ULRICH *et al.*, 1998) e no presente trabalho se mostrou eficiente inclusive para estudo agudo.

O teste do campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934), para se analisar o estado emocional em ratos. O teste do campo aberto neste trabalho foi baseado no modelo proposto por Broadhurst (1957) e foi utilizado no intuito de aferir a capacidade locomotora dos animais. Uma vez que os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico, vieses poderiam surgir em outros testes (como no labirinto em Y, ou esquiva passiva) caso o animal tivesse sua capacidade locomotora afetada. O presente trabalho não encontrou diferenças significativas no número de cruzamentos efetuados pelos os animais submetidos à isquemia. Yan *et al.* (2007), mostraram um aumento significativo no número de cruzamentos em campo aberto em animais isquemiados pelo modelo 4-VO, porém não relata as condições de luminosidade no momento do teste, o que interfere diretamente no comportamento dos animais isquemiados, como ressalta Milot e Plamondon (2008). Em nosso teste, baixa luminosidade foi utilizada.

Além disso, durante o teste do campo aberto, não só os movimentos de exploração horizontal (*crossings*), mas também os movimentos de exploração vertical (*rearings*) foram monitorados. Este trabalho apontou uma diminuição da atividade exploratória no comportamento de *rearing* em animais isquemiados. Wang *et al.* (2007), utilizando um modelo de depressão pós-isquemia também observaram a diminuição no número de *rearing* mesmo 19 dias após a oclusão permanente da artéria cerebral média. Milot e Plamondon (2008), mostraram que a reação de animais isquemiados no teste do campo aberto está diretamente relacionada ao nível de luminosidade a que os animais estão expostos. Quando expostos a um ambiente bem iluminado (450 lux), os ratos têm sua atividade locomotora aumentada enquanto que em um ambiente pouco iluminado (40 lux) esses animais têm uma redução em suas atividades, corroborando com nossos achados. Kadam *et al.* (2008), relatam que camundongos neonatais submetidos à ligação unilateral permanente da carótida têm uma diminuição de atividade no teste do campo aberto. Já Ramos-Zúñiga *et al.* (2008) mostraram uma direta relação entre o dano cerebral e o aumento de atividade no teste de campo aberto em *gerbils*. Plamondon *et al.* (2008), teve como achado o aumento da atividade em animais submetidos à isquemia. Contrastando com alguns autores que utilizaram teste do campo aberto com alta luminosidade, o comportamento de *rearing* dos animais isquemiados sofreu redução no teste do campo aberto com baixa luminosidade.

A memória operacional, também conhecida por memória de procedimento ou de trabalho, é caracterizada por um armazenamento temporário de informação utilizado para o planejamento de uma ação futura. O conceito de memória de trabalho é teoria central no estudo da cognição humana, visto que é memória essencial para as habilidades humanas de compreensão e dedução. A memória operacional inicialmente era dividida em duas partes: um conjunto de memórias que temporariamente armazenavam informações áudios-visuais e espaciais; e um centro executivo responsável por vários cálculos como aritmética. Posteriormente, exames de tomografia por emissão de pósitron, em humanos, apontaram o córtex frontal, pré-motor, parietal e occipital como áreas ativas em testes de memória operacional (JONIDES *et al.*, 1993). Segundo Brioni (1993), o septo medial e hipocampo parecem ter papel fundamental na memória operacional. Neste trabalho, o dano cerebral concentrou-se em três principais áreas cerebrais (estriato, hipocampo e córtex) o que não afetou a memória operacional dos animais. Kim *et al.* (2008), fazendo uso do modelo de isquemia por oclusão dos 4 vasos (4-VO) por 10 minutos obteve déficit de memória no teste de labirinto em Y mesmo quatro dias após o evento isquêmico o que contrasta com nossos achados. Porém, o modelo 4-VO é certamente mais lesivo o que justifica seus achados em detrimento deste trabalho. Os danos na memória encontrados por Ulrich *et al.* (1998) em modelo 2-VO foram principalmente observados 24h após a oclusão das carótidas e tiveram clara redução uma semana após o procedimento cirúrgico. Plamondon *et al.* (2008), citam que os danos da isquemia em ratos afetam principalmente a memória espacial (relacionada ao hipocampo). Downden e Corbett (1999), relatam que mesmo havendo um dano neuronal na região CA1 do hipocampo, eventualmente os animais mostram reações normais provavelmente pela compensação por outras áreas cerebrais.

O presente estudo constatou significativos danos na memória aversiva de longa duração após o procedimento isquêmico, entretanto sem acarretar prejuízo na memória aversiva de curta duração. Maia *et al.* (2004), também observaram dano na memória aversiva de longa duração sem afetar a memória de curto prazo. Danos na memória de curta duração e na aquisição de nova informação geralmente estão relacionados ao dano bilateral no hipocampo (MILNER, 1978; WOODS; SCHOENE; KNEISLEY, 1982) enquanto que o déficit na memória de longo prazo parece estar envolvido com dano na região cortical mais especificamente no neocórtex temporal (CARDOSO, 2008). Nossos achados apontam dano tanto hipocampal como cortical, corroborando com a localização anatômica da memória de longa duração.

O conceito de pré-condicionamento foi introduzido na década de oitenta para o pré-condicionamento isquêmico nos trabalhos dos grupos de Murry, Miyazaki e Zipes. A idéia preconiza que uma breve mudança subcrítica isquêmica poderia mobilizar mecanismos protetores intrínsecos que aumentariam a tolerância contra a isquemia crítica subsequente (STEIGER; HÄNGGI, 2007). Para os diversos tipos de pré-condicionamento até o momento conhecido (isquemia, hipóxia, hipoglicemia, glutamato, etc.), Heurteaux *et al.* (1995), relataram o papel dos receptores A₁ da adenosina e dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP.

O termo estresse, do inglês *stress*, foi inicialmente empregado no campo científico pela engenharia para descrever a força capaz de exercer uma deformação física em determinada estrutura. Já na área biológica, é definida como qualquer condição que perturbe substancialmente a homeostase fisiológica ou psicológica de um organismo (KIM; DIAMOND, 2002). As primeiras conseqüências fisiológicas do estresse foram descritas por Hans e Selye em trabalho datado de 1936 intitulado: “*A syndrome produced by diverse noxious agents*” A síndrome produzida por diversos agentes nocivos (livre tradução). Pesquisas subsequentes mostraram uma infinidade de alterações fisiológicas causadas por estresse tanto em humanos como em animais. Assim, nas últimas décadas, uma importante linha de pesquisa na neurociência vem aprofundando a repercussão do estresse sobre as funções cerebrais.

Em nosso trabalho, o pré-condicionamento por estresse de imobilização agudo, por si só, não causou dano cerebral. O estresse já é bem relatado como causa de perda neuronal e atrofia hipocampal tanto em humanos como em roedores (UNO *et al.*, 1989; SHELINE *et al.*, 1996) e capaz de induzir falhas cognitivas em roedores (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; MAGARIÑOS; VERDUGO; MCEWEN, 1997), entretanto esses achados não abordam o aspecto agudo do estresse utilizado neste trabalho. Utilizaram-se de modelos de estresse crônico ou subcrônico, onde a persistência do evento estressor leva a mudanças cerebrais que possibilitam a neurodegeneração. Várias são essas mudanças, dentre elas podemos citar o aumento da glândula adrenal e o aumento da atividade do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal. A nível sistêmico ainda é encontrada alterações no sistema imune, supressão do sistema imune com atrofia do timo e linfonodos, no sistema vascular, aumento do tônus cardiovascular e o aparecimento de úlceras (KIM; DIAMOND, 2002). No caso do estresse agudo, método utilizado neste trabalho, a principal alteração hormonal se dá na elevação dos níveis de cortisol, o que não é observado no estresse crônico (BISAGNO *et al.*, 2004).

