**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**NEUROPROTEÇÃO HIPOTÉRMICA PRÉ, INTRA E PÓS-ISQUÊMICA
NA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TEMPORÁRIA EM RATOS:
ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

ROBERTO ALEXANDRE DEZENA

**Ribeirão Preto
2011**

ROBERTO ALEXANDRE DEZENA

**NEUROPROTEÇÃO HIPOTÉRMICA PRÉ, INTRA E PÓS-ISQUÊMICA NA
ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL TEMPORÁRIA EM RATOS: ANÁLISE
MORFOMÉTRICA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas. Área de Concentração:
Clínica Cirúrgica – Opção: Neurocirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli

Ribeirão Preto
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dezena, Roberto Alexandre

Neuroproteção Hipotérmica Pré, Intra e Pós-Isquêmica na Isquemia Cerebral Focal Temporária em Ratos: Análise Morfométrica. Ribeirão Preto, 2011.

101p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Colli, Benedicto Oscar.

1. Isquemia Cerebral Focal. 2. Reperfusão. 3. Morfometria.
4. Neuroproteção. 5. Hipotermia leve.

DEZENA, R. A. **Neuroproteção hipotérmica pré, intra e pós-isquêmica na isquemia cerebral focal em ratos: análise morfométrica.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICO ESTA TESE,

Para minha noiva Fabiana,

Para meus pais José Roberto e Célia,

Para minha irmã Rozalina e meu sobrinho Elton,

Para meus avós Paulino Dezena (*in memorian*) e Rozalina (*in memorian*), e,

Mauro Luisi (*in memorian*) e Carolina.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Benedicto Oscar Colli, pelo acolhimento no programa, pela atenciosa orientação, pela amizade, pelos ensinamentos neurocirúrgicos, e pelo exemplo profissional,

Ao Professor Doutor Carlos Gilberto Carlotti Jr., pelo acolhimento no programa, pelo estímulo constante, e pelas valiosas sugestões a este trabalho,

Ao Professor Doutor Luís Fernando Tirapelli, pelo acolhimento no programa, pelas sugestões, e por algumas das belas imagens que ilustram esta tese,

Ao Professor Doutor Amilton Antunes Barreira, pela pronta e gentil autorização ao uso do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, FMRP-USP,

Ao Professor Doutor Ricardo Torres Santana, da Universidade Federal do Amazonas, pela importante orientação à técnica morfométrica aqui utilizada, pelas sugestões, e pelas belas imagens cedidas,

Ao Professor Doutor Leopoldo Prézia de Araújo, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela amizade em todos esses anos, pelo treinamento neurocirúrgico, pelo apoio dado a este trabalho, e pelo estímulo constante à vida acadêmica,

Ao Professor Doutor Luiz Antônio Araújo Dias, do Hospital Santa Casa de Ribeirão Preto, pela amizade, pelo treinamento neurocirúrgico, e pelo apoio fundamental ao início desta jornada, ainda durante a residência médica,

Ao Professor Doutor Daniel Ferreira da Cunha, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela orientação estatística precisa no tratamento dos dados experimentais,

Ao senhor Daniel Mazzetto, do Laboratório de Neurocirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, pela amizade, gentileza, disponibilidade e grande conhecimento prático, em todas as etapas do procedimento cirúrgico,

À senhora Sandra Lúcia Balero Penharvel Martins e ao senhor Jorge Forjaz, do Laboratório de Histologia, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, pela disponibilidade e presteza na preparação histológica dos cérebros,

Ao senhor Antônio Renato Meirelles e Silva, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, FMRP-USP, pela gentileza, paciência e precisão, durante a longa etapa da análise morfométrica,

À senhora Simone Amaral Coelho de Oliveira, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo apoio dado à formatação e revisão final deste trabalho,

À senhora Juliana Pischiotin da Silva, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, FMRP-USP, pela atenção e presteza nas orientações relativas a questões burocráticas do programa.

“A preocupação com o homem e com seu destino deve sempre constituir a motivação principal de todos os esforços científicos e tecnológicos. Jamais esqueçam isto em meio a seus diagramas e equações. A mais bela e a mais profunda emoção que podemos experimentar é o sentido do mistério em benefício do homem. É aí que se encontra a semente de toda a verdadeira ciência”

Albert Einstein

DEZENA, R. A. **Neuroproteção hipotérmica pré, intra e pós-isquêmica na isquemia cerebral focal em ratos: análise morfométrica**. 2011. 101p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A isquemia cerebral é uma doença de alta prevalência, com desfecho clínico imprevisível, e com profilaxia e tratamento ainda limitados. Na atividade neurocirúrgica, as duas situações em que a isquemia cerebral ocorre com maior frequência são o vasoespasma arterial, que ocorre após hemorragia subaracnóidea, e nas microneurocirurgias vasculares, especialmente naquelas em que são realizadas clipagens vasculares temporárias. Dentre todas as formas de neuroproteção a hipotermia tem se mostrado a mais promissora em estudos experimentais. Pode ser aplicada em diferentes momentos do processo isquêmico (pré, intra ou pós-isquemia), sendo a modalidade pré-isquêmica pouco explorada na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o efeito da hipotermia pré, intra e pós-isquêmica na isquemia focal temporária por oclusão da artéria cerebral média em ratos, através de análise morfométrica computacional.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram utilizados 74 ratos machos adultos da linhagem Wistar, divididos em 6 grupos, com 10 animais cada: Controle (C), *Sham* (S), Controle-Isquêmico (CI), Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3). Todos os animais dos grupos isquêmicos foram submetidos à isquemia de 60 minutos, com um período reperfusional de 24 horas. A hipotermia utilizada foi do tipo leve (32 - 34 °C). No grupo IH1 a hipotermia foi iniciada 30 min antes da oclusão arterial e mantida durante toda a isquemia; no grupo IH2 a hipotermia foi mantida somente durante a isquemia; no grupo IH3 a hipotermia foi mantida por 6 horas, sendo iniciada no exato momento da reperusão. Após a eutanásia os cérebros foram perfundidos e fixados, sendo realizadas secções coronais de 10 micrômetros, em toda a extensão da área isquêmica, as quais foram coradas pela técnica *Luxol Fast Blue*. A morfometria foi realizada pelo programa KS400, Carl Zeiss, obtendo-se medidas diretas separadas de cada hemisfério, das

áreas em azul (fibras mielinizadas) e em vermelho (corpos neuronais), bem como a área total de cada secção. Medidas derivadas (área isquêmica média, e volumes isquêmicos parcial e aproximado) de cada animal, foram obtidas nos grupos submetidos à isquemia.

RESULTADOS: Os parâmetros da homeostase dos animais permaneceram dentro dos limites aceitáveis para este tipo de experimento. Em relação às áreas de fibras mielinizadas (azul) não houve diferença significativa entre os grupos C vs. S ($p=0,39$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH3 ($p=0,85$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,63$, Mann-Whitney-Wilcoxon); ocorreu diferença estatística entre os grupos C vs. CI ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH1 ($p=0,01$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Em relação às áreas de corpos neuronais (vermelho), não houve diferença significativa entre os grupos C vs. S ($p=0,48$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH3 ($p=0,27$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,68$, Mann-Whitney-Wilcoxon); ocorreu diferença estatística entre os grupos C vs. CI ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH1 ($p=0,009$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). A análise estatística das áreas isquêmicas médias, e dos volumes isquêmicos parciais e aproximados não mostrou diferença significativa na comparação entre os grupos CI vs. IH3 ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon); mostrou diferença significativa entre os grupos CI vs. IH1 ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,0011$, Mann-Whitney-Wilcoxon).

CONCLUSÕES: As hipotermias pré-isquêmica e intra-isquêmica mostraram-se neuroprotetoras de forma semelhante, o que não ocorreu com a hipotermia pós-isquêmica.

PALAVRAS-CHAVE: isquemia cerebral focal, reperfusão, morfometria, neuroproteção, hipotermia leve.

DEZENA, R. A. **Pre, intra and post-Ischemic hypothermic neuroprotection in temporary focal cerebral ischemia in rats: morphometric analysis.** 2011. 101p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cerebral ischemia is a high prevalent disease, with unpredictable clinical outcome, and prophylaxis and treatment remains limited. In the neurosurgical practice cerebral ischemia occurs most frequently due arterial vasospasm after subarachnoid hemorrhage, and in vascular microneurosurgery, mainly when temporary vascular clipping is performed. Among all forms of experimental neuroprotection, hypothermia has been the most promising. It can be applied at different moments of ischemia (pre, intra or post-ischemia), and the pre-ischemic modality is little explored in literature. This study aimed to evaluate comparatively the effect of pre, intra and post-ischemic hypothermia in temporary focal ischemia obtained by middle cerebral artery occlusion in rats, by computational morphometric analysis.

MATERIAL AND METHODS: We used 74 Wistar adult male rats divided into six groups of 10 animals each: Control (C), Sham (S), Ischemic-Control (IC), Pre-Ischemic Hypothermia (IH1), Intra-Ischemic Hypothermia (IH2), Post-Ischemic Hypothermia (IH3). All animals in the ischemic groups were subjected to ischemia for 60 minutes with a reperfusion period of 24 hours. It was used mild hypothermia (32 - 34 °C). In IH1 group hypothermia was initiated 30 minutes before arterial occlusion and maintained throughout the ischemia, in IH2 group hypothermia was maintained only during ischemia, IH3 group hypothermia was maintained for 6 hours, starting at the beginning of the reperfusion. After euthanasia, the brains were perfused and fixed, and coronal sections of 10 microns were performed to the fullest extent of ischemic area, and these sections were stained by Luxol Fast Blue. The morphometry was performed by the KS400 software, Carl Zeiss, obtaining direct separated measurements in each hemisphere, of blue areas (myelinated fibers) and red areas (neuronal bodies) as well as the total area of each section. Derived measures (average

ischemic area, and partial and approximated ischemic volumes) were also obtained from the ischemic groups.

RESULTS: The animal homeostasis parameters remained within acceptable limits for this type of experiment. Regarding the myelinated areas (blue) there was no significant difference between groups C vs. S ($p=0,39$, Mann-Whitney-Wilcoxon), IC vs. IH3 ($p=0,85$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and IH1 vs. IH2 ($p=0,63$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and there was statistical difference between groups C vs. IC ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), IC vs. IH1 ($p=0,01$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and IC vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Regarding the neuronal bodies areas (red) there was no significant difference between groups C vs. S ($p=0,48$, Mann-Whitney-Wilcoxon), IC vs. IH3 ($p=0,27$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and IH1 vs. IH2 ($p=0,68$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and there was significant difference between C vs. IC groups ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), IC vs. IH1 ($p=0,009$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and IC vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Statistical analysis of average ischemic areas, and partial and approximated volumes of ischemic regions showed no significant difference between groups IC vs. IH3 ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and IH1 vs. IH2 ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and showed statistical difference between groups IC vs. iH1 ($p = 0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), and IC vs. IH2 ($p = 0,0011$, Mann-Whitney-Wilcoxon).

CONCLUSIONS: Pre-ischemic and intra-ischemic hypothermia were shown to be similarly neuroprotective, but this was not true for post-ischemic hypothermia.

KEY WORDS: focal cerebral ischemia, reperfusion, morphometry, neuroprotection, mild hypothermia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eventos bioquímicos decorrentes da privação de oxigênio, com a conseqüente queda de ATP. Adaptado de Pulsinelli (1992).	29
Figura 2. Vias de apoptose durante a isquemia cerebral. Reproduzido de Tirapelli (2007), com permissão.....	30
Figura 3. Fluxograma dos grupos experimentais	45
Figura 4. Detalhe do fio obstrutor com destaque para seu tamanho (25 mm), e o espessamento de silicone (0,28 mm), em sua extremidade (5 mm)	47
Figura 5. Cenário operatório, destacando-se o animal entubado sob ventilação mecânica, com monitorizações invasivas da PAM e da temperatura retal, e o instrumental microcirúrgico.....	48
Figura 6. Desenho esquemático da oclusão arterial. O fio obstrutor foi introduzido retrogradamente através da artéria carótida externa (ACE), passando pela artéria carótida interna (ACI), acabando por ocluir o óstio da artéria cerebral média (ACM). Reproduzido de Santana (2008), com permissão	49
Figura 7. Foto microcirúrgica do da oclusão arterial. O fio obstrutor foi introduzido retrogradamente através da artéria carótida externa (ACE), passando pela artéria carótida interna (ACI), acabando por ocluir o óstio da artéria cerebral média (ACM). Reproduzido de Santana (2008), com permissão.	50
Figura 8. Desenho esquemático da oclusão do óstio de saída da artéria cerebral média (ACM). No destaque o trajeto do fio, sendo 1 - artéria cerebral média, (ACM), 2 - artéria carótida comum (ACC), 3 - artéria carótida interna (ACI), 4 - artéria cerebral anterior (ACA), 5 - artéria pterigopalatina (AP). Reproduzido de Tirapelli (2007), com permissão.	50

Figura 9. Detalhe do crânio aberto do animal para retirada do encéfalo	52
Figura 10. Módulo de captura de imagens, composto de câmera equipada com lente grande angular (55 mm) e sistema de iluminação	54
Figura 11. Detalhe da área de trabalho do programa KS400, na fase de calibração milimétrica (conversão de <i>pixels</i> em mm ²), para a medida de uma série de cortes...	56
Figura 12. Detalhe da área de trabalho do programa KS400, no qual após a seleção do hemisfério esquerdo, a seleção do hemisfério direito é feita automaticamente	57
Figura 13. Detalhe da área de trabalho do programa KS400, com as medidas finais em mm ² , da área total do corte e dos respectivos hemisférios, em azul e vermelho, ao final da Macro	57
Figura 14. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Controle (C). Os animais do grupo <i>Sham</i> (S) demonstraram aspecto semelhante. Na figura podem ser diferenciadas as estruturas mielinizadas (azul-verde), dos neurônios e fibras não mielinizadas (róseo-violeta)	68
Figura 15. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Controle-Isquêmico (CI), na qual nota-se a área clara correspondente à isquemia, no hemisfério esquerdo, desde os núcleos da base até a região cortical	68
Figura 16. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Controle-Isquêmico (CI), na qual nota-se o edema decorrente da isquemia, no hemisfério esquerdo. Tal fato ocorreu em apenas dois animais, dentro deste grupo	69
Figura 17. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), na qual nota-se a área reduzida de isquemia no hemisfério esquerdo, em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI).....	69

Figura 18. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), na qual nota-se a área reduzida de isquemia no hemisfério esquerdo, em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI), semelhantemente aos animais do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1).....	70
Figura 19. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), na qual nota-se a área de isquemia no hemisfério esquerdo, semelhante ao grupo Controle-Isquêmico (CI).....	70
Figura 20. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), com destaque para a área isquêmica, calculada em cada secção, a partir da diferença entre a área total e a soma das áreas em azul e vermelho de ambos os hemisférios.....	71
Figura 21. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Controle-Isquêmico (CI), alocadas em ordem crescente de valores.....	72
Figura 22. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias, do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), alocadas em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI) (Figura 21). Não houve diferença significativa ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon).....	72
Figura 23. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), alocadas em ordem crescente de valores.....	73
Figura 24. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), alocadas em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1) (Figura 23). Não houve diferença significativa ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon)	73
Figura 25. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Controle-Isquêmico (CI), alocados em ordem crescente de valores. O gráfico é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), deste mesmo grupo (Figura 21).....	75

Figura 26. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), alocados em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI). Não houve diferença significativa ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon). O gráfico também é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3) (Figura 22)..... 75

Figura 27. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), alocados em ordem crescente de valores. O gráfico é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), deste mesmo grupo (Figura 23) 76

Figura 28. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), alocados em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1). Não houve diferença significativa ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon). O gráfico também é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2) (Figura 24)..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores únicos de PaCO ₂ (mmHg) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de PaCO ₂ (mmHg) dos outros grupos	61
Tabela 2. Valores únicos de hemoglobina (g/dL) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de hemoglobina (g/dL) dos outros grupos	62
Tabela 3. Valores únicos de hematócrito (%) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de hematócrito (%) dos outros grupos.....	63
Tabela 4. Valores únicos de glicemia (mg/dL) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de glicemia (mg/dL) dos outros grupos	64
Tabela 5. Médias das áreas em azul (mm ²) dos hemisférios esquerdo e direito, com as respectivas razões, de todos os grupos	66
Tabela 6. Médias das áreas em vermelho (mm ²) dos hemisférios esquerdo e direito, com as respectivas razões, de todos os grupos.....	67
Tabela 7. Áreas isquêmicas médias (mm ²) dos animais dos grupos isquêmicos	71
Tabela 8. Volumes isquêmicos parciais (mm ³) dos animais dos grupos isquêmicos	74
Tabela 9. Volumes isquêmicos aproximados (mm ³) dos animais dos grupos isquêmicos	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a. C.	Antes de Cristo
ACA	Artéria cerebral anterior
ACC	Artéria carótida comum
ACE	Artéria carótida externa
ACI	Artéria carótida interna
ACh	Artéria corioidéia
ACM	Artéria cerebral média
ACP	Artéria cerebral posterior
ACoP	Artéria comunicante posterior
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	Artéria pterigopalatina
ATP	Adenosina-trifosfato
C	Grupo Controle
Ca ⁺⁺	Cálcio
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CI	Grupo Controle-Isquêmico
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EEG	Eletroneurograma
et al.	E outros
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitro
GABA	<i>Gama amino butyric acid</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GOS	<i>Glasgow Outcome Scale</i>
h	Horas
HD	Hemisfério cerebral direito
HE	Hemisfério cerebral esquerdo

