

RENATA FERRANTI LEONI

Avaliação da perfusão sangüínea cerebral em modelos animais de hipertensão utilizando *Arterial Spin Labeling*

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.  
*Versão corrigida.*

Orientador: Dr. Afonso Henriques da Costa e Silva

Ribeirão Preto - SP  
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.

Leoni, Renata Ferranti

Avaliação da perfusão sangüínea cerebral em modelos animais de hipertensão utilizando *Arterial Spin Labeling*. Ribeirão Preto, 2011.

144 p. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Silva, Afonso C.

1. *Arterial Spin Labeling*. 2. Fluxo Sangüíneo Cerebral. 3. Hipertensão. 4. Ressonância Magnética.

Ao Dudu,  
pelos sorrisos e pelas atitudes  
surpreendentes que me fazem feliz  
há mais de treze anos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Afonso Silva, meu principal mentor durante o doutorado, obrigada por me dar a grande oportunidade de trabalhar no seu laboratório no NIH, onde aprendi muito e ganhei muita experiência. Obrigada pelas idéias propostas, pelas discussões, pela ajuda com os artigos científicos e pela confiança. Foi uma honra fazer parte da CMU!

Ao Prof. Dr. Dráulio Barros de Araújo, com quem tenho o prazer de trabalhar desde a iniciação científica, muito obrigada pela oportunidade que você me deu anos atrás e por toda a orientação desde então. Obrigada também pela confiança ao me incentivar a fazer doutorado direto e depois a me aventurar pelo NIH; isso foi muito importante para eu acreditar na minha capacidade.

Aos meus pais, Beto e Marcia, por todo amor demonstrado de diversas maneiras, incentivando, investindo e torcendo. Vocês são os maiores responsáveis pelo que sou hoje. Muito obrigada! Ao Du, meu irmão, a pessoa mais justa que eu conheço, pela admiração e carinho. Aos meus avós Badu (*in memorian*) e Maria, José e Rosa, por me deixarem ser sempre a neta preferida.

A Cândida, Lucas e Marina, pessoas maravilhosas, que desde a primeira vez que nos encontramos, fizeram tudo para que eu me sentisse em família nos Estados Unidos.

À Lisa Zhang, técnica do laboratório no NIH, não só pela ajuda na preparação dos animais, mas também pela preocupação e carinho. 感谢!

Ao Ara Kocharyan, Byeong-Teck Kang, Julie Mackel, Junjie Liu, Nathalie Bearden e Yoshiyuki Hirano, com quem tive a sorte de trabalhar no NIH, pela

contribuição na realização desse trabalho. Շնորհակալություն! 감사! Thank you!

感谢! Obrigada! 感謝!

A Ana Paz, Judy Ireland, Kathy Ireland-Pardini e Nadia Bouraoud por toda ajuda que recebi durante o período em que fiquei no NIH.

Ao Fernando Paiva, por todas as valiosas dicas e conselhos dados mesmo antes de nos conhecermos pessoalmente.

A Denise Silveira e Nilza Leone Marino pela paciência em responder todas as minhas dúvidas em relação às regras do programa FAMB.

Às minhas grandes amigas, Juliana, Kelley e Thati, pelos vários momentos de desabafo, e por outros tantos de muitas risadas.

Ao pessoal do laboratório em Ribeirão Preto, André, Bruno, Fabiana, Khallil, Marcio, Nivia e Tiago, foi sempre fui divertido fazer pesquisa com vocês.

À FAPESP, Departamento de Física – FFCLRP/USP e *Graduate Partnership Program* pela ajuda na realização deste trabalho.

*“There is no telling how many miles you  
will have to run while chasing a dream.”*

*Autor desconhecido*

## RESUMO

A hipertensão arterial é uma doença que aflinge mais de um quarto da população adulta mundial e mais da metade da população idosa. Ela é o principal fator de risco para doenças cerebrovasculares e o segundo fator de risco, após idade, para os acidentes vasculares cerebrais (AVC) hemorrágico e isquêmico. É também a principal causa de declínio cognitivo e demência, incluindo a doença de Alzheimer. A hipertensão causa remodelamento vascular e modifica os mecanismos de regulação do fluxo sanguíneo cerebral, incluindo a hiperemia funcional, a autoregulação cerebrovascular e a regulação endotelial. Portanto, pesquisas contínuas sobre os efeitos da hipertensão na função cerebrovascular são cruciais para o desenvolvimento de terapias preventivas que objetivam minimizar os riscos de desenvolvimento de doenças cerebrovasculares. No presente estudo, a perfusão cerebral de um importante modelo experimental de hipertensão, o rato SHR (do inglês *spontaneously hypertensive rat*), foi avaliada utilizando as técnicas de *arterial spin labeling* (ASL), que permitem a quantificação não-invasiva da perfusão. Utilizando o método de ASL contínua, o fluxo sanguíneo cerebral foi quantificado para todo o cérebro do rato sob condições de normocapnia e hipercapnia. Resistência cerebrovascular aumentada e reatividade vascular ao CO<sub>2</sub> reduzida foram observadas em SHR adultos, confirmando que a hipertensão leva à redução progressiva da capacidade de dilatação da vasculatura cerebral. A técnica de ASL dinâmica permitiu medir o fluxo sanguíneo cerebral funcional evocado por estimulação somatosensorial. Além de apresentarem resposta hemodinâmica positiva à estimulação, os ratos hipertensos também apresentaram resposta hemodinâmica negativa em áreas circundantes àquelas ativadas positivamente. Foi mostrado que esse resultado está relacionado com um efeito puramente hemodinâmico causado pela pressão arterial elevada e pela reserva vascular alterada do SHR. Experimentos farmacológicos mostraram diferenças na modulação do acoplamento neurovascular de SHR quando comparado com rato normotenso. Além disso, SHR submetidos à oclusão temporária da artéria cerebral média apresentaram maior volume da lesão isquêmica e do edema cerebral, redução severa da massa corporal e déficits neurológicos piores do que ratos normotensos. Esses resultados estão relacionados à autoregulação cerebral alterada e ao desenvolvimento prejudicado da circulação colateral em SHR. Em suma, os achados do presente estudo mostraram que a hipertensão resulta em reserva vascular prejudicada, acoplamento neurovascular alterado e piores conseqüências a um AVC isquêmico.

Palavras-chave: *Arterial spin labeling*, fluxo sanguíneo cerebral, hipertensão, ressonância magnética

## ABSTRACT

Hypertension is a disease that afflicts more than a quarter of the general population and more than half of the elderly population. It is the most important modifiable risk factor for cerebrovascular diseases and the second most important risk factor, after age, for hemorrhagic and ischemic stroke. It is a leading cause of cognitive decline and dementia, including the Alzheimer's disease. Hypertension causes vascular remodeling and modifies the intricate mechanisms of cerebral blood flow (CBF) regulation, including functional hyperemia, cerebrovascular autoregulation, and endothelial regulation. For all of the above, continued research on the effects of hypertension on cerebrovascular function is a crucial step in the design of preventive therapies aimed at minimizing the risk of development of cerebrovascular disease. In the present work, cerebral perfusion of an important experimental model of hypertension, the spontaneously hypertensive rat (SHR), was evaluated using the arterial spin labeling (ASL) techniques, which allow non-invasive quantification of perfusion. Using continuous ASL, CBF was quantified for the whole rat brain under normocapnic and hypercapnic conditions. Increased cerebrovascular resistance and decreased vascular reactivity to CO<sub>2</sub> were observed in adult SHR, confirming that hypertension leads to reduced compliance of the cerebral vasculature. The dynamic ASL technique allowed the measurement of functional CBF evoked by somatosensorial stimulation. Hypertensive rats not only showed positive hemodynamic response to stimulation, but also negative hemodynamic response in areas surrounding the positively activated areas. It was shown to be related to a purely hemodynamic effect caused by high blood pressure and impaired vascular reserve of the SHR. Pharmacological experiments showed differences on modulation of the neurovascular coupling in SHR when compared to normotensive rats. Moreover, hypertensive rats subjected to temporary middle cerebral artery occlusion had larger ischemic lesion volume and brain edema, severe decrease in body weight and worse neurological deficits, when compared to normotensive rats. These results are related to the altered cerebral autoregulation and impaired collateral circulation development in SHR. Taken together, the findings of the present work show that hypertension results in impaired vascular reserve, which is related to altered neurovascular coupling and worse stroke outcome.

Keywords: Arterial spin labeling, cerebral blood flow, hypertension, magnetic resonance.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 2.1: Unidade neurovascular formada pelos vasos sangüíneos cerebrais, neurônios e glia (adaptada de Iadecola, 2004) .....  | 27 |
| Figura 2.2: Mecanismo de propagação da dilatação dos vasos na região ativa para artérias superficiais. A atividade neural produz fatores vasoativos em neurônios e glia, que agem nas arteríolas e capilares da área ativa. À medida que o fluxo aumenta, a tensão nas células endoteliais produz mais vasodilatação através da liberação de vasodilatadores dependentes do endotélio (adaptada de Iadecola, 2004) ..... | 29 |
| Figura 2.3: À esquerda, secção da artéria cerebral média de um rato normotenso (WKY). À direita, secção da artéria cerebral média de um rato hipertenso (SHR), em que observa-se um remodelamento vascular hipertrófico. A barra horizontal representa 50 µm (adaptada de Yamakawa <i>et al.</i> , 2003) .....   | 31 |
| Figura 2.4: Em condições normais, a autoregulação cerebral mantém o CBF relativamente constante a despeito de variações da pressão arterial (curva azul). Já em sujeitos hipertensos, a curva é deslocada para a direita (curva verde) e níveis mais altos de pressão sangüínea passam a ser necessários para manter valores normais de CBF (adaptada de Iadecola; Davisson, 2008) .....                                 | 32 |
| Figura 2.5: Pressão sangüínea sistólica média em SHR (n = 20) e WKY (n = 20) (adaptada de Unoki <i>et al.</i> , 2003) .....  | 36 |
| Figura 3.1: (a) Imagens EPI da mesma fatia do cérebro humano durante a primeira passagem do bolus do agente de contraste. (b) Curvas temporais da intensidade do sinal para três diferentes regiões de interesse no hemisfério direito: (1) gânglio basal, (2) substância branca na região occipital e (3) ramo da artéria cerebral média (adaptada de Calamante <i>et al.</i> , 1999) .....                             | 43 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 3.2: Representação esquemática de um experimento de ASL contínua (CASL), em que o sangue é marcado durante um tempo $\Delta t$ (plano indicado em verde), e as fatias (em branco) são adquiridas no tempo $T_{aq}$ (adaptada de Petersen <i>et al.</i> , 2006) .....   | 47 |
| Figura 3.3: Representação esquemática de um experimento de ASL pulsada (PASL - EPISTAR), em que o sangue de um volume relativamente grande é marcado com um pulso de RF curto (plano indicado em verde), e as fatias (em branco) são adquiridas no tempo $T_{aq} = TI$ . Já as imagens controles são adquiridas após dupla inversão do sangue contido na mesma região marcada anteriormente (adaptada de Petersen <i>et al.</i> , 2006) .....   | 50 |
| Figura 4.1: (a) Esquema usado para marcar seletivamente o sangue fluindo nas principais artérias que suprem o cérebro. Uma bobina de marcação dedicada (largura $EP_z$ ) é posicionada sob o pescoço do animal a uma distância $\Delta z_0$ do isocentro do magneto. O plano de marcação é definido de maneira a marcar apenas as artérias do lado direito ( $\theta > 0^\circ$ ) ou esquerdo ( $\theta < 0^\circ$ ). (b) Imagem do pescoço do rato (corte transversal, no sentido E-D, em relação a (a)), mostrando as artérias carótidas usadas para planejar o esquema de marcação seletiva. ( $\delta$ : distância entre as artérias carótidas comuns, mostradas em vermelho; A: anterior; P: posterior; E: esquerda; D: direita) ..... | 55 |
| Figura 4.2: Imagens EPI de um rato hipertenso sob isoflurano. Sobrepostas às cinco fatias adjacentes de 2 mm de espessura estão mostradas três regiões de interesse: córtex (azul), caudado-putâmen (vermelho) e tálamo (verde) .....   | 60 |
| Figura 4.3: (a) Imagens EPI de um rato SHR típico sem marcação. Imagens de perfusão adquiridas usando (b) $\theta = 0^\circ$ , (c) $\theta = +60^\circ$ e (d) $\theta = -60^\circ$ . As barras em tons de cinza expressam os valores da intensidade do sinal em unidades arbitrárias (a) e de CBF em mL/100g/min (b-d) .....  | 61 |
| Figura 4.4: Comparação dos territórios de perfusão com os angiogramas de ratos (a-b) WKY e (c-e) SHR. A primeira coluna mostra os angiogramas.  |    |