O presente trabalho não encontrou diferenças significativas no número de cruzamentos efetuados pelos os animais submetidos ao pré-condicionamento por estresse de contensão. Daniels *et al.* (2008), também não observaram alterações no número de *crossing* de animais submetidos ao estresse agudo (1 dia) ou sub-crônico (5 dias) por choque-elétrico aleatório (unpredicted electric foot shock- UEFS). Em relação à exploração vertical por *rearing*, o estresse de contensão, de forma isolada, não alterou o comportamento dos animais. Daniels *et al.* (2008), não observaram alteração no número de *rearing* de animais submetidos ao estresse agudo (1 dia), apenas no grupo submetido ao estresse sub-crônico (5 dias) por UEFS.

Nenhum dano significativo na memória de curta duração, de longa duração ou na memória operacional foi observado nos animais submetidos apenas ao estresse de contensão agudo. Os danos na memória relatados em farta literatura remetem ao estresse na sua forma crônica onde o aumento de cortisol e sua ação massiva sobre os receptores glicocorticóides tipo II, extremamente abundantes no hipocampo afetam negativamente o metabolismo neuronal, a sobrevivência celular, as funções fisiológicas e morfologia neuronal, com consequência danosa na memória e aprendizado (KIM; DIAMOND, 2002).

As áreas cerebrais danificadas pela oclusão bilateral das carótidas (hipocampo, estriato e córtex) fora preservadas no grupo pré-tratado com estresse de contensão, o que nos leva a crer que o evento estressor prévio desencadeou mudanças bioquímicas que promoveram uma neuroproteção cerebral. Esse achado contrasta com o trabalho de Fontella *et al.* (2005), onde o prévio estresse de contensão exacerbou o dano neuronal em cultura de célula exposta à privação de oxigênio e glicose. Segundo Fontella (2005), o estresse de contensão agudo ou intermitente utilizado em seu estudo induziu diferentes graus de susceptibilidade do tecido cerebral à privação de glicose e oxigênio posterior. A própria autora relata que o estresse de contensão de forma aguda (por 1h) não interferiu com os efeitos da exposição à privação de oxigênio e glicose imediatamente ou 24h após o estresse de contensão, período de tempo que coincide com nossos achados. Já os animais submetidos ao estresse de contensão repetida vezes apresentaram uma alta sensibilidade à privação de oxigênio e glicose. Ainda, segundo Fontella (2005), o estresse sub-crônico reduz os níveis de corticosterona aumentado por um único episódio de estresse. Enquanto ratos imobilizados de forma aguda (1h) apresentam aumento de 216% nos níveis plasmáticos de corticosterona, ratos com 40 dias de imobilização têm um aumento de apenas 50% quando comparado com animais controle. Torres *et al.* (2001), relatam que os níveis de corticosterona retornam a normalidade 24h após o fim da contensão dos animais. Madrigal *et al.* (2003), mostraram uma

exacerbação do dano isquêmico induzido por oclusão permanente da artéria cerebral média (*permanent middle cerebral artery occlusion -MCAO*) quando os animais foram pré-condicionados por estresse de contensão por 7 dias, 1h/dia e observaram uma neuroproteção do mesmo estresse quando aplicado de forma crônica 6h/dia, 21 dias. Assim, a influência do estresse de contensão sobre a isquemia parece variar com a intensidade e duração da contensão, ora protegendo como no caso agudo demonstrado nesse trabalho (1h, 1dia) e na forma crônica proposta por Madrigal (6 h/dia, 21 dias), ora exacerbando o dano como observado por Fontella (1h/dia, 8 semanas) e Madrigal (1h/dia, 7 dias). De fato Selye em 1976, já preconizava que as respostas cognitivas ao estresse eram temporalmente dependentes, enquanto que um estressor agudo desencadeava respostas adaptativas, a continuação do estresse resultava em mudanças com efeitos deletérios no sistema fisiológico e prejuízos cognitivos.

O estresse de contensão também foi responsável por normalizar o comportamento de *rearing* no grupo isquemiado que havia decrescido pela indução da isquemia. Klenerová *et al.* (2007), relataram que o estresse de imobilização por 1 hora em ratos Sprague-Dawley não altera a quantidade de *rearing*, fato este também encontrado por nós, onde o estresse na ausência de isquemia, não alterou a atividade locomotora. Já Yan *et al.* (2007), trabalhando com modelo 4-VO e realizando o teste de *open field* 72h após a isquemia demonstrou um aumento considerável (aproximadamente 5x) no número de *rearings* quando comparado o grupo isquemiado e o grupo falso-operado, no nosso caso observamos um aumento significativo em relação ao grupo isquemiado, capaz de normalizar a função locomotora dos ratos. Além disso, não é possível saber se o teste do campo aberto foi realizado no claro ou escuro, o que altera, como já explanado anteriormente, o comportamento dos animais no trabalho de Yan. Desse modo, o pré-condicionamento por estresse de contensão mostrou-se eficaz ao anular a inibição da atividade locomotora induzida pela isquemia.

O estresse de imobilização agudo também foi capaz de reverter o déficit de memória de longo prazo induzido pela isquemia. As situações momentâneas de estresse (estresse agudo), diferentemente do estímulo estressor persistente (estresse crônico) tendem a causar um aumento da cognição como mecanismo adaptativo possibilitando uma resposta eficiente frente a situações adversas que poderiam por em risco a vida do indivíduo (KIM; DIAMOND, 2002). Assim, o pré-condicionamento por estresse de contensão foi capaz de promover uma melhora na memória aversiva de longa duração dos animais isquemiados.

Uma série de estudos mostra a importância do receptor A₁ no pré-condicionamento (PEREZ-PINZON; XU, 1997; PEREZ-PINZON *et al.*, 1999; PUGLIESE,

2003) e a ação de antagonistas A_1 na anulação dessa proteção (HIRAIDE, 2001; NAKAMURA, 2001). A adenosina foi primeiramente descrita ao exercer um potente efeito depressor na atividade neuronal (DUNWIDDIE, 1985) que hoje se sabe ser mediada pelos receptores A_1 . Esse nucleosídeo é um neuromodulador e neurotransmissor largamente distribuído pelo cérebro, que tem como principal ação a inibição da atividade celular (DUNWINDDIE; MASINO, 2001), da excitabilidade neuronal e da transmissão sináptica (CUNHA, 2005) e é considerado um importante modulador da função glial em situações adversas (BOISON, 2006). As ações gerais da adenosina além de reduzirem a atividade de tecidos excitáveis (como por exemplo, causando a diminuição na frequência cardíaca ou da atividade neuronal) levam também ao aumento da oferta de substratos metabólicos (através da vasodilatação) e de uma maneira geral auxilia na redução dos danos isquêmicos por causar um aumento do suprimento energético e a diminuição da demanda energética do tecido (DUNWINDDIE; MASINO, 2001). As ações da adenosina são inúmeras e podem ser consideradas mais neuromodulatórias do que neurotransmissoras propriamente dita. Sua liberação não parece ser cálcio dependente como os neurotransmissores tradicionais e não há registro de que vesículas estoquem a adenosina como neurotransmissor principal. Entretanto, há uma ação modulatória do receptor A_1 da adenosina com praticamente todos os neurotransmissores (inclusive glutamato, ácido gama aminobutírico, acetilcolina, norepinefrina, 5-hidroxitriptamina, dopamina, etc). A ativação do receptor A_1 da adenosina inibe a transmissão sináptica excitatória principalmente pela inibição pré-sináptica da liberação de glutamato (CUNHA, 2005).