IHAST	<i>Intraoperative Hypothermia for Aneurysm Surgery Trial</i>
IH1	Grupo Hipotermia Pré-isquêmica
IH2	Grupo Hipotermia Intra-Isquêmica
IH3	Grupo Hipotermia Pós-isquêmica
M	Molar
mg/dL	Miligramas por decilitro
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
mm ³	Milímetros cúbicos
mmHg	Milímetros de mercúrio
min	Minutos
n ^o	Número
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NINDS	<i>National Institute of Neurological Disorders and Stroke</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
OACM	Oclusão da artéria cerebral média
PaCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PAM	Pressão arterial média
PARP-1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase-1</i>
RGB	<i>Red, Green, Blue</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rTPA	<i>Recombinant tissue plasminogen activator</i>
s	Segundos
S	Grupo <i>Sham</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
TTC	<i>Triphenyl tetrazolium chloride</i>
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo
vs.	<i>Versus</i>
W	<i>Watts</i>
µm	Micrômetros
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Aspectos gerais da isquemia cerebral	24
1.1.1 Apontamentos históricos	24
1.1.2 A isquemia cerebral como doença	25
1.2 Aspectos fisiopatológicos da isquemia cerebral	27
1.3 O rato como modelo experimental de isquemia cerebral.....	31
1.4 Avaliação morfológica da isquemia cerebral.....	34
1.5 Neuroproteção e hipotermia	35
1.5.1 Hipotermia em estudos experimentais.....	36
1.5.2 Hipotermia e neurocirurgia vascular	39
1.6 Objetivo.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Animais	43
2.2 Grupos experimentais.....	43
2.3 Procedimentos gerais	45
2.4 Preparação do fio obstrutor	45
2.5 Procedimento cirúrgico	47
2.6 Hipotermia	51
2.7 Retirada dos encéfalos	51
2.8 Confeção das lâminas.....	52
2.9 Análise morfométrica	53
2.10 Análise estatística	58
3 RESULTADOS	60
3.1 Procedimento cirúrgico	60
3.1.1 Animais.....	60
3.1.2 Parâmetros fisiológicos.....	60
3.2 Análise morfométrica	65
3.2.1 Secções coronais	65
3.2.2 Áreas isquêmicas médias.....	71
3.2.3 Volumes isquêmicos.....	74

4 DISCUSSÃO.....	78
5 CONCLUSÕES.....	88
6 REFERÊNCIAS	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A isquemia cerebral é uma doença de alta prevalência, acometendo milhares de pessoas em todo o mundo. Seu desfecho clínico é imprevisível e, infelizmente, sua profilaxia e tratamento são limitados. O número de pacientes com seqüelas é enorme, e disso decorrem os exorbitantes custos desta doença, sobretudo para as esferas governamentais.

A privação do fluxo sanguíneo cerebral desencadeia uma série de eventos bioquímicos e moleculares, com conseqüências histopatológicas que, se não antagonizados, levam à morte neuronal.

Na atividade neurocirúrgica, as duas situações em que a isquemia cerebral ocorre com maior freqüência, e justificam o estudo deste fenômeno, são o vasoespasma arterial, que ocorre após hemorragia subaracnóidea, e as microneurocirurgias vasculares, especialmente aquelas onde são realizadas clipagens vasculares temporárias.

Os modelos experimentais de isquemia cerebral, como por exemplo, o modelo executável no rato, possibilitam a simulação dos eventos isquêmicos, bem como a avaliação das estratégias de neuroproteção. A dificuldade básica destes modelos consiste em extrapolar para a espécie humana os achados em animais de laboratório.

Neuroproteção define-se como qualquer manobra, ou conjunto de manobras que visam a proteger o tecido cerebral dos danos resultantes do fenômeno isquêmico (GINSBERG, 2008). Dentre todas as formas de neuroproteção, a hipotermia é a mais potente. Temporalmente, a hipotermia pode ser aplicada antes, durante, ou após a isquemia, sendo estas duas últimas as mais exploradas cientificamente. Sua aplicação no cenário clínico-cirúrgico ainda é controversa.

Este trabalho é uma continuação de outros da mesma natureza, realizados no Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP – USP), dentro da linha de pesquisa em isquemia cerebral experimental. A partir de um modelo de oclusão temporária da artéria cerebral média em ratos, visou a analisar o efeito neuroprotetor da hipotermia, aplicada nos diferentes momentos do processo isquêmico, através de análise morfométrica computacional.

1.1 Aspectos gerais da isquemia cerebral

1.1.1 Apontamentos históricos

As doenças cerebrovasculares são entidades nosológicas complexas que vêm afligindo a humanidade há milênios. A primeira descrição conhecida de um suposto evento cerebrovascular foi documentada no papiro de Edwin Smith, que cita um relato de Imhotep, o sacerdote fundador da medicina egípcia, em aproximadamente 3000 a.C. (SELIM, 2007).

Na Grécia antiga, no período antes de Cristo, Hipócrates, com a teoria dos humores, introduziu o termo apoplexia, a que referia “como queda súbita e com violência”, para aqueles pacientes que cursavam com privação cerebral de um dos humores: o sangue, o humor da vitalidade. O também grego, mas cidadão romano Cláudio Galeno, já no início da era cristã, assumiu como verdade e até desenvolveu os conceitos hipocráticos, e da mesma forma, acreditava que a apoplexia era causada pela privação do fluxo do “espírito vital” ao cérebro (SELIM, 2007).

Tais conceitos, tidos como verdadeiros dogmas perduraram durante toda a Idade das Trevas, num período de mais de quinze séculos. Nessa sombria época, a apoplexia embasava-se teoricamente num misto de conceitos clássicos humorais, mesclados com algumas tentativas esparsas de explicação obstrutiva para o fenômeno.

O advento do Renascimento trouxe tentativas de elucidação racional para os conceitos hipocrático-galênicos. No século XVII, William Harvey fez a descrição da circulação sanguínea sistêmica, com discreta incursão no terreno da obstrução da, até então suposta, circulação cerebral (CUNNINGHAM, 1994). Esta foi descrita pormenorizadamente por Thomas Willis, no mesmo século, no qual o autor introduziu o termo *stroke* para definir as doenças cerebrovasculares, na realidade uma tradução literal da palavra grega apoplexia (SELIM, 2007).

Ainda no mesmo século, em seu *Apoplexia*, Johann Jakob Wepfer, afirmou que aqueles pacientes que supostamente faleciam de apoplexia, na realidade tinham coleções sanguíneas em seus cérebros

(“apoplexia pletórica”), ao contrário dos que não as tinham, sendo estes portadores de isquemia cerebral propriamente dita (“apoplexia flegmática”), que acabavam sobrevivendo em maior número. Além disso, constatou pela primeira vez, que quando o fluxo das artérias carótidas ou das artérias vertebrais, era interrompido, causava apoplexia (CUNNINGHAM, 1994).

No século XIX, particularmente em relação à isquemia cerebral, Jean Cruveilhier elucidou aspectos anatômicos; Rudolf Virchow descreveu o mecanismo tromboembólico; Amédée Dechambre descreveu, a partir de exames de encéfalos *post-mortem*, as “lacunas”; Charles Foix e Paul Broca, a partir do exame clínico de pacientes supostamente portadores de isquemia cerebral, introduziram conceitos semiológicos de localização cerebral (SELIM, 2007).

Mas realmente a revolução no entendimento da isquemia cerebral, veio com o século XX, com o advento de um maior armamentário diagnóstico, na forma de exames complementares, bem como um maior conhecimento dos fatores de risco. Marco fundamental deste período foi a descrição detalhada, na década de 60, por Miller Fisher, dos aspectos de observações clínicas e patológicas, de diferentes facetas da isquemia cerebral, como infartos lacunares, doença arterial carotídea e ataques isquêmicos transitórios (ESTOL, 1996).

1.1.2 A isquemia cerebral como doença

Nos dias atuais, a isquemia cerebral é uma condição extremamente prevalente. Recentes estatísticas norte-americanas, através do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*, órgão do *National Institutes of Health* (NINDS/NIH), estimam que haja aproximadamente 780.000 eventos cerebrovasculares nos EUA por ano, sendo que 80% desses são eventos isquêmicos. Tais doenças constituem a terceira causa de óbitos dentre todas as causas, e a primeira causa de seqüelas neurológicas definitivas. Aproximadamente três quartos de todos os eventos cerebrovasculares ocorrem em pessoas acima de 65 anos, sendo que a probabilidade de ocorrência desses eventos, principalmente os isquêmicos, dobra, a cada década de vida, após a idade de 55 anos (NINDS/NIH, 2010). No Brasil não existem dados

precisos, mas possivelmente a prevalência deva ser parecida, dada a semelhança do perfil epidemiológico entre as duas populações, no que tange a eventos cardiocirculatórios.

Em termos prognósticos, a lesão isquêmica tem desfecho imprevisível, ocorrendo em diversos cenários clínicos, podendo decorrer tanto de doenças cerebrais primárias, quanto como consequência de doenças sistêmicas. Apesar de mais prevalente na maturidade, pode acometer todas as faixas etárias. Em neonatos, por exemplo, a lesão cerebral hipóxico-isquêmica (“paralisia cerebral”), que ocorre durante o período perinatal, é uma das causas mais comumente reconhecidas de déficits neurológicos durante a infância (CONWAY et al., 2003; SHALAK; PERLMAN, 2004). Nos adultos pode resultar de uma variedade de causas que prejudicam o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e conduzem à privação de oxigênio e glicose, destacando-se etiologicamente a aterosclerose, de vasos cervicais e cerebrais, na grande maioria dos casos. Quando esta queda no fluxo sanguíneo cerebral persiste, atingindo níveis críticos, pode conduzir a uma plêiade de eventos bioquímicos e moleculares que podem levar à morte neuronal.

A isquemia cerebral possui tratamento difícil, pois seu estudo fisiopatológico, entre outros fatores, é dificultado pela grande diversidade na sua localização anatômica, pela sua etiologia e pelas suas manifestações clínicas (BRATINA et al., 1995; CARLOTTI Jr.; COLLI; KAZUO, 2001; COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998). Em termos terapêuticos, atualmente destaca-se como único tratamento clínico a trombólise química (rTPA), que infelizmente tem uma janela temporal limitadíssima para intervenção, e uma série de contra-indicações (HICKENBOTTOM; BARSAN, 2000; KOLLMAR; SCHWAB, 2007). Em termos operatórios, a craniectomia descompressiva, para aqueles infartos que cursam com inchaço cerebral acentuado (infartos malignos), não constitui tratamento, mas uma tentativa salvadora e de limitação do dano, e com uma série de contra-indicações.

A proporção de pacientes com lesões seqüelares é grande, disso decorrem os enormes custos desta doença, tanto para as esferas governamentais quanto para toda a sociedade. Portanto, justificam-se todos os esforços científicos no sentido de elucidação dos aspectos histopatológicos, bioquímicos e moleculares, não só para que futuros tratamentos possam advir,

mas também para que outras formas de profilaxia, medicamentosas ou não, possam surgir.

1.2 Aspectos fisiopatológicos da isquemia cerebral

O fluxo sangüíneo cerebral (FSC) na espécie humana varia de 20 a 80 ml/100g/min (média de 50 ml/100g/min) (DELA TORRE; MESCHAN, 1959). Reduções a 16-18 ml/100g/min levam a um silêncio no eletrencefalograma (EEG), e abaixo de 10-12 ml/100g/min a homeostase iônica é perdida (HEISS; HAYAKAWA, 1976). Em geral, é aceito que estas áreas cerebrais perfundidas a uma velocidade menor que 12 ml/100g/minuto, são condenadas à morte (LEKER; SHOHAMI, 2002).

Quanto à topografia podemos classificar as isquemias em focais ou globais, de acordo com volume de tecido cerebral lesado (GINSBERG; BUSTO, 1989). A isquemia cerebral focal ocorre quando uma região limitada do sistema nervoso central tem seu fluxo diminuído a níveis que comprometem a integridade celular, podendo levar à necrose, à apoptose ou a ambas (SELMAN; LUST; PUNDIK, 1992).

Para o neurocirurgião as duas situações de isquemia cerebral focal mais freqüentes em sua atividade diária são o vasoespasmo, que geralmente ocorre após hemorragia subaracnóidea, na maioria dos casos decorrente de rotura de aneurismas cerebrais, e a oclusão temporária de um vaso sangüíneo em microneurocirurgias vasculares (POOL, 1961).

Histopatologicamente, na isquemia focal são definidas três áreas relativamente concêntricas: a zona isquêmica central, a zona de penumbra, e a zona de tecido normal de permeio (ASTRUP; SIESJO; SYMON, 1981). Durante a isquemia, após alguns minutos haverá morte celular na zona central (necrose). Na zona de penumbra, inicialmente a célula mantém sua integridade, mas sua função elétrica é abolida, caracterizando o traçado de um eletrencefalograma isoeletrico e, dependendo do tempo de isquemia, e do aparecimento ou não do fluxo sangüíneo por anastomoses, haverá também morte celular (SAKAKI et al., 1993, SWEENEY et al., 1995). Em tal zona a perfusão é reduzida, e por um tempo limitado e variável, as células ainda são viáveis. A perfusão nesta área tem uma velocidade de 15-18 ml/100g/minuto

(LEKER; SHOHAMI, 2002; PULSINELLI, 1992), e pode ser um local de ampliação da área isquêmica, já que é o local mais freqüente do processo apoptótico (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007). Por outro lado, tal área é passível de salvamento quando estratégias de neuroproteção são adotadas, ao contrário da zona isquêmica central.

Em termos celulares, o dano isquêmico no tecido cerebral não é uniforme, sendo as células endoteliais mais resistentes que as gliais e estas, por sua vez, mais resistentes que os neurônios. Mesmo entre os neurônios, alguns apresentam maior susceptibilidade à isquemia, como por exemplo, os do hipocampo (CHURCH; ZEMAN; LODGE, 1988).

A privação sangüínea pela isquemia, com a conseqüente falta de substratos energéticos e de oxigênio leva a uma cascata de eventos bioquímicos sucessivos (Figura 1): interrupção da produção de adenosina-trifosfato (ATP) pela mitocôndria, parada dos mecanismos ativos de transporte iônico com entrada celular de íons cálcio, sódio, cloro e água, saída celular de potássio, acúmulo intracelular de lactato, íons hidrogênio e de radicais ácidos, liberação de neurotransmissores como glutamato principalmente, dopamina e GABA, e finalmente lesão das membranas celulares com perda da função das organelas intracelulares (DIAS et al., 2000; TYMIANSKY; TATOR, 1996). O cálcio, devido ao seu grande influxo intracelular, atua de maneira preponderante nos mecanismos de lesões isquêmicas, devido à sua reconhecida função de segundo mensageiro em vários níveis de cascatas de ativação enzimáticas (HU; WIELOCH, 1995).

O glutamato é o mais importante fator de agravamento da perda da homeostase de íons principalmente durante a encefalopatia hipóxico-isquêmica (GRAHAM; CHEN, 1993). Tal neurotransmissor aumenta o influxo de sódio e principalmente cálcio, sobretudo através do canal de íons que tem como agonista o N-metil-D-Aspartato (NMDA). A expressão “toxicidade excitatória”, foi criada para descrever esta excessiva ativação dos receptores glutamatérgicos, configurando-se via comum de lesão neuronal (DIAS et al., 2000; ROTHMAN; OLNEY, 1986). O glutamato pode levar a um dano cerebral em um processo de três estágios, em que pode haver intervenção farmacológica: indução, amplificação e expressão (ZIVIN; CHOI, 1991). Ondas de depressão (despolarização) cortical, no sentido da zona necrótica para a

zona de penumbra, decorrentes da ação glutamatérgica, causam estresse metabólico e podem conduzir à indução de vários mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e proteínas de choque térmico em áreas topograficamente não relacionadas ao infarto (LEKER; SHOHAMI, 2002).

Figura 1. Eventos bioquímicos decorrentes da privação de oxigênio, com a conseqüente queda de ATP. Adaptado de Pulsinelli (1992).

Concomitantemente, se o insulto isquêmico persiste, ocorre necrose na região isquêmica central, processo este passivo, sem gasto de energia, e as vias de apoptose são ativadas, no ambiente intracelular, sobretudo na área de penumbra. Tal processo, ativado grandemente pelo influxo de cálcio, requer energia, e portanto a mitocôndria não deve estar irreversivelmente lesada, o que acontece na necrose (KASS, 2006).

A apoptose possui uma via extrínseca, via receptor Fas, dependente das proteínas caspases, e uma via intrínseca, mitocondrial, por intermédio do citocromo c, também dependente de caspases (Figura 2). Ambas as vias, possuem uma via molecular final comum, que acaba, em última instância, por desagregar a estabilidade do DNA nuclear, conduzindo à morte neuronal (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007).

São descritas também no insulto isquêmico, vias alternativas de morte celular programada. Uma delas é a via apoptótica independente das proteínas caspases, que também é dependente da mitocôndria. Nesta, há liberação mitocondrial da proteína AIF, que por sua vez desestabiliza uma

proteína intranuclear denominada PARP-1, um dos chamados guardiões do genoma, o que acaba por alterar a estabilidade do DNA nuclear. A outra forma é um fenômeno denominado necroptose, uma espécie de necrose, dependente de receptores de membrana e de energia, que é inibido por uma proteína denominada necrostatina (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007).