Imagens mais detalhadas da parte anterior do círculo de Willis (coluna do meio) mostram variações (flechas) que podem explicar as assimetrias observadas nos mapas dos territórios vasculares (coluna da direita, flechas). Verde: território de perfusão direito; vermelho: território de perfusão esquerdo; DE: dominância esquerda; DD: dominância direita; DA: dominância alternada; ACA: artéria cerebral anterior; AB: artéria basilar; ACC: artéria carótida comum; ACE: artéria carótida externa; ACI: artéria carótida interna; AP: artéria pterigopalatina ..... 64

Figura 4.5: Relação entre o fluxo sanguíneo cerebral (CBF) global e a pressão parcial arterial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) anestesiados com (a) α-chloralose e (b) isoflurano. Enquanto o CBF aumenta linearmente com a PaCO<sub>2</sub> em ratos sob α-chloralose (r > 0.8), é notável uma saturação do CBF para níveis de PaCO<sub>2</sub> maiores que 70 mmHg em ratos sob isoflurano (ajuste polinomial) ..... 67

Figura 4.6: Valores médios de CBF (a-b) e resistência cerebrovascular (c-d) para ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR), sob α-chloralose e isoflurano. (\* vs. WKY jovem; † vs. WKY adulto; ‡ vs. α-chloralose; P < 0,05) ..... 69

Figura 4.7: Valores médios da reatividade cerebrovascular ao CO<sub>2</sub> para ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR), sob (a) α-chloralose e (b) isoflurano. (\* vs. WKY jovem; † vs. WKY adulto; ‡ vs. SHR jovem; § vs. córtex do mesmo grupo de ratos; P < 0,05) ..... 70

Figura 5.1: Representação esquemática dos experimentos funcionais utilizando a técnica de ASL dinâmica (DASL) para medir simultaneamente CBF basal, e respostas BOLD e de CBF evocadas pela estimulação somatosensorial. (a) Método 1: estimulação em DASL. Dois intervalos da curva temporal (cinza) e respectiva curva de ajuste (preta) estão mostradas. (b) Método 2: DASL na estimulação. Um intervalos da curva temporal (cinza) e respectiva curva de ajuste (preta) está mostrada ..... 78

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 5.2: | (a) Curva de tempo original média para toda a fatia de uma rato representativo anestesiado sob $\alpha$ -chloralose. (b) Curva de tempo filtrada baseada apenas nas frequências permitidas pelo modelo descrito pela equação 5.5. Mapas correspondentes de (c) CBF, (d) $T_{1app}$ e (e) tempo de trânsito .....  | 79 |
| Figura 5.3: | (a) Mapa dos territórios de perfusão esquerdo (vermelho) e direito (verde), e curvas de tempo para a região do S1FL (b) esquerdo e (c) direito de um rato típico anestesiado sob $\alpha$ -chloralose .....   | 80 |
| Figura 5.4: | Experimento com a combinação de DASL e estimulação somatosensorial de um rato WKY representativo. (a) Mapa da resposta BOLD. Ativação robusta no córtex somatosensorial primário em ambos os hemisférios esquerdo e direito após estimulação bilateral das patas dianteiras. (b) Curva de tempo original mostrando oito intervalos marcação-reposo. (c) Respostas de CBF medida (cinza) e deconvoluída (preta). Os períodos de estimulação estão indicados pelas barras horizontais cinzas (b-c) .....  | 82 |
| Figura 5.5: | (a) Resposta BOLD sobreposta à imagem anatômica. (b) Resposta do CBF funcional sobreposta ao mapa de CBF basal. (c) Mapa da variação do tempo de trânsito devido à estimulação somatosensorial ...  | 83 |
| Figura 6.1: | Mapas representativos da resposta funcional BOLD à estimulação bilateral das patas dianteiras de um (a) SHR e um (b) WKY. Respostas robustas positivas foram observadas em S1FL de ambos os hemisférios nos dois grupos de ratos. Entretanto, repostas negativas foram observadas principalmente em SHR. Curvas da resposta BOLD estão mostradas para o (c) SHR e o (d) WKY. As curvas das respostas positivas e negativas correspondem à média das respostas obtidas em regiões de interesse, escolhidas bilateralmente, que incluem S1FL e S1BF, respectivamente. As barras horizontais cinzas indicam o período de estimulação ..... | 86 |
| Figura 6.2: | Mapas da resposta BOLD em um SHR representativo adquiridos (a) antes da injeção de esmolol (pressão arterial alta), (b) durante a   |    |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
|             | injeção de esmolol (pressão arterial baixa) e (c) 30 min após descontinuar a administração da droga (pressão arterial alta) .....  | 89 |
| Figura 6.3: | Respostas médias normalizadas de (a) CBF e (b) BOLD evocadas por estimulação bilateral das patas dianteiras para o grupo de SHR tratados com esmolol para redução da pressão sangüínea arterial, durante três intervalos farmacológicos: pré-droga, injeção de esmolol, e 30 min após descontinuar a administração da droga. As barras horizontais cinzas indicam o período de estimulação .....   | 90 |
| Figura 7.1: | Via das ciclooxygenases (COX-1 e COX-2). A partir do ácido araquidônico, produção das prostaglandinas PGG <sub>2</sub> e PGH <sub>2</sub> , e subsequente produção dos prostanóides (prostaciclina – PGI <sub>2</sub> ; prostaglandinas – PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> e PGF <sub>2a</sub> ; e thromboxana – TXA <sub>2</sub> ) .....   | 93 |
| Figura 7.2: | Protocolo experimental com a inibição de (a) COX-1 e (b) COX-2 .....   | 96 |
| Figura 7.3: | Diagrama ilustrativo do cálculo da magnitude da resposta hemodinâmica. Os tempos de início (I) e término (T) da resposta hemodinâmica são definidos como os tempos na intersecção das retas extrapoladas, desenhadas na curva de resposta entre 10% e 90% do pico, com a linha de base. A magnitude (área cinza) foi calculada como a integral da curva (C) da resposta desde o tempo de início até o tempo de término .....   | 97 |
| Figura 7.4: | Pressão sangüínea arterial média de SHR e WKY tratados com (a) meloxicam e (b) SC-560 para quatro períodos: pré-droga, infusão do inibidor de COX, bolus de PGE <sub>2</sub> , e final do experimento. Ambos os inibidores de COX, SC-560 e meloxicam, não afetaram a pressão sangüínea; entretanto, a injeção do bolus de PGE <sub>2</sub> causou uma queda transiente na pressão de todos os ratos (* vs. WKY; † vs. outros períodos farmacológicos; P < 0,05) ..... | 99 |
| Figura 7.5: | Níveis dos prostanóides produzidos pelas isoformas da COX no cérebro de SHR e WKY após inibição com (a) meloxicam e (b) SC-560. Os valores foram normalizados para o grupo controle, considerando o  |    |

|  |     |
|--|-----|
| valor médio dos níveis de prostanóides produzidos em ratos não-tratados como sendo 100% (* vs. WKY; † vs. grupo controle; P < 0,05). Não foi medido o nível de PGD2 em ratos que receberam SC-560 .....  | 101 |
| Figura 7.6: Magnitude média das respostas hemodinâmicas (CBF e BOLD) normalizadas para o período pré-droga, ou seja, considerando os valores basais médios iguais a 100%, em SHR e WKY tratados com (a-b) meloxicam e (c-d) SC-560 (* vs. WKY; † vs. pré-droga; P < 0,05) .....  | 103 |
| Figura 8.1: Imagens ponderadas em T <sub>2</sub> , adquiridas um dia após a oclusão da artéria cerebral média, em ratos representativos dos grupos de (a) WKY, (b) SHR com pressão arterial baixa (SHRn), e (c) SHR em que a pressão arterial foi mantida elevada (SHRh) .....   | 110 |
| Figura 8.2: Imagens ponderadas em T <sub>2</sub> mostram a evolução temporal das lesões isquêmicas obtidas em ratos representativos dos grupos de (a) WKY, (b) SHR com pressão arterial baixa (SHRn), e (c) SHR em que a pressão arterial foi mantida elevada (SHRh) .....   | 111 |
| Figura 8.3: Evolução temporal do (a) volume da lesão, (b) edema cerebral e (c) déficit neurológico obtidos após isquemia temporária em WKY e SHR com (SHRh) ou sem (SHRn) a manutenção da hipertensão durante a oclusão da artéria cerebral média (OACM). (*vs. WKY; † vs. SHRn; ‡ vs. OACM; P < 0,05) .....   | 112 |
| Figura 8.4: Evolução temporal do CBF medido (a) dentro e (b) fora da lesão com déficit de perfusão no hemisfério ipsilateral. Valores de CBF nas regiões correspondentes, (c) dentro e (d) fora da lesão, no hemisfério contralateral. (e) Mapa de CBF representativo mostrando as quatro regiões de interesse em que CBF foi medido. (* WKY vs. SHRn; † WKY vs. SHRh; § SHRn vs. SHRh; ¶ vs. basal WKY; † vs. basal SHRn, e ‡ vs. basal SHRh; P < 0,05) ..... | 114 |
| Figura 8.5: Territórios de perfusão esquerdo (vermelho) e direito (verde) de um rato SHR representativo (a) antes e (b) durante a oclusão da ACM, e (c) depois da reperusão .....  | 116 |