O receptor A_1 da adenosina está acoplado à proteína G_{i1-3} e a estimulação desse receptor causa a inativação de alguns canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem (GREENE; HAAS, 1991), aumento de cálcio intracelular (FREDHOLM *et al.*, 2005) e inibição do influxo de cálcio (JHAVERI *et al.*, 2006). Rodrigo Cunha (2005), em revisão publicada, relata que já é largamente sabido que o receptor A_1 da adenosina possui um papel chave na neuroproteção devido à diminuição da liberação de glutamato e hiperpolarização neuronal. Boulenger *et al.* (1984), mostraram que estímulos estressores podem influenciar os receptores A_1 da adenosina no sistema nervoso central (SVENNINGSSON; FREDHOLM, 1996). Sabe-se hoje que a concentração de adenosina aumenta rapidamente durante eventos estressores (FREDHOLM, 2007). Uma vez que a administração de agonistas do receptor A_1 ou estimulantes de adenosina endógena, como inibidores da recaptação de adenosina ou inibidores da sua metabolização, quando administrados logo após um período de isquemia parcial ou global, protegem da neurodegeneração ou de danos cognitivos (DE MENDONÇA,

SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2000; SWEENEY, 1997), é razoável se propor que outros eventos estressores além da isquemia, como por exemplo o estresse de contensão, promovam também a liberação de adenosina e exerçam neuroproteção. Steiger e Hänggi (2007) em revisão, citam a ativação dos receptores da adenosina como envolvida no pré-condicionamento neuronal. Desse modo, uma vez constatado no presente trabalho que o estresse de contensão conferiu neuroproteção ao tecido cerebral submetido ao modelo 2-VO levantou-se a hipótese que a via da adenosina poderia também estar envolvida.

A ação inibitória mais proeminente da adenosina se dá sobre o sistema excitatório glutamatérgico, que está intimamente relacionado as conseqüências danosas da isquemia (DUNWINDDIE; MASINO, 2001). Shubert *et al.* (2006), foram os pioneiros na hipótese que a adenosina teria um importante papel no controle da neuro-inflamação. É notória a habilidade da adenosina no controle do metabolismo, seja pela ativação de seus receptores com conseqüente modificação no metabolismo primário de diferentes tipos celulares (CUNHA, 2001) inclusive em neurônios e astrócitos (HABERG; QU; HARALDSETH, 2000; HAMMER *et al.*, 2001) ou mesmo no controle do metabolismo do glicogênio (MAGISTRETTI; HOF; MARTIN, 1986). A participação da adenosina como neuroprotetor parece ser eficaz apenas nos períodos iniciais da privação de oxigênio, haja vista que sua ação 18 horas após o evento isquêmico já se mostra incapaz de proteger o tecido neural (SWEENEY, 1997).

Dois mecanismos principais possibilitam que a adenosina chegue ao espaço extracelular cerebral onde desempenha suas ações neurotransmissora e neuromoduladora: a desfosforilação do nucleotídeo adenina pelas ecto-nucleotidases e a liberação direta de adenosina via transportadores. Esse transporte pode ser realizado de duas maneiras que podem ser distintas pela sensibilidade ao inibidor de transporte nitrobenziltioinosina. Ambos transportes acontecem de forma passiva independente de ATP ou gradiente iônico e possibilitam o equilíbrio nos níveis de adenosina dos dois lados da membrana (CUNHA, 2005). Devido a alta atividade da adenosina quinase intracelular, normalmente os níveis de adenosina são baixos no interior da célula. Entretanto, com um evento isquêmico suficientemente forte para causar falência energética, os níveis de adenosina sobem e a liberação de adenosina ocorre através de seus transportadores. Um terceiro tipo de transporte, pouco esclarecido, ocorre de maneira ativa, dependente de sódio, porém a falta de ferramentas farmacológicas especifica para esse transportador dificultam sua compreensão (DUNWINDDIE; MASINO, 2001).

A ação da adenosina se torna ainda mais interessante e complexa quando observada no aspecto conjuntural com seus demais receptores. Cunha *et al.* (2006), mostraram um desbalanço na expressão de receptores A_1 e A_{2A} em animais submetidos a estresse de contensão de forma subcrônica. Enquanto que os receptores A_1 , notadamente neuroprotetores, sofreram *down-regulation*, os receptores A_{2A} que possuem participação ativa no dano isquêmico (MELANI *et al.*, 2006) sofreram *up-regulation*. Duarte *et al.* (2006) observaram a mesma alteração na densidade dos receptores A_1 e A_{2A} em ratos diabéticos induzidos por streptozotocina.

Outro fenômeno intrigante que envolve o receptor A_1 é a sua dessensibilização e internalização após a privação de glicose e oxigênio (COELHO *et al.*, 2006). Muitos estudos já mostraram que essa privação possibilitou a diminuição da densidade de receptores A_1 em diferentes regiões cerebrais (LEE; TETZLAFF; KREUTZBERG, 1986; NAGASAWA; ARAKI; KOGURE, 1994; ONODERA; SATO; KOGURE, 1987) e que tal dessensibilização ocorre rapidamente após a isquemia (COELHO *et al.*, 2006). Desse modo, a ação neuroprotetora da adenosina é proeminente em eventos estressantes agudos e sua eficiência decai para longos períodos pós-isquemia (CUNHA, 2005). Assim, o uso de fármacos para o tratamento da isquemia que envolva os receptores A_1 esbarra na escassa janela de tempo para sua ação.

Interessante é o trabalho de Rebola *et al.* (2005), com cultura primária de neurônios corticais e o uso de agonistas e antagonista dos receptores A_1 e A_{2A} associados à cainato e ciclotiazida. O uso de concentrações seletivas dos agonistas e antagonistas, como o DPCPX, levaram o grupo a concluir que a ativação dos receptores A_1 exacerbam a neurotoxicidade induzida por cainato e ciclotiazida, enquanto que a ativação dos receptores A_{2A} confere neuroproteção aos neurônios corticais. O bloqueio dos receptores A_1 com DPCPX teve ação neuroprotetora indicando que a ativação tônica dos receptores A_1 contribuem para o dano causado por cainato e ciclotiazida. Outros trabalhos apontam para os mesmos resultados em diferentes culturas neuronais (LOBNER; CHOI, 1994; BARTH *et al.*, 1997; TURNER; BLACKBURN; RIVKEES, 2004; LOGAN; SWEENEY, 1997). Esses achados são surpreendentes haja vista que o papel dos receptores da adenosina no dano neuronal em cultura são fundamentalmente o oposto dos resultados encontrados em animais adultos. Essa diferença parece ser explicada pela diferença do metabolismo extracelular da adenosina em preparações celulares imaturas citada em escassa literatura e pela diferença na densidade e na localização dos receptores A_1 e A_{2A} em neurônios imaturos e neurônios adultos. Enquanto nos neurônios imaturos a imunoreatividade para os receptores A_1 é mais

evidente no corpo celular, nos neurônios maduros os receptores A₁ se concentram nas sinapses (REBOLA *et al.*, 2005)

Akaiwa *et al.* (2006), puderam observar a participação da via da adenosina nas primeiras 72h após a isquemia, onde o tratamento com DPCPX dos animais pré-condicionados por isquemia moderada atenuou os benefícios obtidos pelo pré-condicionamento. Devido à grande especificidade do antagonista A₁ DPCPX, esse fármaco mostrou-se útil para se testar nossa hipótese. Nossos achados mostraram que o DPCPX na dose 1 mg/kg foi capaz de anular o efeito protetor do pré-condicionamento, sobre o dano neuronal hipocampal e estriatal. Já a menor dose (0,1mg/kg) não teve efeito significativo. Em baixa concentração, a adenosina já foi relatada como excitatória (ação sobre os receptores A_{2a}) (OKADA; SAKURAI; MORI, 1992) o que poderia justificar o tal achado.