Figura 2. Vias de apoptose durante a isquemia cerebral. Reproduzido de Tirapelli (2007), com permissão.

A reperfusão, definida como a restauração do fluxo sanguíneo após a isquemia, pode contribuir para o agravamento das condições teciduais, fenômeno este denominado “lesão da reperfusão” (ARONOWSKI; STRONG; GROTTA, 1997; DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003). Neste tipo de insulto ocorre a exacerbação dos fenômenos isquêmicos: depleção de adenosina-trifosfato (ATP), degradação dos fosfolípides, acidose intracelular, liberação rápida de neurotransmissores como o glutamato e o GABA, alteração na homeostasia do cálcio e, em consequência ativação das proteases cálcio-dependentes e fosfolipases, levando à lesão das membranas e perda da função das organelas (DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003). Além disso, há produção em larga escala de radicais livres de oxigênio (ROS), a partir da ativação de proteases (lipases).

Possivelmente a causa do fenômeno de lesão da reperfusão é a persistência da alteração na homeostasia iônica, principalmente na distribuição

do cálcio, e o processo peroxidativo (FOLBERGROVÁ et al., 1993). Quando na reperfusão a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons mantém seu comprometimento em razão da intensidade e duração da isquemia, não retornando a operar em níveis considerados normais, ocorre a aceleração na glicólise e na produção de lactato. Estes fatos podem ser potencializados pela excessiva taxa de cálcio mitocondrial, inibindo assim a respiração celular. Auxílio a esta inibição é oferecido pelos radicais livres do oxigênio (ROS) produzidos durante a isquemia temporária ou parcial, através da peroxidação lipídica (DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003; O'ROURKE, 2000). Em decorrência, há redução na síntese protéica e pode desencadear reações que conduzem a apoptose (CROMPTON, 2000).

1.3 O rato como modelo experimental de isquemia cerebral

Os modelos experimentais para estudo da isquemia cerebral apresentam como vantagem a possibilidade de um melhor controle das variáveis biológicas, os métodos invasivos podem ser usados com maior liberdade, e os resultados podem ser mensurados com maior rigor. Existem vários modelos experimentais, com diferentes animais, para se provocar isquemia focal, e na maioria deles é utilizada a oclusão da artéria cerebral média (SELMAN; LUST; PUNDIK, 1992).

Vários animais têm sido usados com finalidade do estudo da isquemia cerebral experimental, porém, dentre eles, destaca-se o rato (CARLOTTI Jr., 1998; NISHIGAYA et al., 1991; NISHINO et al., 1994). Tal animal apresenta baixo custo, facilidade de obtenção, de manuseio e de manutenção, relativa homogeneidade dos animais dentro de uma mesma raça, e semelhança anatômica cerebrovascular com outras espécies filogeneticamente mais evoluídas, inclusive a humana. Destaca-se também como vantagem, em termos de isquemia cerebral experimental, a sua irrigação arterial encefálica muito bem descrita (COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998; GREENE, 1963; SILVA, 1998).

Em termos de anatomia vascular cerebral do rato, a artéria carótida comum (ACC) direita origina-se do tronco braquiocefálico, enquanto a artéria vertebral direita origina-se da porção proximal da artéria subclávia

direita. Já a artéria carótida comum esquerda (ACE) e a vertebral esquerda originam-se diretamente da aorta. As artérias vertebrais possuem trajeto ascendente através dos forames transversos e, ao penetrarem no crânio, unem-se para formar a artéria basilar, a qual tem trajeto ascendente na porção rostral do tronco encefálico, e termina dando origem às artérias cerebelares superiores.

As artérias carótidas comuns (ACC) ascendem pela região cervical, paralelas à traquéia e medialmente ao músculo esternomastóide, bifurcando-se em artérias carótidas externas (ACE) e artérias carótidas internas (ACI), ao nível da glândula tireóide. A ACI é menos calibrosa e inicialmente está lateralizada, e mais posterior em relação à ACE, mantendo trajeto ascendente até a base do crânio. Neste segmento dá origem à artéria pterigopalatina (AP). Após penetrar no crânio origina as artérias cerebral posterior (ACP), corioidéia (ACh), cerebral média (ACM) e cerebral anterior (ACA). As ACA unem-se para formar uma artéria única, comunicando assim as duas ACI, enquanto que as artérias cerebrais posteriores (ACP) são unidas às artérias cerebelares posteriores através das artérias comunicantes posteriores (ACoP), formando assim o círculo arterioso do cérebro do rato (SILVA, 1998).

A artéria cerebral posterior (ACP) após sua origem da ACI apresenta trajeto posterior, curvando-se ao redor do pedúnculo cerebral para alcançar a superfície tentorial do hemisfério, e as superfícies medial e lateral do lobo occipital, seu território de irrigação. Termina em anastomoses com ramos terminais da ACA.

A artéria cerebral anterior (ACA), ramo terminal da ACI, inicia-se lateralmente ao quiasma óptico, dirigindo-se anteriormente para unir-se à contralateral e constituir uma artéria única que se aloja na fissura longitudinal em direção ao corpo caloso, percorrendo toda a sua extensão, até a região parietal, quando termina em anastomose com os ramos da ACP, irrigando assim a face medial do hemisfério.

A artéria corioidéia (ACh), que tem sua origem próxima à da ACP, percorre curta distância no sulco entre o lobo temporal e o pedúnculo cerebral, e toma direção dorsal para chegar até os ventrículos laterais e o terceiro ventrículo, participando da formação do plexo coróide.

A artéria cerebral média (ACM), que juntamente com a ACA constituem os ramos terminais da ACI, tem origem na base do cérebro junto ao infundíbulo, dirigindo-se para cima, para atingir a face lateral do hemisfério, cruzando perpendicularmente o trato olfatório e a veia cerebral inferior. No segmento proximal ao trato olfatório origina as artérias lentículo-estriadas laterais, responsáveis pela irrigação do complexo caudado-putaminal nas suas porções posterior e anterior, respectivamente. A porção medial do complexo caudado-putaminal é irrigada pela artéria recorrente de Heubner, ramo da ACA. Os ramos distais da ACM são mais variáveis (MENZIES; HOFF; BETZ, 1992).

A circulação arterial do rato apresenta anastomoses na base do encéfalo (círculo arterioso do cérebro), entre os ramos corticais do sistema carotídeo, e entre os ramos do sistema carotídeo interno e externo. Ratos mais jovens, geralmente abaixo do peso de 300 gramas, apresentam redes colaterais mais desenvolvidas. Estes aspectos dão ao cérebro de tais animais uma maior resistência ao infarto (COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998; MENZIES; HOFF; BETZ, 1992).

O modelo de oclusão focal temporária em ratos, com ou sem reperfusão é o que simula a situação clínica vivenciada pelo neurocirurgião durante microneurocirurgias vasculares. O modelo mais adequado para tal estudo é realizado através da introdução de um fio cirúrgico de sutura a partir da artéria carótida interna, com progressão cranial até ocluir a origem da artéria cerebral média (CARLOTTI Jr., 1998; KOIZUMI et al., 1986; ZEA LONGA et al., 1989). Tal método apresenta a vantagem de dispensar a realização de craniectomia, realizada em outros modelos (TAMURA et al., 1981), bem como permite a reperfusão, quando o fio de sutura é retirado, permitindo simular com exatidão os fenômenos que ocorrem quando da oclusão temporária de uma artéria durante microneurocirurgias, e talvez durante a oclusão e reabertura de um vaso durante o vasoespasma cerebral, ou o processo isquêmico cerebral primário, como um ataque isquêmico transitório. Tal técnica ocasiona um infarto cortical e caudado-putaminal lateral (CARLOTTI Jr., 1998; DIAS et al., 2000; DUARTE, 2006; SANTANA, 2008; TAMURA et al., 1981).

1.4 Avaliação morfológica da isquemia cerebral

A avaliação morfológica da isquemia cerebral permite a mensuração da isquemia, e é possível quando o fenômeno isquêmico foi de intensidade suficiente para provocar edema e/ou morte celular, que ocorrem caracteristicamente nos processos isquêmicos definitivos, mas também, eventualmente, nas isquemias temporárias.

Em termos temporais, a injúria isquêmica ao cérebro é um processo dinâmico, que requer pelo menos 14 dias para evoluir completamente (DU et al., 1996). Durante tal evolução, podem-se observar fenômenos apoptóticos como condensação cromatínica, excentrização do nucléolo para a parede nuclear e condensação do citoplasma, com preservação das organelas. Isto ocorre em uma fase inicial, já observada em torno de 30 minutos de isquemia (DUARTE, 2006), atingindo seu máximo em 24 horas, e estendendo-se até quatro dias, quando se observa uma fragmentação da célula nos corpos apoptóticos. Inicialmente, minutos após a isquemia, ocorre na área, edema que evolui posteriormente para necrose e conseqüentemente atrofia, quando os animais são submetidos à eutanásia vários dias após a isquemia (AVENDAÑO et al., 1995).

Morfológicamente, o cérebro pode ser examinado macroscopicamente, imediatamente após a eutanásia do animal, ou ser fixado para posterior exame. Para as medidas de área e volume das regiões de infarto os cérebros dos animais geralmente são perfundidos *in situ*, e fixados, antes de serem seccionados. Tradicionalmente, corantes supravitais como o 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), podem ser usados para delimitar melhor a área de necrose celular (BEDERSON et al., 1986; CARLOTTI Jr.; COLLI; KAZUO, 2001; CHEN et al., 1986).

As áreas de isquemia podem ser medidas nas secções de cérebro utilizando-se um planímetro, ou um sistema de fotografia adaptado a programas de computadores, e o volume pode ser calculado baseado nas áreas das lesões e na espessura da secção (NAKANO; COLLI; LOPES, 2007).

Outra contribuição importante foi a introdução de sistemas informatizados de análise de imagens (NAKANO; COLLI; LOPES, 2007; SANTANA, 2008). Tais sistemas possibilitam o uso de métodos semi-

automatizados para obtenção de medidas de áreas e volumes de infarto cerebral focal experimental. Todos esses sistemas tratam a imagem na forma de *pixels*, ajustados em faixas correspondentes às densidades ópticas das estruturas da secção analisada e permitem controlar possíveis variabilidades na intensidade da coloração da secção do cérebro nas faixas limites dos *pixels* previamente estabelecidos para cada uma delas. A dificuldade reside em aplicar técnicas de colorações das secções que permitam aos programas de computador captar as variações ocorridas nas estruturas cerebrais de interesse para o estudo (LIN et al., 1993; SWANSON et al., 1990).

O estudo histopatológico utilizando o método *Luxol Fast Blue* (KLÜVER; BARRERA, 1953) permite visibilizar, além de elementos celulares, a cito e a mielino-arquitetura na mesma lâmina. Tal coloração, acoplada a um sistema semi-automatizado computacional padronizado (SANTANA, 2008), permite realizar a morfometria diretamente das lâminas sem necessidade de procedimentos adicionais de tratamento da imagem, como por exemplo, o método descrito por Swanson et al. (1990), que utiliza um sistema de análise de imagens para criar imagens digitalizadas “pseudocoloridas” de cada secção.

O método semi-automatizado computacional, utilizando a coloração *Luxol Fast Blue*, mostrou-se ideal para análise de cortes histológicos de cérebros de ratos submetidos à isquemia cerebral, e submetidos à eutanásia após trinta dias, quando as alterações morfológicas peri e pós-isquêmicas agudas e subagudas, relacionadas sobretudo ao edema, já ocorreram (SANTANA, 2008).

1.5 Neuroproteção e hipotermia

Segundo Ginsberg, neuroproteção é definida como qualquer estratégia, ou conjunto de estratégias, aplicadas unicamente ou em combinação, experimentalmente ou *in vivo*, que antagonizam, interrompem ou lentificam, a seqüência de eventos bioquímicos e moleculares lesivos que culminam na lesão isquêmica irreversível (GINSBERG, 2008). Dentre as diferentes abordagens utilizadas, nelas incluídas drogas, a hipotermia mostrou-se ser a mais potente em reduzir a lesão cerebral causada pela isquemia em estudos experimentais (BARONE; FEUERSTEIN; WHITE, 1997). Assim, sob

condições rigorosamente controladas, a hipotermia pode promover proteção encefálica em pacientes com afecções neurológicas ou neurocirúrgicas (CLIFTON et al., 2001).

1.5.1 Hipotermia em estudos experimentais

A primeira descrição do efeito neuroprotetor da hipotermia em estudos experimentais de isquemia cerebral, deve-se a Rosomoff, em 1956. Em seu trabalho, foi demonstrada a redução da área de infarto cerebral em cães submetidos à oclusão da artéria cerebral média sob hipotermia profunda (23 - 24 °C) (ROSOMOFF, 1956). Porém, a hipotermia profunda mostrou-se associada a efeitos colaterais graves, como se observou desde então: arritmias cardíacas, coagulopatias, comprometimento hemodinâmico e retardo na recuperação da anestesia (OGILVY et al., 1996). Nos últimos anos, tem sido dado enfoque à utilização das modalidades de hipotermia leve e moderada nos estudos experimentais, pois reduções menos intensas da temperatura não estão associadas a efeitos colaterais graves (GOTO et al., 1993).

A neuroproteção conferida pela hipotermia possui um mecanismo multifatorial, sendo seu mecanismo clássico a redução das demandas metabólicas. Outros mecanismos propostos são:

- Redução da quebra da barreira hemato-encefálica e do edema (DIETRICH et al., 1990);
- Redução da hipoperfusão pós-isquêmica (KARIBE et al., 1994);
- Redução da síntese, liberação e recaptação de neurotransmissores, especialmente o glutamato (BARONE; FEUERSTEIN; WHITE, 1997);
- Redução da resposta inflamatória local (KAWAI et al., 2000; PRANDINI et al. 2005);
- Redução da acidose intracelular (HUH et al., 2000);
- Redução da produção de radicais livres (CORBETT; HAMILTON; COLBOURNE, 2000);
- Recuperação precoce da síntese de proteínas (HUH et al., 2000).

Além disso, a hipotermia, tanto leve e moderada (CHOI et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2008), quanto a profunda (QIN et al., 2008), estão envolvidas com alterações na expressão gênica, induzindo ativação de genes relacionados à neuroproteção, sobretudo relacionados à produção de fatores anti-apoptóticos.

De acordo com os diferentes momentos do processo isquêmico, o papel neuroprotetor da hipotermia durante a isquemia propriamente dita (intra-isquêmica), está bem definido (CLIFTON et al., 2001; BARONE; FEUERSTEIN; WHITE, 1997), parece ser mais potente, e não está associada a efeitos colaterais graves (GOTO et al., 1993).

A hipotermia intra-isquêmica inibe principalmente a depleção de ATP e a despolarização anóxica, além de manter a integridade da barreira hemato-encefálica, suprimir a cascata inflamatória, inibir a liberação de glutamato e de radicais livres, impedir a translocação da proteína-quinase C, bloquear a expressão da matriz de metaloproteinases, e inibir a apoptose e a necrose. Além disso, atenua a atividade astrocitária e inibi o dano à substância branca (CHOI et al., 2009).

Seus efeitos benéficos são demonstrados em vários trabalhos. São descritos redução significativa do volume total de infarto e também melhora clínica dos animais (CHEN et al., 1992; GOTO et al., 1993; HUH et al., 2000; KARIBE et al., 1994; MARKARIAN et al., 1996; RIDENOUR et al., 1992; TOYODA et al., 1996). Quando o volume de infarto é calculado separadamente para o córtex e gânglios da base, esta modalidade de hipotermia é efetiva em produzir redução significativa nos dois sítios (MAIER et al., 2001; WESTERMAIER et al., 2000). Em termos moleculares, a diminuição da expressão de caspase-3 nos animais dos subgrupos isquêmico-hipotérmico em relação aos do subgrupo isquêmico, sugere uma inibição da apoptose (TIRAPELLI, 2007).

Ainda com relação à hipotermia intra-isquêmica, o tratamento hipotérmico focal do cérebro tem mostrado reduzir a extensão das lesões teciduais, decorrente de vários insultos cerebrais experimentais em animais, incluindo a isquemia cerebral. O resfriamento sanguíneo local cerebral (infusão cerebral de sangue resfriado), durante o período intra-isquêmico, em ratos submetidos à isquemia cerebral temporária, com temperatura retal mantida em

níveis normais, demonstrou redução do volume do infarto cerebral (CHENG et al., 2009). Por outro lado, com relação às diferentes formas de indução da hipotermia (resfriamento intravascular, resfriamento sistêmico e resfriamento local cerebral), a forma de resfriamento intravascular demonstrou ser a mais efetiva em termos de redução do volume do infarto cerebral, com melhor resultado neurológico funcional final (WANG et al., 2010). Entretanto, o resfriamento seletivo cerebral direto, associado à craniectomia, em coelhos submetidos à isquemia cerebral definitiva, demonstrou resultados promissores (PRANDINI et al., 2002).