## LISTA DE TABELAS

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Tabela 4.1: | Fluxo sangüíneo cerebral, em mL/100g/min, nos territórios esquerdo e direito, para $\theta = 0^\circ$ , $-60^\circ$ and $+60^\circ$ , em ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e hipertensos (SHR) do grupo 1 ..... | 62  |
| Tabela 4.2: | Parâmetros fisiológicos em condições basais ( $\text{PaCO}_2 \leq 45$ mmHg) e sob hipercapnia ( $\text{PaCO}_2 > 60$ mmHg), para os quatro grupos de ratos, sob as duas diferentes anestésias .....                | 66  |
| Tabela 6.1: | Parâmetros fisiológicos de ratos WKY (N = 38) e SHR (N = 48), anestesiados sob $\alpha$ -chloralose, durante o experimento de DASL combinado com estimulação somatosensorial .....                                 | 85  |
| Tabela 6.2: | Respostas hemodinâmicas, CBF e BOLD, evocadas por estimulação somatosensorial em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) ...   | 87  |
| Tabela 6.3: | Parâmetros fisiológicos de ratos SHR (N = 10), anestesiados sob $\alpha$ -chloralose, antes e após a administração de esmolol .....  | 88  |
| Tabela 6.4: | Parâmetros fisiológicos de ratos WKY (N = 10), anestesiados sob $\alpha$ -chloralose, antes e após a administração de norepinefrina .....  | 91  |
| Tabela 8.1: | Parâmetros fisiológicos medidos antes, durante e após a oclusão da artéria cerebral média (OACM) de ratos WKY e SHR .....  | 109 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| AA              | Ácido Araquidônico                       |
| AB              | Artéria Basilar                          |
| ACA             | Artéria Cerebral Anterior                |
| ACC             | Artéria Carótida Comum                   |
| ACE             | Artéria Carótida Externa                 |
| ACI             | Artéria Carótida Interna                 |
| ACM             | Artéria Cerebral Média                   |
| ADC             | <i>Apparent Diffusion Coefficient</i>    |
| AIF             | <i>Arterial Input Function</i>           |
| ANOVA           | Análise de Variância                     |
| AP              | Artéria Pterigopalatina                  |
| ASL             | <i>Arterial Spin Labeling</i>            |
| AVC             | Acidente Vascular Cerebral               |
| BOLD            | <i>Blood Oxygenation Level Dependent</i> |
| CASL            | <i>Continuous ASL</i>                    |
| CBF             | <i>Cerebral Blood Flow</i>               |
| CBV             | <i>Cerebral Blood Volume</i>             |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                       |
| COX             | Ciclooxigenase                           |
| DA              | Dominância Alternada                     |
| DASL            | <i>Dynamic Arterial Spin Labeling</i>    |
| DD              | Dominância Direita                       |
| DE              | Dominância Esquerda                      |
| DSC             | <i>Dynamic Susceptibility Contrast</i>   |
| DWI             | <i>Diffusion Weighted Imaging</i>        |



|                   |   |
|-------------------|---|
| EDCF              | <i>Endothelium-derived Contracting Factor</i>                                   |
| EDRF              | <i>Endothelium-derived Relaxing Factor</i>                                      |
| EIA               | <i>Enzyme Immuno Assay</i>  |
| EPI               | <i>Echo-planar Imaging</i>  |
| EPISTAR           | <i>Echo Planar Imaging and Signal Targeting with Alternating Radiofrequency</i> |
| EtCO <sub>2</sub> | <i>End tidal CO<sub>2</sub></i>   |
| FAIR              | <i>Flow-sensitive Alternating Inversion Recovery</i>                            |
| FOV               | <i>Field-of-View</i>  |
| GRE               | <i>Gradient-recalled Echo</i>   |
| IRM               | Imagem por Ressonância Magnética  |
| IRMf              | Imagem por Ressonância Magnética funcional                                      |
| LDF               | <i>Laser-Doppler Flowmetry</i>  |
| MIP               | <i>Maximum Intensity Projection</i>   |
| MTT               | <i>Mean Transit Time</i>  |
| NE                | Norepinefrina   |
| OACM              | Oclusão da Artéria Cerebral Média   |
| PaCO <sub>2</sub> | Pressão Parcial Arterial de CO <sub>2</sub>                                     |
| PaO <sub>2</sub>  | Pressão Parcial Arterial de O <sub>2</sub>                                      |
| PASL              | <i>Pulsed ASL</i>   |
| pCASL             | <i>Pseudocontinuous ASL</i>   |
| PG                | Prostaglandina  |
| PGHS              | Prostaglandina H <sub>2</sub> Sintase   |
| RARE              | <i>Rapid Acquisition with Refocused Echoes</i>                                  |
| RCV               | Resistência Cerebrovascular   |
| RF                | Radiofreqüência   |
| S1BF              | <i>Primary Somatosensorial Barrel Field</i>                                     |
| S1FL              | <i>Primary Somatosensorial Forelimb</i>   |

|                  |   |
|------------------|---|
| SHR              | <i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>   |
| SHRh             | SHR hipertenso                          |
| SHRn             | SHR normotenso                          |
| SpO <sub>2</sub> | <i>Pulse Oximeter Oxygen Saturation</i> |
| SRY              | <i>Sex-determining Region Y</i>         |
| VOI              | Volume de Interesse                     |
| VS-ASL           | <i>Velocity-Selective ASL</i>           |
| WKY              | Wistar-Kyoto                            |
| βA               | β-amilóide                              |

# SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introdução</b>   | <b>21</b> |
| <b>2</b> | <b>Hipertensão Arterial</b>   | <b>25</b> |
|          | 2.1 Circulação sangüínea cerebral .....                                 | 26        |
|          | 2.2 Efeitos cerebrovasculares da hipertensão .....                      | 29        |
|          | 2.3 Doenças cerebrovasculares .....                                     | 32        |
|          | 2.3.1 Acidente vascular cerebral .....                                  | 33        |
|          | 2.3.2 Declínio cognitivo .....  | 34        |
|          | 2.3.3 Doença de Alzheimer .....   | 34        |
|          | 2.4 Modelo animal de hipertensão: SHR .....                             | 35        |
| <b>3</b> | <b>Medidas de Fluxo Sangüíneo Cerebral</b>                              | <b>38</b> |
|          | 3.1 Modelos Teóricos .....  | 38        |
|          | 3.1.1 Traçadores Difusíveis .....                                       | 38        |
|          | 3.1.2 Traçadores Intravasculares .....                                  | 40        |
|          | 3.2 Técnicas para Medir CBF .....                                       | 41        |
|          | 3.2.1 DSC .....   | 42        |
|          | 3.2.2 ASL .....   | 44        |
|          | 3.2.2.1 CASL .....  | 46        |
|          | 3.2.2.2 PASL .....  | 49        |
|          | 3.2.2.3 Outros Métodos .....  | 51        |
|          | 3.2.2.4 Considerações Gerais .....                                      | 51        |
| <b>4</b> | <b>Fluxo Sangüíneo Cerebral e Territórios Vasculares em Hipertensão</b> | <b>53</b> |
|          | 4.1 Territórios Vasculares .....  | 54        |
|          | 4.2 Teste de Hipercapnia .....  | 57        |
|          | 4.3 Materiais e Métodos .....   | 57        |
|          | 4.4 Resultados e Discussão .....  | 61        |
|          | 4.4.1 Territórios Vasculares .....                                      | 61        |
|          | 4.4.2 CBF, RCV e Reatividade ao CO <sub>2</sub> .....                   | 65        |
|          | 4.5 Considerações Gerais .....  | 70        |
| <b>5</b> | <b>CBF Funcional</b>  | <b>73</b> |
|          | 5.1 DASL .....  | 74        |
|          | 5.2 Materiais e Métodos .....   | 75        |
|          | 5.3 Resultados e Discussão .....  | 78        |
| <b>6</b> | <b>Aplicação do Método DASL para Medir a Resposta Hemodinâmica</b>      |           |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Funcional em SHR</b>                                    | <b>84</b>  |
| 6.1 Resposta Hemodinâmica Funcional Negativa em SHR .....  | 84         |
| 6.2 Estudo Farmacológico .....                             | 87         |
| <b>7 Inibição de COX e Regulação do CBF Funcional</b>      | <b>92</b>  |
| 7.1 Materiais e Métodos .....                              | 94         |
| 7.1.1 IRMf .....   | 94         |
| 7.1.2 Atividade Enzimática .....                           | 97         |
| 7.2 Resultados e Discussão .....                           | 98         |
| <b>8 Hipertensão Arterial e Acidente Vascular Cerebral</b> | <b>104</b> |
| 8.1 Materiais e Métodos .....                              | 105        |
| 8.2 Resultados e Discussão .....                           | 108        |
| 8.2.1 CBF e Circulação Colateral .....                     | 113        |
| 8.3 Considerações Gerais .....                             | 117        |
| <b>9 Conclusões e Perspectivas</b>                         | <b>118</b> |
| <b>Referências</b>   | <b>123</b> |

## 1. Introdução

A hipertensão arterial é uma doença que aflige mais de um quarto da população adulta mundial e mais da metade da população idosa (Pedelty; Gorelick, 2008), sendo considerada um dos maiores problemas de saúde do Ocidente, com proporções pandêmicas na América do Norte e Europa (Jennings; Zanstra, 2009). É um importante fator de risco para doenças cerebrovasculares, sendo o segundo fator de risco mais importante, após idade, para acidentes vasculares cerebrais isquêmicos e hemorrágicos (Veglio *et al.*, 2009). Além disso, é uma das principais causas para declínio cognitivo e demência, incluindo a doença de Alzheimer. A hipertensão modifica a estrutura dos vasos sanguíneos cerebrais, afetando os mecanismos de regulação do fluxo sanguíneo cerebral (CBF, do inglês *cerebral blood flow*). Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver técnicas não-invasivas que permitam o estudo dos efeitos da hipertensão na regulação funcional do CBF, bem como entender como a hipertensão altera a vulnerabilidade do cérebro às doenças cerebrovasculares.

