

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS
POR OBLITERAÇÃO TEMPORÁRIA DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RENATO LUÍS CALLONI

ORIENTADOR:
PROF. DR. OLY CAMPOS CORLETA

DEZEMBRO 2006

RENATO LUÍS CALLONI

MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS
POR OBLITERAÇÃO TEMPORÁRIA DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Universidade de Caxias do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Oly Campos Corleta

Porto Alegre
Dezembro 2006

À minha mulher Margaret e ao meu filho Lorenzo pelas horas não vividas, pelo amor incondicional e pela felicidade de viver com vocês.

[...] acho que só há um caminho para a ciência – ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonarmo-nos por ele; casarmo-nos com ele, até que a morte nos separe – a não ser que obtenhamos uma solução.

Mas ainda que encontremos uma solução, poderemos descobrir, para nossa satisfação, a existência de toda uma família de encantadores, se bem que talvez difíceis, problemas-filhos, para cujo bem-estar poderemos trabalhar, com uma finalidade em vista, até ao fim dos nossos dias.

Karl R. Popper

Quantos homens se lançam para a luz, não para ver melhor, mas sim para brilhar.

F. Nietzsche

LISTA DE SIGLAS

- ACA – Artéria Cerebral Anterior
- ACC – Artéria Carótida Comum
- ACCE – Artéria Carótida Comum Esquerda
- ACE – Artéria Carótida Esquerda
- ACED – Artéria Carótida Direita Externa
- ACEE – Artéria Carótida Esquerda Externa
- AChA – Artéria Coroidéia Anterior
- ACI – Artéria Carótida Interna
- ACIE – Artéria Carótida Interna Esquerda
- ACM – Artéria Cerebral Média
- ACME – Artéria Cerebral Média Esquerda
- DP – Desvio Padrão
- FCEV – Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- FSC – Fluxo Sangüíneo Cerebral
- M1 – Porção Inicial da Artéria Cerebral Média
- OACM – Oclusão da Artéria Cerebral Média
- PVS – Polyvynilsiloxane
- RM – Ressonância Magnética
- TTC- 2,3,4 Triphenylterazoliun chloride

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta dissertação, para a obtenção do título de Mestre, agradeço às pessoas que contribuíram de forma valiosa, para que este projeto se transformasse em realidade.

Ao Dr. Wilson P. Spiandorelo, que de maneira corajosa viabilizou este mestrado interinstitucional. De modo particular, pelo apoio incansável e pela disposição em aliviar minhas angústias.

Ao Dr. Frederico Henrich, radiologista do Hospital do Círculo Operário Caxiense, que auxiliou nas análises das imagens e nas mensurações, com muita disposição e entusiasmo.

Ao Dr. Mário Wagner, professor da Disciplina de Bioestatística do Curso de Pós-graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, contribuindo de maneira fundamental na análise dos resultados do experimento.

Ao Dr. André Germano Leite, que, ao longo deste período, sempre esteve à disposição para atender a meus pedidos de auxílio, gentilmente cedendo seu tempo.

Aos alunos do curso de Medicina – UCS, Bruno Costamilan Winkler, Guilherme Ricci e Wagner Martins Homero pelo trabalho e suporte imprescindível à implementação deste estudo.

Ao Dr. Prof. Eduardo Serafini pela sua colaboração e orientação na realização deste trabalho e na imprescindível ajuda dos exames anátomo patológicos.

Ao Dr. Oly Campos Corleta na doação do tempo e do conhecimento, sobretudo pela experiência que concretizou este estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo primário	16
2.2 Objetivos secundários	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Anestesia	18
3.3 Procedimento cirúrgico	19
3.4 Fio ocluidor	22
3.5 Avaliação neurológica	23
3.6 Anatomopatológico	24
3.7 Análise dos dados	26
3.8 Análise estatística	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	40
7. PERSPECTIVAS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	
Figura 9	48
Figura 10	49
Figura 11	50

RESUMO

Introdução: Os eventos isquêmicos cerebrais representam um fenômeno grave e de difícil solução, ocasionam perturbações importantes na vida dos acometidos e elevam os custos sociais da assistência à saúde. Para o estudo do fenômeno cérebro-vascular, a utilização de modelos animais é importante, pois permite melhor entendimento do fenômeno e possibilita o desenvolvimento de drogas neuroprotetoras e outras terapias para o infarto cerebral. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o modelo de isquemia cerebral, por oclusão da artéria cerebral média, mediante introdução de fio intraluminal por 90 minutos e 120 minutos, e seu efeito sobre a área de infarto cerebral em ratos. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 52 ratos machos *Wistar*, com peso médio de 426 ± 43 g. Os animais foram submetidos à isquemia cerebral por introdução de fio de nylon 3-0 na artéria cerebral média por 90 minutos ou 120 minutos, variável que diferenciou os grupos em estudo. Todos os animais que sobreviveram 24 horas ou mais foram avaliados quanto ao comprimento do fio introduzido, à presença de lesão isquêmica, ao déficit neurológico e ao volume da área de infarto. O fio utilizado para o procedimento foi Mononylon® 3-0® (Ethico) e foi acrescentada cola Enthelan®. Foram considerados com lesão isquêmica os animais que apresentassem achados histopatológicos compatíveis. A avaliação do déficit neurológico foi realizada após recuperação anestésica, mediante aplicação de escore padronizado. O volume da lesão isquêmica foi determinado mediante utilização do corante TTC, fotografia digital e utilização do programa ImageJ (NIH for Windows). Na análise estatística, foram utilizados o teste *t*-student e, para variáveis com grande assimetria, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney. **Resultados:** Não houve diferença estatística na comparação entre os pesos dos animais nos dois grupos de estudo ($p=0,59$). O comprimento do fio introduzido foi de 14,7 mm no grupo 90 minutos e 20,2 mm no grupo 120 minutos ($p=0,37$). Lesão isquêmica foi detectada em 11 animais (39%) no grupo que sofreu isquemia por 90 minutos e 11 (45%) do grupo de 120 minutos ($p=0,77$). Nos animais que apresentaram lesão, o comprimento do fio foi de $16,1 \pm 11$ mm (90 minutos) e $21,9 \pm 7,4$ mm (120 minutos) ($p=0,15$). O volume médio da área de infarto foi maior no grupo 120 minutos ($259,2 \text{ mm}^3$) do que no grupo 90 minutos ($162,9 \text{ mm}^3$) ($p=0,04$). O escore de déficit neurológico foi de 2,0 no grupo 90 minutos e de 2,4 no grupo 120 minutos ($p=0,84$). **Conclusão:** O modelo experimental estudado não induz lesão isquêmica cerebral importante em ambos os grupos. O grupo 120 minutos apresentou maior volume de infarto do que o grupo 90 minutos. O modelo experimental estudado demandou treinamento extenso e gerou resultados potencialmente reprodutíveis, o que sugere sua viabilidade para aplicação em futuros estudos, mais treinamento é necessário para se obter melhores resultados com menos animais.

ABSTRACT

Introduction: Ischemic events are a serious and hard to solve phenomenon. They cause significant disturbances in people's lives, while contributing to increase social costs. For the study of the brain vascular phenomenon it is important to use animal models because it they allows the understanding and offer possibilities to develop and evaluate the efficiency of neuroprotective drugs and brain infarct therapy. An experiment has been carried out aiming to assess a brain ischemia model by occlusion of the middle brain artery via an endovascular thread, by submitting to ischemia for 90 min and 120 min. **Materials and methods:** Focal infarct was obtained by occlusion of the middle brain artery, following the technique of introducing endovascularly a 3-0 Mononylon®, thread. For the experiment fifty-two (52) samples of *wistar* male rats, with an average weight of 426 ± 43.26 g. were used. The animals were submitted to ischemia for 90 min and 120 min., and later, were reperfused. All animals that survived over 24 hours were analyzed as to the presence of ischemic lesion, neurological deficit and volume of infarct area. The thread used was Ethicon (J&J) Mononylon® 3-0, and ENTHELAN®, in order to increase adhesiveness and promote better occlusion. **Results:** The lesion was detected in 39.3%, and 45.8% of the groups which suffered ischemia for 90 min and 120 min. Weight comparison did not show any statistical difference between the groups ($p=0.59$). The thread introduced measured 14.68 mm in the 90-min. group, and 20.17 mm in the 120-min. group ($p=0.37$). In the animals with lesion, the thread distance was 16.09 ± 10.7 mm and 21.9 ± 7.4 mm $p=0.15$. The volume was 162.9 mm³ (90 min.), and 259.2 mm³ (120 min.), $p=0.04$. Neurological score was 2.04 (90 min.) and 2.38 (120 min.), with $p=0.84$. Statistical analyses were performed with student's t-test, and for variables with large asymmetry Mann-Whitney Test was applied. The analyses of ischemic areas were performed with a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) dye, and later photographed and measured by using ImageJ 1.35 (NIH for Windows). **Conclusion:** This model presents flaws in producing infarcts in both groups. Nevertheless the results show that the group exposed to the longest ischemia has a tendency to develop a more consistent infarct zone suggesting that this is the appropriate period for the experiment. The applied model remains gold standard in the study of focal ischemia. However, to master the technique more training is necessary to obtain better results with fewer animals.

1 INTRODUÇÃO

Mais do que qualquer outro órgão do corpo humano, a integridade do cérebro é dependente de um contínuo fornecimento de sangue e glicose para a manutenção de suas funções. (HOSSMANN,1998).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define Acidente Vascular Encefálico (AVE) como “um sinal clínico de rápido desenvolvimento de perturbação focal da função cerebral, de suposta origem vascular e com mais de 24h de duração”. (CESÁRIO, 2006).

As doenças isquêmicas, entre elas o infarto cerebral isquêmico, são a terceira causa de morte nos EUA, ocorrendo uma a cada três minutos, com uma incidência de 700.000 casos/ano. O infarto cerebral, além de apresentar elevado índice de mortalidade, é considerada importante causa de incapacidade e invalidez na fase adulta (CARMICHAEL,2005).

Segundo Carmichael (2005), a proporção de indivíduos adultos que sobrevivem ao infarto cerebral é de 76%. Destes, em torno de 50% apresentam quadro de seqüelas motoras, 26% são dependentes nas atividades do cotidiano diário e 26% apresentam invalidez total, necessitando de suporte e cuidados especiais por longo tempo (CARMICHAEL,2005). Frequentemente requerem adaptações no domicílio (*American Academy of Neurology,1996*), justificando, assim, o alto custo hospitalar e de reabilitação, estimado em U\$ 35 bilhões de dólares nos Estados Unidos. Esses dados também foram demonstrados e publicados pela *American Heart Association*. (TÜREYEN, 2005).

Apesar de conhecido como uma doença da idade avançada, o infarto cerebral também ocorre no período neonatal, quando ocasiona disfunções neurológicas que potencialmente acompanham toda a vida do acometido. Nesse período, acidentes vasculares encefálicos ocorrem em 20% a 30% dos nascidos com menos de 35 semanas de gestação, o que faz com que esse grupo tenha uma freqüência ainda maior que o dos indivíduos com mais de 65 anos (DERUGIN,2000).