Quando a hipotermia é aplicada após a isquemia (pós-isquêmica), seus efeitos benéficos também são demonstrados em vários trabalhos. Esta modalidade inibe a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, atenua a cascata inflamatória, inibe a geração de radicais livres e suprime a atividade das caspases (CHOI et al., 2009). A hipotermia leve a moderada aplicada na fase de reperfusão da isquemia focal transitória produz neuroproteção significativa, embora menos efetiva do que a hipotermia intra-isquêmica (HUH et al., 2000; MAIER et al., 2001). Esta modalidade de hipotermia produz melhora clínica do animal e redução do volume do infarto cortical, porém, não produz redução significativa do volume do infarto dos gânglios da base (COLBOURNE et al., 2000; CORBETT; HAMILTON; COLBOURNE, 2000; KAWAI et al., 2000; YANAMOTO et al., 1999; ZHANG et al., 1993).

A hipotermia leve durante a fase de reperfusão em fetos de ovelhas sujeitos à isquemia cerebral grave, no útero, reduziu a extensão das lesões das células neuronais nas áreas do córtex cerebral em cerca de 60% (GUNN et al., 1999). A liberação de citocromo c e a ativação da caspase-3 e da caspase-2, 24 h após a isquemia, foram significativamente diminuídas pela hipotermia (ZHU et al., 2006). Ohmura et al. (2005) examinaram o efeito prolongado da hipotermia (30°C por 72 h) no cérebro de ratos neonatais após serem submetidos ao processo isquêmico com reperfusão, evidenciando-se neuroproteção. Ainda em termos moleculares, cita-se também que ocorreu diminuição da liberação mitocondrial de citocromo c e AIF na zona de penumbra em isquemia focal em ratos, associada a recanalização parcial, com hipotermia intra-isquêmica associada a pós-isquêmica (ZHAO et al., 2007).

A redução na expressão de genes responsáveis pelo estresse condiz com a atenuação das lesões celulares durante proteção hipotérmica pós-isquêmica (BORIS-MÖLLER; KAMME; WIELOCH, 1998).

O momento em que a hipotermia pós-isquêmica deve ser iniciada é controverso. Classicamente, para a obtenção do efeito máximo neuroprotetor da hipotermia, em isquemia temporária experimental, em cães, a mesma deve ser instituída em até 15 minutos após a reperusão (KUBOYAMA et al., 1993). Porém, trabalhos mais recentes, em ratos, demonstram uma janela de tolerância viável de até 3 horas (KRIEGER; YENARI, 2004), ou 4 horas (OHTA et al., 2007) para o início da hipotermia, para que a mesma tenha efeito. Logicamente a janela para o início deve ser levada em conta juntamente com a profundidade e a duração da hipotermia reperfusional (CHOI et al., 2009).

Ainda com relação à neuroproteção hipotérmica pós-isquêmica, Xiong et al. (2009), demonstraram inibição da perda neuronal hipocampal, através de marcação imunohistoquímica por NeuN e GFAP, induzida pela hipotermia pós-isquêmica com duração de 24 horas (XIONG et al., 2009). Esta também pode suprimir a liberação excessiva de aminoácidos, neurotransmissores monoaminérgicos e a atividade inflamatória (ZHANG et al., 2008), e pode reduzir o volume do infarto cerebral em ratos mais velhos (FLORIAN et al., 2008), bem como pode prevenir a disfunção da barreira hemato-encefálica, após isquemia cerebral global em ratos (BAUMANN et al., 2009).

Dadas tais evidências experimentais, atualmente a hipotermia pós-isquêmica é aplicada clinicamente em pacientes que sobreviveram de parada cardio-respiratória, tipo fibrilação ventricular (BERNARD et al., 2002).

1.5.2 Hipotermia e neurocirurgia vascular

As primeiras descrições de hipotermia aplicada em cirurgias neurovasculares remontam às décadas de 1950 e 1960 (DAW et al., 1964, MICHENFELDER et al., 1965). À época, nos primórdios dos procedimentos neurovasculares, a hipotermia profunda era utilizada como neuroproteção durante oclusão vascular temporária em cirurgias de aneurismas cerebrais. Tal conduta logo foi abandonada em decorrência de graves efeitos colaterais como

arritmias, parada cardíaca, coagulopatias e tendência a complicações infecciosas (CHOI et al., 2009).

Nas décadas subseqüentes, tal procedimento foi relegado a segundo plano, dadas tais complicações, retornando ao cenário clínico nas décadas de 1990 e 2000, a partir dos estimulantes resultados de estudos experimentais, sobretudo envolvendo hipotermia leve intra-isquêmica. Apesar desses resultados, a aplicação no cenário operatório ainda é controversa.

Atualmente, a hipotermia é aplicada no contexto intra-operatório para prolongar o tempo de clipagem temporária durante microcirurgias para tratamento de aneurismas cerebrais.

Hindman et al. (1999), utilizaram hipotermia leve, comparada à normotermia, em pacientes submetidos à microcirurgia de aneurismas cerebrais, durante clipagem temporária, e constataram que os pacientes hipotérmicos, numa análise global, apresentaram menos déficits neurológicos precoces, bem como apresentaram uma maior taxa de retorno ao lar. Por outro lado, com resultados não tão animadores, merece destaque também o IHAAT (*Intraoperative Hypothermia for Aneurysm Surgery Trial*) (TODD et al., 2005). Trata-se um estudo prospectivo, multicêntrico, com 1001 pacientes, cujo objetivo foi avaliar o papel da hipotermia leve durante microcirurgias para aneurismas cerebrais. Este estudo mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos normo e hipotérmicos, no que diz respeito ao prognóstico neurológico precoce, em 9, e em 15 meses, sobretudo nos pacientes melhores clinicamente.

Apesar de controversa, a hipotermia intra-operatória em procedimentos cirúrgicos neurovasculares é bastante utilizada na atualidade em vários centros. Um estudo britânico acerca de sua utilização demonstrou que aproximadamente 58% dos neurocirurgiões, da Grã-Bretanha e Irlanda em conjunto, utilizam tal técnica (PEMBERTON; DINSMORE, 2003). Na atualidade, utiliza-se sobretudo resfriamento endovascular, com cateteres venosos centrais, para infusão de soluções salinas resfriadas, durante o ato anestésico-cirúrgico, que permitem também o reaquecimento após o procedimento (CHOI et al., 2009).

Em virtude da controvérsia existente na literatura, este estudo teve como meta, a partir de um modelo experimental de oclusão temporária da

artéria cerebral média em ratos, analisar o efeito neuroprotetor da hipotermia, aplicada nos diferentes momentos do processo isquêmico, através de análise morfométrica.

1.6 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar comparativamente o efeito neuroprotetor da hipotermia leve (32 - 34 °C), nos diferentes momentos do processo isquêmico (pré, intra e pós-isquemia), em ratos submetidos à isquemia cerebral focal temporária, através da análise morfométrica por método semi-automatizado computacional, com coloração *Luxol Fast Blue*.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados 74 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 280 a 310 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas durante o período pré-operatório, com livre acesso à ração balanceada e água, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo número 108/2009). Durante todo o experimento foram respeitadas as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*, visando a manter um procedimento ético em todas as etapas da pesquisa. Dentre estas normas destacam-se: evitar o desconforto, o estresse, a angústia, a dor e as más condições de confinamento e de alimentação, todos os procedimentos com animais que possam causar dor ou angústia necessitam desenvolver-se com sedação, analgesia ou anestesia adequada, os animais que sofram dor ou angústia intensa ou crônica, que não se possa aliviar, e os que não serão utilizados, devem ser sacrificados por método indolor e que não cause estresse (FLECKNELL, 1993; MORTON, 1990; SIMÕES, 1998).

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram alocados nos respectivos grupos aleatoriamente, por sorteio realizado antes do procedimento operatório. Todos os grupos, excetuando-se os grupos Controle (C) e *Sham* (S), foram submetidos a um período fixo de isquemia cerebral (60 min) e de reperfusão (24 h), utilizando-se ou não diferentes padrões de hipotermia leve (32 - 34 °C). Foram divididos da seguinte forma (Figura 3):

- Grupo Controle (C): constituído por 10 animais que após anestesia e a estabilização das variáveis biológicas, foram submetidos à eutanásia, sem a realização do procedimento cirúrgico;
- Grupo *Sham* (S): constituído por 10 animais controle, em condições normotérmicas, que foram submetidos à simulação completa do procedimento cirúrgico, com introdução do fio obstrutor, porém sem oclusão da artéria cerebral média (OACM), e em seguida submetidos à eutanásia;
- Grupo Controle-Isquêmico (CI): constituído por 10 animais submetidos à isquemia (OACM) com 60 minutos de duração, sem hipotermia;
- Grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1): constituído por 10 animais submetidos à hipotermia pré-isquêmica de 30 min (antes da OACM), que se estendeu durante o período isquêmico propriamente dito (OACM);
- Grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2): constituído por 10 animais submetidos à hipotermia intra-isquêmica, durante a OACM, retornando à normotermia no início da reperfusão;
- Grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3): constituído por 10 animais submetidos à hipotermia pós-isquêmica, após a OACM iniciada no exato momento da reperfusão, e mantida durante 6 horas.

Figura 3. Fluxograma dos grupos experimentais.

2.3 Procedimentos gerais

Os procedimentos experimentais operatórios foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia Experimental, do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, seguindo-se os passos técnicos descritos por Carlotti Jr. (1998).

2.4 Preparação do fio obstrutor

Os fios destinados à oclusão vascular (Figura 4), para produção da isquemia, foram preparados previamente, dias antes do procedimento operatório. Foram confeccionados pela técnica de recobrir uma das extremidades com silicone (CARLOTTI Jr., 1998; KOIZUMI et al., 1986).

Os fios (mononylon 4.0 – Ethicon) foram retirados de sua embalagem e mantidos estendidos durante 24 h para suavizar as curvaturas formadas pela posição em que é embalado. Foram seccionados segmentos de 25 mm, com lâmina de barbear de aço, e a seguir colocados entre as folhas de um livro, deixando-se uma de suas extremidades livre.

Com a utilização de microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos), a extremidade livre do fio foi recoberta com uma camada de silicone, preparado pela mistura do silicone propriamente dito (Silon F – Dimetil Polisiloxano, Aroma de Menta e Corante Artificial) e do catalisador (Silon C – Octoato de Estanho e Silicato de Etila), da Herp Produtos Dentários, na proporção de 5:1.

Tal mistura foi colocada na extremidade de uma pinça de microcirurgia e levada até o fio e sobre ele era colocada e distribuída com movimentos suaves para uma maior uniformidade. A extensão da camada de silicone utilizada foi de 5 mm, medida com uma régua milimetrada, colocada ao lado do fio durante o procedimento, sob visão microcirúrgica. A espessura preconizada, de aproximadamente 0,28 mm, foi medida com um paquímetro através da comparação visual da espessura de silicone e da abertura do paquímetro.

Os fios foram mantidos na mesma posição durante 24 h para a complementação da polimerização do silicone. Durante o procedimento vários fios foram desprezados por não se conseguir atingir os critérios acima descritos, principalmente em relação à uniformidade da espessura em toda a extensão da camada de silicone e, às vezes pela sua não polimerização.

Para a verificação de sua adequação, previamente ao procedimento operatório, os fios foram testados em ratos submetidos à eutanásia, através de sua inserção na artéria carótida interna, até sua parada de progressão, e visibilizados diretamente na base do crânio, depois de retirada da abóboda craniana e envoltórios. A adequação do fio foi assumida quando a extremidade siliconizada penetrava parcialmente na artéria cerebral anterior (ACA), e ocluía o óstio de origem da artéria cerebral média (ACM).

Figura 4. Detalhe do fio obstrutor com destaque para seu tamanho (25 mm), e o espessamento de silicone (0,28 mm), em sua extremidade (5 mm).

2.5 Procedimento cirúrgico

Após sorteio do grupo, cada animal foi pesado e em seguida submetido à anestesia geral por inalação de halotano, sob uma campânula de vidro. Foi utilizada uma canaleta de madeira, para a manutenção do animal em decúbito dorsal, sendo a seguir entubado manualmente, a partir da tração digital da língua para o exterior (Figura 5).

A extremidade da cânula foi conectada a um respirador desenvolvido para animais de pequeno porte, iniciando-se a vaporização contínua de halotano. A artéria ventral da cauda foi dissecada e canulada para registro contínuo da pressão arterial média, frequência cardíaca e coleta de amostras sanguíneas (Figura 5). Foi utilizado nesta fase um biomonitor (modelo 78339A – Hewlett Packard Company, USA). Após quinze minutos de ventilação mecânica, foi colhida uma amostra de sangue arterial para realização de gasometria e dosagem de hemoglobina, hematócrito e glicemia. Tal coleta foi repetida nos quinze minutos finais da isquemia, para dosagem dos mesmos parâmetros.

Figura 5. Cenário operatório, destacando-se o animal entubado sob ventilação mecânica, com monitorizações invasivas da PAM e da temperatura retal, e o instrumental microcirúrgico.

O procedimento teve início com a tricotomia da região cervical anterior, incisão mediana da pele e tela subcutânea, e secção do músculo platisma, seguida pelo tracionamento digital lateral até a exposição da glândula submandibular. Imediatamente abaixo desta identifica-se o músculo esternohióideo em situação mediana, e os músculos esternomastóideos em situação lateral. A região de interesse foi o hiato entre os dois músculos supracitados, no lado esquerdo, em todos os animais. A seguir foram colocados ganchos de tração expondo a delicada bainha por sobre a artéria carótida comum (ACC) esquerda.

Posteriormente, com o auxílio de microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos), e com a utilização de técnica e instrumental microcirúrgicos, foi identificada e exposta a artéria carótida comum (ACC) esquerda até sua bifurcação, e as artérias carótida interna (ACI) e externa (ACE). A ACE foi dissecada no sentido cranial e seus ramos colaterais coagulados e seccionados. A ACI também foi dissecada até a origem da artéria pterigopalatina (AP), e sua continuação até a base do crânio.

A seguir a ACE foi ligada o mais cranial possível, com fio de algodão (4.0 – Ethicon), para a introdução do fio obstrutor. Com técnica microcirúrgica, foram colocados microclipes temporários junto à emergência da AP, para impedir a migração do fio obstrutor para dentro de sua luz, na ACC,

para interromper o seu fluxo, e na continuação cranial da ACI, para evitar o refluxo de sangue.

A ACE foi seccionada, e a partir do coto proximal, foi introduzido o fio obstrutor retrogradamente até a ACC, e depois cranialmente pela ACI, após a retirada do clipe aí situado, até sua parada de progressão por resistência. Em seguida, foi medida a distância da bifurcação da ACC até a extremidade externa do fio obstrutor, sendo o valor aceitável entre 0,5-0,7 cm, o que indicava que o fio penetrou o suficiente para ocluir o óstio de origem da artéria cerebral média (ACM) (CARLOTTI Jr., 1998; KOIZUMI et al., 1986) (Figuras 6, 7 e 8). Os cliques da ACC e da artéria pterigopalatina (AP) em seguida foram retirados. Ao término do período de isquemia, o fio obstrutor foi retirado, permitindo a reperusão encefálica, e o coto proximal da artéria carótida externa foi ligado definitivamente com fio de algodão (4.0 – Ethicon).

Figura 6. Desenho esquemático da oclusão arterial. O fio obstrutor foi introduzido retrogradamente através da artéria carótida externa (ACE), passando pela artéria carótida interna (ACI), acabando por ocluir o óstio da artéria cerebral média (ACM). Reproduzido de Santana (2008), com permissão.

Figura 7. Foto microcirúrgica da oclusão arterial. O fio obstrutor foi introduzido retrogradamente através da artéria carótida externa (ACE), passando pela artéria carótida interna (ACI), acabando por ocluir o óstio da artéria cerebral média (ACM). Reproduzido de Santana (2008), com permissão.

Figura 8. Desenho esquemático da oclusão do óstio de saída da artéria cerebral média (ACM). No destaque o trajeto do fio, sendo 1 - artéria cerebral média, (ACM), 2 - artéria carótida comum (ACC), 3 - artéria carótida interna (ACI), 4 - artéria cerebral anterior (ACA), 5 - artéria pterigopalatina (AP). Reproduzido de Tirapelli (2007), com permissão.

2.6 Hipotermia

A hipotermia utilizada foi do tipo leve (32 - 34 °C), e realizada no período pré-isquêmico, intra-isquêmico e pós-isquêmico, sendo controlada por termistor retal. Nos grupos normotérmicos (C, S e CI) a temperatura do animal foi mantida com o auxílio de uma fonte de calor (lâmpada 60 W). Nos grupos Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1) e Hipotermia Intra-isquêmica (IH2), cada animal foi umedecido com solução fisiológica resfriada, e o ambiente do laboratório permaneceu com temperatura reduzida, por equipamento de ar condicionado. No grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), os animais, imediatamente após a extubação, foram acondicionados em recipiente contendo gelo, sendo sedados com halotano a cada hora, até o término das 6 horas de manutenção de hipotermia, com medidas intermitentes de temperatura através do termistor retal.

2.7 Retirada dos encéfalos

Encéfalos de todos os animais, divididos nos grupos experimentais citados, foram destinados a estudos de morfometria por método semi-automatizado computacional, com coloração *Luxol Fast Blue*, para avaliação da isquemia cerebral (SANTANA, 2008).

Os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com inalação maciça de halotano, e submetidos à tóraco-freno-laparotomia, com exposição do coração e da aorta. A aorta abdominal foi clampada, com a finalidade de realizar-se perfusão manual transcardíaca com solução salina tamponada (tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,3 a 4 °C), seguida de perfusão manual de solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,3 em temperatura ambiente.