Analisando o efeito do DPCPX sobre a atividade locomotora, o tratamento com o antagonista anulou a ação do pré-condicionamento no comportamento de *rearing* e os benefícios na memória aversiva de longa duração, confirmando assim que os efeitos benéficos do pré-condicionamento por estresse de imobilização, envolve os receptores A₁ da adenosina.

Nossos resultados apontam uma neuroproteção por estresse de contensão agudo sobre o modelo 2-VO de isquemia e a participação dos receptores A₁ da adenosina nesse processo. Todavia, o escasso relato a respeito do estresse de contensão e os nossos resultados nos impedem de concluir por quais vias de transdução de sinal se dá essa neuroproteção. Alguns mecanismos podem ser propostos, como um aumento inicial na liberação de adenosina e conseqüentemente ação nos receptores A₁ e ativação de segundos mensageiros. Outra via possível para a neuroproteção a se discutir, seria um aumento nos níveis de glicocorticóides, já que é sabido que neste modelo se observa um aumento nos níveis de glicocorticóides (KIM; DIAMOND, 2002) e que em algumas situações o aumento dos glicocorticóides podem conferir neuroproteção (DE NICOLA *et al.*, 2009; JEANNETEAU; GARABEDIAN; CHAO, 2008). Neste sentido, dados da literatura mostram que existe uma modulação positiva entre a liberação de glicocorticóides e a regulação na expressão de receptores A₁ da adenosina (SVENNINGSSON; FREDHOLM, 1997; GERWINS; FREDHOLM, 1991), deste modo o efeito inicial do estresse de contensão seria o aumento dos níveis de glicocorticóides, levando a um aumento na expressão dos receptores A₁ da adenosina e conseqüentemente, ativação de segundos mensageiros e neuroproteção.

Finalizando, mostramos um papel importante dos receptores A₁ da adenosina na neuroproteção em situações de isquemia cerebral e um efeito benéfico da modulação destes receptores usando um modelo de estresse psicossocial.

7 CONCLUSÃO

- O modelo de isquemia cerebral transitória por oclusão das artérias carótidas durante 30 minutos, foi capaz de causar dano hipocampal e estriatal, diminuição no comportamento exploratório e perda de memória aversiva de longa duração em ratos.
- O estresse de contensão por 2 horas, foi capaz de proteger dos danos cerebrais induzido pelo modelo de isquemia.
- O estresse de contensão foi capaz de proteger dos danos no comportamento exploratório e na memória aversiva de longa duração induzido pela isquemia cerebral.
- O tratamento prévio com o antagonista A₁ da adenosina, DPCPX na dose de 1mg/kg, foi capaz de anular a proteção neuronal induzida pelo estresse de contensão agudo.
- O tratamento prévio com o antagonista A₁ da adenosina, DPCPX na dose de 1mg/kg, foi capaz de anular a melhora no comportamento exploratório e na memória aversiva de longa duração obtidos pelo estresse de contensão agudo.

O pré-condicionamento usando um modelo de estresse psicossocial, como o estresse de contensão agudo, confere neuroproteção em situações de isquemia cerebral, via ativação dos receptores A₁ da adenosina.

REFERENCIAS

- ABC DA SAÚDE. **Acidente Vascular Cerebral**. Disponível em <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?6>>. Acesso em 03 jun. 2008.
- AKAIWA, K.; AKASHI, H.; HARADA, H.; SAKASHITA, H.; HIROMATSU, S.; KANO, T.; AOYAGI, S. Moderate cerebral venous congestion induces rapid cerebral protection via adenosine A1 receptor activation. **Brain Res.**, v. 1122 , p. 47-55, 2006.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart and Stroke facts**. Dallas, TX, 1991.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart Disease and Stroke Statistics**. Dallas, TX, 2005.
- ASHE, P.C.; BERRY, M.D. Apoptotic signaling cascades. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v.27, n.2, p.199-214, 2003.
- BALLANYI, K. Protective role of neuronal KATP channels in brain hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 3201-3212, 2004.
- BARONE, F. C.; WHITE, R. F.; SPERA, P. A.; ELLISON, J.; CURRIE, R. W.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G. Z. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. **Stroke**, v. 29, p. 1937-1951, 1998.
- BARTH, A.; NEWELL, D. W.; NGUYEN, L. B.; WINN, H. R.; WENDER, R.; MENO, J. R.; JANIGRO, D. Neurotoxicity in organotypic hippocampal slices mediated by adenosine analogues and nitric oxide. **Brain Res.**, v. 762, p. 79–88, 1997.
- BAXTER, G. F. Role of adenosine in delayed preconditioning of myocardium. **Cardiovasc Res.**, v. 55, p. 483-494, 2002.
- BLACKWOOD, W.; CORSELLIS, J. (Ed.). **Greenfield's neuropathology**. Chicago, IL: Year Book Medical, 1996. v. 246, p. 43–85.
- BLOMGREN, K.; HALLIN, U.; PUKA-SUNDEVALL, M.; HAGBERG, H. Caspase-calpain interaction and calpastatin as a stress protein in neonatal rat hypoxia-ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.19 , p. S49,1999.
- BOGOUSSLAVSKY, J.; VAN MELLE, G.; REGLI, F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1000 consecutive patients with first stroke. **Stroke**, v. 19, p. 1083-1092, 1988.
- BOISON, D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, p.652-658, 2006.
- BRALET, J.; BELEY, P.; JEMAA, R.; BRALET, A. M.; BELEY, A. Lipid metabolism, cerebral metabolic rate, and some related enzyme activities after brain infection in rat. **Stroke**, v. 18, p. 418-425, 1987.

BREDESEN, D. E. Keeping neurons alive: the molecular control of apoptosis. **Neuroscientist**, v. 2, p. 211-216, 1996.

BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Dev. Res.**, v. 28, p. 3-27, 1993.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Br. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.

BROWN, A. W.; BRIERLY, J. B. The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 49, p. 78-106, 1968.

BRUNS, R. F.; FERGUS, J. H.; BADGER, E. W.; BRISTOL, J. A.; SANTAY, L. A.; HARTMAN, J. D.; HAYS, S. J.; HUANG, C. C. Binding of the A1-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 335, n. 1, p. 59-63, 1987.

CAHIL, L.; McGAUGH, J. L. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. **Behav. Neurosci.**, v. 104, p. 532-543, 1990.

CAHIL, L.; McGAUGH, J. L. Modulation of memory storage. **Curr. Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 237-242, 1996.

CARDOSO, S. H. **Memória: O Que é e Como Melhorá-la.** Disponível em: <<http://www.cerebromente.org.br/n01/memo/memoria.htm>> Acesso em 30 Dez, 2008.

CASTRO E SILVA, O.; BEER, A.; ZUCCOLOTO, S. (Ed.). **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia.** São Paulo: Probel, 1998.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/about/>>. Acesso em: 27 Apr. 2008.

CENTERO, J. M.; ORTI, M.; SALOM, J. B.; SICK, T. J.; PEREZ-PINZON, M. A. Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 836, p. 62-69, 1999.

CHOI, D. W. Nitric oxide: foe or friend in the injured brain? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 9741-9743, 1993.

CHOI, D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. **Trends Neurosci.**, v. 18, p. 58-60, 1995.

CIRCLE of Willis pt.svg Altura: 376 pixels. Largura: 599 pixels. 66262 bites. Formato SVG. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Circle_of_Willis_pt.svg>. Acesso em: 13 out. 2008.

CLARK, S. F. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutr. Clin. Pract.**, v. 17, p. 5-17, 2002.

CORNFIELD, D. N.; MCQUESTON, J. A.; MCMURTRY, I. F.; RODMAN, D. M.; ABMAN, S. H. Role of ATP-sensitive potassium channels in ovine fetal pulmonary vascular tone. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. 1363-1368, 1992.

CORNFIELD, L. J.; HU, S.; HURT, S. D.; SILLS, M. A. [3H]2-phenylaminoadenosine ([3H]CV 1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 263, n. 2, p. 552-561, 1992.