O infarto cerebral, por isquemia cerebral focal, tem três subtipos: trombose, embolismo e hemorragia. A trombose e embolia representam cerca de 80% dos quadros vasculares no ser humano (ZHANG,1997). Já a mais importante causa clínica de isquemia cerebral global é a parada cardíaca. Seus efeitos são maiores ou

menores, de acordo com o tempo do restabelecimento da circulação. Outros fatores que podem levar à redução global é o estrangulamento, o choque séptico ou a hipertensão endocraniana.

As diferentes causas de infarto cerebral estão associadas à sua dimensão, que varia de quadros lacunares, pela oclusão de pequenos vasos, a grandes infartos córtico-subcorticais (CARMICHAEL,2005). A oclusão da artéria carótida interna (ACI), ou da artéria cerebral média (ACM), causa 10% a 15% dos infartos e resulta em edema cerebral importante, com aumento na pressão intracraniana e freqüentemente progressão ao coma e à morte. Os índices de mortalidade chegam a 80% nesses casos, cunhando a expressão infarto maligno (ENGELHORN,2002; JIEYONG,2006).

Em quadros agudos de isquemia, o principal objetivo da terapia é a interrupção da evolução da lesão isquêmica, com a transformação da chamada área de penumbra em zona de infarto. As estratégias visam a reduzir as seqüelas do infarto (HENNINGER,2006). O tratamento dos eventos isquêmicos é baseado, inicialmente, no restabelecimento da perfusão da área afetada. Procedimentos para a recanalização vascular nas primeiras horas do evento têm sido utilizados para melhorar os índices de recuperação e redução do infarto.

Os neurocirurgiões deparam-se com situações análogas às do infarto cerebral, durante procedimentos neurovasculares, em que há necessidade de oclusão temporária de um vaso. Isso ocorre principalmente em procedimentos cirúrgicos onde há envolvimento dos vasos do polígono de *Willis* (DIAS,2000). A aplicação transitória de cliques nas cirurgias de aneurisma é um exemplo dessas situações. A diminuição da pressão arterial focal e das dimensões do aneurisma facilitam a abertura para a remoção de material ateromatoso e das calcificações, e à reconstrução do vaso nutridor (KORENKOV,2000;LAVINE,1997); porém é potencialmente geradora de isquemia.

Há na literatura especializada crescente evidência de que as terapias de revascularização são clinicamente efetivas e reduzem o transtorno neurológico (BARBER, 2004).

No tratamento e na reabilitação dos eventos isquêmicos cerebrais, verificou-se, nas últimas décadas, um avanço no emprego de drogas trombolíticas e na terapia endovascular. Outras duas modalidades terapêuticas que vêm sendo

empregas são a hipotermia e craniectomia descompressiva (YANAMOTO,2001; JIEYONG, 2006).

Apesar dos avanços técnicos no tratamento da isquemia cerebral, alguns obstáculos têm permanecido (BARDUTZKI,2005). O tempo de isquemia cerebral tolerado pelo cérebro é dependente da intensidade da isquemia, da concentração de oxigênio no tecido encefálico, da reserva metabólica primária e secundária, da velocidade do consumo dessa reserva, da temperatura e da presença ou não de drogas anestésicas. Diferentes áreas cerebrais apresentam vulnerabilidade variável à isquemia (HOSSMANN, 1998).

O desenvolvimento de um modelo experimental de isquemia cerebral tem sido alvo de muitos trabalhos científicos. Busca-se encontrar formas fáceis e consistentemente reprodutíveis para avaliação da fisiopatologia, bem como para o desenvolvimento e à avaliação de tratamentos, pois os eventos em humanos são imprevisíveis, e os estudos clínicos são de difícil inferência. Nos modelos animais conhecidos, a reprodução do infarto cerebral é bastante parecida com a que ocorre no ser humano. A maioria dos modelos experimentais enfoca a busca da redução da área de infarto e o estudo do infarto de grandes dimensões, considerados maligno. (GERRIETS,2004). O protótipo da isquemia cerebral focal mais utilizado é a trombose por oclusão da artéria cerebral média (OACM) (HOSSMANN,1998).

O emprego de modelos animais permite o estudo e a investigação da fisiopatologia da isquemia cerebral, especialmente os modelos de isquemia focal (GERRIETS,2003). A avaliação de novas abordagens terapêuticas representa importante contribuição dos modelos experimentais (DITTMAR, 2003). O estudo da isquemia e reperfusão pode contribuir para a diminuição das seqüelas permanentes e à melhora da qualidade de vida (SUN, 2005).

Duas questões relacionadas ao infarto cerebral têm sido muito investigadas, com o emprego de modelos experimentais (PEELING, 2001):

1. Que seqüela comportamental pode perdurar a curto e longo prazo na evolução de animais que se apresentam neurologicamente normais após recuperação da OACM?
2. Que fármacos utilizados para tratamento de infarto cerebral são efetivos na redução e prevenção das seqüelas neurológicas da isquemia?

A grande diversidade dos modelos experimentais atualmente utilizados demonstra, de um lado, a necessidade do estudo experimental da isquemia; de

outro, o fato de que ainda não se obteve um padrão ideal quanto à espécie e à técnica cirúrgica. O modelo ideal deve atender aos seguintes princípios: reproduzir condições de relevância clínica; ser facilmente reprodutível; ser facilmente executável, e evitar efeitos colaterais não relacionados à isquemia (HOSSMANN,1998).

O modelo de OACM tem sido amplamente utilizado para produzir danos isquêmicos em estudos experimentais (TAKAMATSU, 2002) e, desde o ano de 1975, têm sido desenvolvidos vários modelos de OACM em ratos. O mais utilizado no passado foi a OACM por coagulação da ACM através de uma craniectomia.

A isquemia cerebral focal tem sido produzida por uma variedade de métodos, e as variações na indução do infarto são atribuídas à diversidade de espécie e à técnica empregada (TAKAMATSU, 2002). Os modelos não trombóticos são obtidos por abordagem cirúrgica direta, através de craniectomia temporal e oclusão da ACM. Nos modelos trombogênicos, são utilizados agentes como: trombo sangüíneo, microsfersas de látex, acetato de polivinil, injetados na artéria carótida comum (ACC) ou na artéria cerebral média (ACM). Estes parecem ser os mais relevantes para analogia com a situação clínica do infarto, pois tendem a reproduzir mais fielmente o infarto cerebral de humanos (YANG, 2002).

O modelo de OACM foi introduzido por Koizumi et al. (1986), mediante craniectomia e coagulação da ACM. Longa (1989) o aprimoraram, diminuindo sua variabilidade, com emprego de técnica endovascular, menos invasiva e, portanto, preferível. Consiste na introdução de fio cirúrgico na luz do vaso até sua obliteração. (GERRIETS, 2004; TAKAMATSU, 2002). No entanto, o tamanho da lesão induzida, a ocorrência de hemorragia subaracnóidea devido à perfuração de vasos e a mortalidade precoce variam de um laboratório para outro (KUGE, 1995; TAKANO, 1997). Atualmente, as diferenças de resultado têm sido atribuídas a outras variáveis, como: raça e idade dos animais e comprimento do fio ocluidor introduzido na artéria (WOITZIK, 2006).

Neste trabalho, avalia-se a utilização do fio monofilamentar 3-0 com a extremidade recoberta por cola, empregada para aumentar a aderência e, com isso, aumentar a probabilidade de ocasionar lesão (ZHAO, 1996). Além disso, pretende-se avaliar e comparar os efeitos do tempo de oclusão intravascular, 90 minutos e 120 minutos, sobre a presença de lesão isquêmica, déficit neurológico e volume de infarto cerebral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Implantar modelo experimental de isquemia cerebral em ratos por oclusão da artéria cerebral média, mediante introdução de intraluminal de fio por 90 minutos e 120 minutos.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- a) Avaliar e comparar os efeitos da oclusão da artéria cerebral média, mediante introdução de fio endovascular por 90 minutos e 120 minutos sobre a ocorrência de lesão isquêmica cerebral;
- b) Avaliar e comparar os efeitos da oclusão da artéria cerebral média, fio sobre a ocorrência e a magnitude do déficit neurológico;
- c) Avaliar e comparar os efeitos da oclusão da artéria cerebral média, sobre a ocorrência e o volume de infarto cerebral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul – RS (UCS) e aprovado em 25 de janeiro de 2005. Os cuidados e procedimentos foram realizados em conformidade com as normas éticas para utilização de animais para experimentos médicos, descritas no *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Academic Press, 1996).

Utilizaram-se 52 ratos da raça *Wistar*, machos, adultos, com peso variável entre 300 g a 500 g e com idades semelhantes, obtidos do Biotério da Universidade de Pelotas. Os animais foram acondicionados em caixas de propileno em número de quatro animais por caixa. Foram colocados em temperatura controlada, alimentação e água livremente, sob condições de luminosidade diurna e noturna de 12 horas.

Os procedimentos cirúrgicos foram executados no Laboratório de Fisiologia da UCS.

3.2 ANESTESIA

A indução anestésica foi realizada com halotano em campânula. Após depressão do sensório, foi administrada atropina na dose de 5 mcg/100 g peso do animal, por via intramuscular e tiletamina + zolazepan (Zoletil® 50), em doses 0,18 ml a 0,3 ml.

O ar inspirado foi enriquecido com 1L/min de O² a 100% em funil. A temperatura do animal foi mantida, com a utilização de lâmpadas e compressas aquecidas.

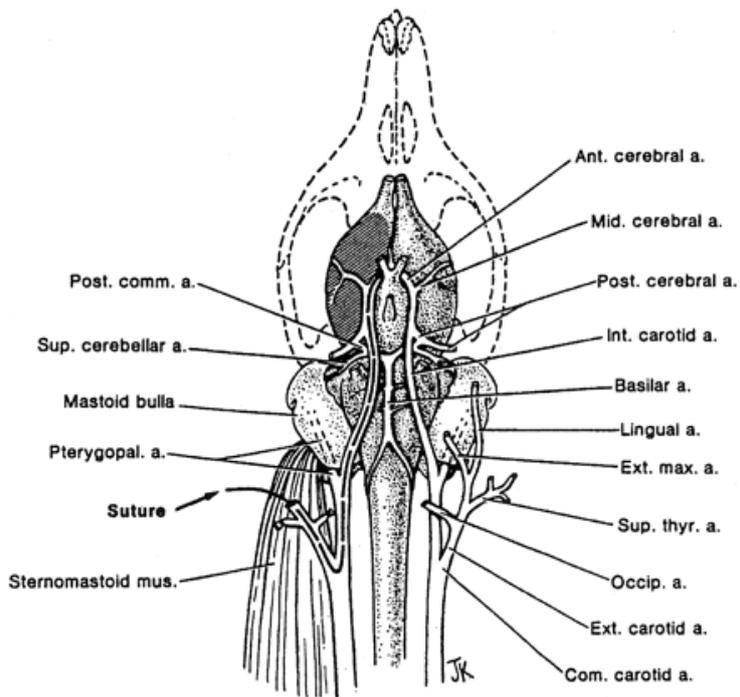


Figura 1: Diagrama da anatomia vascular cerebral do rato (LONGA Z., 1988).