A técnica de marcação dos spins arteriais (ASL, do inglês *arterial spin labeling*) pode ser utilizada para obter mapas quantitativos da perfusão cerebral. A ASL é uma técnica de imagem por ressonância magnética (IRM), não invasiva, que utiliza a água presente no sangue arterial como traçador endógeno, oferecendo um método de medição do CBF com boas resoluções espacial e temporal (Detre *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992). Além disso, a ASL possibilita o mapeamento dos territórios de perfusão das principais artérias cerebrais (Paiva *et al.*, 2007), sendo útil na avaliação do fluxo sanguíneo colateral em sujeitos com doenças cerebrovasculares.

Seguindo as recomendações do *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR) (1999), nos últimos anos tem havido um crescente número de estudos com modelos animais associados às patologias observadas em humanos.

No estudo de doenças cerebrovasculares, o rato que desenvolve hipertensão espontaneamente (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rat*) (Amenta *et al.*, 2003) tem tido um papel importante. A presença da hipertensão arterial crônica nesses ratos resulta em remodelamento vascular e outras alterações similares a de humanos hipertensos.

Portanto, o SHR foi o modelo animal escolhido para o desenvolvimento do presente estudo com o objetivo de investigar, através da técnica de ASL, os efeitos da hipertensão nos mecanismos de regulação do CBF, tais como reatividade vascular ao dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), resistência cerebrovascular, hiperemia funcional, e autoregulação cerebral após a indução de isquemia. Para efeitos de comparação, os experimentos também foram realizados em ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) com idades compatíveis. O estudo foi aprovado pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* do *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS), *National Institutes of Health* (NIH).

O estudo teve início em meados de 2006, quando surgiu o interesse em investigar a perfusão cerebral e a reatividade cerebrovascular em pacientes com doenças cerebrovasculares, em uma parceria do nosso laboratório no Departamento de Física, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Até aquele momento, os estudos de reatividade em voluntários saudáveis eram realizados em um magneto de 1.5T, utilizando o contraste BOLD (do inglês *blood oxygenation level dependent*). No entanto, nos estudos em pacientes com doenças cerebrovasculares, o objetivo era obter mapas quantitativos de perfusão através de uma técnica não-invasiva, como a ASL. Com o programa CInAPCe – FAPESP, estava previsto que o HC-FMRP receberia uma máquina de ressonância magnética de 3T, com capacidade de adquirir imagens de perfusão com a técnica de ASL. Porém, com o atraso da instalação da máquina, foi resolvido que seria interessante realizar o projeto em outro laboratório onde fosse possível obter conhecimento sobre a técnica de ASL e suas aplicações em doenças cerebrovasculares.

No final de 2008, uma parceria foi fechada entre o Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, da FFCLRP-USP, e a *Cerebral Microcirculation Unit*, do *Laboratory of Functional and Molecular Imaging*, NINDS-NIH, através do Dr. Afonso C. Silva, chefe da unidade. Com isso, as

disciplinas exigidas foram cursadas na FFCLRP–USP, e os experimentos foram realizados no NINDS–NIH.

Assim, foi possível realizar o estudo que constitui a presente tese, em que a utilização da técnica de ASL no estudo dos efeitos da hipertensão em diferentes aspectos da regulação do CBF está descrita e discutida em sete capítulos. No capítulo seguinte, há uma introdução sobre hipertensão arterial, abordando a incidência, as características, as conseqüências e a relação com doenças cerebrovasculares, como o acidente vascular cerebral (AVC) e a doença de Alzheimer. Além disso, o capítulo traz informações sobre o SHR, modelo animal utilizado no presente estudo.

O capítulo 3 aborda os aspectos teóricos envolvidos na medição do CBF através de técnicas de IRM, utilizando contrastes exógenos e endógenos. Além disso, os diferentes métodos de ASL estão descritos. Devido às vantagens da ASL contínua (CASL, do inglês *continuous ASL*) apresentadas no capítulo 3, esse método foi utilizado para avaliar o CBF basal, a resistência cerebrovascular, a reatividade à hipercapnia e os territórios vasculares em SHR. Os resultados obtidos estão apresentados e discutidos no capítulo 4.

Como a hipertensão arterial pode também alterar a hiperemia funcional, houve o interesse em investigar seus efeitos na resposta hemodinâmica evocada pela estimulação somatosensorial. Para isso, foi necessário utilizar um método de ASL com resolução temporal adequada para a medição do CBF funcional. Esse método, denominado ASL dinâmica (DASL, do inglês *dynamic ASL*), suas vantagens e aplicações estão discutidos detalhadamente no capítulo 5.

O capítulo 6 discute as diferenças obtidas entre ratos normotensos e hipertensos em relação às respostas hemodinâmicas (CBF funcional e BOLD) evocadas pela estimulação somatosensorial e medidas utilizando DASL. Complementando esse capítulo, o capítulo 7 aborda a função da enzima ciclooxigenase (COX), principalmente sua isoforma COX-2 conhecida por mediar a hiperemia funcional em animais normotensos, na resposta hemodinâmica à estimulação somatosensorial em ratos hipertensos.

Como a hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para o AVC, no capítulo 8 abordamos os efeitos da hipertensão na perfusão e no desenvolvimento do fluxo sanguíneo colateral após indução de isquemia cerebral através da oclusão temporária da artéria cerebral média. Um dos pontos discutidos

nesse capítulo é a vantagem de manter a pressão arterial elevada em ratos hipertensos durante a oclusão da artéria, facilitando o desenvolvimento do fluxo sanguíneo colateral. Por fim, as conclusões e direções futuras do trabalho estão apresentadas no capítulo 9.



## 2. Hipertensão Arterial

Hipertensão é clinicamente definida como a elevação da pressão sangüínea arterial sistólica acima de 140 mmHg e/ou diastólica acima de 90mmHg, sendo que na maioria dos casos não é possível identificar uma causa específica para esse aumento de pressão. Entre os vários potenciais fatores relacionados estão aumento da atividade do sistema nervoso simpático (Nascimento *et al.*, 2010); aumento da produção de hormônios que retêm sódio; aumento da produção de vasoconstritores, como tromboxana, e deficiência de vasodilatadores, como prostaciclina e óxido nítrico (Chou *et al.*, 1998); ingestão de sódio por longo tempo; dieta inadequada de potássio e cálcio; secreção elevada de renina que resulta no aumento da produção de angiotensina II e aldosterona (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006); anormalidades dos vasos de resistência, incluindo lesões na microvasculatura renal; resistência à insulina; diabetes mellitus; obesidade; atividade elevada dos fatores de crescimento vasculares; alterações em receptores adrenérgicos que influenciam a taxa cardíaca e o tônus vascular; e transporte alterado de íons celulares (Oparil *et al.*, 2003).

Muitos dos fatores citados acima estão associados ao cérebro, principal alvo de doenças associadas à hipertensão, responsáveis por grande parte da mortalidade e morbidade relacionadas a ela (Dahlof, 2007). Quando a hipertensão não é tratada, a pressão sangüínea arterial atinge níveis muito elevados que ameaçam a integridade dos vasos sangüíneos cerebrais, potencialmente induzindo doenças cerebrovasculares. Assim, a hipertensão é um dos principais fatores de risco para AVC, declínio cognitivo e demência, incluindo a doença de Alzheimer (Iadecola; Gorelick, 2004; Veglio *et al.*, 2009), tornando seu contínuo estudo crucial para o melhor entendimento das causas e conseqüências da doença, e para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

### 2.1. Circulação sangüínea cerebral

O cérebro possui uma limitada reserva de combustível ao mesmo tempo em que apresenta uma alta demanda energética, o que o torna um órgão criticamente dependente do fornecimento contínuo de oxigênio e substratos energéticos através do fluxo sangüíneo (Iadecola, 2004). Assim, o cérebro necessita de mecanismos que mantêm a perfusão cerebral adequada, garantindo sua integridade e funcionalidade.

Os vasos sangüíneos cerebrais se diferenciam de vasos de outros órgãos em relação a sua estrutura e suas funções. Um exemplo disso é sua estreita interação com neurônios e glia, formando a “unidade neurovascular” (Figura 2.1) (Girouard; Iadecola, 2006). As interações entre os componentes da unidade neurovascular, denominadas acoplamento neurovascular, permitem a redistribuição de CBF a áreas de maior atividade e demanda metabólica, e ajustes em resposta a variações na pressão transmural (Iadecola, 2004).

As artérias cerebrais intracranianas provenientes do círculo de Willis ramificam-se em artérias progressivamente menores que percorrem a superfície do cérebro através do espaço subaracnóideo. As artérias superficiais, denominadas artérias piais, possuem uma camada de células endoteliais, outra de células musculares lisas (miócitos) que regulam o diâmetro vascular, e uma camada adventícia constituída por colágeno, fibroblastos e nervos perivasculares (Figura 2.1). Essas artérias ramificam-se em artérias e arteríolas ainda menores que penetram no cérebro e são separadas deste pelo espaço Virchow-Robin, constituído por líquido cefalorraquidiano, que desaparece à medida que as arteríolas penetram mais profundamente no cérebro e ramificam-se em capilares. Nos capilares, os miócitos são substituídos por pericitos, e as terminações dos astrócitos estão em contato direto com os vasos.

Enquanto as arteríolas e capilares intracerebrais são responsáveis por 1/3 da resistência vascular, as artérias e arteríolas extraparenquimais são responsáveis por 2/3, tendo então maior impacto no fluxo sangüíneo parenquimal (Iadecola; Davisson, 2008). A desregulação do tônus vascular dessas artérias contribui para o aumento da pressão sangüínea mantendo a resistência vascular periférica elevada. O tônus desses vasos é regulado pelo sistema nervoso simpático, hormônios circulantes e

substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio da parede dos vasos (Lang *et al.*, 1995).