CRAMER, S. C.; MOORE, C. I.; FINKLESTEIN, S. P.; ROSEN, B. R. A Pilot Study of Somatotopic Mapping After Cortical Infarct. **Stroke**, v. 31, p. 668-671, 2000.

CRUMRINE, R. C.; BERGSTRAND, K.; COOPER, A. T.; FAISON, W. L.; COOPER, B. R. Lamotrigine protects hippocampal neurons from ischemic damage after cardiac arrest. **Stroke**, v. 28, p. 2230-2237, 1997.

CRUMRINE, R. C.; LAMANNA, J. C. Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 11, p. 272-282, 1991.

CUNHA R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptor. **Neurochem. Int.**, v. 38, p.107-125, 2001.

CUNHA, G. M. A.; CANAS, P. M.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A_{2A} receptors upon sub-chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 141, p. 1775-1781, 2006.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brains: from A_1 receptor activation to A_2A receptor blockade. **Purinergic Sig.**, v. 1, p. 111-134, 2005.

DA CUNHA, C.; HUANG, C. H.; WALZ, R.; DIAS, M.; KOYA, R.; BIANCHIN, M.; PEREIRA, M. E.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory facilitation by post-training intraperitoneal, intraventricular and intra-amygdala injection of Ro5-4864. **Brain Res.**, v. 544, p.133-136, 1992.

DANIELS, W. M. U.; UYS, J. K.; VUUREN, P. V.; STEIN, D. J. The development of behavioral and endocrine abnormalities in rats after repeated exposure to direct and indirect stress. **Neuropsychiatr. Dis. Treat.**, v. 4, n. 2, p. 451-464, 2008.

DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends Neurosci.**, v.17, p. 208-214, 1994.

DE MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? **Brain Res. Rev.**, v. 33, p. 258-274, 2000.

DE NICOLA, A. F.; PIETRANERA, L.; BEAUQUIS J.; FERRINI, M. G.; SARAVIA, F. E. Steroid protection in aging and age-associated diseases. **Exp. Gerontol.**, v. 44, p. 34-40, 2009.

DE NOBLE, V. J.; REPETTI, S. J.; GELPKE, L. W.; WOOD, L. M.; KEIM, K. L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits

of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1123-1128, 1986.

DIETRICH, W. D.; BUSTO, R.; YOSHIDA, S.; GINSBERG, M. D. Histopathological and hemodynamic consequences of complete versus incomplete ischemia in the rat. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 7, p. 300–308, 1987.

DOWNDEN, J.; CORBETT, D. Ischemic preconditioning in 18- to 20-monthold gerbils: long-term survival with functional outcome measures. **Stroke**, v. 30, p. 1240–1246, 1999.

DRENTH, J.; ENZING, C. M.; KALK, K. H.; VESSIES, J. C.; Structure of porcine pancreatic phospholipase A2. **Nature**, v. 48, p. 503-509, 1976.

DUARTE, J. M. N.; OLIVEIRA, C. R.; AMBRÓSIO, A. F.; CUNHA, R. A. Modification of adenosine A₁ and A_{2A} receptor density in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurochem. Int.**, v. 48, p. 144-150, 2006.

DUNWIDDIE, T. V. The physiological role of adenosine in the central nervous system. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 27, p. 63–139, 1985.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 31-55, 2001.

EKHOLM, A.; ASPLUND, B.; SIESJO, B. K. Perturbation of cellular energy state in complete ischemia: relationship to dissipative ion fluxes. **Exp. Brain Res.**, v. 90, p. 47–53, 1992.

ELEFF, S. M.; MARUKI, Y.; MONSEIN, L. H.; TRAYSTMAN, R. J.; BRYAN, R. N.; KOEHLER, R.C. Sodium, ATP and intracellular pH transients during reversible compression ischemia of dog cerebrum. **Stroke**, v. 22, p. 233–241, 1991.

ELIASSON, M. J. L.; HUANG, Z. H.; FERRANTE, R. J. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 5910-5918, 1999.

FONTELLA, F. U.; CIMAROSTI, H.; CREMA, L. M.; THOMAZI, A. P.; LEITE, M. C.; SALBEGO, C.; GONÇALVES, C. A. S.; WOLCHUK, S.; DALMAZ, C.; NETTO, C. A. Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Res. Bull.**, v. 65, p. 443–450, 2005.

FOX, G.; GALLACHER, D.; SHEVDE, S.; LOFTUS, J.; SWAYNE, G. Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. **Stroke**, v. 24, p. 2087–2093, 1993.

FREDHOLM, B. B. Adenosine an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1315-1323, 2007.

FREDHOLM, B. B.; CHEN, J. F.; CUNHA, R. A.; SVENNINGSSON, P.; VAUGEOIS, J. M. Adenosina and brain function. **Int. Rev. Neurobiol.**, n. 63, p. 191-270, 2005.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Free radicals and tissue injury. **La Invest.**, v. 47, p. 412-426, 1982.

GEORGOTAS, A.; McCUE, R. E.; COOPER, T.; CHANG, I.; MIR P.; WELKOWITZ, J. Clinical predictors of response to antidepressants in elderly patients. **Biol. Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 733-740, 1987.

GERWINS, P.; FREDHOLM, B.B. Glucocorticoid receptor activation leads to up-regulation of adenosine A1 receptors and down-regulation of adenosine A2 responses in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **Mol Pharmacol.**, v. 40, n.2, p.149-155, 1991.

GINSBERG, M. D.; BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**, v. 20, p. 1627-1642, 1989.

GINSBERG, M. D.; PULSINELLI, W. A. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. **Ann Neurol.**, v. 36, p. 553-554, 1994.

GOLDLUST, E. J.; PACZYNSKI, R. P.; HE, Y.Y.; HSU, C.Y.; GOLDBERG, M. P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v. 27, n. 9, p. 1657-1662, 1996.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GREENE, R. W.; HAAS, H. L. The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v.36; n. 4, p. 329-341, 1991.

HABERG, A.; QU, H.; HARALDSETH, O. *In vivo* effects of adenosine A₁ receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with *ex vivo* ¹³C MR spectroscopy. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 324-333, 2000.

HAKIM, A. M. The cerebral ischemic penumbra. **Can. J. Neurol.**, v. 14, p. 557-559, 1987.

HALL, E. D. Cerebral ischaemic, free radicals and antioxidant protection. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 21, p. 334-339, 1993.

HAMMER, J.; QU, H.; HABERG, A.; SONNEWALD, U. *In vivo* effects of adenosine A₂ receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with *ex vivo* ¹³C MR spectroscopy. **J. Neurochem.**, v.79, p. 885-892, 2001.

HARA, H.; FINK, K.; ENDRES, M.; FRIEDLANDER, R.M.; GAGLIARDINI, V.; YUAN, J.; MOSKOWITZ, M.A. Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.17, p.370-375, 1997.

HEURTEAUX, C.; LAURITZEN, I.; WIDMANN, C.; LAZDUNSKI, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 10, p. 4666-4670, 1995.

HIRAIDE, T.; KATSURA, K.; MURAMATSU, H.; ASANO, G.; KATAYAMA, Y. Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbils. **Brain Res.**, v. 910, p. 94-98, 2001.

HOGAN, M. J.; HAKIM, A. M. Reversibility of nimodipine binding to brain in transient cerebral ischemia. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1745-1752, 1992.

HORI, M.; GOTOH, K.; KITAKAZE, M.; IWAI, K.; IWAKURA, K.; SATO, H.; KORETSUNE, Y.; INOUE, M.; KITABATAKE, A.; KAMADA, T. Role of oxygen-derived free radicals in myocardial edema and ischemia in coronary microvascular embolization. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 828-40, 1991.