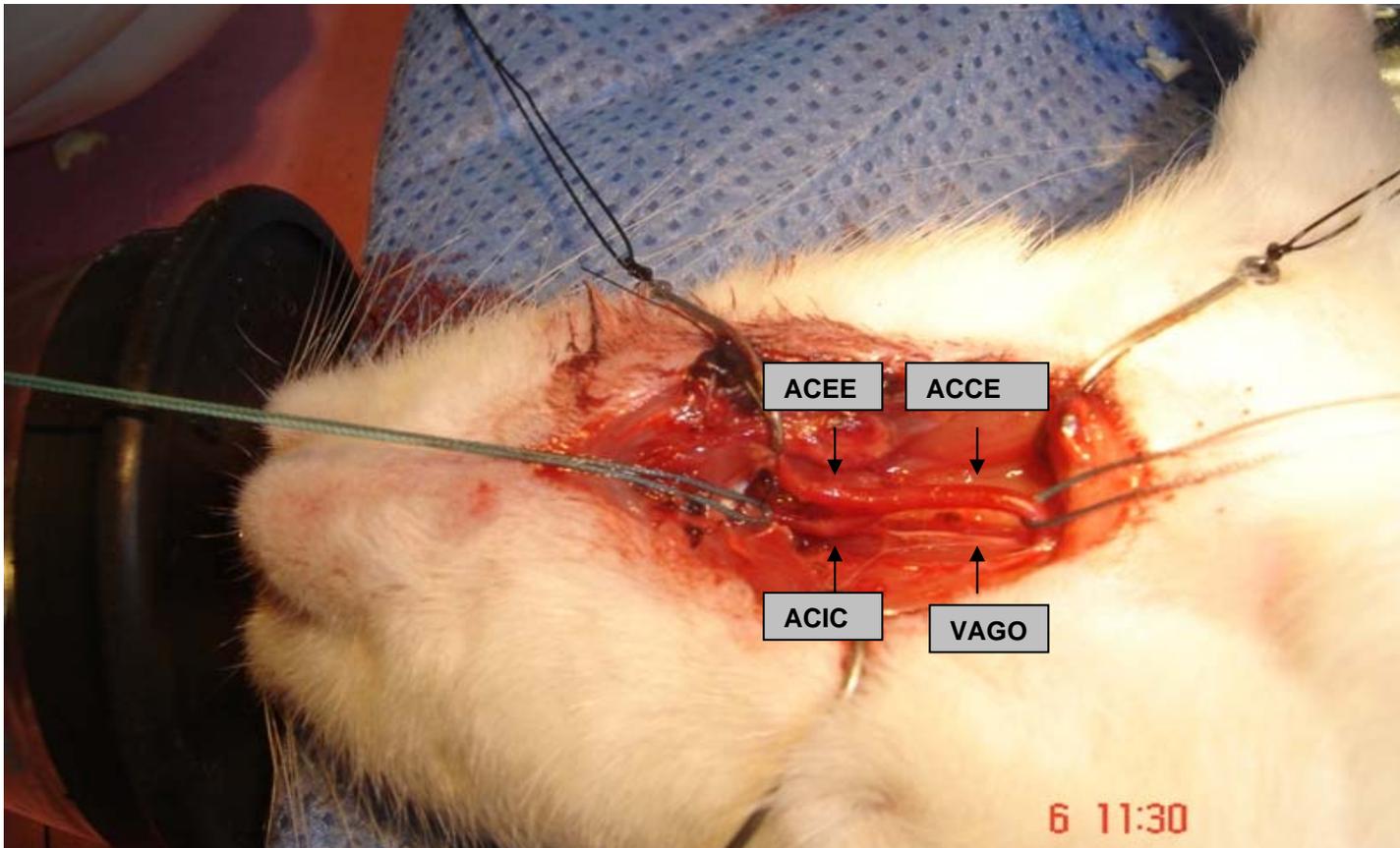


Figura 2: Anatomia vascular das artérias carótidas e do nervo vago.

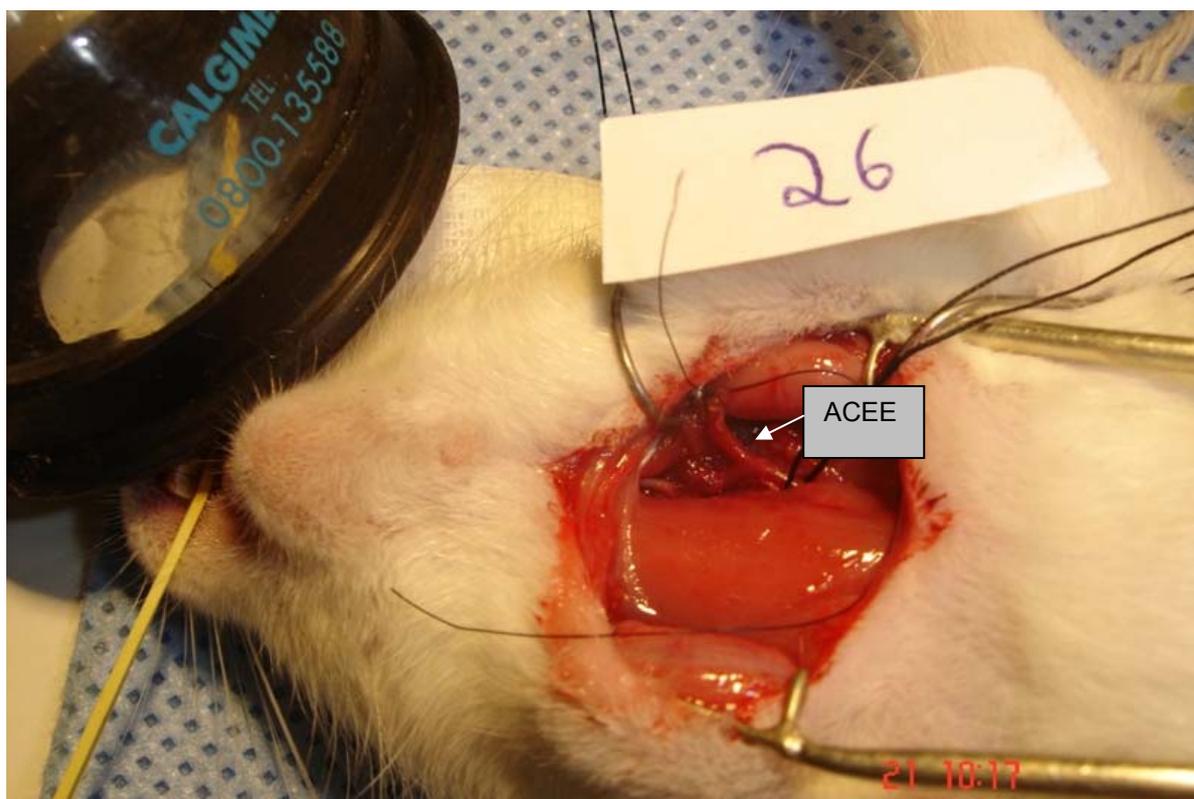


Figura 3: A artéria carótida esquerda externa pronta para a introdução do fio ocluidor.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após confirmado o plano anestésico do animal, o mesmo foi colocado sobre um suporte e imobilizado com amarras nas patas.

Após tricotomia da região cervical, foi realizada incisão mediana cervical longitudinal, com extensão de 2 cm a 3 cm, progredindo-se dissecção subcutânea até o plano vascular. Os planos musculares e a traquéia foram afastados, por afastadores em forma de anzol, tracionados lateralmente com elásticos para facilitar a exposição.

Após esse momento, o procedimento foi realizado sob aumento, com a utilização de lupas cirúrgicas (4X). Foi realizada dissecção do nervo vago, separando-o da artéria carótida comum esquerda (ACCE). As ligaduras vasculares foram realizadas com fio de nylon monofilamentado (Mononylon® 5-0). A ACEE foi isolada, e seus ramos: artéria tireóidea superior e artéria lingual, ligados. A artéria occipital foi coagulada com a utilização de cautério cirúrgico e, posteriormente,

seccionada. A ACEE foi seccionada junto à bifurcação dos ramos distais. A artéria pterigoidopalatina, ramo da artéria carótida interna, foi ligada junto à bula mastóidea.

A oclusão temporária da ACC e da ACI, foi realizada com microclipes, semelhantes aos utilizados em cirurgias de aneurisma cerebral (VICCA®). Após arteriotomia no coto proximal da ACEE, o fio ocluidor foi introduzido retrogradamente, descrito abaixo, e o clipe da ACIE foi retirado. A progressão do fio, a partir da bifurcação da ACCE foi no sentido ascendente, pela luz da ACIE. O fio foi introduzido até o encontro de resistência firme, sendo, então, ligado junto ao coto. O clipe, localizado na ACCE, foi liberado, e o restabelecimento do fluxo sangüíneo foi verificado. Foi controlado eventual sangramento no campo operatório. Em seguida, procedeu-se ao fechamento do ferimento operatório em plano único com fio nylon monofilamentado (Mononylon® 4-0).

O tempo da oclusão foi de 90 minutos (grupo A) e 120 minutos (grupo B). A alocação dos grupos foi aleatória, não probabilística.

Após o procedimento, os animais foram recolhidos as suas caixas e observados durante o período da oclusão até serem novamente anestesiados para retirada da oclusão.

Decorrido o tempo de oclusão, os animais foram novamente anestesiados com metade das doses iniciais. A sutura da incisão foi retirada, a incisão foi reaberta, e o fio ocluidor foi retirado. Na presença de sangramento da ACEE, este foi coagulado. A incisão foi novamente suturada. Solução fisiológica 10 ml foi injetada na cavidade peritoneal para hidratação.

Após os animais terem despertado e apresentado movimentação espontânea, foram avaliados para verificar a presença e o escore de déficit neurológico, conforme escala apresentada a seguir.

Após essa etapa, foram recolocados nas caixas e receberam alimento e água livremente.