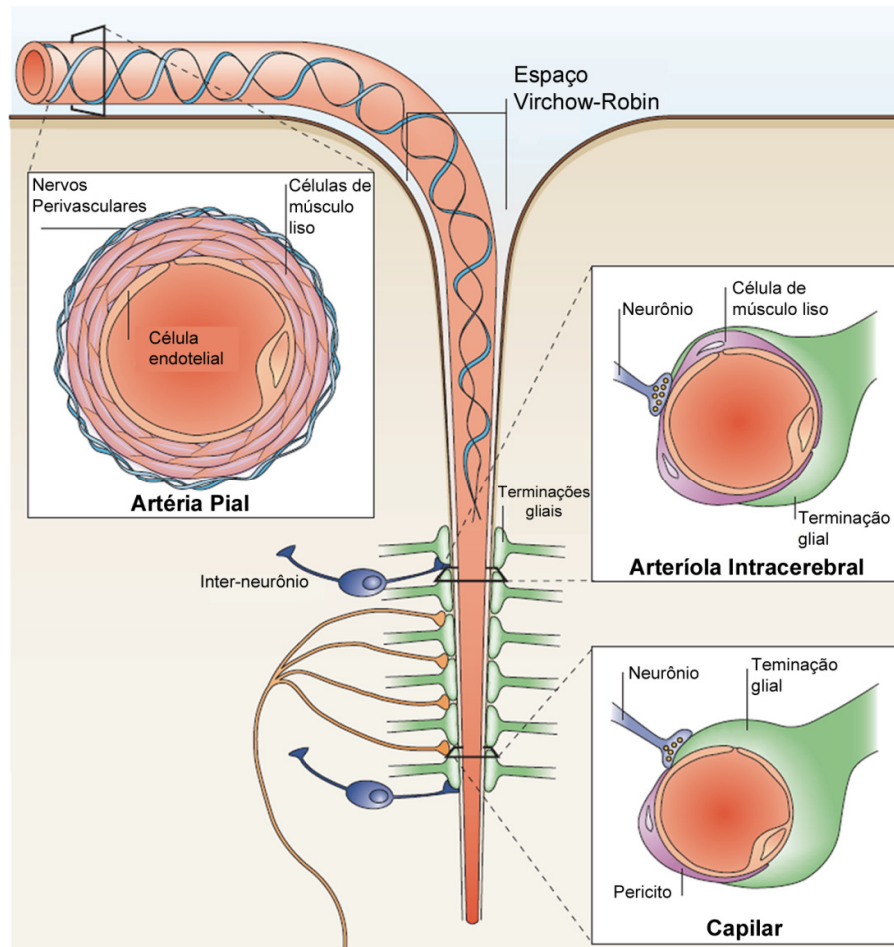


Figura 2.1: Unidade neurovascular formada pelos vasos sanguíneos cerebrais, neurônios e glia (adaptada de Iadecola, 2004).

Além disso, o fornecimento de CBF necessário ao cérebro é possível devido aos mecanismos adaptativos dos vasos sanguíneos cerebrais, como a autoregulação cerebral, a regulação endotelial e a hiperemia funcional. A autoregulação cerebral é responsável pela manutenção do CBF relativamente constante a despeito de variações na pressão arterial, aproximadamente de 60 a 150 mmHg para pressão arterial média (Iadecola; Davissou, 2008). Como a pressão

arterial pode variar mesmo durante as atividades normais do dia-a-dia, as artérias cerebrais têm a capacidade de contrair quando a pressão intravascular aumenta e relaxar quando esta diminui, mantendo o CBF constante.

Já a hiperemia funcional é o mecanismo que regula a distribuição do CBF de acordo com a atividade funcional de diferentes regiões cerebrais, de maneira que o fluxo aumenta em uma determinada região quando a atividade cerebral naquela região aumenta (Figura 2.2). Células vasculares (miócitos e pericitos) têm a capacidade de converter sinais químicos provenientes das células endoteliais, neurônios ativos e glia em variações no diâmetro vascular através de mudanças na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, levando ao aumento de CBF (Brayden *et al.*, 2008). Portanto, esse mecanismo, responsável pela entrega de substratos e a remoção de produtos metabólicos, é mediado por diversos fatores originados de diferentes células e que agem em diferentes níveis da vascularização cerebral (Iadecola; Nedergaard, 2007).

Entre os fatores vasoativos produzidos pela ativação neuronal que agem localmente nas artérias cerebrais para aumentar o CBF, estão os íons vasoativos  $K^+$ ,  $H^+$  e  $Ca^{2+}$ ; alguns neurotransmissores e neuromoduladores, como dopamina, acetilcolina e GABA, que são liberados durante a atividade neuronal e contribuem para a vasodilatação; fatores metabólicos, como concentração de lactato,  $CO_2$ , hipóxia e adenosina; além de outros como óxido nítrico e produtos da COX (Girouard; Iadecola, 2006). Estudos têm mostrado que apesar da inibição de um fator vasoativo específico atenuar o aumento de CBF evocado pela atividade neural, ela não bloqueia essa resposta completamente (Iadecola, 2004; 1993; Niwa *et al.*, 2001; Stefanovic *et al.*, 2006), sugerindo a ação conjunta dos diferentes agentes vasoativos no aumento do CBF funcional.

Como dito anteriormente, as artérias superficiais constituem o principal local de resistência vascular no cérebro, controlando o fluxo sanguíneo. Assim, a dilatação das artérias intracerebrais no local da ativação deve estar associada com a dilatação de artérias superficiais para alterar adequadamente a perfusão (Figura 2.2). A vasodilatação na área ativa se propaga até as artérias superficiais através de sinais vasculares intramurais, mantendo o equilíbrio da pressão na árvore vascular de tal maneira que o fluxo sanguíneo não seja desviado de regiões ativas para outras regiões irrigadas pelos mesmos ramos arteriais.

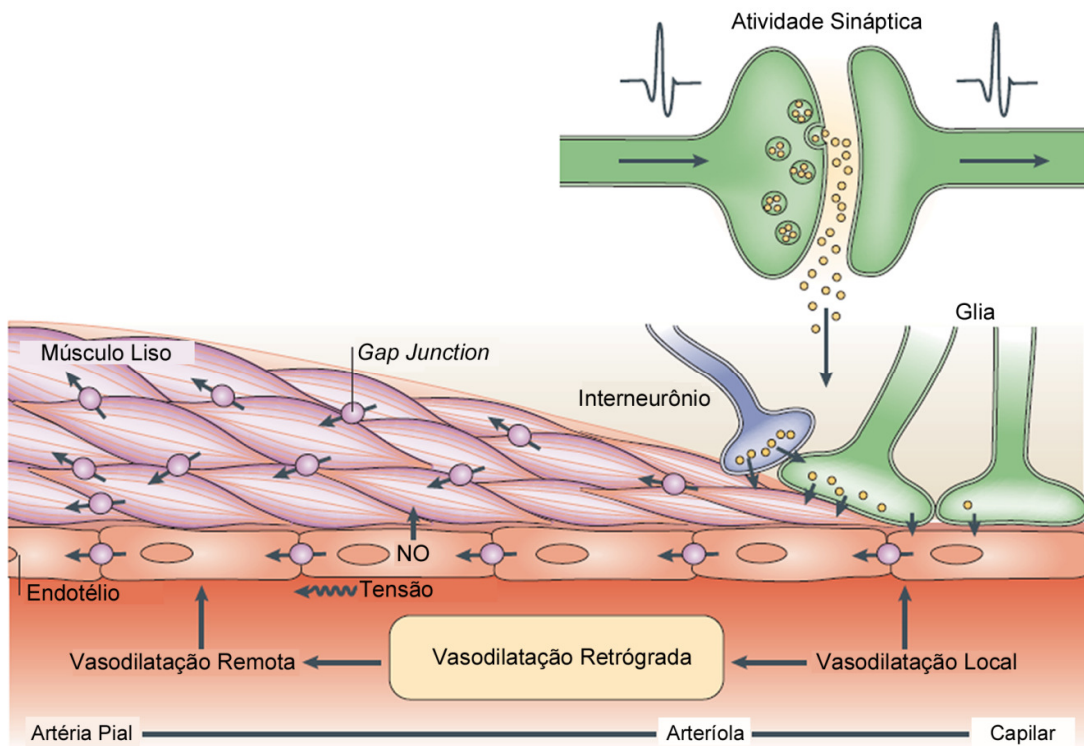


Figura 2.2: Mecanismo de propagação da dilatação dos vasos na região ativa para artérias superficiais. A atividade neural produz fatores vasoativos em neurônios e glia, que agem nas arteríolas e capilares da área ativa. À medida que o fluxo aumenta, a tensão nas células endoteliais produz mais vasodilatação através da liberação de vasodilatadores dependentes do endotélio (adaptada de Iadecola, 2004).

## 2.2. Efeitos cerebrovasculares da hipertensão

A hipertensão causa alterações progressivas nos vasos sanguíneos cerebrais e, conseqüentemente, nos mecanismos de regulação do CBF, que levam a relações complexas e dinâmicas entre pressão sanguínea e função cerebral (Veglio *et al.*, 2009). Ela altera o acoplamento neurovascular e diminui a capacidade de reserva vasomotora, ou seja, a capacidade das unidades neurovasculares de uma região ou do cérebro todo em responder a variações na pressão sanguínea e ao aumento da demanda metabólica (Iadecola; Gorelick, 2004).

Uma característica da hipertensão tanto em humanos quanto em modelos animais é o aumento da resistência periférica, que ocorre devido ao aumento da

contratilidade ou diminuição da relaxação do músculo liso das artérias de resistência. Como dito anteriormente, as células endoteliais participam da regulação do fluxo sanguíneo, modulando o tônus do músculo liso vascular ao liberar substâncias vasodilatadoras (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*) e vasoconstritoras (EDCF, do inglês *endothelium-derived contracting factor*) (Girouard; Iadecola, 2006; Iadecola; Davissou, 2008). Um desequilíbrio na produção dessas substâncias pode iniciar ou sustentar a vasoconstrição anormal da hipertensão. Essa disfunção endotelial é o primeiro passo de uma cadeia de eventos que leva à aterosclerose e à doença coronariana, sendo uma marca, e até mesmo um preditor, de doenças vasculares (Vanhoutte, 2009).

A hipertensão altera a estrutura dos vasos sanguíneos cerebrais facilitando oclusões vasculares e comprometendo a perfusão cerebral. Essas alterações incluem a formação de placas ateroscleróticas, que levam a oclusão arterial e danos isquêmicos, e indução de necroses das artérias e arteríolas penetrantes que suprem a matéria branca, resultando em pequenos infartos e hemorragias.

Alterações adaptativas nas artérias cerebrais, como os remodelamentos hipertróficos e eutróficos (Figura 2.3), também são induzidas pela hipertensão tanto em modelos animais (Heagerty *et al.*, 2010; Yamakawa *et al.*, 2003), quanto em humanos (Rizzoni *et al.*, 2009). Fatores mecânicos, neurais e hormonais contribuem para essas mudanças na estrutura e composição da parede das artérias cerebrais. No remodelamento hipertrófico, as células de músculo liso sofrem hipertrofia ou hiperplasia e crescem para dentro, invadindo e reduzindo a luz da artéria, e aumentando a espessura de sua parede (Baumbach; Heistad, 1988). Entre os fatores que contribuem para a hipertrofia estão a inervação perivascular simpática, que exerce um efeito trófico na parede do vaso, e efeitos mecânicos da pressão intravascular elevada na parede vascular. Já no remodelamento eutrófico, as células do músculo liso sofrem um rearranjo que leva à redução da luz do vaso sem alterar a espessura da parede (Baumbach; Heistad, 1989). Além disso, a hipertensão também leva ao aumento do colágeno e da rigidez da parede do vaso, um processo denominado enrijecimento vascular (Laurent; Boutouyrie, 2005).