A seguir foi realizada uma incisão transversal na pele e na tela subcutânea do crânio e, com um descolamento subgaleal, todo o crânio era exposto, desde a região da nuca até as narinas. Em seguida foram realizadas secções no crânio utilizando-se tesoura de Mayo, uma entre as órbitas, e outra ao longo da linha média, iniciando no osso occipital, continuando entre os ossos parietais, e terminando com a separação dos ossos frontais. A secção dos ossos frontais foi feita com tesoura delicada para evitar lesão do

parênquima cerebral. Após as secções ósseas, os hemisférios cerebrais foram expostos (Figura 9). O encéfalo foi retirado após secção do tronco cerebral e dos nervos cranianos, utilizando-se micropinça. Foram seccionados e desprezados os pólos frontal e occipital, por não conter tecido isquêmico.

Figura 9. Detalhe do crânio aberto do animal para a retirada do encéfalo.

2.8 Confecção das lâminas

As lâminas foram preparadas no Laboratório de Histologia, do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Os encéfalos foram fixados em formol tamponado a 10% por um período de no máximo 24 h. Em seguida foram submetidos à desidratação em bateria progressiva de pureza alcoólica na seguinte seqüência: 1 - álcool 50% durante 10 min, 2 - álcool 70% durante 20 min, 3 - álcool 80% durante 20 min, 4 - álcool 90% durante 40 min, 5 - álcool 95% durante 40 min, e 6 - 4 vezes em álcool absoluto durante 40 min cada. Após a desidratação os cérebros foram diafanizados por imersão em xilol em duas sessões de 40 min e uma sessão de 60 min. Posteriormente os cérebros foram imersos em parafina a 56 °C em uma sessão por 120 min e em duas sessões de 60 min cada, seguida da inclusão em parafina.

Nos encéfalos já parafinizados, fazendo-se uso de micrótomo, foram realizadas secções coronais seqüenciais de 10 µm de espessura, obtendo-se para cada encéfalo aproximadamente mil secções. Foi selecionada uma secção a cada intervalo de 15 secções seqüenciais, a ser destinada à coloração, sendo obtidas ao final 60 secções coronais coradas por encéfalo, sendo este o número padronizado para cada animal. As secções selecionadas foram coradas pela técnica *Luxol Fast Blue* para enfatizar os elementos celulares (corpos neuronais) que são corados em róseo-violeta, e a mielina, corada em azul-verde, na mesma lâmina (KLÜVER; BARRERA, 1953).

2.9 Análise morfométrica

A fase de análise morfométrica foi realizada no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

O primeiro passo consistiu na digitalização de cada corte contido nas lâminas. Nesta fase foi utilizada câmera análogo-digital modelo JVC TK1270, com lente grande angular 55 mm fixada em suporte vertical, instalada em módulo de captura de imagens, equipado com fonte de luz própria (conjunto de lâmpadas especiais frias 60 W) (Figura 10). Para cada seqüência de cortes capturados, realizou-se uma calibração de cores, com o objetivo de homogeneizar as eventuais variações na intensidade da coloração de cada corte. Para o presente estudo, para a fase de captura das imagens, foi padronizada a seguinte caracterização padrão de cores primárias, no sistema RGB, sendo R: 215, G: 226 e B: 173. Da mesma forma, para cada seqüência de imagens capturadas, foi digitalizada a imagem de uma régua milimetrada, que serviu como referência à calibração das medidas, para posterior conversão das medidas digitais (*pixels*), em medidas de área (mm²). Após a captura, todas as imagens foram armazenadas em disco rígido.

Figura 10. Módulo de captura de imagens, composto de câmera equipada com lente grande angular (55 mm) e sistema de iluminação.

Após esses procedimentos, foi realizada a morfometria de cada corte através do programa de análise de imagens KS400, Carl Zeiss, versão 2.0, instalado em sistema de processamento constituído de microcomputador padrão IBM-PC e placa de captura de vídeo FG1, Carl Zeiss.

A mensuração de cada seqüência de cortes iniciou-se carregando a imagem de cada corte a ser medido, na área de trabalho. Em seguida procedeu-se à calibração de medidas (milímetros), a partir da régua previamente digitalizada. O programa foi calibrado para conversão dos valores de *pixels* em milímetros (Figura 11).

A seguir foi iniciada a mensuração propriamente dita através da execução de uma seqüência de comandos programados em linguagem tipo *script*, denominada Macro, construída no programa KS400, específica para estudos desta natureza (SANTANA, 2008).

Pela técnica *Luxol Fast Blue*, as estruturas mielinizadas são coradas em azul-verde, e os corpos neuronais são corados em róseo-violeta (KLÜVER; BARRERA, 1953). Essas cores foram identificadas pelo sistema de processamento de imagens através de processo de limiarização por camadas de cor, que consiste em marcar as estruturas que se enquadrem dentro de uma faixa intencionalmente determinada, dentro do sistema de cores primárias RGB

(*Red, Green, Blue*). Na seqüência Macro, o azul-verde é denominado simplesmente azul, e o róseo-violeta, simplesmente vermelho. Para este estudo, determinou-se, no sistema RGB, que as estruturas mielinizadas estão na faixa de *limiarização* R: 0/45/91 – G: 20/58/96 – B: 169/212/255, e as não mielinizadas e os corpos celulares estão na faixa R: 80/141/203, G: 88/144/201 e B: 183/219/255.

Apesar da automação do processo, foi permitido ao operador controlar visualmente cada medida, para corrigir eventuais erros de identificação decorrentes de possível variabilidade da intensidade de coloração da secção de cérebro examinada, bem como eventuais dobras no tecido. Na prática isso ocorreu em poucas ocasiões. Auxiliaram este processo alguns filtros como o Contraste Automático, *Scrap* de estruturas muito pequenas, e *Smooth*, para ajuste de ruído em baixa freqüência, que provoca perda de foco em áreas isoladas dentro da imagem, devido a efeitos de intensidade luminosa. Áreas não coradas, tais como ventrículos cerebrais foram excluídas.

No passo seguinte, o hemisfério cerebral esquerdo (isquêmico) foi selecionado manualmente através de uma ferramenta do programa chamada retângulo. O programa identificou automaticamente o hemisfério direito. Dessa forma, foi possível realizar morfometria das estruturas de cada hemisfério separadamente, permitindo posteriores comparações de área (Figura 12).

Foram medidas sucessivamente, automaticamente pelo programa: área total, áreas em azul (fibras mielinizadas) do hemisfério esquerdo e hemisfério direito, áreas em vermelho (corpos neuronais) do hemisfério esquerdo e do hemisfério direito. Tais medidas aparecem na área de trabalho num quadro, ao final da Macro (Figura 13).

Para cada animal foram realizadas médias de todas as medidas supracitadas. Com tais médias foram calculadas razões das médias (hemisfério esquerdo (isquêmico) / hemisfério direito), tanto para as áreas em azul, quanto para as áreas em vermelho.

As áreas isquêmicas de cada corte foram obtidas a partir da diferença entre a área total e a soma de todas as medidas em azul e vermelho, de ambos os hemisférios. A partir de medidas dessas áreas, da espessura de cada secção e do número de secções, foi possível o cálculo do volume da

isquemia nos respectivos hemisférios isquêmicos, segundo a equação abaixo (BARTUS et al., 1994):

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = \frac{\Sigma \text{ área (mm}^2\text{) por lado}}{\text{n}^\circ \text{ de lados analisados}} \times (\text{extensão máxima do infarto});$$

onde, a extensão máxima do infarto resulta da multiplicação do número de cortes com isquemia por 0,01 (espessura do corte = 10 μm = 0,01 mm).

Foram calculados volumes isquêmicos parciais, correspondentes aos 60 cortes submetidos à morfometria, de cada animal. O volume isquêmico aproximado foi obtido através da fórmula: volume isquêmico parcial x 1000 / 60, sendo esta obtida por regra de três simples.

Para a correção do edema, quando necessário, foi utilizada a seguinte equação (CHANG et al., 2002):

Volume isquêmico corrigido = volume isquêmico (mm³) x volume do hemisfério contralateral / volume do hemisfério ipsilateral.

Figura 11. Detalhe da área de trabalho do programa KS400, na fase de calibração milimétrica (conversão de *pixels* em mm²), para a medida de uma série de cortes.

Figura 12. Detalhe da área de trabalho do programa KS400, no qual após a seleção do hemisfério esquerdo, a seleção do hemisfério direito é feita automaticamente.

Figura 13. Detalhe da área de trabalho do programa KS400, com as medidas finais em mm^2 , da área total do corte e dos respectivos hemisférios, em azul e vermelho, ao final da Macro.

2.10 Análise estatística

Para a análise estatística dos valores dos parâmetros fisiológicos dos animais (PaCO₂, hemoglobina, hematócrito e glicemia) foi aplicado o teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA). Para a comparação grupo a grupo das razões das médias do hemisfério cerebral esquerdo em relação ao hemisfério cerebral direito, das áreas isquêmicas médias (mm²), e dos volumes isquêmicos parciais e aproximados (mm³), foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. Foi adotado o nível de significância $p \leq 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad InStat for Windows, versão 3.06 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Procedimento cirúrgico

3.1.1 Animais

Foram operados 74 animais. Destes, seis animais foram excluídos durante o procedimento cirúrgico por parâmetros laboratoriais inadequados, sobretudo gasométricos. Ocorreram oito óbitos nesta fase, sendo quatro animais do grupo IH1, dois animais do grupo IH3, um animal do grupo IH2 e um do grupo CI. Todos os animais excluídos e os óbitos foram repostos, perfazendo-se um total de 10 animais por grupo experimental.

3.1.2 Parâmetros fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos mantidos pelos animais durante o procedimento cirúrgico seguiram a padronização de Carlotti Jr. (1998). Estes parâmetros estão apresentados nas tabelas que se seguem, com as respectivas análises estatísticas.

Tabela 1. Valores únicos de PaCO₂ (mmHg) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de PaCO₂ (mmHg) dos outros grupos.

C	S	CI		IH1		IH2		IH3	
Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
37	46	36	31	36	34	40,3	37,3	40,4	41
31	30	32	35	36	32	46	38	31	43
44	46	29,4	35,5	44	33	46	36	33	39
41	36	40,4	36	44,6	38	44	40	39	32
46	38	43	34	45	33	42	38	44	33
40	32	38	33	42	42	43	38	42	34
38	47	45	34	39	34	48	36	48	34
38	42	34	33	46	45	36	32	38	32
41	37	48	40	38	32	38	36	44	39
38	32	39	36	33	31	43	40	46	41

Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação aos valores iniciais de PaCO₂ (p=0,47, ANOVA). Em relação aos valores finais, nos grupos analisados, também não houve diferença significativa (p=0,4, ANOVA). C – grupo Controle, S – grupo *Sham*, CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

Tabela 2. Valores únicos de hemoglobina (g/dL) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de hemoglobina (g/dL) dos outros grupos.

C	S	CI		IH1		IH2		IH3	
Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
12,2	11,8	11,7	10,2	9,8	9,9	13,6	13,8	12,2	11,1
11,7	11,9	11,7	10,3	12,9	10,7	10,8	9,8	12,1	11,9
11,1	10,3	12	9,8	11,6	10,1	13,1	12,7	10,5	9,3
12,3	12	11,9	10,8	12,2	11,3	10,3	9,6	13,3	13,4
11	13,3	11,4	11,2	11,6	10,3	11,8	10,3	11,5	11,6
12,3	12,6	10,5	10,1	9,3	9,0	13,6	12,1	9,6	9,2
9,8	10,6	10,9	10,6	12,1	12	10,9	9,8	10,6	9,9
10,7	9,9	10,5	10,4	13,9	12,3	11,8	10,5	11	10,6
10,9	12,1	9,6	9,2	11,3	10,4	11,9	11,3	13,3	12,1
13,8	10,1	12,2	12,1	9,7	8,8	10,6	10,2	11,8	12,1

Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação aos valores iniciais de hemoglobina ($p=0,84$, ANOVA). Em relação aos valores finais, nos grupos analisados, também não houve diferença significativa ($p=0,49$, ANOVA). C – grupo Controle, S – grupo *Sham*, CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

Tabela 3. Valores únicos de hematócrito (%) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de hematócrito (%) dos outros grupos.

C	S	CI		IH1		IH2		IH3	
Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
38,6	35,5	35,6	34,1	32,8	32,3	34,6	34,2	39,8	38,8
33,1	32,3	34,1	31,1	37,2	33,1	33,1	31,2	39	38,2
34,4	31,8	37,1	35,2	35,8	34,2	40,2	36,8	34	28
33	33,7	35,4	37,2	38,4	37,2	31,8	30,2	38	39,1
36	40,1	36	34,2	33,4	32,1	35,5	34,2	35	36,1
37	37,2	33	32,3	30	31	36	35,2	31	29
29,3	35,2	35	36	38,9	37,2	35	32,6	34	32
36,6	32,4	34	33,2	40,7	36,2	38	37	35	34,3
34,2	37,2	29	28,1	37,3	36,2	33,2	32,4	41,5	36,2
36,9	31,8	31,8	30,2	28,9	27,3	33,7	32,8	38,3	39,3

Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação aos valores iniciais de hematócrito ($p=0,57$, ANOVA). Em relação aos valores finais, nos grupos analisados, também não houve diferença significativa ($p=0,56$, ANOVA). C – grupo Controle, S – grupo *Sham*, CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

Tabela 4. Valores únicos de glicemia (mg/dL) dos grupos C e S, e valores iniciais e finais de glicemia (mg/dL) dos outros grupos.

C	S	CI		IH1		IH2		IH3	
Inicial	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
197	182	125	112	128	117	213	202	271	192
138	120	116	98	170	123	181	126	167	132
199	167	137	109	115	117	228	208	125	116
162	172	128	119	170	167	108	103	194	182
210	220	136	128	216	202	182	176	138	128
202	198	102	101	110	96	196	187	123	108
129	192	148	103	189	201	175	182	143	121
148	215	197	108	109	101	193	202	201	182
111	119	143	132	172	162	103	102	227	126
108	91	99	91	96	92	108	102	96	97

Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação aos valores iniciais de glicemia ($p=0,34$, ANOVA). Em relação aos valores finais, nos grupos analisados, também não houve diferença significativa ($p=0,09$, ANOVA). C – grupo Controle, S – grupo *Sham*, CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

3.2 Análise morfométrica

3.2.1 Secções coronais

Foram analisadas por morfometria 3600 secções coronais (60 secções por animal). O programa KS400 forneceu valores, para cada secção, de área total, de áreas em azul dos hemisférios esquerdo e direito, e de áreas em vermelho do hemisfério esquerdo e direito. Para cada animal foi calculada uma média das áreas em azul, de ambos os hemisférios, e uma média das áreas em vermelho, também de ambos os hemisférios. A partir destas médias foram calculadas, para cada animal, razões das médias do hemisfério esquerdo (isquêmico) sobre o hemisfério direito (não isquêmico), para áreas em azul e para áreas em vermelho. Os resultados estão apresentados nas tabelas que se seguem. Os padrões de isquemia de cada grupo são mostrados nas figuras que se seguem.

Tabela 5. Médias das áreas em azul (mm²) dos hemisférios esquerdo e direito, com as respectivas razões, de todos os grupos.

C			S			CI			IH1			IH2			IH3		
HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD
6,31	6,69	0,94	6,97	7,62	0,91	2,94	6,13	0,47	4,28	6,39	0,66	4,24	5,89	0,71	2,78	5,86	0,47
4,71	4,96	0,94	6,28	6,54	0,96	2,99	6,27	0,47	5,57	6,52	0,85	4,58	6,99	0,65	6,22	6,88	0,9
6,36	6,8	0,93	5,34	5,9	0,9	2,99	6,33	0,47	4,19	6,21	0,67	4,09	5,92	0,69	2,73	5,76	0,47
4,97	5,66	0,87	4,79	5,25	0,91	5,84	6,76	0,86	6,15	6,71	0,91	4,45	6,62	0,67	6,81	7,48	0,91
5,96	6,65	0,89	5,79	6,46	0,89	4,86	5,69	0,85	4,62	7,06	0,65	5,39	5,88	0,91	2,91	6,43	0,45
5,54	6,26	0,88	5,01	5,46	0,91	2,75	5,84	0,47	4,06	6,22	0,65	4,27	6,35	0,67	2,99	6,45	0,46
5,9	6,38	0,92	5,25	5,64	0,93	2,37	5,04	0,47	3,87	5,69	0,68	5,59	6,2	0,9	6,48	6,84	0,94
5,27	5,92	0,89	5,55	6,18	0,89	2,58	5,29	0,48	4,64	6,78	0,68	2,37	5,2	0,45	2,43	5,19	0,46
5,79	6,45	0,89	6,28	6,57	0,95	2,72	5,72	0,47	4,52	6,52	0,69	3,85	5,67	0,67	3,37	8,28	0,4
5,2	5,77	0,9	5,86	6,52	0,89	2,9	6,2	0,46	4,41	6,52	0,67	5,41	5,72	0,94	3,07	6,24	0,49

Não houve diferença significativa entre os grupos C vs. S ($p=0,39$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH3 ($p=0,85$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,63$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Houve diferença significativa entre os grupos C vs. CI ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH1 ($p=0,01$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). C – grupo Controle, S – grupo *Sham*, CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica, HE – hemisfério cerebral esquerdo, HD – hemisfério cerebral direito.