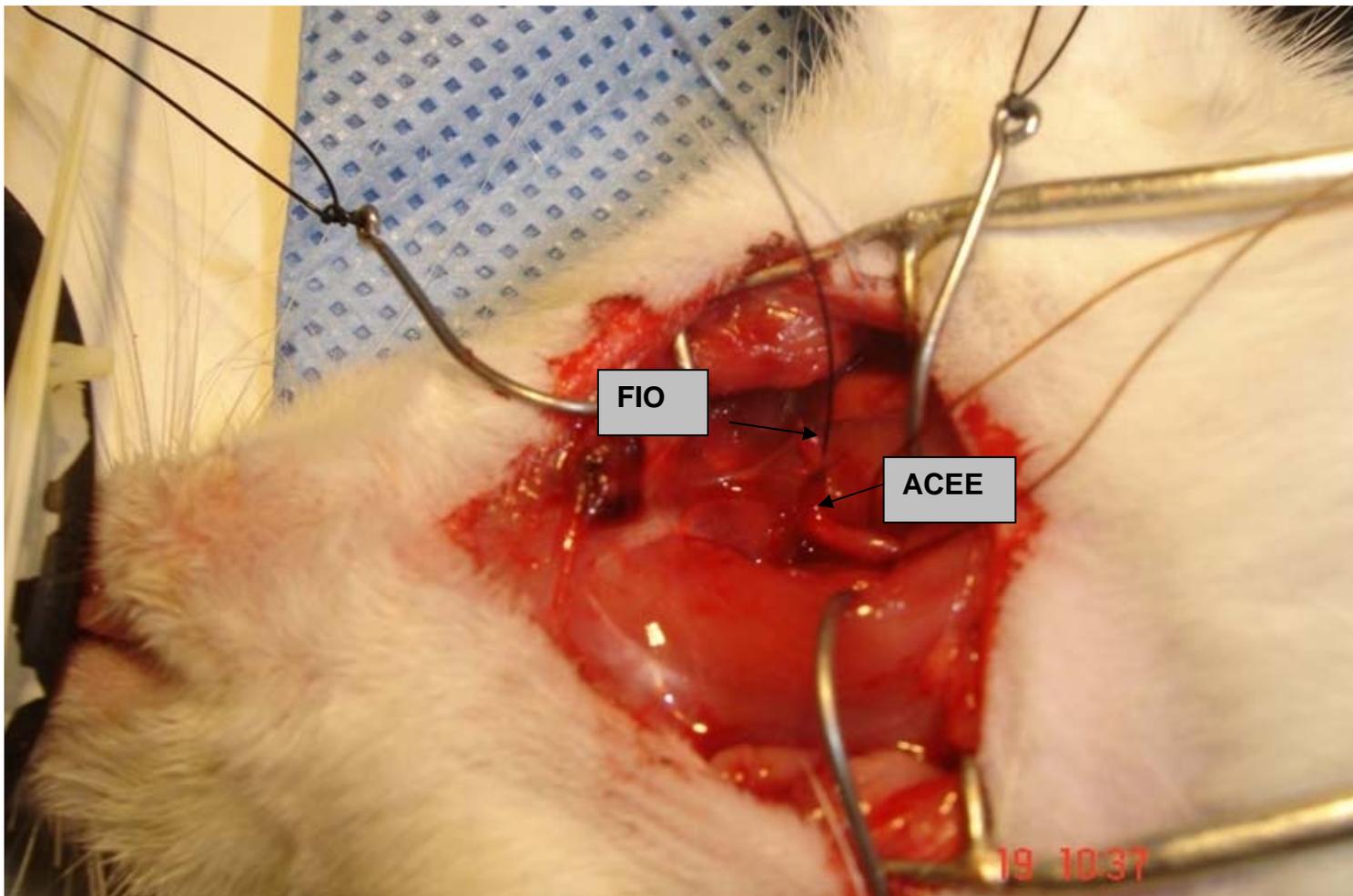


Figura 4: Fio introduzido pelo coto da artéria da carótida externa.

3.4 FIO OCLUIDOR

O fio escolhido para a oclusão foi o nylon monofilamentar (Mononylon® 3-0® Ethicon). Um segmento de 5 cm foi padronizado para facilitar a mensuração de comprimento a ser introduzido. A extremidade introduzida foi modificada, tornando-se arredondada por calor (chama). A extremidade do fio foi umedecida em bálsamo sintético (Entellan®-Merck Germany) e deixada para secar. Este procedimento é importante para aumentar a probabilidade de causar lesão isquêmica por aumento da aderência.

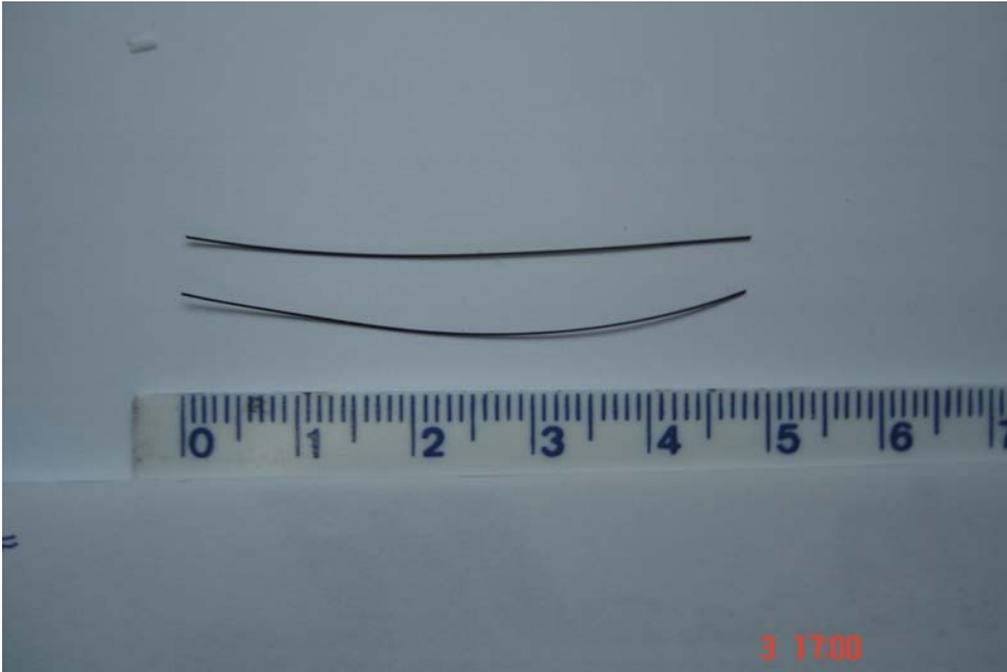


Figura 5: Fio Mononylon 3-0.

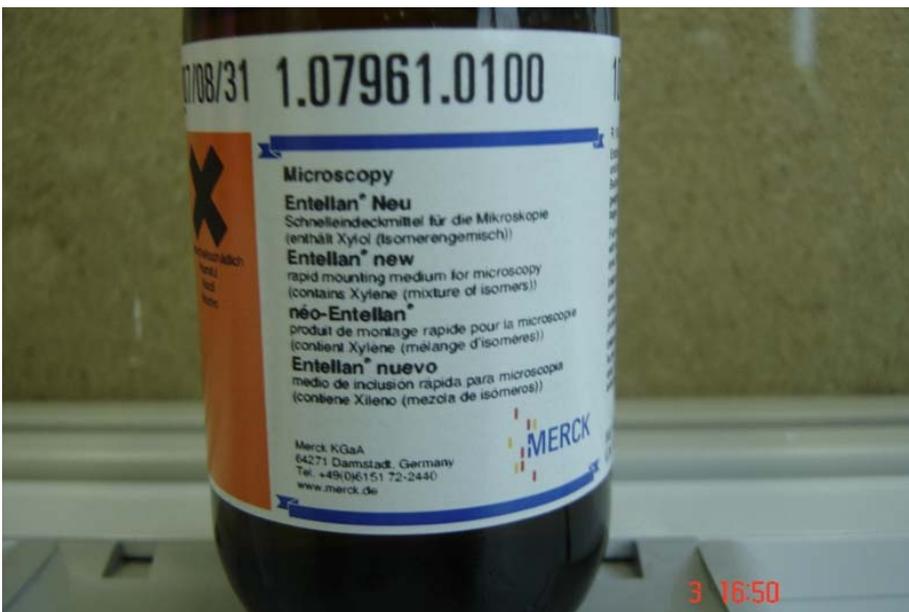


Figura 6: Cola Entellan.

3.5 AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA

O exame neurológico foi realizado após o término do procedimento e o despertar do animal, segundo uma escala de cinco (05) pontos (GERRIETS, 2004; BEDERSON, 1986):

- a) 0 (zero) – sem déficit neurológico;
- b) 1 (um) – perda de movimento na pata dianteira direita;
- c) 2 (dois) – circula para direita de modo inconstante;
- d) 3 (três) – circula para a direita de forma constante e/ou com queda para o lado;
- e) 4 (quatro) – depressão do sensorio;
- f) 5 (cinco) – morte.

Os animais que sobreviveram nas primeiras 24h foram sacrificados no período de 72h, e o cérebro retirado e examinado. O sacrifício foi feito com sobredose de anestésico halogenado em campânula.

3.6 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Os cérebros dos animais foram retirados e colocados em água fria, realizado o corte no plano coronário, em cinco fatias de 2 mm de espessura e corados em solução de 2% de 2,3,4-Triphenyltetrazolium chloride (TTC). As fatias permaneceram incubadas em temperatura de 37°C por um período de trinta (30) minutos e fixadas em solução de formalina tamponada a 10%. Após, permaneceram em ambiente refrigerado durante 24h, em recipiente fechado evitando exposição à luz (BEDERSON, 1986; SCHILICHTING, 2004; YANG, 2002; TÜREYEN, 2005; KUGE, 1995; WANG, 2001).

As peças foram colocadas em ordem do pólo frontal ao pólo occipital. Foi considerado que a lesão isquêmica estaria presente se a coloração com TTC fosse negativa.

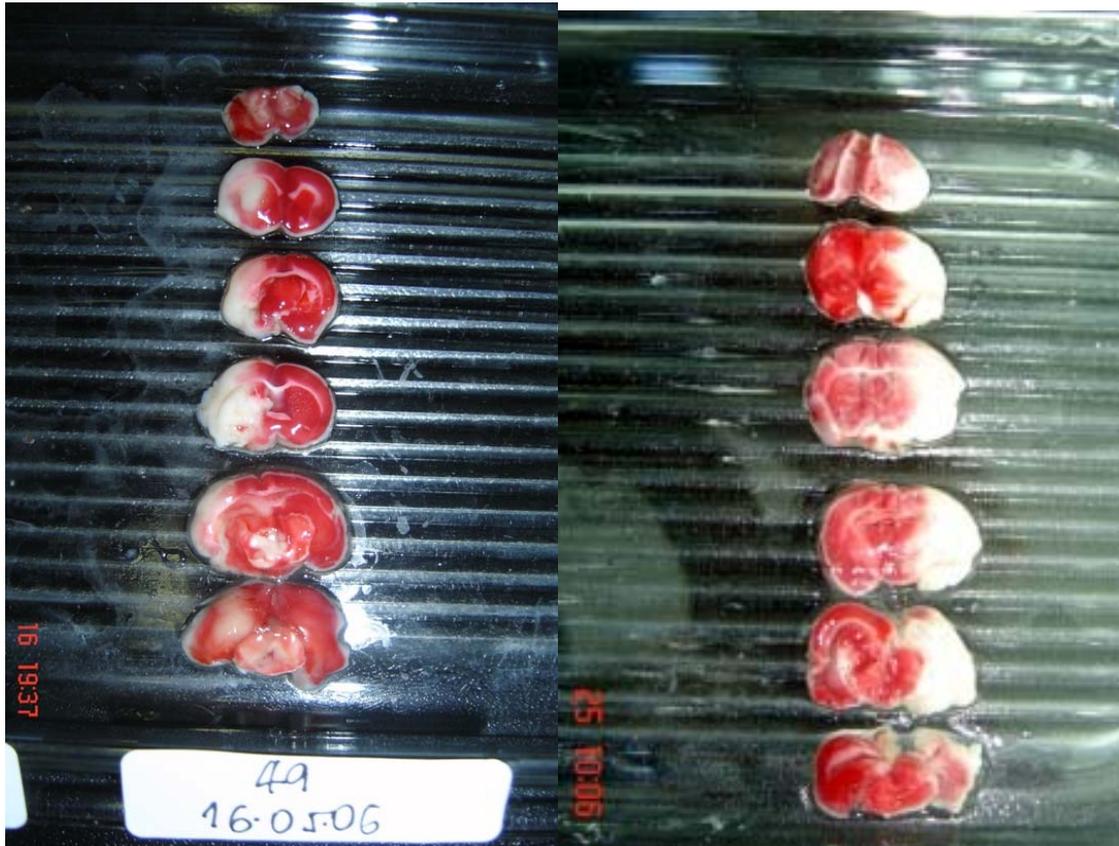


Figura 7: Peças com cloração pelo TTC onde há demonstração da lesão isquêmica.