Se por um lado essas alterações morfológicas ocorrem de maneira a reduzir o estresse na parede dos vasos, protegendo os microvasos dos efeitos da pressão elevada e reduzindo a probabilidade de ocorrer alterações na barreira hematoencefálica, edema cerebral, e desenvolvimento de doenças cerebrovasculares

(Gonzalez *et al.*, 2008; Harper; Bohlen, 1984); por outro lado, o remodelamento vascular pode resultar em insuficiência vascular já que reduz a luz do vaso e aumenta sua resistência.

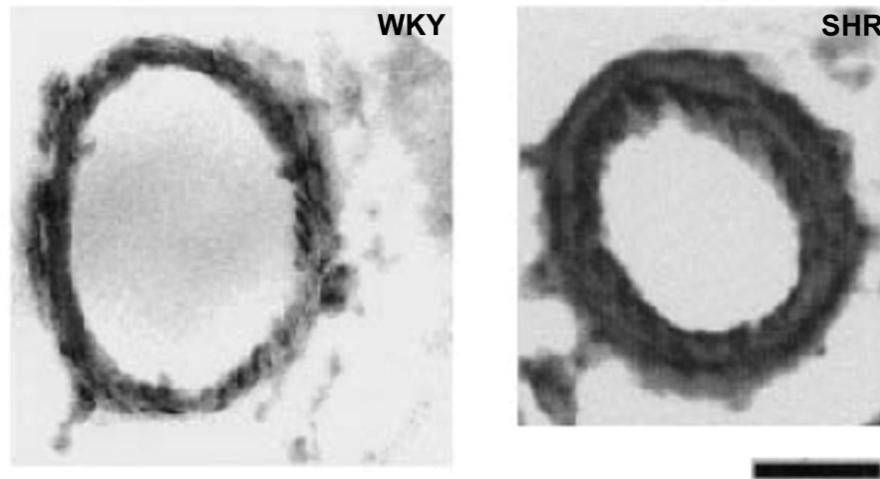


Figura 2.3: À esquerda, secção da artéria cerebral média de um rato normotenso (WKY). À direita, secção da artéria cerebral média de um rato hipertenso (SHR), em que observa-se um remodelamento vascular hipertrófico. A barra horizontal representa 50  $\mu\text{m}$  (adaptada de Yamakawa *et al.*, 2003).

A autoregulação cerebrovascular também é alterada na presença da hipertensão, causando um deslocamento da curva pressão-fluxo para a direita, como mostrado na figura 2.4 (Iadecola; Davisson, 2008; Novak; Hajjar, 2010). Esse deslocamento está relacionado com o aumento do tônus miogênico induzido pelo aumento da sensibilidade dos miócitos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , redução da luz do vaso e aumento da resistência cerebrovascular. Conseqüentemente, em sujeitos hipertensos, pressões de perfusão mais altas são necessárias para manter o mesmo nível de CBF. Assim, a autoregulação alterada aumenta a susceptibilidade do cérebro à isquemia quando a pressão sanguínea cai, devido à falha dos vasos cerebrais em compensar a redução da pressão de perfusão.

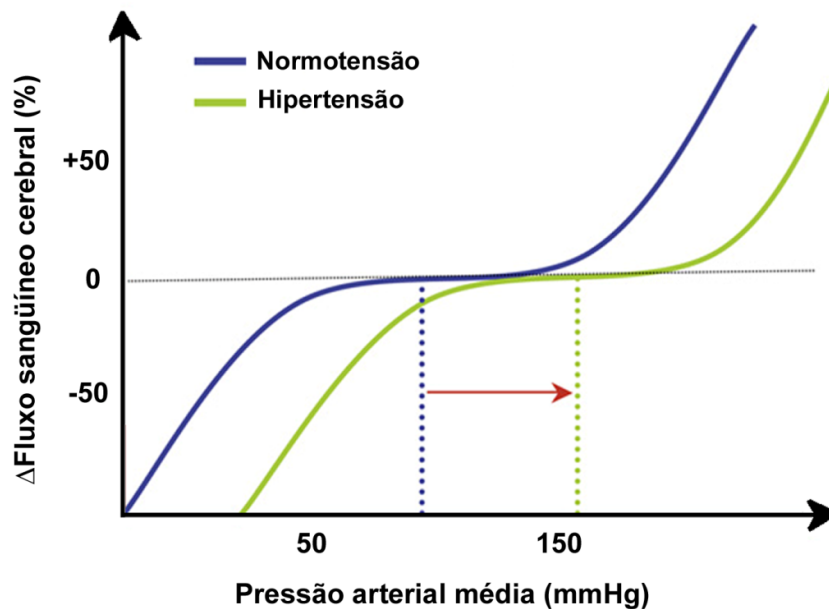


Figura 2.4: Em condições normais, a autoregulação cerebral mantém o CBF relativamente constante a despeito de variações da pressão arterial (curva azul). Já em sujeitos hipertensos, a curva é deslocada para a direita (curva verde) e níveis mais altos de pressão sangüínea passam a ser necessários para manter valores normais de CBF (adaptada de Iadecola; Davison, 2008).

### 2.3. Doenças cerebrovasculares

Devido aos seus efeitos na morfologia dos vasos cerebrais e nos mecanismos de regulação do fluxo sangüíneo, a hipertensão tem um importante papel em duas das maiores patologias cerebrais, AVC e demência (Girouard; Iadecola, 2006; Iadecola *et al.*, 2009). O AVC pode ser isquêmico, resultado da oclusão de uma grande artéria cerebral, ou hemorrágico, causado pela ruptura de arteríolas intracerebrais. Já o déficit cognitivo vascular é causado pela oclusão de arteríolas pequenas na matéria branca subcortical, interrompendo conexões neurais relacionadas à cognição e memória, resultando em demência (Chui, 2007).

Estudos recentes mostram que reduções na pressão sangüínea reduzem significativamente a incidência de AVCs fatais e não fatais, e protegem contra outras doenças cerebrovasculares e suas conseqüências (Novak; Hajjar, 2010; Pedelty; Gorelick, 2008). Entretanto, o valor da pressão sangüínea arterial alvo de anti-



hipertensos e os casos em que a redução da pressão é favorável ainda precisam ser determinados.

### 2.3.1. Acidente vascular cerebral

A hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para o AVC sendo que mais de 50% dos AVCs são atribuídos à alta pressão sangüínea e mais de 2/3 dos pacientes que sofrem AVC são hipertensos. A hipertensão leva a lesões cerebrais através de diversos mecanismos e é o fator de risco mais importante para doenças em microvasos, causando infartos lacunares e hemorragias intracerebrais.

Como dito anteriormente, a autoregulação cerebral está alterada em sujeitos hipertensos, sendo que o limite superior da autoregulação aumenta ao mesmo tempo em que o limite inferior no qual CBF adequado pode ser mantido também aumenta (Figura 2.4). Conseqüentemente, sintomas de hipoperfusão cerebral são desenvolvidos em níveis superiores de pressão arterial. Portanto, redução da pressão arterial devido a medicamentos anti-hipertensos muito eficientes ou problemas cardíacos pode causar hipoperfusão local ou global, resultando em isquemias.

Além disso, o remodelamento vascular causado pela hipertensão contribui para a ruptura da função protetora do endotélio, causando lesões severas às células endoteliais que permitem a saída excessiva de lipídios dando início ao processo aterosclerótico. Esse evolui de simples estrias de gordura a placas fibrosas (Veglio *et al.*, 2009), que normalmente se localizam em curvas e bifurcações de grandes artérias e levam a estenoses, podendo causar AVC isquêmico através da oclusão dos vasos sangüíneos.

As microartérias cerebrais também são alvos dos danos causados pela hipertensão e as lesões cerebrais resultantes podem aparecer em diferentes formas neuropatológicas, como lesões isquêmicas focais, denominadas infartos lacunares; pequenas hemorragias; e doença difusa da matéria branca. Essas doenças cerebro-microvasculares aceleram o declínio do CBF com a idade e estão associadas com diferenças regionais de vasoregulação e reserva vascular (Novak; Hajjar, 2010).

A hipertensão também tem um papel importante após o desenvolvimento da isquemia, quando a reatividade vascular a estímulos vasomotores está alterada e a autoregulação está prejudicada (Iadecola; Davisson, 2008). Ela agrava essas

alterações, limitando a regulação do CBF. Assim, em pacientes com doenças cerebrovasculares já estabelecidas, é mais crítico manter o CBF adequado nas regiões cerebrais (Pedelty; Gorelick, 2008).

### 2.3.2. Declínio cognitivo

A combinação de hipertensão com outros fatores de risco, como idade, pode acelerar o declínio cognitivo devido à reserva vascular prejudicada e às doenças microvasculares (Novak; Hajjar, 2010). Um estudo recente reportou que o enrijecimento arterial aumentado e danos microvasculares estão associados com o declínio cognitivo em pacientes hipertensos nunca tratados (Triantafyllidi *et al.*, 2009). As alterações vasculares relacionadas à hipertensão que, como dito anteriormente, podem induzir hipoperfusão, isquemia e hipóxia, são o elo entre doenças cerebrovasculares e demência. Além disso, essas condições podem desestabilizar neurônios e sinapses, e evoluir para um processo neurodegenerativo (Veglio *et al.*, 2009).

### 2.3.3. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer, causa mais comum de demência entre os idosos (Veglio *et al.*, 2009), é tradicionalmente considerada uma condição neurodegenerativa, caracterizada pela deposição de peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ A) no cérebro (placas amilóides) e vasos sanguíneos (angiopatia amilóide), e pelo acúmulo de neurofilamentos hiperfosforilados nos neurônios (Kelley; Petersen, 2007). Entretanto, estudos recentes reportaram evidências epidemiológicas, patológicas e experimentais que sugerem um papel importante de fatores vasculares, como a hipertensão, na patogênese da doença de Alzheimer, acelerando sua progressão (Iadecola, 2004; Skoog; Gustafson, 2006).