HOSSMAN, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. **Ann. Neurol.**, v. 36, p. 557-565, 1994.

HOWARD, V. J. Data Needs for Cardiovascular Events, Management, and Outcomes. **Stroke**, 2005.

IZQUIERDO, I. Pharmacology evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB**, v. 8, p.1139-1145, 1994.

IZQUIERDO, I.; Da CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behav. Neural. Biol.**, v. 58, p. 16-26, 1992.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. GABA-A receptor modulation of memory: The role of endogenous benzodiazepines. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 260-265, 1991.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; BIANCHIN, M.; WALZ, R.; ZANATTA, M. S.; DA SILVA, R. C.; BUENO E SILVA, M.; RUSCHEL, A. C.; PACZKO, N. Memory processing by the limbic system: Role of specific neurotransmitter systems. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 91-98, 1993.

JACOBSON, K. A.; SUZUKI, F. Recent developments in selective agonists and antagonists acting at purine and pyrimidine receptors. **Drug Dev. Res.**, v. 39, p. 289–300, 1996.

JEANNETEAU, F.; GARABEDIAN, M. J.; CHAO, M. V. Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 12, p. 4862-4867, 2008.

JHAVERI, K. A.; TOTH, L. A.; SEKINO, Y.; RAMKUMAR, V. Nitric oxide serves as an endogenous regulator of neuronal adenosine A1 receptor expression. **J. Neurochem.**, v. 99, p. 42-53, 2006.

JONIDES, J.; SMITH, E. E.; KOEPPE, R.A.; AWH, E.; MINOSHIMA, S.; MINTUN, M.A. Spatial working memory in humans as revealed by PET. **Nature**, v. 363, n. 6430, p. 623-625, 1993.

JOSHI, C. N.; JAIN, S. K.; MURTHY, P. S. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. **Brain Res. Brain Res. Protoc.**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2004.

- KADAM, S. D.; MULHOLLAND, J. D.; SMITH, D. R.; JOHNSTON, M. V.; COMI, A. M. Chronic brain injury and behavioral impairments in a mouse model of term neonatal strokes. **Behav. Brain Res.**, v. 197, n. 1, p. 77-83, Jan. 2009.
- KADOWAKI, M.; TOKITA, K.; NAGAKURA, Y.; TAKEDA, M.; HANAOKA, K.; TOMOI, M. Adenosine A₁ receptor blockade reverses dysmotility induced by ischemia-reperfusion in rat colon. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 409, p. 319-323, 2000.
- KAKIRO, K.; WEISSMAN, D.; WELSH, F. A. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling – A unifying theme in ischemic tolerance. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 24, p. 1288-1304, 2004.
- KAWAI, K.; NITECKA, L.; JOO, F.; SAITO, N.; KLATZO, I. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat. I. Dynamics of early neuronal changes. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 12, p. 238–249, 1992.
- KILPATRICK, E. L.; NARAYAN, P.; MENTZER-JUNIOR, R. M.; LASLEY R. D. Adenosine A₃ agonist cardioprotection in isolated rat and rabbit hearts is blocked by the A₁ antagonist DPCPX. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 281, p. H847–H853, 2001.
- KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 453-462, 2002.
- KIM, Y. T.; KIM, M. Y.; BU, Y.; JIN, Z. H.; CHOI, H.; DORÉ, S.; KIM, H. Neuroprotection and enhancement of spatial memory by herbal mixture HT008-1 in rat global brain ischemia model. **Am. J. Chin. Med.**, v. 36, n. 2, p. 287-299, 2008.
- KIRINO, T.; TAMURA, A.; SANO, K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. **Prog. Brain Res.**, v. 63, p. 39–58, 1985.
- KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; YANG, G. M. Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture in mice: evaluation of the patience of posterior communicating artery. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 18, p. 570–579, 1998.
- KLENEROVÁ, V.; SÍDA, P.; KREJČÍ, I.; HLINÁK, Z.; HYNIE, S. Effects of two types of restraint stress on spontaneous behavior of Sprague-Dawley and Lewis rats. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 58, n. 1, p. 83-94, 2007.
- KLOTZ, K. N. Adenosine receptors and their ligands. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 362, n. 4/5, p. 382-391, 2000.
- KRAUSE, G. S.; KUMAR, K.; WHITE, B. C.; AUST, S. D.; WIEGENSTEIN, J. G. Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanism of tissue injury and prospects for protection. **Am. Heart J.**, v. 111, p. 178-180, 1986.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- LASLEY, R. D.; SMART, E. J. Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.11, n.7, p. 259-263, 2001.

- LEE, K. S.; TETZLAFF, W.; KREUTZBERG, G. W. Rapid down regulation of hippocampal adenosine receptor following brief anoxia. **Brain Res.**, v. 380, p. 155-158, 1986.
- LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **Am. J. Pathol.**, v. 36, p. 1–17, 1960.
- LEYEN, V. D. Effects of 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), a highly selective adenosine receptor antagonist, on force of contraction in guinea-pig atrial and ventricular cardiac preparations. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 340, n. 2, p. 204-209, 1989.
- LIEPERT, J.; BAUDER, H.; MILTNER, W. H. R.; TAUB, E.; WEILLER, C. Treatment-Induced Cortical Reorganization After Stroke in Humans. **Stroke**, v. 31, p. 1210-1216, 2000.
- LIPTON, A. S.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 613-622, 1994.
- LIPTON, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 1431-1568, 1999.
- LIU, R.; GAO, M.; YANG, Z.; DU, G. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both in vivo and in vitro. **Brain Res.**, v. 1216, p. 104-115, 2008.
- LJUNGGREN, B.; SCHUTZ, H.; SIESJO, B. K. Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia. **Brain Res.**, v. 73, p. 277–289, 1974.
- LOBNER, D.; CHOI, D. W. Dipyridamole increases oxygen–glucose deprivation-induced injury in cortical cell culture. **Stroke**, v. 25, p. 2085-2089, 1994.
- LOGAN, M.; SWEENEY, M. I.; Adenosine A1 receptor activation preferentially protects cultured cerebellar neurons versus astrocytes against hypoxia-induced death. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 31, p.119–133, 1997.
- LOHSE, M. J.; KLOTZ, K.; LINDENBORN-FOTINOS, J.; REDINGTON, M.; SCHWABE, U.; OLSSON, R. A. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) — a selective high affinity antagonist radioligand for A₁ adenosine receptors. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 333, n. 2, p. 204-210, 1987.
- LOVE, S. Apoptosis and brain ischemia. **Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 267-282, 2003.
- LOVE, S.; BARBER, R.; SRINIVASAN, A.; WILCOCK, G. K. Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischaemia in man. **Neuroreport**, v. 11, n. 11. p. 2495-2499, 2000.
- LUINE, V.; VILLEGAS, M.; MARTINEZ C.; McEWEN, B.S. Stress-dependent impairments of spatial memory. Role of 5-HT. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 746, p. 403-404, 2004.
- MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- MADRIGAL, J. L. M.; CASO, J. R.; de CRISTÓBAL, J.; CÀRDENAS, A.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I.; LORENZO, P.; MORO, M. A. Effect of subacute and chronic immobilisation

stress on the out come of permanent focal cerebral ischaemia in rats. **Brain Res.**, v. 979, p. 137-145, 2003.

MAFFEI, F. H. A. **Doenças vasculares periféricas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002.

MAGARIÑOS, A. M.; McEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**, v. 69, p. 83-88, 1995.

MAGARIÑOS, A. M.; VERDUGO, J. M.; McEWEN, B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampal. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 14002-14008, 1997.

MAGISTRETTI, P. J.; HOF, P. R.; MARTIN, J. L. Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex: A possible coupling mechanism between neuronal activity and energy metabolism. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 2558-2562, 1986.

McCGAUGH, J. L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 12, p. 255-287, 1989.