Tabela 6. Médias das áreas em vermelho (mm²) dos hemisférios esquerdo e direito, com as respectivas razões, de todos os grupos.

C			S			CI			IH1			IH2			IH3		
HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD	HE	HD	HE/HD
35,38	36,42	0,97	31,9	32,9	0,96	7,25	30,51	0,23	32,01	44,7	0,71	34,43	44,52	0,77	7,51	36,35	0,2
34,39	35,03	0,98	35,66	36,63	0,97	8,24	34,35	0,23	34,33	35,38	0,97	34,63	45,61	0,75	35,25	36,52	0,96
35,56	36,59	0,97	34,98	35,96	0,97	8,14	36,42	0,22	32,53	45,81	0,71	31,69	44,63	0,71	8,02	33,7	0,23
35,04	35,91	0,97	34,22	35,9	0,95	31,85	37,04	0,85	33,93	34,96	0,97	31,78	45,43	0,69	34,82	35,85	0,97
34,95	35,86	0,97	35,88	37,1	0,96	30,99	35,92	0,86	25	38,19	0,65	34,42	35,75	0,96	9,16	39,54	0,23
34,95	36,24	0,96	35,02	36,06	0,97	7,6	37,13	0,2	31,34	44,56	0,7	31,98	44,68	0,71	8,06	39,08	0,2
34,45	35,79	0,96	34,49	35,71	0,96	7,55	37,34	0,2	31,81	43,42	0,73	34,22	35,22	0,97	34,62	35,66	0,97
34,82	36,05	0,96	34,4	35,59	0,96	7,22	36,24	0,19	35,06	45,66	0,76	7,08	35,82	0,19	7,24	38,04	0,19
35,32	36,68	0,96	35,34	36,46	0,96	7,64	35,71	0,21	32,73	45,1	0,72	31,78	43,36	0,73	8,12	31,95	0,25
35,3	36,5	0,96	34,47	35,35	0,97	8,51	38,31	0,22	32,93	46,22	0,71	35,2	36,1	0,97	7,44	30,8	0,24

Não houve diferença significativa entre os grupos C vs. S ($p=0,48$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH3 ($p=0,27$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,68$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Houve diferença significativa entre os grupos C vs. CI ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), CI vs. IH1 ($p=0,009$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,03$, Mann-Whitney-Wilcoxon). C – grupo Controle, S – grupo *Sham*, CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica, HE – hemisfério cerebral esquerdo, HD – hemisfério cerebral direito.

Figura 14. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Controle (C). Os animais do grupo *Sham* (S) demonstraram aspecto semelhante. Na figura podem ser diferenciadas as estruturas mielinizadas (azul-verde), dos neurônios e fibras não mielinizadas (róseo-violeta).

Figura 15. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Controle-Isquêmico (CI), na qual nota-se a área clara correspondente à isquemia, no hemisfério esquerdo, desde os núcleos da base até a região cortical.

Figura 16. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Controle-Isquêmico (CI), na qual nota-se o edema decorrente da isquemia, no hemisfério esquerdo. Tal fato ocorreu em apenas dois animais, dentro deste grupo.

Figura 17. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), na qual nota-se a área reduzida de isquemia no hemisfério esquerdo, em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI).

Figura 18. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), na qual nota-se a área reduzida de isquemia no hemisfério esquerdo, em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI), semelhantemente aos animais do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1).

Figura 19. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), na qual nota-se a área de isquemia no hemisfério esquerdo, semelhante ao grupo Controle-Isquêmico (CI).

3.2.2 Áreas isquêmicas médias

As áreas isquêmicas de cada secção foram calculadas pela diferença entre a área total e a soma de todas as áreas medidas pelo programa. Para cada animal submetido à isquemia, foi calculada a média dessas áreas isquêmicas, obtendo-se um valor único. Os resultados estão apresentados na tabela e gráficos que se seguem.

Tabela 7. Áreas isquêmicas médias (mm²) dos animais dos grupos isquêmicos.

CI	IH1	IH2	IH3
23,36	9,07	8,23	38,23
33,8	7,18	4,65	3,73
35,8	7,43	8,93	32,21
9,51	5,58	8,45	3,13
11,7	13,74	6,4	38,73
37,71	9,25	9,19	38,64
41,72	10,43	4,81	4,98
40,12	4,31	39,53	43,05
37,53	9,13	10,55	24,95
38,14	6,43	4,75	22,7

Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos CI vs. IH3 ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Houve diferença significativa entre os grupos CI vs. IH1 ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,0011$, Mann-Whitney-Wilcoxon). CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

Figura 20. Imagem de secção coronal de encéfalo de rato do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), com destaque para a área isquêmica, calculada em cada secção, a partir da diferença entre a área total e a soma das áreas em azul e vermelho de ambos os hemisférios.

Grupo Controle-Isquêmico (CI)

Figura 21. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias (mm²), do grupo Controle-Isquêmico (CI), alocadas em ordem crescente de valores.

Grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3)

Figura 22. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias, do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), alocadas em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI) (Figura 21). Não houve diferença significativa ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon).

Grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1)

Figura 23. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias (mm²), do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), alocadas em ordem crescente de valores.

Grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2)

Figura 24. Gráfico de dispersão das áreas isquêmicas médias (mm²), do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), alocadas em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1) (Figura 23). Não houve diferença significativa ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon).

3.2.3 Volumes isquêmicos

Os volumes isquêmicos foram calculados segundo Bartus et al. (1994), e corrigidos quando necessário, conforme proposto por Chang et al. (2002). A partir de tais fórmulas, foram calculados volumes isquêmicos parciais, correspondentes aos 60 cortes submetidos à morfometria, para cada animal. O volume isquêmico aproximado, de cada animal, foi obtido através da fórmula: volume parcial x 1000 / 60, sendo esta obtida por regra de três simples. Os resultados estão apresentados nas tabelas e gráficos que se seguem.

Tabela 8. Volumes isquêmicos parciais (mm³) dos animais dos grupos isquêmicos.

CI	IH1	IH2	IH3
14,1	5,44	4,93	22,93
20,28	4,3	2,79	2,23
21,48	4,45	5,35	19,32
5,7	3,34	5,07	1,87
7,02	8,24	3,84	23,23
22,62	5,55	5,51	23,18
25,03	6,25	2,88	2,98
24,07	2,58	23,71	25,83
22,51	5,47	6,33	14,97
22,88	3,85	2,85	13,62

Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos CI vs. IH3 ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Houve diferença significativa entre os grupos CI vs. IH1 ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,0011$, Mann-Whitney-Wilcoxon). CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

Tabela 9. Volumes isquêmicos aproximados (mm³) dos animais dos grupos isquêmicos.

CI	IH1	IH2	IH3
239,7	92,48	83,81	389,81
344,76	73,1	47,43	37,91
361,76	75,65	90,95	328,44
96,9	56,78	86,19	31,79
119,34	140,08	65,28	394,91
384,54	94,35	93,67	394,06
425,51	106,25	48,96	50,66
409,19	43,86	403,07	439,11
382,67	92,99	107,61	254,49
388,96	65,45	48,45	231,54

Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos CI vs. IH3 ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e IH1 vs. IH2 ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon). Houve diferença significativa entre os grupos CI vs. IH1 ($p=0,0001$, Mann-Whitney-Wilcoxon), e CI vs. IH2 ($p=0,0011$, Mann-Whitney-Wilcoxon). CI – grupo Controle-Isquêmico, IH1 – grupo Hipotermia Pré-Isquêmica, IH2 – grupo Hipotermia Intra-Isquêmica, IH3 – grupo Hipotermia Pós-Isquêmica.

Grupo Controle-Isquêmico (CI)

Figura 25. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Controle-Isquêmico (CI), alocados em ordem crescente de valores. O gráfico é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), deste mesmo grupo (Figura 21).

Grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3)

Figura 26. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), alocados em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Controle-Isquêmico (CI). Não houve diferença significativa ($p=0,57$, Mann-Whitney-Wilcoxon). O gráfico também é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3) (Figura 22).

Grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1)

Figura 27. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1), alocados em ordem crescente de valores. O gráfico é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), deste mesmo grupo (Figura 23).

Grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2)

Figura 28. Gráfico de dispersão dos volumes isquêmicos aproximados (mm^3), do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), alocados em ordem crescente de valores, no qual nota-se a semelhança na dispersão em relação ao grupo Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1). Não houve diferença significativa ($p=0,79$, Mann-Whitney-Wilcoxon). O gráfico também é semelhante ao gráfico das áreas isquêmicas médias (mm^2), do grupo Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2) (Figura 24).

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

A isquemia cerebral é uma condição extremamente grave e de alta prevalência, que vem flagelando a humanidade há milênios. Seu entendimento ao longo do tempo evoluiu sobremaneira, mas infelizmente ainda possui profilaxia e tratamento limitadíssimos. Muitos aspectos dessa doença ainda estão por serem completamente elucidados, especialmente para que uma forma terapêutica específica advenha. Especialmente para o neurocirurgião, que lida diariamente com condições que cursam com isquemia cerebral, como por exemplo, o vasoespasma, que ocorre após hemorragia subaracnóidea, e em clipagens vasculares temporárias durante neurocirurgias, estratégias de neuroproteção poderiam aumentar sobremaneira os resultados operatórios e o prognóstico dos pacientes.

Sabe-se que em condições fisiológicas o cérebro cobre sua demanda de energia quase que exclusivamente pela oxidação da glicose, além de ser o órgão mais susceptível à privação de oxigênio (HAYWOOD; SILBERGLEIT; ROSENTHAL, 1997). Tal privação, na medida de sua localização, duração e intensidade pode resultar em isquemia global ou focal, permanente ou temporária, total ou parcial, respectivamente. Na vigência de isquemia cerebral focal, existe uma área denominada penumbra isquêmica, localizada entre a área central de infarto (necrose), e a zona de cérebro normal de permeio. Os neurônios localizados nessa área de penumbra estão funcionalmente silenciosos (EEG isoeletrico), mas estruturalmente intactos (ASTRUP; SIESJO; SYMON, 1981), e por esse motivo viáveis por uma ou poucas horas após ocorrência do evento isquêmico (LASSEN; FIESCHI; LENZI, 1991). Nessa região predominam fenômenos de morte celular programada (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007). Se o período de isquemia persiste, ocorre injúria celular e disfunção neurológica. Uma vez a isquemia resultando em morte celular (infarto cerebral), a injúria torna-se irreversível e não pode ser reparada (SPETZLER; HADLEY, 1989). A extensão da lesão e seu potencial de reversibilidade dependem da intensidade e da duração do processo isquêmico (SPETZLER; HADLEY, 1989). Desta forma, o foco das intervenções terapêuticas está direcionado para tal área de penumbra isquêmica, com aplicação de medidas que possam reduzir o tamanho do infarto

cerebral, como por exemplo a hipotermia (SPETZLER; HADLEY, 1989; HOSSMANN, 2002).

Para o estudo sistemático da isquemia cerebral experimental é fundamental o uso de um modelo animal, reprodutível *in vivo*, no qual se tenha controle de todas as variáveis fisiológicas, proporcionando maior rigor na mensuração dos resultados (GINSBERG, 2008; GINSBERG; BUSTO, 1989). Nesse contexto, dentre os vários modelos experimentais utilizados, destaca-se o modelo executável no rato (VAN DER WORP et al., 2007). Tal animal além de apresentar baixo custo, possui relativa homogeneidade dos animais dentro de uma mesma raça, e semelhança anatômica cerebrovascular com outras espécies filogeneticamente mais evoluídas, inclusive a humana, tendo sua irrigação arterial encefálica muito bem descrita (COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998; GREENE, 1963; SILVA, 1996).

No presente estudo, foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar. Tal linhagem tem como vantagem o fato de não sofrer uma isquemia tão intensa, e conseqüentemente edema, como ocorre em ratos da linhagem SHR, que desenvolve pouca circulação colateral; nem sofre infartos limitados, como ocorre nos ratos da linhagem Long Evans, especialmente quando há reperfusão, porque esta linhagem desenvolve circulação colateral abundante (KRIEGER; YENARI, 2004). Animais do sexo masculino foram escolhidos porque existem evidências de que no sexo feminino pode existir certo grau de neuroproteção, fato este devido aos hormônios sexuais específicos (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007), o que poderia ser uma variável confundidora na análise da neuroproteção. Foram escolhidos ratos adultos, com peso entre 280 e 310 gramas, pois animais mais jovens, geralmente abaixo deste patamar, apresentam redes colaterais mais desenvolvidas, conferindo uma maior resistência ao infarto (COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998; MENZIES; HOFF; BETZ, 1992).

O procedimento operatório utilizado (CARLOTTI Jr., 1998; KOIZUMI et al., 1986) mostrou-se efetivo, e também de um custo viável. Sua grande vantagem foi a possibilidade de reversão da isquemia, permitindo a reperfusão quando da retirada do fio intraluminal, ao contrário de outros que utilizam craniotomia com coagulação e/ou ligadura da artéria cerebral média (TAMURA et al., 1981). O fato de alguns animais de grupos isquêmicos não

demonstrarem isquemia deve-se possivelmente ao fato de variações anatômicas individuais de cada animal. Ocorreram em poucos animais, obedecendo ao limite de aproximadamente 70% de positividade de isquemia por grupo experimental (COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr., 1998). Os óbitos ocorreram principalmente nos grupos hipotérmicos, provavelmente devido a exposição à baixa temperatura por um longo período, e não diferiram de outros estudos desta mesma natureza (BAUMANN et al., 2009; SANTANA, 2008; WANG et al. 2010).

O agente anestésico utilizado, o halotano, utilizado como droga de manutenção do nível anestésico durante todo o procedimento cirúrgico, nos animais de todos os grupos experimentais, inclusive dos grupos Controle (C) e *Sham* (S), trouxe como vantagem o fato de ser o único anestésico inalatório que não produz alterações significativas na pressão intracraniana (WARNER et al., 1991), além de acessibilidade e custo viável. Apesar de questionado em estudos prévios (SANTANA, 2008; WARNER et al., 1993), por possuir um possível efeito neuroprotetor, neste estudo, tal efeito não teve um papel importante, pois a droga foi utilizada nas mesmas concentrações, em todos os grupos experimentais. Além disso, continua a ser largamente empregado em estudos de isquemia cerebral experimental (VAN DER WERP et al., 2007).

Os parâmetros laboratoriais mais importantes dos animais durante o procedimento operatório (PaCO₂, hemoglobina, hematócrito e glicemia), e que poderiam de alguma forma alterar o resultado isquêmico, estiveram sempre dentro dos valores aceitos para este tipo de experimento (BROUX et al., 2002; CARLOTTI Jr., 1998; DUVERGER; MACKENZIE, 1988). Tais parâmetros, dentro de cada grupo, apresentaram distribuição estatística normal, sendo utilizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA). Foi constatado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à primeira amostra de sangue arterial (colhida antes de iniciar a isquemia), e nem em relação à coleta ao final da isquemia, entre os diferentes grupos, de forma que os parâmetros fisiológicos não interferiram no insulto isquêmico.

A análise morfométrica da área e do volume da isquemia cerebral focal representa um meio objetivo para estimar a extensão da injúria isquêmica e é comumente empregada para mensurar a eficácia de agentes

neuroprotetores (NAKANO; COLLI; LOPES, 2007; WESTERMAIER et al., 2000; SANTANA, 2008). A interpretação dessas intervenções terapêuticas pode ser comprometida em decorrência das distorções do volume do infarto, sobretudo devido ao inchaço cerebral, que ocorre de seis horas a sete dias após isquemia (LIN et al., 1993), pela ausência de distinção entre margens de áreas isquêmicas e não isquêmicas (SWANSON et al., 1990), pela perda de substância em virtude do infarto ou da formação de artefatos durante o processamento histológico, e pela dificuldade de excluir espaços previamente ocupados por líquido cefalorraquidiano, como os ventrículos e as cisternas subaracnóideas. Utilizando um período de reperfusão de 24 horas no presente estudo, observamos certo grau de edema cerebral em apenas dois animais do grupo Controle-Isquêmico (CI). Para minimizar esses efeitos de distorção, diferentes métodos e colorações histológicas têm sido utilizados nesses estudos, como hematoxilina-eosina (WESTERMAIER et al., 2000; ZEA LONGA et al., 1989), cresil-violeta (AVENDAÑO et al., 1995; SWANSON et al., 1990), *Luxol Fast Blue* (SANTANA, 2008).

Uma contribuição importante ao estudo da isquemia cerebral experimental foi a introdução de sistemas informatizados de análise de imagens (NAKANO; COLLI; LOPES, 2007; SANTANA, 2008; SWANSON et al., 1990; WARNER et al., 1996). Tais métodos possibilitam a aplicação de técnicas semi-automatizadas para obtenção de medidas de áreas e volumes de infarto cerebral focal experimental. Todos esses sistemas tratam a imagem na forma de *pixels* ajustados em faixas correspondentes às densidades ópticas das estruturas da secção analisada e permitem controlar possíveis variabilidades na intensidade da coloração da secção do cérebro, nas faixas limites dos *pixels* previamente estabelecidas para cada uma delas (NAKANO; COLLI; LOPES, 2007; SANTANA, 2008).