Tanto a estrutura quanto a função cerebrovasculares estão bastante alteradas em sujeitos com a doença de Alzheimer (Girouard; Iadecola, 2006). Os microvasos cerebrais são reduzidos em número, as células da parede dos vasos sofrem degeneração, o CBF basal é reduzido, e tanto a hiperemia funcional quanto a autoregulação estão prejudicadas (Iadecola, 2004; Niwa *et al.*, 2002). Como essas alterações são observadas antes do início do dano cognitivo, elas provavelmente

contribuem para os mecanismos de disfunção cerebral subjacente à demência. A perfusão cerebral reduzida pode resultar em lesões isquêmicas devido à hipóxia, que facilitam a produção de  $\beta$ A, aumentando sua quantidade no cérebro. Além disso, CBF reduzido pode desacelerar a remoção de  $\beta$ A através da barreira hematoencefálica, o que também leva ao seu acúmulo no cérebro (Iadecola; Davisson, 2008).

Como a hipertensão está associada a essas alterações estruturais e funcionais dos vasos cerebrais, ela se torna um fator de risco para a doença de Alzheimer e outros tipos de demência. Entretanto, um estudo recente mostrou que enquanto a hipertensão pode promover o desenvolvimento de placas amilóides no início da doença, as alterações induzidas pela doença de Alzheimer levam à redução da pressão arterial durante o curso da doença (Skoog; Gustafson, 2006). Devido à autoregulação prejudicada, a hipotensão pode levar à hipoperfusão cerebral e isquemia, que por sua vez aumenta a deposição de  $\beta$ A, exacerbando a demência (Iadecola; Davisson, 2008). Além disso, a neuroinflamação, também associada à hipertensão, está relacionada a esse processo (Choi *et al.*, 2009).

#### 2.4. Modelo animal de hipertensão: SHR

Modelos animais de hipertensão foram introduzidos há aproximadamente sete décadas e, desde então, são extensivamente usados para o estudo da patofisiologia da doença, danos aos órgãos, e efeito de tratamentos. Diferentes modelos têm sido gerados: hipertensão aguda, através de métodos cirúrgicos ou indução farmacológica (Sarikonda *et al.*, 2009); modelos genéticos, através de cruzamentos (Amenta *et al.*, 2003); e modelos transgênicos (Langheinrich *et al.*, 1996; Shimokama *et al.*, 1998). Apesar das formas de hipertensão arterial desenvolvidas por esses modelos não serem idênticas à patologia humana, eles têm contribuído bastante para o conhecimento da doença e o desenvolvimento de métodos terapêuticos.

Um dos modelos mais utilizados é o de ratos que desenvolvem hipertensão espontaneamente (SHR). Esses animais são normotensos quando nascem e desenvolvem hipertensão severa gradualmente entre oito e dezesseis semanas de vida, apresentando pressão arterial média acima de 170 mmHg quando adultos (Figura 2.5) (Amenta *et al.*, 2003). O desenvolvimento dessa raça de ratos começou

na década de 50, cruzando ratos WKY machos que apresentavam hipertensão moderada – pressão sistólica de 145 a 175 mmHg, com fêmeas que apresentavam pressão sistólica entre 130 e 140 mmHg. Em 1963, a primeira colônia em que todos os ratos desenvolviam hipertensão foi reportada (Okamoto; Aoki, 1963).

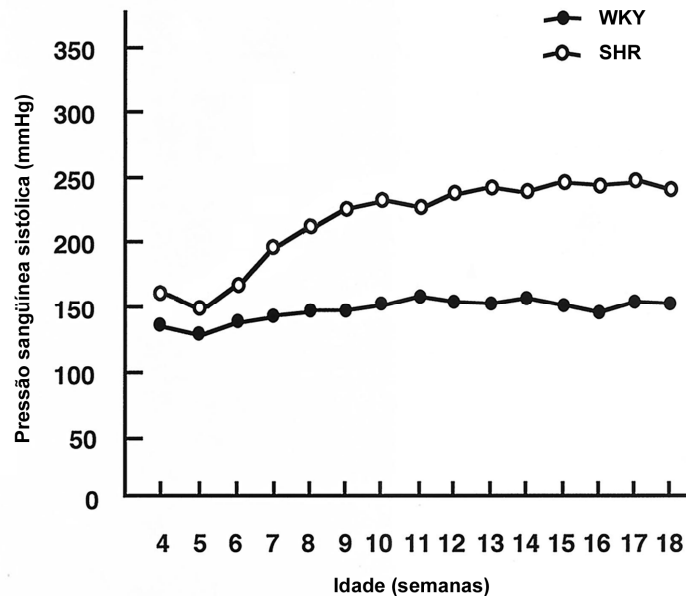


Figura 2.5: Pressão sanguínea sistólica média em SHR (n = 20) e WKY (n = 20) (adaptada de Unoki *et al.*, 2003).

O fato de ser possível desenvolver através de cruzamento seletivo uma raça em que todos os ratos têm hipertensão mostra que a hereditariedade é um fator importante, justificando os diversos estudos desenvolvidos nos últimos anos para investigar os genes envolvidos nessa doença. Em 2002, Okuda e colaboradores reportaram diferenças na expressão gênica de ratos SHR e WKY, sendo que mais de vinte genes parecem estar com regulação excessiva, enquanto outros vinte reprimidos em SHR (Okuda *et al.*, 2002).

Uma série de estudos utilizando o cruzamento genético entre ratos WKY e SHR mostrou que a pressão sanguínea dos descendentes é dependente da raça do pai, associando hipertensão em SHR com o cromossomo Y (Ely *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2009; Turner *et al.*, 1991). Em SHR, a expressão de SRY (do inglês, sex-

*determining region Y*) é aumentada ao mesmo tempo em que a pressão sangüínea aumenta, sendo possível então que a hipertensão seja desenvolvida após um determinado nível de expressão ser atingido (Turner *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado recentemente o papel do cromossomo Y e especificamente o gene SRY em mecanismos que envolvem o sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina, ambos relacionados à hipertensão (Ely *et al.*, 2010). Essa associação entre variações genéticas do cromossomo Y com pressão sangüínea elevada também foi demonstrada em humanos (Ellis *et al.*, 2000).

Várias mudanças observadas em SHR com o desenvolvimento da doença, como variações cerebrovasculares, aumento ventricular, atrofia cerebral e perda de células nervosas em áreas corticais, são similares àquelas observadas em humanos hipertensos. O remodelamento vascular citado anteriormente (hipertrofia e eutrofia) foi reportado recentemente nas artérias cerebrais de SHR e foi inibido após tratamento da hipertensão (Yamakawa *et al.*, 2003). Desempenho prejudicado em tarefas de aprendizado e memória (Clements; Wainwright, 2006; Robertson *et al.*, 2008), lesões isquêmicas maiores e desempenho neurológico pior após oclusões vasculares (Letourneur *et al.*, 2011) também foram reportados em SHR quando comparados com ratos normotensos. Portanto, o SHR foi o modelo animal escolhido para o desenvolvimento do presente estudo. Todos os animais foram adquiridos de um vendedor comercial (Harlan Laboratories, Sommerville, NJ), provenientes de colônias em que ratos apresentam tipicamente pressões sistólicas iguais a 140, 160 e 180 mmHg, quando têm 6-7, 8-13 e 14-15 semanas de idade, respectivamente. Eles são albinos, expressam resistência à insulina e são hiperativos, além de apresentarem volume glomerular reduzido em relação aos ratos WKY, o que é consistente com a hipótese de que os rins têm papel importante na hipertensão.

### *3. Medidas de Fluxo Sangüíneo Cerebral*

Como discutido no capítulo anterior, o cérebro é dependente do fornecimento contínuo de oxigênio e substratos energéticos através do fluxo sangüíneo, devido a sua limitada reserva de combustível e alta demanda energética. O CBF indica a quantidade de sangue que irriga um determinado volume de tecido cerebral por unidade de tempo e é normalmente dado em mL/100g/min. Ele pode ser determinado a partir da análise da cinética de um agente de contraste (traçador), enquanto o mesmo se encontra em estado de perfusão no cérebro. Assim, para determinar a perfusão cerebral, são necessários um agente de contraste, uma técnica para a detecção da variação do sinal no tecido de interesse devido ao traçador e um modelo que descreva o comportamento do traçador permitindo estimar o CBF.

#### 3.1. Modelos Teóricos

Entre os traçadores utilizados para medir a perfusão cerebral, existem os traçadores difusíveis e os intravasculares. A seguir, os modelos desenvolvidos para quantificar a perfusão através desses traçadores estão descritos.

##### 3.1.1. Traçadores Difusíveis

Os traçadores difusíveis são moléculas inertes pequenas, inaladas na forma gasosa ou injetadas na forma líquida, que atravessam a barreira dos capilares e atingem uma concentração de equilíbrio com o tecido. Como exemplos, podem ser citados os traçadores radioativos  $^{133}\text{Xe}$  ou  $\text{H}_2^{15}\text{O}$ , e alguns isótopos de radionuclídeos, que têm momento magnético diferente de zero e podem ser usados em IRM, como  $^2\text{H}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^1\text{H}$ .

A teoria para a quantificação do fluxo sangüíneo através de traçadores difusíveis foi proposta inicialmente por Kety e Schmidt (Kety; Schmidt, 1948). Nela, a quantidade de traçador absorvida pelo tecido cerebral por unidade de tempo depende da concentração de traçador que chega (arterial) e da que sai (venosa) do tecido:

$$\frac{dC_t(t)}{dt} = CBF[c_a(t) - c_v(t)] \quad [3.1]$$

em que  $c_a$  e  $c_v$  são as concentrações do traçador nas redes arterial e venosa, respectivamente. Considerando que o volume sangüíneo no tecido é desprezível quando comparado ao volume do tecido e que há um equilíbrio instantâneo entre o compartimento venoso e o do tecido, tem-se que:

$$C_t(t) = \lambda c_v(t) \quad [3.2]$$

em que  $\lambda$  é o coeficiente de partição molecular entre o sangue e o tecido, dado em mL/g. Assim, pode-se reescrever a equação 3.1 como:

$$\frac{dC_t(t)}{dt} = -\frac{CBF}{\lambda} [C_t(t) - \lambda c_a(t)] \quad [3.3]$$

A equação 3.3 pode ser integrada entre  $t = 0$  (chegada do traçador) e  $t = T$  (tempo da medida):

$$C_t(T) = CBF e^{-CBF(T/\lambda)} \int_0^T c_a(t) e^{CBF[t/\lambda]} dt \quad [3.4]$$

Supondo que o traçador chegue como um bolus ideal, a solução da equação 3.4 mostra um comportamento exponencial para a descrição da cinética do traçador:

$$C_t(T) = c_a(0) CBF e^{-CBF(T/\lambda)} \quad [3.5]$$

em que T é o tempo em que a medição é feita.