MCGEE-RUSSELL, S. M.; BROWN, A. W.; BRIERLY, J. B. A combined light and electron microscope study of early anoxicischemic cell change in rat brain. **Brain Res.**, v. 20, p. 193-200, 1970.

MELANI, A.; GIANFRIDDO, M.; VANNUCCHI, M. G.; CIPRIANI, S.; BARALDI, P. G.; GIOVANNINI, M. G.; PEDATA, F. The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. **Brain Res.**, v. 1073-1074, p. 470-480, 2006.

MILNER, B. Clues to the cerebral organization of memory. *In*: BUSER, P. A.; ROUGEL-BUSER, A. (Ed.). **Symposium on cerebral correlates of conscious experience**. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 139-153.

MILOT, M.; PLAMONDON, H. Ischemia-induced hyperactivity: effects of dim versus bright illumination on open-field exploration and habituation following global ischemia in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 192, n. 2, p. 166-172, 2008.

MOREAU, J.; HUBER, G. Central adenosine A_{2A} receptors: an overview. **Brain Res. Rev.**, v. 31, p. 65-82, 1999.

MORLEY, P.; HOGAN, M. J.; HAKIM, A. M. Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection. **Brain Pathol.**, v. 4, p. 37-47, 1994.

MOSKOWITZ, M. A.; KIWAK, K. J.; HEKIMIAN, K.; LEVINE, L. Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. **Science**, vol 224, n. 4651, p. 886-889, 1984.

MUBAGWA, K.; FLAMENG, W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. **Cardiovasc. Res.**, v. 52, p. 25-39, 2001.

NAGASAWA, H.; ARAKI, T.; KOGURE, K. Alteration of adenosine A₁ receptor binding in the post-ischaemic rat brain. **Neuroreport**, v. 5, p. 1453-1456, 1994.

- NAKAMURA, M.; NAKAKIMURA, K.; MATSUMOTO, M.; SAKABE, T. Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 66, n. 5, p. 521-527, 2002.
- NAMURA, S.; ZHU, J.; FINK, K.; ENDRES, M.; SRINIVASAN, A.; TOMASELLI, K.J. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. **J. Neurosci.**, v.18, p.3659-3668, 1998.
- NISHIO, S.; YUNOKI, M.; CHEN, Z. F.; ANZIVINO, M. J.; LEE, K. S. Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning. **J. Neurosurg.**, v. 93, p. 845-851, 2000.
- OKADA, Y.; SAKURAI, T.; MORI, M. Excitatory effects of adenosine on neurotransmission is due to increase of transmitter release in the hippocampal slices. **Neurosci. Lett.**, v.142, p. 233-236, 1992.
- ONODERA, H.; KOGURE, K. Calcium antagonist, adenosine A1, and muscarinic bindings in rat hippocampus after transient ischemia. **Stroke**, v. 21, p. 771-776, 1990.
- ONODERA, H.; SATO, G.; KOGURE, K. Quantitative autoradiographic analysis of muscarinic cholinergic and adenosine A₁ binding sites after transient forebrain ischemia in the gerbil. **Brain Res.**, v. 415, p. 309-322, 1987.
- OZACMAK, V. H.; SAVAN, H. Pretreatment with adenosine and adenosine A₁ receptor agonist protects against intestinal ischemia-reperfusion injury in rat. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 4, p. 538-547, 2007.
- PEREZ-PINZON, M. A.; ALONSO, O., KRAYDEH, S.; DIETRICH, W. D. Induction of tolerance against traumatic brain injury by ischemic preconditioning. **Neuroreport**, v. 10, p. 2951-2954, 1999.
- PEREZ-PINZON, M. A.; BORN, J. G. Rapid preconditioning neuroprotection following anoxia in hippocampal slices: role of the K⁺ATP channel and protein kinase C. **Neuroscience**, v. 89, p. 453-459, 1999.
- PEREZ-PINZON, M. A.; XU, G. P.; DIETRICH, W. D.; ROSENTHAL, M.; SICK, T. J. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 17, p. 175-182, 1997.
- PHILLIS, J. W. Adenosine in the control of the cerebral circulation for identification of cerebral infarcts. **Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.**, vol. 1, n. 1, p. 26-54, 1989.
- PLAMONDON, H.; BLONDEAU, N.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 12, p. 1296-1308, 1999.
- PLAMONDON, H.; DAVIGNON, G.; KHAN, S.; CHARRON, C. Cerebral ischemic preconditioning induces lasting effects on CA1 neuronal survival, prevents memory

impairments but not ischemia-induced hyperactivity. **Behav. Brain Res.**, v. 189, n. 1, p. 145-51, 2008.

PLUTA, R.; LOSSINSKY, A. S.; MOSSAKOWSKI, M. J.; FASO, L.; WISNIEWSKI, H. M. Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. **Acta Neuropathol.**, v. 83, p. 1-11, 1991.

POOL, J. L. Aneurysms of the anterior communicating artery, bifrontal craniotomy, and routine use of temporary clips. **J. Neurosurg.**, p. 98-112, 1961.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 3-33, 2003.

PUGLIESE, A. M.; LATINI, S.; CORRADETTI, R.; PEDATA, F. Brief, repeated, oxygen-glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the in vitro hippocampus: role of adenosine receptor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 140, p. 229-230, 2003.

PULSINELLI, W. A.; BUCHAN, A.M. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. **Stroke**, v. 19, p. 913-914, 1988.

PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann. Neurol.**, v. 11, p. 491-498, 1982.

PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke**, v. 10, p. 267-272, 1979.

RAMKUMAR, V.; KWATRA, M.; BENOVIC, J. L.; STILES, G.L.; STILES, G.L. Functional consequences of A1 adenosine-receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1179, n. 1, p. 89-97, 1993.

RAMKUMAR, V.; STILES, G. L.; BEAVEN, M. A.; ALI, H. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 23, p. 16887-16890, 1993.

RAMOS-ZUÑIGA, R.; GÓMEZ, P. U.; NAVARRO RUIZ, A.; LUQUÍN de A. S.; GARCÍA-ESTRADA, J. Locomotor activity is a predictive test after global ischemia-reperfusion in Mongolian gerbils. **Minim Invasive Neurosurg.**, v. 51, n. 2, p. 87-90, 2008.

RANGE, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. São Paulo: Elsevier, 1999.

REBOLA, N.; RODRIGUES, R.J.; OLIVEIRA, C.R.; CUNHA, R.A. Different roles of adenosine A1, A2A and A3 receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. **Neurochem. Int.**, v.47, n.5, p.317-325, 2005.

ROSAMOND, W.; FLEGAL, K.; FURIE, K.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S. M.; HO, M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KITNER, S.; LLOYD-JONES, MCDERMOTT, M.; MEIGS, J.; CLAUDIA, M.; NICHOL, G.; O'DONNELL, C.; ROGER, V.; SORLIE, P.; STEINBERGER, J.; THOM, T.; WILSON, M.; HONG, Y.; AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE, STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. **Circulation**, v. 117, p. e25-

e147, 2008. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/117/4/e25>> Acesso em: 27 Apr. 2008

ROSENZWEIG, H. I.; LESOV, N. S.; HENSHALL, D. C.; MINAMI, M.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice. **Stroke**, v. 35, p. 2576-2581, 2004.

RUDOLPHI, K.A.; SCHUBERT, P.; PARKINSON, F.E.; FREDHOLM, B.B. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 439-445, 1992.

SALVATORE, C. A.; JACOBSON, M. A.; TAYLOR, H. E.; LINDEN, J.; JOHSON, R. G. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 10365-10369, 1993.

SCHAPER, W.; SCHAPER, J. **Collateral Circulation: Heart, Brain, Kidney, and Limbs**, Boston, MA: Kluwer, 1993.