Figura 8: Cérebro sem demonstração de lesão isquêmica.

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

As peças foram fotografadas para posterior medição e análise de suas áreas de infarto, utilizando-se, para isso, equipamento da marca Sony com resolução de 3,2 *Megapixels*.

Para a mensuração do volume de infarto, foi utilizado o programa NIH image (IMAGE 1.31 Windows). As áreas de infarto, em cada fatia, foram mensuradas e multiplicadas pela espessura de 2mm para a aquisição do volume da zona de infarto. A análise e mensuração do tamanho da zona de infarto foram realizadas por investigador sem conhecimento do procedimento. As medidas foram estabelecidas em *pixels*, o cálculo da superfície em mm^2 e o volume medido em mm^3 .

Todos os dados mensurados foram coletados de forma isolada, e medição foi feita tanto nas áreas sem infarto como nas áreas com infarto.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram descritos com média e desvio padrão, e os dados categóricos, por frequência e percentuais.

As comparações entre os grupos com oclusão de A e de B, para os dados quantitativos, foram realizadas mediante teste *t*-student de amostras independentes.

Nos casos de assimetria, aplicou-se o teste U de Mann Whitney para análise comparativa. O teste U de Mann Whitney também foi utilizado na comparação do exame neurológico.

As variáveis categóricas, presença de lesão e peso, foram comparadas pelo teste exato de Fischer.

Na comparação da média da área isquêmica e do volume entre os grupos A e B, ajustando para potencial efeito confusional de peso, foi utilizado o modelo de análise de co-variância.

Para visualização e demonstração das diferenças entre os grupos, utilizaram-se gráficos de *boxplot*. (Anexo A). O nível de significância ajustado no estudo foi de $\alpha=0,05$.

Os dados foram processados e analisados pelo programa SPSS, versão 12.0.

4 RESULTADOS

Tabela 1 – Resultados das variáveis do estudo segundo o grupo.

	Grupo A n. 28	Grupo B n. 24	p
Peso (Gramas)	423±41	439±46	0,59
Tempo cirúrgico	64,8±41	66,04±22	0,82
Fio (mm)	14,6±9,8	20,1±8,4	0,04
E.N.	2,0±1,1	2,4±0,6	0,19
Vol isq (mm ³)	162,9±110,8	259,3±125,1	0,13
Maisq (mm ²)	12,4±7,6	18,5±9,4	0,25

Peso= gramas

E.N.= exame neurológico..

Fio mm= distância do fio a partir da bifurcação carotídea.

Vol isq mm³= volume da área isquêmica em mm³.

Maisq= média da área isquêmica.

Foram analisadas cinquenta e duas (52) amostras de ratos *Wistar*, com pesos médios de 426,19 g, desvio padrão (DP+- 43,26) e com amplitude de 205 g (330 a 535 g).

O grupo 90 minutos foi constituído por 28 animais com peso médio de 423±41 g. O grupo 120 minutos foi constituído por 24 animais com peso médio de 429±46 g. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao peso (p=0,59).

Em relação à dose do anestésico Zoletil, a média foi de 0,21+-0,46 ml. Atropina foi de 0,41 +-0,1 ml.

O comprimento do fio introduzido, a partir da bifurcação, no grupo 90 minutos (n=28) foi de 14,6±9 mm e no grupo 120 minutos (n=24) foi 20,2±8 mm. O grupo 120 minutos teve maior comprimento de fio introduzido (p=0,04).

O tempo cirúrgico de procedimento para oclusão da ACM, no grupo 90 minutos foi de 64,8±16,4min e no grupo 120 minutos foi de 66,8±22,5 min. Não

houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tempo cirúrgico do procedimento, excluído o tempo de oclusão ($p=0,82$).

Tabela 2 – Resultados da Média da Área Isquêmica segundo o grupo.

Grupo	90 min	120 min
	n=11	n=11
Maisq	12,4±7,6	18,4±9,4

Valores expressos em porcentagem (%)
 $p=0,04$. ajustado por co variância

Isquemia foi observada em 11 animais (40%) do grupo 90 minutos e em 11 (50%) do grupo 120 minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com relação à ocorrência de isquemia ($p=0,78$). O risco no grupo 90 minutos foi de 1,07 (I.C.0,65-1,76) e no grupo 120 minutos, foi de 0,97 (I.C. 0,52-1,68).

A média da proporção percentual de volume de isquêmica em relação ao volume cerebral no grupo 90 minutos ($n=11$) foi de 12,4±7,6% e no grupo 120 minutos de 18,4±9,4%. O grupo 120 minutos apresentou maior área isquêmica ($p=0,04$).

O volume obtido de área isquêmica (infarto) no grupo 90 minutos ($n=11$) foi de 162,9±111,0 mm³ e no grupo 120 minutos ($n=11$) foi de 259,2±125,1 mm³. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao volume de infarto ($p=0,07$). Quando ajustado pelo peso de cada animal, por análise de co-variância, o volume médio de infarto foi 162,9±111,0 mm³ no grupo de 90 minutos e de 259,2±125,1 mm³ no grupo de 120 minutos ($p=0,04$).

A distribuição dos animais, quanto ao déficit neurológico, apresentou os seguintes resultados: no grupo 90 minutos de oclusão: grau zero $n=2(7,1\%)$ grau 1 $n=8(28,5\%)$, grau 2 $n=7(25,0\%)$, grau 3 $n=9(32,0\%)$ e grau 4 $n=2(7,1\%)$.

No grupo de 120 minutos; grau 0 $n=0(0\%)$, grau 1 $n=0(0\%)$ grau 2 $n=16(66,6\%)$, grau 3 $n=7(29,2\%)$ e grau 4 $n=1(3,3\%)$.

O escore no exame neurológico foi de 2,0±1,1 no grupo 90 minutos e 2,4±0,6 no grupo 120 minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação ao escore neurológico ($p=0,26$, U Mann-Whitney).

Tabela 3 – Distribuição exame neurológico comparado ao tempo de oclusão.

	90 min	n	120 min	n
0	7,1	2	0	
1	25,0	8	0	
2	30,4	7	66,6	16
3	32,0	9	29,2	7
4	7,1	2	3,3	1

Valores em porcentagem %. P=0,26

Em relação à presença de lesão, a distribuição dos animais, quanto ao exame neurológico, apresentou: grau 0 n= 0(0%), grau 1 n=1(4,5%), grau 2 n=12(54,5%), grau 3 n=9(40,9%) e grau 4 n=0(0%).

O grupo 90 minutos apresentou uma média no escore de 2,04±1,1, enquanto no grupo 120 minutos a média foi de 2,38±0,5 com nível de significância p=0,65.

Tabela 4 – Distribuição percentual conforme presença ou ausência de lesão isquêmica.

Grau	Ausência	N	Presença	n
0	10,0	3	0	0
1	20,0	6	4,5	1
2	36,6	11	54,5	12
3	23,3	7	40,9	9
4	10,0	3	0	

p=0,42

Tabela 5 – Resultados do Tempo de Oclusão com ou sem lesão.

	Sem lesão	Com lesão
90 min	60,7	39,3
n 28	n 17	n 11
120 min	54,2	45,8
n 24	n 13	n 11

P=0,78

5 DISCUSSÃO

Os eventos isquêmicos cerebrais são problema de alta relevância clínica: são muito freqüentes, associados a grande morbimortalidade e elevados custos. A pesquisa clínica nessa área tem grande limitação. O evento é imprevisível, as dimensões das seqüelas não são uniformes, e as condições clínicas associadas são muito variadas. O desenvolvimento de modelos experimentais de pesquisa nesse contexto é altamente desejável.

Por ser clinicamente mais importante, a isquemia cerebral focal tem sido alvo da atenção de muitos pesquisadores. A oclusão experimental da artéria cerebral média (OACM) é a maneira mais comumente utilizada em pesquisa para obtenção de isquemia cerebral focal. O modelo exige manipulação de vasos sangüíneos; portanto, o animal deve ter um porte mínimo que o permita. O rato, animal utilizado no presente estudo, é provavelmente o animal menos desenvolvido na escala zoológica, com configuração anatômica favorável para tal.

As técnicas descritas para indução de isquemia cerebral são diversas, podem envolver craniotomia para obtenção da oclusão; embolização arterial; oclusão de quatro ou três vasos na região cervical. A variação no tempo de isquemia utilizado contribui para a diversidade dos modelos experimentais de pesquisa. (CARMICHEAL, 2005). Atualmente, o modelo de isquemia cerebral focal mais utilizado é a trombose por OACM (HOSSMANN, 1998).

Vários são os métodos descritos para OACM. O método de Koizumi (1986) consiste em realizar craniectomia e coagular a ACM. Obtém-se infarto cerebral em 93% dos animais. A oclusão irreversível do vaso não permite o estudo de um importante evento verificado na condição clínica: a reperfusão. O método de Longa (1989) consiste em introduzir fio cirúrgico na Artéria Carótida Interna (ACI), com progressão até a oclusão da artéria cerebral média (ACM). Infarto cerebral é alcançado em 56% dos casos, e a taxa de mortalidade é significativa. A retirada do fio ocluser desobstrui o vaso, o que leva à reperfusão do tecido isquêmico. Essa situação mimetiza o que ocorre no tratamento atual do acidente vascular isquêmico, que visa à desobstrução vascular por angioplastia ou trombólise. Além disso, esse

método permite o estudo das conseqüências de diferentes tempos de isquemia. Foi, por essas razões, o método escolhido para o presente estudo.