No presente estudo utilizamos o novo método semi-automatizado de análise morfométrica computacional (SANTANA, 2008). A técnica faz uso de secções coronais coradas pela técnica *Luxol Fast Blue*, descrita por Klüver e Barrera (1953). Tal coloração traz a vantagem da diferenciação entre corpos neuronais e fibras mielinizadas. O método também permite a realização da morfometria diretamente das lâminas sem necessidade de procedimentos adicionais de tratamento das imagens, presentes em outros métodos

(SWANSON et al., 1990). A técnica utilizada também possibilitou analisar separadamente as áreas cerebrais que contenham corpos celulares (neurônios), como preconizam Avendaño et al. (1995), e áreas de substância branca. Além disso, permite desenhos de estudos experimentais para analisar exclusivamente o comportamento das fibras mielinizadas, cuja resposta à injúria isquêmica ocorre via mecanismo diferente daquele da substância cinzenta (PULSINELLI, 1992; SWANSON et al., 1990). Além disso, com esta técnica foi possível a exclusão de todos os espaços vazios naturais (como os ventrículos e cisternas) ou artefatuais, decorrentes do processamento histológico. O método mostrou-se efetivo para isquemia cerebral focal temporária de 90 min, com um período reperfusional de 30 dias (SANTANA, 2008).

O programa KS400 forneceu valores de áreas coradas em azul e em vermelho, de cada hemisfério separadamente, para cada corte coronal, e foram calculadas médias para todos esses valores e, a seguir, razões das médias (HE/HD), para cada animal. O cálculo de tais razões permitiu a comparação de encéfalos de diferentes tamanhos, já que os animais possuíam pesos distintos, dentro de um intervalo aceitável. Foram possíveis comparações de áreas em azul (fibras mielinizadas) e áreas em vermelho (corpos neuronais). A análise estatística das razões das médias revelou grupos experimentais com padrões de normalidade estatística distintos. Dessa forma para uma comparação analítica grupo a grupo, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon.

As áreas isquêmicas foram obtidas, para cada corte, a partir da diferença entre a área total e a soma de todas as áreas medidas pelo programa. Os volumes isquêmicos foram medidos indiretamente, calculados a partir das áreas isquêmicas e da extensão do infarto cerebral (BARTUS et al., 1994; CHANG et al., 2002). Foi possível o cálculo de um volume parcial e um volume isquêmico aproximado. As áreas isquêmicas, e os volumes isquêmicos parciais e aproximados, também apresentaram padrões distintos de normalidade estatística, sendo que, para uma análise grupo a grupo, o método que se mostrou mais adequado foi o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. As áreas isquêmicas médias, os volumes isquêmicos parciais e os volumes isquêmicos aproximados, quando analisados grupo a grupo

apresentaram comportamento estatístico idêntico, pois na realidade os volumes foram obtidos a partir da multiplicação das áreas isquêmicas médias pela espessura dos cortes (BARTUS et al., 1994). Também seguiram padrão estatístico semelhante ao das razões das médias, confirmando tais resultados.

Os dados da literatura obtidos em estudos experimentais mostram, que a hipotermia, dentre todas as diferentes abordagens utilizadas, nelas incluídas drogas, é ainda o elemento mais efetivo para reduzir a lesão cerebral causada pela isquemia (BARONE; FEUERSTEIN; WHITE, 1997; BUSTO et al., 1987). A hipotermia tem a capacidade de alterar muitos dos efeitos danosos conseqüentes à isquemia, suprimindo cascatas moleculares de morte celular, como observado em modelos experimentais (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007).

Em termos temporais, a hipotermia pode ser aplicada antes da isquemia (hipotermia pré-isquêmica), durante (hipotermia intra-isquêmica) ou após (hipotermia pós-isquêmica). A modalidade intra-isquêmica reduz sobremaneira o tamanho do infarto na grande maioria dos modelos experimentais (VAN DER WORP et al., 2007). Na modalidade pós-isquêmica o efeito neuroprotetor geralmente é menor e, em estudos experimentais em ratos, é preconizada uma janela para o início da mesma de até 1 h para isquemias cerebrais definitivas, e 3 h (KRIEGER; YENARI, 2004), ou 4 h (OHTA et al., 2007), para isquemias cerebrais temporárias. Além disso, o prolongamento do resfriamento e a profundidade da hipotermia podem aumentar sua eficácia (BAUMANN et al., 2009; KRIEGER; YENARI, 2004). O efeito da hipotermia pré-isquêmica é pouco conhecido, sendo pouco explorado na literatura.

No presente estudo utilizamos hipotermia leve, que é a mais utilizada em modelos experimentais porque ocasiona menos efeitos colaterais (VAN DER WORP et al., 2007). A hipotermia foi aplicada antes, durante e após a isquemia. A forma de indução da hipotermia, para os grupos Hipotermia Pré-Isquêmica (IH1) e Hipotermia Intra-Isquêmica (IH2), com refrigeração ambiente e umedecimento do animal mostrou-se adequada em reduzir a temperatura retal em alguns minutos. No grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3), a hipotermia, realizada em recipiente contendo gelo, e controlada por medidas intermitentes da temperatura retal, também mostrou-se adequada.

Desde a primeira descrição do efeito neuroprotetor da hipotermia leve intra-isquêmica na isquemia cerebral temporária em ratos (BUSTO et al., 1987), inúmeros estudos experimentais demonstram seu efeito benéfico. A grande maioria dos estudos demonstra que a hipotermia leve intra-isquêmica em isquemia cerebral focal temporária é capaz de reduzir grandemente o infarto cerebral (KRIEGER; YENARI, 2004). Numa grande meta-análise dos modelos experimentais para o estudo da isquemia cerebral concluiu-se que, numa análise global, a hipotermia leve intra-isquêmica pode reduzir o volume do infarto em até 44% (VAN DER WOUPE et al., 2007). Os resultados do presente estudo apontam para essa tendência. Constatamos também que tal efeito neuroprotetor ocorre tanto para corpos neuronais, quanto para substância branca. Além disso, Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez, para isquemia experimental focal temporária em ratos, associada a um período reperfusional de 24 horas, a não superioridade da isquemia pré-isquêmica, iniciada 30 minutos antes da isquemia, em relação à hipotermia intra-isquêmica. Entretanto, é possível que o período de hipotermia pré-isquêmica aqui utilizado tenha sido insuficiente, havendo necessidade de outras abordagens experimentais.

Com relação à hipotermia pós-isquêmica em ratos, alguns autores afirmam ser necessário o uso prolongado da hipotermia reperfusional por 24 h (XIONG et al., 2009) ou 48 h (FLORIAN et al., 2008) para que ocorra neuroproteção. Por outro lado, outros estudos experimentais recentes afirmam que é suficiente que a hipotermia inicie no exato momento da reperfusão e que tenha uma duração de pelo menos 1 h (ZHANG et al., 2008), para ocorrer neuroproteção. Dentro deste conceito, Baumann et al. (2009) utilizaram hipotermia leve num período de 6 horas, iniciada no exato momento da reperfusão, em isquemia cerebral temporária, obtendo neuroproteção, evidenciada pela preservação da barreira hemato-encefálica nos diferentes grupos reperfusionais (6 e 24 h). Baseado nestes relatos, no presente trabalho utilizamos hipotermia pós-isquêmica com 6 h de duração, iniciada no momento da reperfusão. Não observamos neuroproteção, fato este evidenciado pela não significância estatística entre o grupo Hipotermia Pós-Isquêmica (IH3) e o grupo Controle-Isquêmico (CI). Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que, embora a temperatura retal de todos os animais do grupo IH3 se mantivessem

nos limites da hipotermia leve (32 - 34 °C) adotada para este estudo, não foi possível saber se a temperatura cerebral realmente permaneceu nesse patamar durante a reperfusão. Estudo recente utilizando infusão cerebral de sangue resfriado durante isquemia cerebral temporária de 2 h mostrou diminuição da temperatura cerebral, e manutenção da temperatura retal em níveis normais. Por esse motivo, Wang et al. (2010) preconizaram recentemente o uso do resfriamento endovascular através de cateteres para o estudos da isquemia cerebral experimental em ratos, em detrimento do resfriamento sistêmico (utilizado neste estudo), ou local (resfriamento craniano direto). Os tremores do animal, a despeito da sedação, também podem ter influenciado negativamente a manutenção da hipotermia pós-isquêmica. Para isso, atualmente é preconizado o uso de drogas que os inibam, experimentalmente e em futuros desenhos clínicos (FROEHLER; OVBIAGELE, 2010).

A grande dificuldade dos resultados dos estudos experimentais é a extrapolação à espécie humana, no cenário clínico-cirúrgico. Apesar do efeito positivo da hipotermia em estudos experimentais, faltam estudos multicêntricos, com um grande número de pacientes, portadores de isquemia cerebral em sua fase aguda. Resultados positivos envolvendo pacientes sobreviventes de parada cardíaco-respiratória e recém-nascidos portadores de encefalopatia hipóxico-isquêmica sugerem que a estratégia de neuroproteção hipotérmica, aplicada clinicamente, tende a ser promissora (GINSBERG, 2008). Froehler e Ovbiagele (2010) afirmaram que já existem evidências científicas suficientes para que os grandes estudos clínicos tenham início. Segundo estes autores as duas principais lições advindas dos estudos experimentais são: o início da hipotermia deve ser o mais rápido possível após o evento isquêmico, preferencialmente com esfriamento endovascular e, a prevenção dos tremores na vigência da hipotermia é primordial, sobretudo através da utilização de drogas como meperidina e buspirona, ou por aquecimento na superfície corporal.

No cenário neurocirúrgico, também faltam mais estudos que explorem a hipotermia. Apesar da conclusão negativa do *Intraoperative Hypothermia for Aneurysm Surgery Trial* – IHASt (TODD et al. 2005) é possível que tais resultados possam ser explicados por um tempo de

resfriamento insuficiente, seguido por um rápido reaquecimento. Além disso, outras restrições a este estudo são a priorização a pacientes em bom estado neurológico (baixo risco de injúria isquêmica), e a utilização como parâmetro clínico a *Glasgow Outcome Scale* (GOS), que não contempla adequadamente a avaliação das funções cognitivas, e não é capaz de detectar alterações neuroclínicas sutis. Além disso, uma análise mais aprofundada dos resultados do IHAAT mostrou que, especialmente nos grupos hipotérmicos de pacientes do sexo masculino, e dos pacientes de ambos os sexos submetidos à cirurgia em 8 a 14 dias após o ictus hemorrágico, houve melhora no resultado neurológico final (CHOI et al., 2009). Além disso, corroborando tais possíveis resultados positivos, Prandini et al. (2009), utilizando hipotermia loco-regional em cirurgias de aneurismas da artéria cerebral média, com clipagens arteriais temporárias, demonstraram um possível efeito benéfico da hipotermia (PRANDINI et al., 2009).

Em virtude da controvérsia em torno do tema, muito há ainda a ser investigado sobre os efeitos benéficos da hipotermia, sobretudo no cenário clínico-cirúrgico.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, a hipotermia leve pré-isquêmica promoveu um efeito neuroprotetor na isquemia cerebral focal transitória em ratos, semelhante à hipotermia leve intra-isquêmica, fato este não observado com a hipotermia leve pós-isquêmica.

REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS¹

ARONOWSKI, J.; STRONG, R.; GROTTA, J. C. Reperfusion injury demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 17, n. 10, p. 1048-1056, 1997.

ASTRUP, J.; SIESJO, B. K.; SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. **Stroke**, v. 12, p. 723-725, 1981.

AVENDAÑO, C.; RODA, J. M.; CARCELLER, F.; DIEZ-TEJEDOR, E. Morphometric study of focal ischemia in rats: a stereological evaluation. **Brain Research**, v. 673, p. 83-92, 1995.

BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z.; WHITE, R. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. **Neuroscience Behavioral Review**, v. 21, n. 1, p. 31-44, 1997.

BARTUS, R. T.; BAKER, K. L.; HEISER, A. D.; SAWYER, S. D.; DEAN, R. L.; ELLIOTT, P. J.; STRAUB, J. A. Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 14, p. 537-544, 1994.

BAUMANN, E.; PRESTON, E.; SLINN, J.; STANIMIROVIC, D. Post-ischemic hypothermia attenuates loss of the vascular basement membrane proteins, agrin and SPARC, and the blood-brain barrier disruption after global cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 1269, p. 185-197, 2009.

BEDERSON, J. B.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS R. L.; BARKOWSKI, H. M. Evaluation of 2,3,5-tripheniltetrazolium chloride as a stain detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, v. 17, n. 6, p. 1304-1308, 1986.

BERNARD, S. A.; GRAY, T. W.; BUIST, M. D.; JONES, B. M.; SILVESTER, W.; GUTTERIDGE, G.; SMITH, K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 557-563, 2002.

BORIS-MÖLLER, F. B.; KAMME, F.; WIELOCH, T. The effect of hypothermia on the expression of neurotrophin mRNA in the hippocampus following transient cerebral ischemia in the rat. **Molecular Brain Research**, v. 63, p. 163-173, 1998.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BRATINA, P.; GRENBORG, L.; PASTEUR, W.; et al. Current emergency department management of stroke in Houston, Texas. **Stroke**, v. 26, p. 409-14, 1995.

BROUX, C.; TROPRES, I.; MONTIGON, O.; JULIEN, C.; DECORPS, M.; PAYEN, J. F. The effects of sustained hyperventilation on regional cerebral blood volume in thiopental-anesthetized rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 95, p. 1746-1751, 2002.

BUSTO, R.; DIETRICH, W. D.; GLOBUS, M.Y.; et al. Small differences in intranscemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 7, p. 729-738, 1987.

CARLOTTI Jr., C. G. **Estudo da respiração mitocondrial do córtex de ratos submetidos à isquemia focal por oclusão da artéria cerebral média**. 1998. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

CARLOTTI Jr., C. G.; COLLI, B. O.; KAZUO, J. Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, p. 365-371, 2001.

CHANG, M. L.; YANG, J.; KEM, S.; KLAIDMAN, L.; SUGAWARA, T.; CHAN, P. H.; ADAMS, J. D. Nicotinamide and ketamine reduce infarct volume and DNA fragmentation in rats after brain ischemia and reperfusion. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 137-140, 2002.

CHEN, S. T.; HSU, C. Y.; HOGAN, E. L.; MARICQ, H.; BALENTINE, J. D. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. **Stroke**, v. 17, n. 4, p. 738-743, 1986.

CHEN, H.; CHOPP, M.; ZHANG, Z. G.; GARCIA, J. H. The effect of hypothermia on transient middle cerebral artery occlusion in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 12, n. 4, p. 621-628, 1992.

CHENG, H.; JI, X.; DING, Y.; LUO, Y.; WANG, G.; SUN, X.; CHEN, J.; LING, F. Focal perfusion of circulating cooled blood reduces the infarction volume and improves neurological outcome in middle cerebral artery occlusion. **Neurological Research**, v. 31, n. 4, p. 340-345, 2009.

CHOI, R.; ANDRES, R. H.; STEINBERG, G. K.; GUZMAN, R. Intraoperative hypothermia during vascular neurosurgical procedures. **Neurosurgical Focus**, v. 26, n. 5, p. 1-6, 2009.

CHURCH, J.; ZEMAN, S.; LODGE, D. The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. **Anesthesiology**, v. 69, p. 702-709, 1988.

CLIFTON, G. L.; MILLER, E. R.; CHOI, S. C.; LEVIN, H. S.; et al. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 556-563, 2001.

COLBOURNE, F.; CORBETT, D.; ZHAO, Z.; YANG, J.; BUCHAN, A. M. Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 20, n. 12, p. 1702-1708, 2000.

COLLI, B. O.; SILVA, M. N.; CARLOTTI Jr., C. G. Isquemia cerebral experimental. In: SILVA Jr., O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER Jr., A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Editora Robe, 1998, cap. 65, p. 643-62.

CONWAY, E. M.; ZWERTS, F.; EYMEN, V. V.; DEVRIESE, A.; NAGAI, N.; LUO, W.; COLLEN, D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain molecular mechanisms of hipoxia-induced upregulation. **American Society for Investigative Pathology**, v. 163, p. 935-946, 2003.

CORBETT, D.; HAMILTON, M.; COLBOURNE, F. Persistent neuroprotection with prolonged postischemic hypothermia in adult rats subjected to transient middle cerebral artery occlusion. **Experimental Neurology**, v. 163, p. 200-206, 2000.

CROMPTON, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. **The Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 11-21, 2000.

CUNNINGHAM, A. Blood. In: SEALE, C.; PATTISON, S. **Medical Knowledge: doubt and certainty**. Buckingham: Open University Press, 1994.

DAW, E. F.; MOFFITT, E. A.; MICHENFELDER, J. D.; et al. Profound hypothermia. **Canadian Anaesthetists Society Journal**, v. 11, p. 382-393, 1964.

DE LA TORRE, E.; MESCHAN, I. Intracranial and extracranial circulation in the dog: anatomic and angiographic studies. **American Journal of Anatomy**, v. 105, p. 343-347, 1959.

DIAS, L. A. A.; COLLI, B. O.; NETTO, J. C.; LACHAT, J. J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, n. 4, p. 1047-1054, 2000.

DIETRICH, W. D.; BUSTO, R.; HALLEY, M.; VALDES, I. The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 49, n. 5, p. 486-497, 1990.

DU, C.; HU, R.; CSERNANSKY, C. A.; HSU, C. Y.; CHOI, D. W. Very delayed infarction after mild cerebral ischemia: a role for apoptosis? **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 16, p. 195-201, 1996.