SCHOENBERG, B. S.; MELLINGER, J. F.; SCHOENBERG, D.G. Cerebrovascular disease in infants and children: a study of incidence, clinical features and survival. **Neurology**, v. 28, p. 763-768, 1978.

SCHULBERT, P.; OGATA, T.; FERRONI, S. Modulation of glial cell signaling by adenosine and pharmacological reinforcement. A neuroprotective strategy ? **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 28, p. 185-190, 1996.

SCHULZ, J. B.; WELLER, M.; MOSKOWITZ, M. A. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. **Ann. Neurol.**, v.45, n. 4, p. 421-429, 1999.

SCIOTTI, V. M.; ROCHE, F. M.; GRABB, M. C.; VAN WYLEN, D. G. Adenosine receptor blockade augments interstitial fluid levels of excitatory amino acids during cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 12, n. 4, p. 646-655, 1992.

SELYE, H. **The Stress of Life**. New York: McGraw-Hill, 1976.

SHELIN, Y. I.; WANG, P. W.; GADO, M.H.; CSERNANSKY, J.G.; VANNIER, M.W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 3908-3913, 1996.

SMITH, M. L.; AUER, R. N.; SIESJÖ, B. K. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. **Acta Neuropathol.**, v. 64, p. 319-332, 1984.

SMITH, M. L.; BENDEK, G.; DAHLGREN, N.; ROSEN, I.; WIELOCH, T.; SIESJÖ, B.K. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. **Acta Neurol. Scand.**, v. 69, n. 385-401, 1984.

SMITH, W. S. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, v. 15, n. 1, Pt. 2, p. S3-12, 2004.

SPETZLER, R. F.; CARTER, L. P. (Ed.). **Neurovascular surgery**. New York: McGraw-Hill, 1994. p. 583-601.

SQUIRE, L. R. **Memory and brain**. Oxford: Oxford Univ. Press, 1987.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 24, p. 13515-13522, 1996.

STEIGER, H. J.; HÄNGGI, D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. **Acta Neurochir.**, v. 149, n. 1, p. 1-10, 2007.

STONE, C. P.; BAKHTIARI, A. B. Effects of electroconvulsive shocks on maze relearning by albino rats. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 49, n. 3, p. 318-320, 1956.

STRIJBOS, P. J. L. M.; LEACH, M. J.; GARTHWAITE, J. Vicious cycle involving Na channels, glutamate release and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation. **J. Neurosci.**, v.16, p. 5004–5013, 1996.

SVENNINGSSON, P.; FREDHOLM, B. B. Glucocorticoids regulate the expression of adenosine A₁ but not A_{2A} receptors in rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 280, n. 2, p. 1094-1101, 1997.

SWEENEY, M. I. Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia: window of opportunity. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, p. 207-217, 1997.

TARDINI, D. M. S.; YOSHIDA, W. B. Brain injury due to ischemia and reperfusion in carotid endarterectomy surgery. **J. Vasc. Br.**, v. 2, n. 2, p. 119-128, 2003.

TERENT, A.; JONSSON, E. Costs of stroke in Sweden: a national perspective. **Stroke**, v. 25, p.2363-2369, 1994.

TORRES, I. L.; GAMARO, G. D.; SILVEIRA-CUCO, S. N.; MICHALOWSKI, M. B.; CORREA, J. B.; PERRY, M. L.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 111–116, 2001.

TRAVAGLI, R.A.; ULIVI, M.; WOJCIK, W.J. Gamma-Aminobutyric acid-B receptors inhibit glutamate release from cerebellar granule cells: consequences of inhibiting cyclic AMP formation and calcium influx. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 258, n. 3, p. 903-909, 1991.

TRUELOVE, D.; SHUAIB, A.; IJAZ, S.; ISHAQZAY, R.; KALRA, J. Neuronal protection with superoxide dismutase in repetitive forebrain ischemia in gerbils. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, n. 5, p. 445-450, 1994.

TURNER, C.P.; BLACKBURN, M.R.; RIVKEES, S.A. A₁ adenosine receptors mediate hypoglycemia-induced neuronal injury. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 32, p.129–144, 2004.

ULRICH, P. T.; KROPPESTEDT, S.; HEIMANN, A.; KEMPFSKI, O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic two-vessel occlusion model in rats. **Stroke**, v. 29, p. 2412–2420, 1998.

UMEMURA, A. Regional difference in free fatty acids release and the action of phospholipase during ischemia in rat brain. **No To Shinkei**, v. 42, p. 979-986, 1990.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE, NATIONAL SURVEY OF STROKE. **NIH Publ.**, p. 80-2069, 1980.

UNO, H.; TARARA, R.; ELSE, J. G.; SULEMAN, M. A.; SAPOLSKY, R. M. Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 1705-1711, 1989.

VON ARNIM, C. A.; TIMMLER, M.; LUDOLPH, A. C.; RIEPE, M. W. Adenosine receptor up-regulation: initiated upon preconditioning but not upheld. **Neuroreport**, v. 11, n. 6, p. 1223-1226, 2000.

VON LUBITZ, D. K. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? **Eur. J. Pharmacol.**, v. 371, n. 1, p. 85-102, 1999.

WANG, Q.; XIONG, I.; CHEN, S.; LIU, Y.; ZHU, X. Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is induced by preconditioning with electroacupuncture: window of protection and the role of adenosine. **Neurosci. Lett.**, v. 381, p. 158-162, 2005.

WANG, S. H.; ZHANG, Z. J.; GUO, Y. J.; TENG, G.J.; CHEN, B. A. Establishment of rat model of post-stroke depression and the effects of citalopram on behavior thereof. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 87, n. 19, 1355-1357, 2007.

WIKIPÉDIA. Disponível em:
<<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Ribose&oldid=9321959>>. Acesso em: 28 mar. 2008.

WOODS, B. T.; SCHOENE, W.; KNEISLEY, L. Are hippocampal lesions sufficient to cause lasting amnesia? **Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 45, n.3, p.243-246, 1982.

XU, H.; AIBIKI, M.; NAGIYA, J. Neuroprotective effects of hyperthermic preconditioning on infarcted volume after middle cerebral artery occlusion in rats: role of adenosine receptors. **Crit. Care Med.**, v. 30, p. 1126-1130, 2002.

YAGER, J.; TOWFIGHI, J.; VANNUCCI, R.C. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. **Pediatr. Res.**, v. 34, n. 4, p. 525-529, 1993.

YAN, X. B.; WANG, S. S.; HOU, H. L.; JI, R.; ZHOU, J.N. Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. **Behav. Brain Res.**, v. 177, n. 2, p. 282-289, 2007.

YOSHIDA, M.; NAKAKIMURA, K.; CUI, Y.J.; MATSUMOTO, M.; SAKABE, T. Adenosine A1 receptor antagonist and mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker attenuate the tolerance to focal cerebral ischemia in rats. **J. Cereb Blood Flow Metab.**, v. 14, p. 771-779, 2004.

YUNOKI, M.; NISHIO, S.; UKITA, N.; ANZIVINO, M. J.; LEE, K. S. Hypothermic preconditioning induces rapid tolerance to focal ischemic injury in the rat. **Exp. Neurol.**, v. 181, p. 291-300, 2003.

ZANATTA, M. S.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P. K.; MEDINA, J. H.; QUEVEDO, J.; QUILLFELDT, J. A.; IZQUIERDO, I. Sequential involvement of NMDA-dependent mechanisms in the hippocampus, amygdala, entohinal cortex and parietal cortex in memory processing. **Behav. Pharmacol.**, v. 6, p. 341-345, 1996.

ZIEGLER, E. E.; FILER JUNIOR, L. J. (Ed.). **Conocimientos actuales sobre nutrición**. 7th. ed. Washington: OMS, 1997.

ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R., AMARAL, D. G., SUZUKI, W. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 4355-4370, 1989.