O método original de Longa teve aprimoramentos. A utilização de Mononylon® 3-0 e recoberto com poly-l-lysine, uma cola, levou a índices mais elevados de infarto cerebral. Todos os ratos submetidos à isquemia por 60 minutos e 120 minutos apresentaram zona de infarto (BELAYEV, 1996). No presente estudo, essa modificação foi incorporada, porém obtiveram-se índices inferiores de infartos. Fatores limitantes ao índice de sucesso do experimento podem estar relacionados com a não-visualização direta da extremidade do fio. Se não fixado na posição correta, na origem da ACM, imediatamente distal à sua bifurcação da ACI, pode ocorrer reperfusão precoce ou má-oclusão da ACM. Cita-se também que pode ocorrer deslocamento do fio por aumento da pressão arterial durante o experimento. (SUN, 2005). Se o fio ocluidor não progride suficientemente dentro da ACI, oclui apenas a artéria coroidéia anterior, que se origina da porção intracraniana da ACI e não da ACM, estabelecendo-se fluxo colateral pelo lado oposto, pela ACA ipsilateral e bifurcação da ACI. (GERRIETS, 2004; SUN, 2005). Sabidamente, a oclusão da artéria coroidéia anterior leva a déficit motor sem infarto cerebral estabelecido. O posicionamento inadequado do fio pode explicar o fato de que, no presente estudo, 27 animais apresentam déficit neurológico sem infarto cerebral estabelecido.

Outros fatores que podem influenciar a ocorrência de infarto cerebral nesse modelo são: a variação do comprimento da ACM, a variabilidade anatômica de seus ramos, e a suplência de ramos colaterais (YANG, 2002; BARDUTZKY, 2005; HOSSMANN, 1998).

Independentemente da técnica de obtenção da isquemia, há diferença entre as espécies e entre os indivíduos quanto à resistência ao insulto isquêmico, o que pode também explicar parcialmente as diferenças de volume e freqüência de lesão (KAPLAN, 1991).

A experiência do pesquisador também é fator de importância na aplicação do método. A percepção da resistência à progressão do fio é em grande parte subjetiva, dependente de treinamento. (Sun, 2005). Takano (1997) considera principiante um pesquisador com prática de seis meses, pesquisador experiente entre um e dois anos e pesquisador bem habilitado (*well skilled*) com mais de dois anos. Nesse contexto, ainda que treinado em microcirurgia, o autor do presente

estudo pode ser considerado principiante, o que deve ter influenciado os resultados apresentados.

Permanece na literatura questionamento sobre a escolha do fio para oclusão. (Kuge, 1995; Yang, 2002; Ábrahám, 2002). O diâmetro e o material do fio são fatores críticos na obtenção de resultados no modelo de OACM. Não está eleito um padrão definitivo de fio para esse fim. (Sun, 2005).

No presente estudo, a escolha do fio Mononylon® deveu-se à fácil obtenção e manuseio do mesmo. O diâmetro escolhido, 3-0, permite melhor oclusão e induz infarto com mais consistência e extensão. (Belayev, 1996). O uso de cola (ENTHELAN®) permite maior aderência, o que, teoricamente, aumenta as chances de ocasionar lesão isquêmica (Zhao, 1996). Belayev (2005) em seus experimentos também utilizou fio Mononylon® 3-0 coberto com poly-lysine.

Kuge et al (1995) compararam dois fios Mononylon® 4-0 de produtores distintos (Ethilon® e Nitcho®) e observaram que o fio com maior diâmetro tem maior probabilidade de causar uma oclusão vascular mais completa e, conseqüentemente, produzir lesão mais extensa. Li et al (1999) utilizaram fio Mononylon® 4-0 siliconizado com ponta arredondada, para evitar a ruptura vascular. Gerriets (2003; 2004) e Woitzik (2006) utilizaram fio Mononylon® 4-0 siliconizado com a mesma técnica.

Há uma relação entre comprimento do fio introduzido na ACI e presença de déficit neurológico. O comprimento do fio introduzido para causar OACM varia, conforme vários autores, de 17 mm a 23 mm (Longa, 1989; Forsting, 1995; Ábrahám, 2002; Belayev, 2005), dependendo da raça e do peso do rato. Schimidt-Elsaesser (1998) verificaram que a introdução de segmento de fio igual ou superior a 22 mm provoca maior déficit neurológico quando comparada com a introdução menor ou igual a 18 mm. No presente estudo a variável comprimento do fio introduzido foi aferida. No grupo de 90 minutos, a média foi de 14,7 mm e no grupo de 120 minutos, de 20,1 mm ($p=0,37$). Zhao (1996) demonstrou que o comprimento do fio varia de acordo com o peso do animal. Se realizada correção pelo peso do animal, por análise de covariância, obtém-se que há diferença entre os grupos ($p=0,04$), o que deve ter influenciado os resultados, especialmente os relacionados ao volume de infarto. Esses dados demonstram que o grupo de 90 minutos teve uma média de comprimento de fio introduzido inferior àquela citada pela literatura. Separados nos dois grupos, os animais que não apresentaram lesão isquêmica, o

comprimento introduzido variou de 13,7 a 18,6 mm, enquanto os dados análogos dos animais que apresentaram lesão foram de 16 a 21,9 mm. Essa diferença pode ser atribuída à distribuição da alocação dos grupos: a maioria dos experimentos do grupo de 90 minutos foi realizada no início do trabalho. Supõe-se que a experiência do autor tenha influenciado essa variável.

Outra variável utilizada no presente estudo, para avaliar a consistência da implantação do modelo experimental, foi o tempo de oclusão da ACM. Kaplan (1991) verificaram que o restabelecimento de perfusão uma hora após a indução da isquemia pode não resultar em infarto cerebral significativo. Sugerem que uma isquemia sustentada entre uma e duas horas é suficiente para causar infarto, enquanto que, acima de três horas, o infarto resultante não é diferente do obtido com oclusão completa, corroborando os resultados de Longa (1989), segundo os quais oclusões mais prolongadas do que duas horas não acrescentam área de infarto e são semelhantes às obtidas com oclusão permanente. Tempo de oclusão de duas horas foi utilizado por Ding (2002) e por Kristián (1998) com diferentes objetivos, enquanto o tempo de 90 minutos foi utilizado por Schmid-Elsaesser (1998) e por Maier (2001).

Estudo realizado com ressonância nuclear magnética, na fase aguda de isquemia, demonstra que volume anormal na difusão aumenta nos primeiros 90 minutos e alcança seu maior pico após duas horas. (Henninger 2006), sugerindo ser esse o tempo do estabelecimento da lesão tecidual irreversível. A formação de edema e sua queda rápida são das características dos modelos de reperfusão. O aumento no déficit neuronal não depende apenas da zona de infarto ou do seu curso temporal. O edema influencia a formação e o aumento do infarto, portanto, o tempo na melhora do déficit está relacionado ao declínio do edema. (Takamatsu, 2002).

Engelhorn (2002) verificou que a reperfusão, uma hora após OACM, reduz significativamente o volume do infarto e melhora o resultado neurológico comparativamente aos controles em seu estudo. Não houve redução na área de infarto quando o tempo de oclusão foi superior a duas horas.

No presente estudo, obteve-se lesão isquêmica em 39% dos animais do grupo 90 minutos e em 46% nos do grupo 120 minutos. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,77$). Deve-se mencionar que foi relatado que a raça *Wistar* notadamente apresenta maior tolerância a períodos de OACM acima dos 120 minutos e apresenta boas taxas de sobrevivência. (Peeling, 2001).

A dimensão da zona de infarto freqüentemente tem sido um indicador primário da extensão do dano isquêmico cerebral nos modelos animais. O volume de infarto pode ser identificado por métodos histoquímicos, como o utilizado no presente estudo, pelo uso de triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Schiliching, 2004). Esse método tem ampla aceitação na literatura científica e foi utilizado para diferentes finalidades, como a quantificação de volume de infarto em ratos submetidos a OACM com e sem hipertensão. (Dogan,1998). O método é de fácil aplicação e interpretação e não é dispendioso economicamente. Há evidências de que as lesões mensuradas são menores pelo TTC do que pela ressonância nuclear magnética, provavelmente pela influência do edema tecidual. (Bardutzky, 2005).

Optou-se por utilizar programa de computador de domínio público para quantificação do volume baseado na análise de fotografias digitais. Esse método tem sido freqüentemente utilizado para esse fim. (Jieyong, 2006). Os resultados são expressos em volume ou em proporção percentual do volume cerebral total.

O volume médio do infarto foi menor no grupo 90 minutos do que no grupo 120 minutos. É esperado que o maior tempo de isquemia resulte em maior volume de infarto. (Engelhorn, 2002). A proporção percentual de infarto foi de 12,4 % no grupo 90 minutos e de 18,5% no grupo 120 minutos ($p=0,22$ ajustado pelo peso). Esses resultados estão em concordância com os apresentados por Takano (1997), que comparou dados de pesquisador iniciante ($195,9 \text{ mm}^3$), experiente ($212,6 \text{ mm}^3$) e bem habilitado ($204,7 \text{ mm}^3$). Resultados em mesma faixa foram encontrados por Dogan (1998), comparando ratos hipertensos ($262,6 \text{ mm}^3$) com não hipertensos ($145,4 \text{ mm}^3$) após OACM e por Zhao (1996), que foi de 149 mm^3 .

Estudando proporção percentual de infarto e tempo de isquemia, Gerriets (2003) obteve 29,8% em 30 minutos de OACM, 46,8% em 240 minutos. Yang (2002) obteve proporção de 27,6%. Essas proporções são maiores do que as obtidas no presente estudo, o que provavelmente pode ser creditado à experiência dos pesquisadores.

Outro parâmetro utilizado para avaliação do modelo experimental foi o déficit neurológico. A análise estatística demonstrou que um maior escore neurológico está associado com maior probabilidade de infarto, o que reforça a validade da utilização dessa variável. Na comparação geral entre os grupos, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao escore neurológico. No entanto, separados os animais que apresentaram lesão isquêmica, o grupo 120 minutos teve

escore maior do que o grupo 90 minutos ($p=0,05$). Esses resultados são comparáveis com os dados publicados na literatura. (Peeling, 2001; Yang, 2002).

A ausência de déficits motores pode indicar falha na oclusão e, portanto, falha na aplicação do método. Falhas e efeitos não desejados ocorrem, freqüentemente, no modelo do fio intravascular para infarto em animais. Não é possível identificar esses animais baseados apenas no exame clínico, pois podem apresentar sinais deficitários, independentemente da oclusão da artéria cerebral. (Gerriets, 2004).

Vários autores excluem animais que não demonstram anormalidades no exame neurológico, pois provavelmente não terão infarto cerebral. O fio intravascular pode falhar em promover oclusão da ACM, o que leva ao não-desenvolvimento de infarto cerebral. (Gerriets, 2004). No presente estudo, nenhum dos animais que teve escore neurológico zero ($n=3$) desenvolveu infarto cerebral.

O escore neurológico não é totalmente confiável pois sinais e comportamentos são dependentes de algumas porções do sítio do infarto e não fazem parte da avaliação. (Roof, 2001).