DUARTE, S. G.; CAMPOS, A. D.; COLLI, B. O. Functional evaluation of temporary focal cerebral ischemia: experimental model. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, p. 751-756, 2003.

DUARTE, S. G. **Isquemia cerebral focal de curta duração seguida de reperfusão em ratos. Estudos relacionados com a infiltração leucocitária, peroxidação lipídica e apoptose.** 2006. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.

DUVERGER, D.; MACKENZIE, E. T. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 8, p. 449-461, 1988.

ESTOL, C. J. Dr C. Miller Fisher and the History of Carotid Artery Disease. **Stroke**, v. 27, p. 559-566, 1996.

FLECKNELL, P. A. Anaesthesia of animals for biomedical research. **Brazilian Journal of Anaesthesia**, v. 71, p. 885-965, 1993.

FLORIAN, B.; VINTILESCU, R.; BALSEANU, A. T.; BUGA, A. M.; GRISK, O.; WALKER, L. C.; KESSLER, C.; POPA-WAGNER, A. Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 438, n. 2, p. 180-185, 2008.

FOLBERGROVÁ, J.; KIYOTA, Y.; PAHLMARK, K.; MEMEZAWA, H.; SMITH, M. L.; SIESJÖ, B. K. Does ischemia with reperfusion lead to oxidative damage to proteins in the brain? **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 145-152, 1993.

FROEHLER, M. T.; OVBIAGELE, B. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 8, n. 4, p. 593-603, 2010.

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

GINSBURG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-389, 2008.

GOTO, Y.; KASSEL, N. F.; HIRAMATSU, K.; SOLEAU, S. W.; LEE, K. S. Effects of intranscemic hypothermia on cerebral damage in a model of reversible focal ischemia. **Neurosurgery**, v. 32, n. 6, p. 980-984, 1993.

GRAHAM, S. H.; CHEN, J. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 13, p. 88-97, 1993.

GREENE, E. C. **Anatomy of the rat**. New York: Hafner Publishing Company, 1963.

GUNN, A. J.; BENNET, L.; GUNNING, M. I.; GLUCKMAN, P. D.; GUNN, T. R. Cerebral hypothermia is not neuroprotective when started after postischemic seizures in fetal sheep. **Pediatrics Research**, v. 46, p. 274-280, 1999.

HAYWOOD, Y.; SILBERGLEIT, R.; ROSENTHAL, R. E. Neuroprotection from cerebral ischemia: the role of ventilatory oxygen. In: BLANCK, T. J. J. **Neuroprotection**. New York: Williams & Wilkins, 1997, p. 63-87.

HEISS, W. D.; HAYAKAWA, T. Cortical neuronal function during ischemia. Effects of occlusion of one middle cerebral artery on single unit activity in cats. **Annals of Neurology**, v. 33, p. 813-820, 1976.

HICKENBOTTOM, S. L.; BARSAN, W. G. Acute ischemic stroke therapy. **Neurologic Clinics**, v. 18, p. 379-397, 2000.

HINDMAN, B. J.; TODD, M. M.; GELB, A. W.; LOFTUS, C. M.; et al. Mild hypothermia as a protective therapy during intracranial aneurysm surgery: a randomized prospective pilot trial. **Neurosurgery**, v. 44, p. 23-32, 1999.

HOSSMANN, K. A. The ischemic penumbra: pathophysiology and therapeutic implications. In: PINSKY, M. R. **Cerebral blood flow: mechanisms of ischemia, diagnosis, and therapy**. Pennsylvania: Springer, 2002, p.137-146.

HU, B.; WIELOCH, T. Persistent translocation of Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase II to synaptic junction in the vulnerable hippocampal CA I region following transient ischaemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 277-284, 1995.

HUH, P. W.; BELAYEV, L.; ZHAO, W.; KOCH, S.; BUSTO, R.; GINSBERG, M. D. Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intransischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia. **Journal of Neurosurgery**, v. 92, p. 91-99, 2000.

KARIBE, H.; CHEN, J.; ZAROW, G. J.; GRAHAM, S. H.; WEINTEIN, P. R. Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of Neurosurgery**, v. 80, p. 112-119, 1994.

KASS, I. S. **Brain metabolism and mechanics of cerebral ischemia**. Park Ridge: The American Society of Anesthesiologists, Inc. 2006.

KAWAI, N.; OKAUCHI, M.; MORISAKI, K.; NAGAO, S. Effects of delayed intransischemic hypothermia on a focal model of transient cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 31, p. 1982-1989, 2000.

KLÜVER, H.; BARRERA, E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 12, p. 400-403, 1953.

KOBAYASHI, M. S.; ASAI, S.; ISHIKAWA, K.; NISHIDA, Y.; NAGATA, T.; TAKAHASHI, Y. Global profiling of influence of intra-ischemic brain temperature on gene expression in rat brain. **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 1, p. 171-191, 2008.

KOIZUMI, J.; YOSHIDA, Y.; NAKAZAA, T.; ONEDA, G. Experimental studies on ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. **Japanese Journal of Stroke**, v. 8, p. 1-8, 1986.

KOLLMAR, R.; SCHWAB, S. Ischaemic stroke: acute management, intensive care, and future perspectives. **British Journal of Anaesthesia**, v. 99, n. 1, p. 95-101, 2007.

KRIEGER, D. W.; YENARI, M. A. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? **Stroke**, v. 35, p. 1482-1489, 2004.

KUBOYAMA, K.; SAFAR, P.; RADOVSKY, A.; et al. Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. **Critical Care Medicine**, v. 21, p. 1348-1358, 1993.

LASSEN, N. A.; FIESCHI, C.; LENZI, G. L. Ischemic penumbra and neuronal death: comments on the therapeutic window in acute stroke with particular reference to thrombolytic therapy. **Cerebrovascular Diseases**, v. 1, n. 1, p. 32-35, 1991.

LEKER, R. R.; SHOHAMI, E. Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. **Brain Research Reviews**, v. 39, p. 55-73, 2002.

LIN, T. N.; HE, Y. Y.; WU, G.; KHAN, M.; HSU, C. Y. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. **Stroke**, v. 24, n. 1, p. 117-121, 1993.

MAIER, C. M.; SUN, G. H.; KUNIS, D.; YENARI, M. A.; STEINBERG, G. K. Delayed induction and long-term effects of mild hypothermia in a focal transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. **Journal of Neurosurgery**, v. 94, p. 90-96, 2001.

MARKARIAN, G. Z.; LEE, J. H.; STEIN, D. J.; HONG, S. Mild hypothermia: therapeutic window after experimental cerebral ischemia. **Neurosurgery**, v. 38, n. 3, p. 542-551, 1996.

MEHTA, S. L.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 1, p. 34-66, 2007.

MENZIES, S. A.; HOFF, J. T.; BETZ, A. L. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of reproducible model. **Neurosurgery**, v. 31, p. 100-107, 1992.

MICHENFELDER, J. D.; TERRY Jr., H. R.; DAW, E. F.; et al. Induced hypothermia: physiologic effects, indications and techniques. **Surgical Clinics of North America**, v. 45, p. 889-898, 1965.

MORTON, D. B. The animals (scientific procedures) act 1986 and research into anaesthesia. **Brazilian Journal of Anaesthesia**, v. 65, p. 303-305, 1990.

NAKANO, H.; COLLI, B. O.; LOPES, L. S. Neuroprotective effect of mild hypothermia in the temporary brain ischemia in cats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 65, n. 3, p. 810-815, 2007.

NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE / NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NINDS/NIH). **United States of America statistics of health**. Disponível em <<http://www.ninds.nih.gov>>. Acesso em 23 Mar 2010.

NISHIGAYA, K.; YOSHIDA, Y.; SASUGA, M.; NUKUI, H.; OONEDA, G. Effect of recirculation on exacerbation of ischemic vascular lesions in rat brain. **Stroke**, v. 22, n. 5, p. 635-642, 1991.

NISHINO, H.; CZURKÓ, A.; FUKUDA, A.; HASHITANI, T.; HIDA, H.; KARADI, Z.; LÉNARD, L. Pathophysiological process after transient ischemia of the middle cerebral artery in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 35, n. 1, p. 51-56, 1994.

OGILVY, C. S.; MAYNARD, K. I.; CHEN, D.; ARANGO, P. M. Nitric oxide produced during ischemia improves functional recovery in the rabbit retina. **Neuroreport**, v. 81, p. 81-85, 1996.

OHMURA, A.; NAKAJIMA, W.; ISHIDA, A.; YASUOKA, N.; KAWAMURA, M.; MIURA, S.; TAKADA, G. Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis. **Brain & Development**, v. 27, p. 517-526, 2005.

OHTA, H.; TERAOKA, Y.; SHINTANI, Y.; KIYOTA, Y. Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. **Neuroscience Research**, v. 57, n. 3, p. 424-433, 2007.

O'ROURKE, B. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. **The Journal of Physiology**, v. 529, n. 1, p. 23-36, 2000.

PEMBERTON, P. L.; DINSMORE, J. The use of hypothermia as a method of neuroprotection during neurosurgical procedures and after traumatic brain injury: a survey of clinical practice in Great Britain and Ireland. **Anaesthesia**, v. 58, p. 370-373, 2003.

POOL, J. L. Aneurysms of the anterior communicating artery, bifrontal craniotomy, and routine use of temporary clips. **Journal of Neurosurgery**, v. 18, p. 98, 1961.

PRANDINI, M. N.; LACANNA, S. N.; VALENTE, P. R.; STÁVALE, J. N. Regional mild hypothermia in the protection of the ischemic brain. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 17, n. 4, p. 232-235, 2002.

PRANDINI, M. N.; NEVES FILHO, A.; LAPA, A. J.; STÁVALE, J. N. Mild hypothermia reduces polymorphonuclear leukocytes infiltration in induced brain inflammation. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 3B, p. 779-784, 2005.

PRANDINI, M. N.; RIBEIRO, C. H.; LACANNA, S. N.; CAVALCANTE, H. R. Protocol to the induction of loco-regional mild hypothermia for temporary clipping in the surgery of the middle cerebral artery aneurysm. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 20, n. 1, p. 33-38, 2009.

PULSINELLI, W. A. Pathophysiology of the ischemic stroke. **The Lancet**, v. 339, p. 533-536, 1992.

QIN, H. P.; MEI, G. H.; WEI, L.; JIANG, J. Y. Effect of profound hypothermia on genomics of hippocampus following complete cerebral ischemia in rats. **Neurological Research**, v. 30, n. 5, p. 536-541, 2008.

RIDENOUR, T. R.; WARNER, D. S.; TODD, M. M.; McALLISTER, A. C. Mild hypothermia reduces infarct size resulting from temporary but not permanent focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 23, n. 5, p. 733-738, 1992.

ROSOMOFF, H. L. Hypothermia and cerebral vascular lesions. I: experimental interruption of middle cerebral artery during hypothermia. **Journal of Neurosurgery**, v. 13, n. 4, p. 244-255, 1956.

ROTHMAN, S. M.; OLNEY, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. **Annals of Neurology**, v. 19, p. 105-111, 1986.

SAKAKI, T.; TSUJIMOTO, S.; SASAOKA, Y.; TSUNODA, S.; SHINTOMI, K. The effect of a new calcium antagonist, TA3090 (clentiazem), on experimental transient focal cerebral ischemia in cats. **Stroke**, v. 24, p. 872-879, 1993.

SANTANA, R. T. **Avaliação clínica e morfológica do efeito do tiopental e da clorpromazina na isquemia cerebral focal temporária em ratos**. 2008. Tese

(Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

SELIM, M. Stroke: historical perspectives and future directions. In: GREER, D.M. **Acute ischemic stroke: an evidence-based approach**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007, cap.1, p. 1-2.

SELMAN, W. R.; LUST, W. D.; PUNDIK, S. Metabolic failure leads to the deterioration of the border zone in reversible focal ischemia. **Abstracts of Society for Neuroscience**, v. 18, n. 1579-1585, 1992.

SHALAK, L.; PERLMAN, J. M. Hipoxic-ischemic brain injury in the term infant - current concepts. **Early Human Development**, v. 80, p. 125-141, 2004.

SILVA, M. N. **Contribuição ao estudo morfológico do círculo arterioso do encéfalo (Polígono de Willis) de ratos**. 1998. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.

SIMÕES, M. L. P. B. Ética e legislação da pesquisa clínica e experimental. In: SILVA Jr., O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER Jr., A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Editora Robe, 1998, cap. 03, p. 149-158.

SPETZLER, R. F.; HADLEY, M. K. Protection against cerebral ischemia: the role of barbiturates. **Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews**, v. 1, n. 3, p. 212-229, 1989.

SWANSON, R. A.; MORTON, M. T.; TSAO-WU, G.; SAVALOS, R. A.; DAVIDSON, C.; SHARP, F. R. A Semiautomated method for measuring brain infarct volume. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 10, p. 290-293, 1990.

SWEENEY, M. I.; YAGER, J. Y.; WIAZ, W.; JUURLINK, B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 1525-1535, 1995.

TAMURA, A.; GRAHAM, D. I.; McCULLOCH, J.; TEASDALE, G. M. Focal cerebral ischemia in the rat. I: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 1, p. 53-60, 1981.

TIRAPELLI, D. P. C. **Expressão gênica da apoptose celular na isquemia cerebral focal em ratos e a ação neuroprotetora da hipotermia e do**

cetoprofeno. 2007. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

TODD, M. M.; HINDMAN, B. J.; CLARKE, W. R.; et al. Mild intraoperative hypothermia during surgery for intracranial aneurysm. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 135-145, 2005.

TOYODA, T.; SUZUKI, S.; KASSEL, N. F.; LEE, K. S. Intraischemic hypothermia attenuates neutrophil infiltration in the rat neocortex after focal ischemia-reperfusion injury. **Neurosurgery**, v. 39, n. 6, p. 1200-1205, 1996.

TYMIANSKI, M.; TATOR, C. H. Normal and abnormal calcium homeostasis in neuron: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. **Neurosurgery**, v. 38, p. 1176-1194, 1996.

VAN DER WORP, H. B.; SENA, E. S.; DONNAN, G. A.; HOWELLS, D. W.; MACLEOD, M. R. Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. **Brain**, v. 130, p. 3063-3074, 2007.

WANG, F.; LUO, Y.; LING, F.; WU, H.; CHEN, J.; YAN, F.; HE, Z.; GOEL, G.; JI, X.; DING, Y. Comparison of neuroprotective effects in ischemic rats with different hypothermia procedures. **Neurological Research**, v. 32, n. 4, p. 378-383, 2010.

WARNER, D. S.; ZHOU, J.; RAMANI, R.; TODD, M. M. Reversible focal ischemia in the rat. Effects of halotane, isoflurane, and methohexital anesthesia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 11, p. 794-802, 1991.

WARNER, D. S.; McFARLANE, C.; TODD, M. M.; LUDWIG, P.; McALLISTER, A. L. Sevoflurane and halothane reduce focal ischemic brain damage in the rat. Possible influence on thermoregulation. **Anesthesiology**, v. 79, p. 985-992, 1993.

WARNER, D. S.; TAKAOKA, S.; WU, B.; LUDWIG, P. S.; PEARLSTEIN, R. D.; BRINKHOUS, A. D.; DEXTER, F. Electroencephalographic burst suppression is not required to elicit maximal neuroprotection from pentobarbital in rat model of focal cerebral ischemia. **Anesthesiology**, v. 84, n. 6, p. 1475-1484, 1996.

WESTERMAIER, T.; ZAUSINGER, S.; BAETHMANN, A.; STEIGER, H.; SCHMID-ELSAESSER, S. No additional neuroprotection provided by barbiturate-induced suppression under mild hypothermic conditions in rats subjected to reversible focal ischemia. **Journal of Neurosurgery**, v. 93, p. 835-844, 2000.

YANAMOTO, H.; NAGATA, I.; NAKAHARA, I.; TOHNAI, N.; ZHANG, Z.; KIKUCHI, H. Combination of intransischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 30, p. 2720-2726, 1999.

XIONG, M.; YANG, Y.; CHEN, G. Q.; ZHOU, W. H. Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 351-357, 2009.

ZEALONGA, E.; WEINSTEIN, P. R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, v. 20, p. 84-91, 1989.

ZHANG, H.; ZHOU, M.; ZHANG, J.; MEI, Y.; SUN, S.; TONG, E. Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury. **Neurological Research**, v. 30, n. 4, p. 332-336, 2008.

ZHANG, R.; CHOPP, M.; CHEN, H.; GARCIA, J. H.; ZHANG, Z. G. Postischemic (1 hour) hypothermia significantly reduces ischemic cell damage in rats subjected to 2 hour of middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 24, n. 8, p. 1235-1240, 1993.

ZHAO, H.; WANG, J. Q.; SHIMOHATA, T.; SUN, G.; YENARI, M. A.; SAPOLSKY, R. M.; STEINBERG, G. K. Conditions of protection by hypothermia and effects on apoptotic pathways in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. **Journal of Neurosurgery**, v. 107, p. 636-641, 2007.

ZHU, C.; XU, F.; WANG, X.; SHIBATA, M.; UCHIYAMA, Y.; BLOMGREEN, K.; HAGBERG, H. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, p. 1016-1027, 2006.

ZIVIN, J. A.; CHOI, D. W. Stroke therapy. **Scientific American**, v. 265, p. 36-43, 1991.