6. CONCLUSÃO

O modelo experimental de isquemia cerebral, por oclusão da artéria cerebral média, por fio intraluminal, mostrou-se viável em nossas condições laboratoriais e técnicas. Sua implantação é promissora para a execução de projetos futuros.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo em relação à frequência de lesão isquêmica à histopatologia, avaliada pela coloração com TTC.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao déficit neurológico, avaliado por escore padronizado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo, em relação ao volume de infarto, avaliado pela coloração pelo TTC, pela fotografia digital e pelo cálculo computadorizado. Quando ajustado pelo peso dos animais, o volume de infarto cerebral foi maior no grupo 120 minutos do que no grupo 90 minutos.

7. PERSPECTIVAS

Novas investigações sobre terapias com células multipotenciais trazem perspectivas otimistas na regeneração de lesões cerebrais ocasionadas por isquemia. Utilizando o modelo empregado no presente estudo, foi demonstrada regeneração do complexo axônio-mielina, melhora funcional e aumento da angiogênese, sinaptogênese e gangliogênese, nas áreas isquêmicas cerebrais de ratos, pela administração de células-tronco. (Shen, 2006). Efeitos positivos sobre modificações estruturais dos dendritos, e relacionados à plasticidade cerebral e à completa reconstrução do circuito neuronal, foram demonstrados entre três e 72 horas após OACM. (Iihoshi, 2004).

Também com a utilização desse modelo experimental, estudos estão sendo realizados com o auxílio de fator de crescimento endotelial. Os resultados são promissores, com reversão de sinais isquêmicos sobre o sensorio, a motricidade e o comportamento, avaliados após 4 semanas da OACM. (Wang, 2006).

A implantação e aplicação desse modelo experimental requer treinamento prolongado. As condições para sua aplicação em nosso meio foram testadas, e os resultados ensejam sua aplicação em futuras pesquisas. O condicionamento à isquemia, fenômeno descrito em vários órgãos, poderá ser alvo de avaliação futura, tendo em vista sua possível aplicação clínica em neurocirurgia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ábrahám H, Somogyvári-vigh A, Maderdrut JL, Vihg S, Arimura A. Filament size influences temperature change and brain damage following middle cerebral after occlusion in rats. *Exp Brain Res* 2002,142:131-8.

Aspey BS, Cohen S, Patel Y, Teruli M, Harrison MJG. Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke. *Neuropathology and applied Neurobiology* 1998,24:487-97.

American Academy of Neurology. Practice advisory: thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. 1996.www.ann.com/professionals

Barber PA, MD ChB, MRCP(UK), HOYTE, Lisa, BSc, COLBOURNE, Frederick, PhD, BUCHAN, Alastair M, BM FRCP. Temperature – regulated model of focal ischemia in the mouse. A study with histopathological and behavioral outcome. *Stroke* 2004,35:1720-5.

Bardutzki J, MD, Shen Q, PhD, Henninger N, MD, Bouley J, BS, Duongt Q, PhD, Fischer M, MD. Differences in ischemic lesions evolution in different strain using diffusion and perfusion imaging. *Stroke* 2005,36:2000-5.

Bederson JB, MD, Pitts LH, MD, Tsui M, BS, Nishimura MCAB, Davis RL, MD, Bartkowiak HM, MD, PhD. A rat middle cerebral occlusion: evaluation of model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986,17;(3):472-6.

_____. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986,17;(6):1304-8.

Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao R, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke* 1996; 27:1616-22.

Belayev L, MD Khotorova IBS, Zhao W.PhD, Vigdorichik A, MD, Belayev ABS, Busto R, BS, Magal E PhD, Ginsberg MD, MD. Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2005,36:1071-6.

Brott T MD, Bogousslavski J. Treatment of acute ischemic. *Stroke NEJM* 2000, set 7, v.343;10:710-9.

Carmichael TS, Rodent L. Models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *Neuro Rx: Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2005, July (2):396-409.

Cesário CMM, Penasso P, Oliveira APR. Impact of the motor dysfunction in the quality of life in patients with stroke. *Rev Neuroscience* 2006, 14(1):006-9.

Derugin NMA et al. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke* 2003,31:1752-61.

Dias LAA, Colli BO, Netto JC, Lachat JJ. Avaliação da isquemia focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. *Arq neuropsiquiatria* 2000, 58(4):1047-54.

Ding Y MD, PhD, Lij, MD, Rafoals JÁ PhD, Phillips J, BVSc PhD, Diaz FG, MD, PhD. Preperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory after transient cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 2002,33:492-2504.

Dittmar M, MD, Spruss T PhD, Schuierer GMD, Horn M, MD. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 2003,34:2252-7.

Dogan A, Baskaya MK, Rao VL, Rao AM, Dempey RJ. Intraluminal suture occlusion of the middle cerebral artery in spontaneously hypertensive rats. *Neurology Res* 1998, April(20):265-7.

Engelhorn T MD, Kummer R von MD, Reith W MD, Forsting M, MD, Doerfler A, MD. What is effective in malignant middle cerebral artery infarction: reperfusion, craniectomy, or both? An experimental study in rats. *Stroke* 2002,33:617-22.

Forsting M, MD, Reith W, MD, Schäbitz W, MD, Heiland S, PhD, Kummer R von MD, Hacke W, MD, Sartor K, MD. Decompressive craniectomy for cerebral infarction. *Stroke* 1995,26:259-64.

Gerriets T LI, Silva F, MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, Fischer M. The macrosphere model: evaluation of new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods* 2003;34:4-2239.

Gerriets T, MD, Stolz E, MD, Walberer MD, Müller C PhD, Rottger C, MD, Kluge A, MD, Kaps M, MD, Fischer M, MD, Bachmann G, MD. Complications and pitfalls in rat. Models for middle cerebral artery occlusion: a comparison between the suture and macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke* 2004,35:2372-7.

Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. National Academic Press. Washinton DC 1996

Henninger N, MD. Comparison of Ischemic lesion evolution in embolic versus mechanical middle cerebral artery occlusion in sprague dawley rats using diffusion and perfusion imaging. *Stroke* 2006,37:1283-7.

Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Res* 1998, 39:106-20.

Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. A therapeutic windows for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adults rats. *Brain Research* 2006,1007: 1-9.

Jieyong B, Zhong W, Shiming Z, Dai Z, Kato Y, Kano Y, Kanno T, Sano H. Descompressive craniectomy and mild hypothermia reduces infarction size and counterregulates bax and bcl- 2 expression after permanent focal ischemia in rats. *Neurosurg Rev* 2006, 29:68-172.

Kaplan B MD, Brint SMD, Tanabe J, MD, Jacewicz M, MD, Wang X-J, MD, Pulsinelli W, PhD, MD. Temporal threshold for neocortical infarction in rats: subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke* 1991, 22:1032-9.

Koizumi J, Yoshida Y, Nakasawa O. A experimental studies of ischemic brain edema. In: New experimental model of cerebral embolism in rats ith recirculation can be introduced in the ischemic area. *JPM, Stroke* 1986;8:1-8.

Korenkov AI, Pahnke J, Frei K, Warzok R, Schroeder HWS, Frick R, Muljana L, Piek J, Yonekawa Y, Gaab MR. Treatment with nimodipine or mannitol reduces programmed cell death and infarct size following focal cerebral ischemia. *Neurosurgery Rev* 2002, 23:145-50.

Kristián T, Gidö G, Kuroda S, Schütz, A, Siesjö BK. Calcium metabolism of focal and penumbra tissues in rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion. *Exp rain Res* 1998,120:3-509.

Kuge Y MS, Minematsu K MD, Yamaguchi T MD, Miyakeyoshihiro MD. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1995, 26:5-1658.

Lavine SD, MD, Masri LS, MS, Levy ML ,MD, Gianotta SL, MD. Temporary occlusion of the middle cerebral artery intracranial aneurysm surgery: time limitation and advantage of brain protection. *J Neurosurgery* 1997,87:17-824.

Fuhai LI, MD, Omae T, MD, Fisher M, MD. Spontaneous hypertermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 1999; 30: 2464-2471.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke* 1989,20:84-91.

Maier CM, PhD, Sun GH, MD, PhD, Kunis D, BS, Yenari MA, MD, Steinberg MD, PhD. Delayed induction and long-term effects of mild hypotermia in a focal model of transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. *J Neurosurgery n.* 94, 2001:90-6.

Peeling J, PhD, Corbett D, PhD, Del Bigio MR, PhD, MD, Hudzik TJ, PhD, Campbell MMA, Palmer GC, PhD. Rat middle cerebral artery occlusion correlations between histopathology, T2-wighted magnetic resonanceimaging, and behavioral indices. *Journal of Stoke and Cerebrovascular Disease* 2001,10(4):166-77.

Roof RL, PhD, Schielke GP PhD, Ren X, MD, Hall ED, PhD. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 2001,32:2648-57.

Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. Therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Research* 2004,1007:1-9.

Schiliching CRL, Cestari Junior LA, Sekiyama JY, Silva FM, Milani, H. Validation of simple and inexpensive method for the quantitation of infarct in the rat brain. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* 2004,37:11-521.

Schimid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H-J. Monotherapy with dextromethorphan or trilazad-but not a combination of both: improves outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Exp Brain Res* 1998, 122:1-127.

Shen LH, Li Y, Chen J, Zhang J, Vanguri P, Borneman J, Chopp M. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increase axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience* 2006,137:393-9.

Sun, F, Lopez, Sanches C, Romero FJM, Luis L, Merino CG, Martinez VG. Transfemoral selective intraluminal wiring technique for transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 2005,149:82-9.

Takamatsu H, Tatsumi, M, Nitta S, Ichise R, Muramatsu K, Iida M, Nishimura S, Umemura K. Time course of progress to the chronic stage of middle cerebral artery occlusion models in rats. *Exp Brain Res* 2002,46:95-102.

Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG 3rd, Fischer M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture in rats. *Journal Neurology Science* 1997, Dec 9;153(1):8-11 ABSTRACT.

Türeyen K, MD, Vemuganti R, PhD, Sailor KA, BS, Dempsy RJ, MD. Ideal suture diameter is critical for consistent middle cerebral artery occlusion in mice. *Operative Neurosurgery* 2005 Jan, v. 56:196-9.

Wang Y, Galvan V, Gorotiza O, Ataie M, Jin K, Greember DA. Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorimotor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research* 2006,1115:186-93.

Wang CX, Yang Y, Yang T, Shuaib A. A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation. *Brain Research* 2001,1:115-20.

Woitzik J, Schneider C, Thomé C, Scheck H, Schilling L. Comparison of different intravascular thread occlusion models for experimental stroke in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 2006, 151: 224-31.

Xu C, Yang Y, Yang T, Shuaib, A. A Focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation. *Brain Research Protocols* 2001, (7):115-120.

Yamamoto H MD, DMSc, Nagata I MD DMSc, Niitsu Y, Msc, Zhang Z, MD, PhD, Xue JH, MD, PhD, Sakai N, MD, DmSc, Kikuchi H, MD, DMSc, Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. *Stroke* 2001,32:232-9.

Yang Y, Yang T, Li Q, Wang CX, Shuaib A. A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into middle cerebral artery: a comparison study. *Journal of Neuroscience Methods* 2002, 118:199-206.

Zhang RL, Chopp M, Hang ZG, Jiang Q, Ewing JR. A rat model focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res* 1997, 22; 766(1):83-92.

Zhang RL, Chopp M, Zhang ZG; Jiang Q, Ewing JR. A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Research* 1997, (766):83-92.

Zhao W, PhD, Ginsberg M, MD, Prado R MD; Belayev L MD. Description of infarct frequency distribution by computer-assisted image mapping in rat brains with middle cerebral artery occlusion. Comparison of photothrombotic and intraluminal suture models. *Stroke* 1996,27:1112-17.

ANEXOS

Anexo A

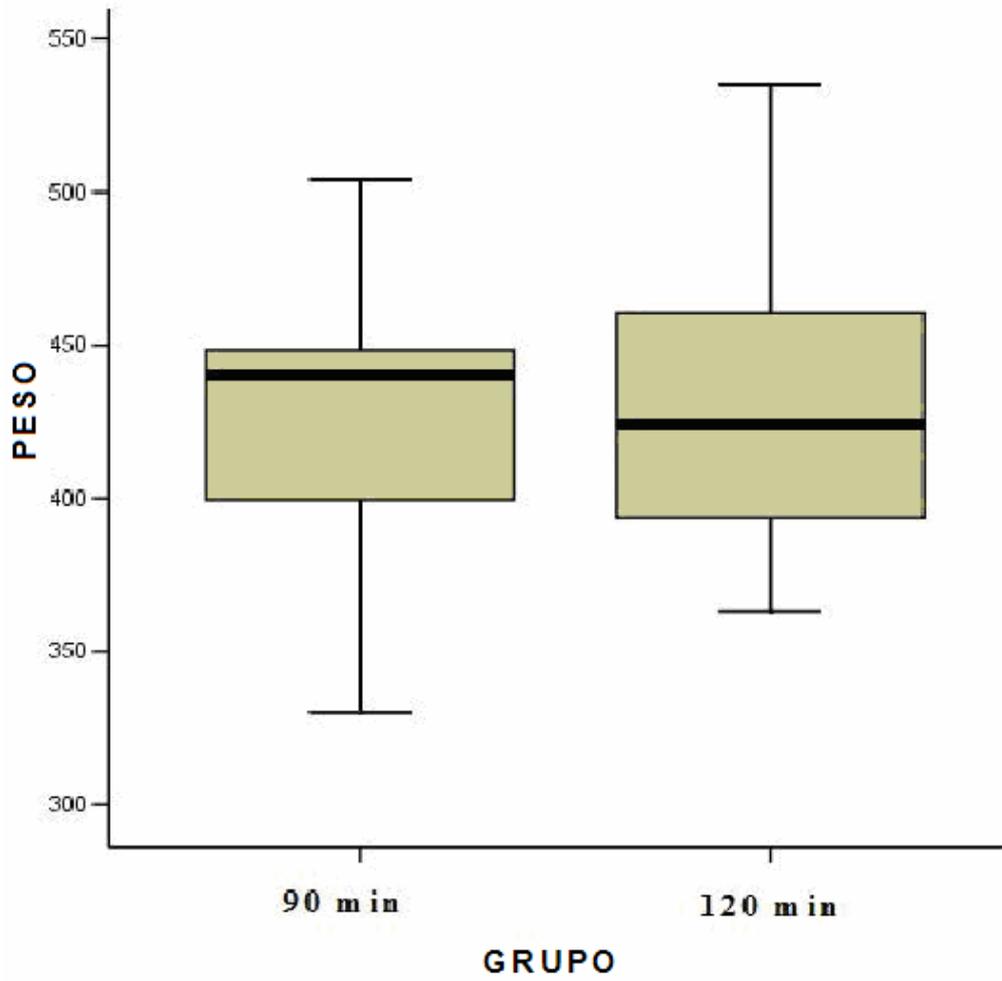
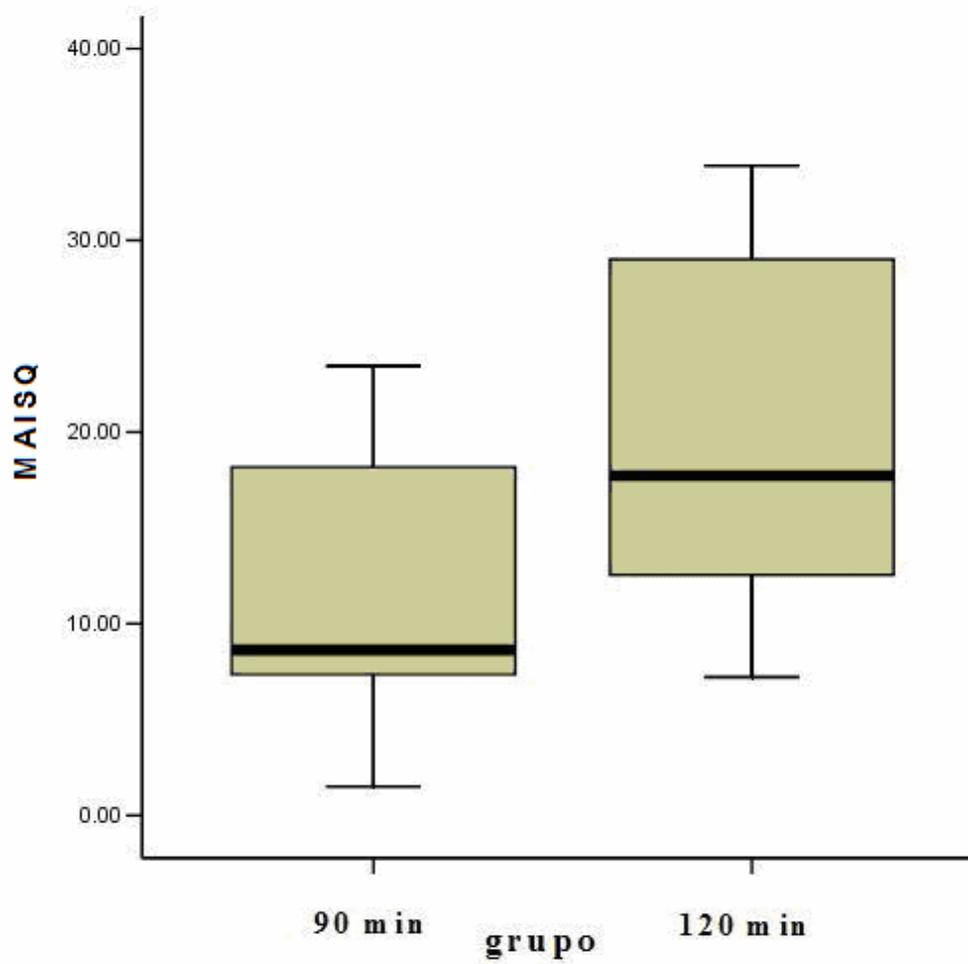


Figura 9: Distribuição dos grupos em relação ao peso (gramas)



Maisq = média da área isquêmica

Figura 10: Média da área isquêmica em relação ao porcentual e à sua distribuição nos grupos

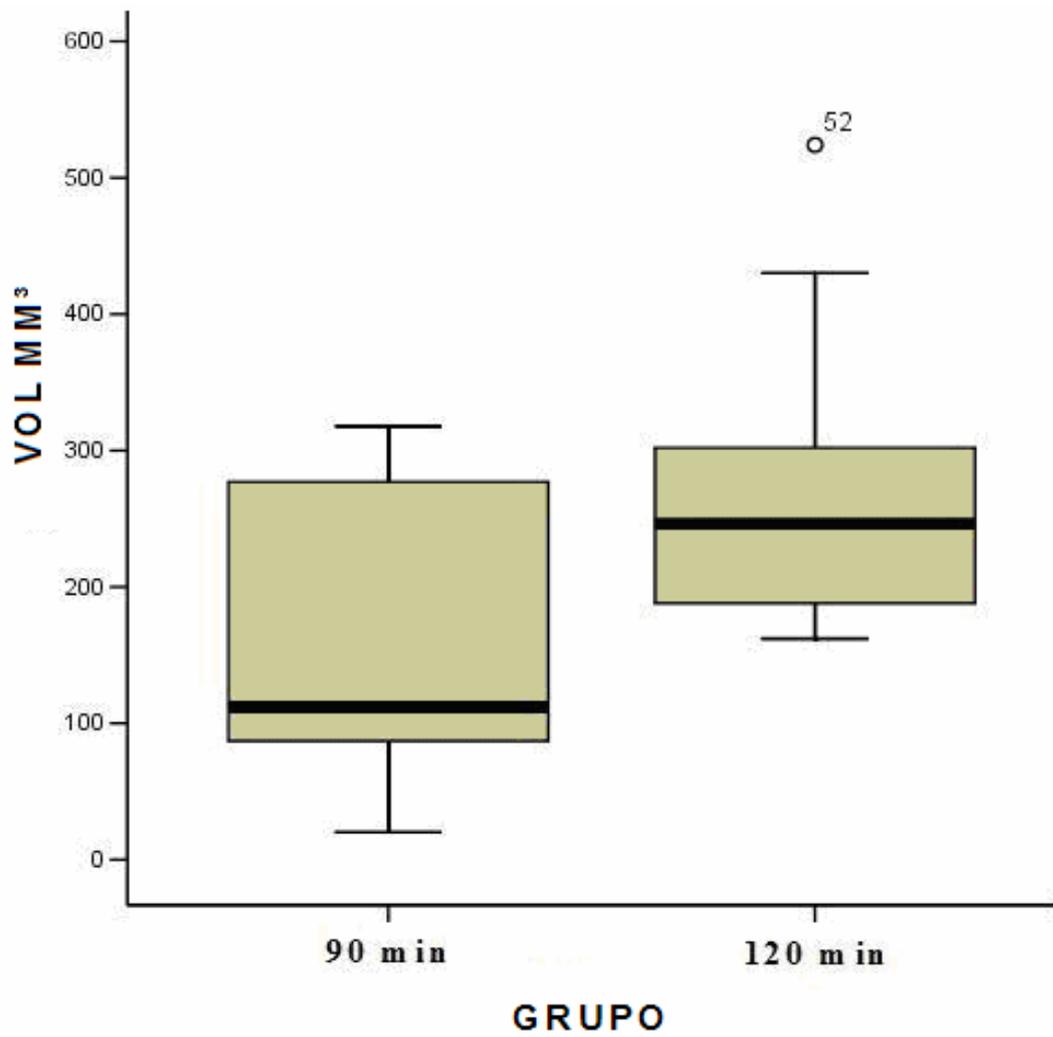


Figura 11: *Volume da área de infarto em relação aos grupos*