### 3.1.2. Traçadores Intravasculares

Os traçadores intravasculares são moléculas grandes que, no cérebro, não atravessam a barreira hemato-encefálica, permanecendo no sistema vascular. Portanto, o modelo teórico usado para explicar a cinética dos traçadores intravasculares baseia-se no fato de que esses agentes permanecem no meio intravascular quando a barreira hemato-encefálica está intacta (Axel, 1980). Assim, considerando a injeção de um bolus do agente de contraste, a sua concentração em um dado volume de interesse (VOI) no tempo t é definida por (Calamante *et al.*, 1999):

$$\begin{aligned} C_{VOI}(t) &= \frac{\rho}{k_H} \cdot F_{VOI} \cdot (c_a(t) \otimes R(t)) \\ &= \frac{\rho}{k_H} \cdot F_{VOI} \cdot \int_0^t c_a(\tau) R(1 - \tau) d\tau \end{aligned} \quad [3.6]$$

em que  $F_{VOI}$  é o CBF no VOI;  $c_a(t)$  é a concentração do agente de contraste no vaso que supre o VOI no tempo t (em inglês também chamada de AIF, *arterial input function*);  $R(t)$  é a fração residual do traçador no VOI no tempo t, seguindo uma injeção ideal e instantânea do bolus do traçador;  $\rho$  é a densidade do tecido cerebral; e  $k_H = (1 - H_{art}) / (1 - H_{cap})$  é o termo que considera a diferença de hematocrito (H) entre os capilares e as grandes artérias.

Assim, para o cálculo de CBF através do uso de traçadores intravasculares, a equação 3.6 deve ser deconvoluída e o fluxo sangüíneo obtido para  $t = 0$ .

Outro parâmetro fisiológico que também pode ser obtido através do uso de traçadores intravasculares é o volume sangüíneo cerebral (CBV, do inglês *cerebral blood volume*). No caso da barreira hemato-encefálica intacta, o CBV é proporcional à quantidade normalizada do traçador (Calamante *et al.*, 1999):

$$CBV(t) = \frac{k_H}{\rho} \cdot \frac{\int C_{VOI}(t) dt}{\int c_a(t) dt} \quad [3.7]$$



O terceiro parâmetro fisiológico, o tempo de trânsito médio (MTT, do inglês *mean transit time*), é o tempo médio necessário para o traçador passar através do volume do tecido após a injeção de um bolus ideal. Uma vez que CBF e CBV são conhecidos, MTT pode ser diretamente calculado pelo teorema do volume central (Meier; Zierler, 1954):

$$MTT = \frac{CBV}{CBF} \quad [3.8]$$

### 3.2. Técnicas para Medir CBF

Nos últimos cem anos, várias técnicas têm sido implementadas para medir o CBF, incluindo a tomografia computadorizada, a tomografia por emissão de fóton único, a tomografia por emissão de pósitrons e a imagem por ressonância magnética. Dentre elas, a técnica mais amplamente aceita como “padrão ouro” é a tomografia por emissão de pósitrons com  $H_2^{15}O$  como contraste (Schwaiger; Pirich, 2000). Entretanto, a IRM, além de ser não-invasiva, possibilita usar a aquisição de outros tipos de imagens (imagens de difusão, espectroscopia, relaxometria) na mesma sessão, permitindo a avaliação conjunta da perfusão do tecido e de aspectos morfológicos, metabólicos e funcionais. Além disso, os traçadores utilizados nesse caso são mais seguros e a resolução espacial das imagens é comparável ou melhor do que as outras técnicas citadas acima.

Duas diferentes técnicas de ressonância magnética surgiram com o objetivo de avaliar quantitativamente o CBF, e diferem entre elas em relação ao agente de contraste (exógeno ou endógeno) utilizado. Uma das técnicas, a do contraste de susceptibilidade dinâmico (DSC, do inglês *dynamic susceptibility contrast*), não é inteiramente não-invasiva por requerer a injeção de um agente de contraste que, em altas dosagens, é tóxico. Já a outra técnica, a de marcação dos spins arteriais (ASL), utiliza pulsos de radiofrequência (RF) para marcar magneticamente os spins do sangue.

### 3.2.1. DSC

O uso de contrastes exógenos em IRM para o estudo da perfusão cerebral teve início há mais de vinte anos (Villringer *et al.*, 1988). Eles podem fornecer informações sobre diferentes parâmetros fisiológicos relacionados ao CBF, CBV e MTT. Tanto no ambiente clínico quanto nos estudos com animais, o agente mais utilizado é o gadolínio, injetável, que pode ser indiretamente detectado pelo efeito que tem sobre o sinal da água.

A técnica DSC normalmente envolve a injeção de um bolus do agente de contraste paramagnético que permanece no meio intravascular, mas produz gradientes de campo magnético locais que se estendem do compartimento intravascular ao tecido que o circunda. Esses gradientes de campo magnético causam a defasagem dos spins, levando à redução do sinal nas imagens ponderadas em  $T_2$  ou  $T_2^*$  (Figura 3.1). Além disso, a passagem do contraste próxima ao tecido reduz o  $T_1$ , resultando em um aumento do sinal nas imagens ponderadas em  $T_1$ . Essa característica é principalmente utilizada na visualização de tumores, já que o agente de contraste não é mantido no espaço intravascular com a ruptura da barreira hemato-encefálica, levando ao aumento do sinal na região do tumor de imagens ponderadas em  $T_1$ .

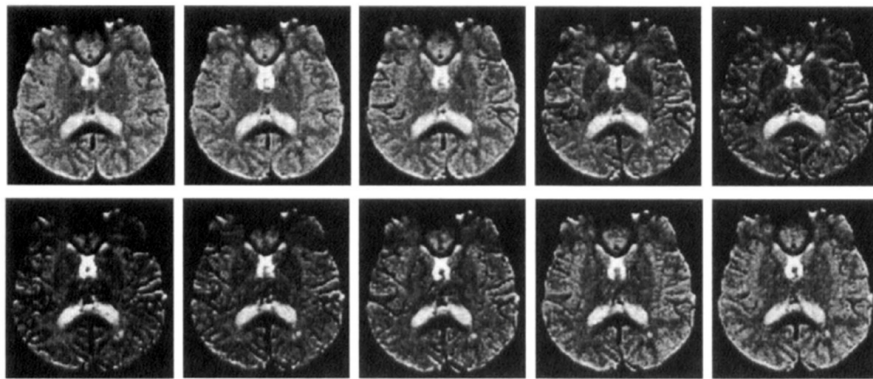
O modelo usado para quantificar a perfusão é baseado no princípio da cinética dos traçadores intravasculares (seção 3.1.2) e na suposição de que o agente de contraste permanece no meio intravascular se a barreira hemato-encefálica estiver intacta. Além disso, supõe-se que o fluxo esteja estável durante a medição; o agente de contraste não tenha efeitos sobre o fluxo e tenha um volume insignificante; a recirculação do traçador também seja insignificante, assim como a dispersão e o atraso do bolus ao chegar no volume de interesse. Essa última suposição dificilmente será válida durante isquemia cerebral e pode subestimar o valor da perfusão nesse caso.

Como não se mede diretamente a concentração do traçador com IRM, há a necessidade de converter as variações na intensidade do sinal em curvas de tempo dessa concentração. A concentração do traçador no VOI é aproximadamente proporcional à variação observada na taxa de relaxação  $R_2$  ( $= 1/T_2$ ) ou  $R_2^*$  ( $= 1/T_2^*$ ) em tecido normalmente perfundido (Kennan *et al.*, 1994; Villringer *et al.*, 1988). Assim, a concentração do agente de contraste no VOI é dada por:

$$C_{VOI}(t) = k_{VOI} \cdot \Delta R_2 = \frac{k_{VOI}}{TE} \cdot \ln\left(\frac{S_{VOI}(t)}{S_0}\right) \quad [3.9]$$

em que  $S_{VOI}(t)$  é a intensidade do sinal no VOI medida no tempo  $t$ ,  $S_0$  é intensidade do sinal basal antes da administração do contraste,  $TE$  é o tempo ao eco da seqüência e  $k_{VOI}$  é a constante de proporcionalidade que depende do tecido, do traçador, do campo magnético, e dos parâmetros da seqüência de pulsos.

a



b

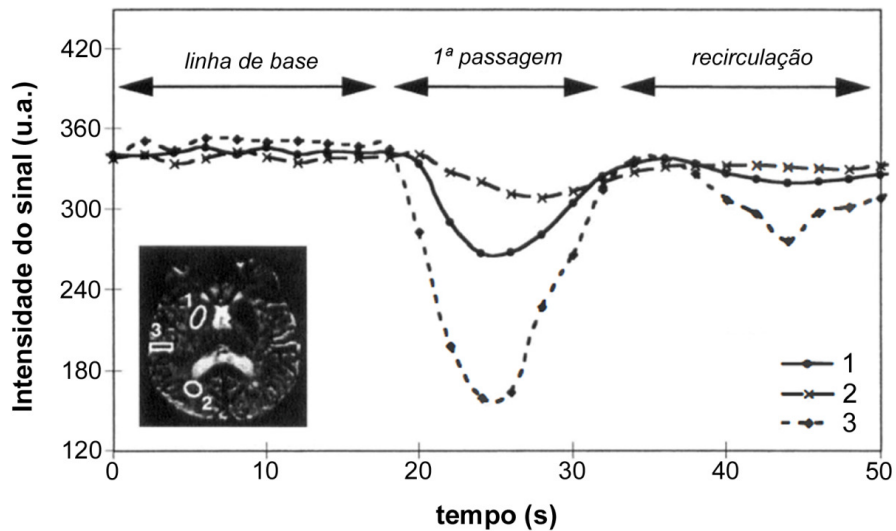


Figura 3.1: (a) Imagens EPI da mesma fatia do cérebro humano durante a primeira passagem do bolus do agente de contraste. (b) Curvas temporais da intensidade do sinal para três diferentes regiões de interesse no hemisfério direito: (1) gânglio basal, (2) substância branca na região occipital e (3) ramo da artéria cerebral média (Calamante *et al.*, 1999).

Para a correta determinação das curvas de tempo da concentração do agente, precisa-se de técnicas de imagens com alta resolução temporal, como eco-planar (EPI, do inglês *echo planar imaging*) e espiral. A figura 3.1 mostra imagens EPI adquiridas durante a primeira passagem de um bolus de contraste e as curvas de tempo da intensidade do sinal para três diferentes regiões de interesse. Três intervalos diferentes podem ser observados: a linha de base, antes da chegada do bolus do traçador; a primeira passagem do bolus; e a recirculação. Essas curvas podem ser convertidas nas curvas de concentração do traçador (equação 3.9) para a quantificação do CBF (equação 3.6), CBV (equação 3.7) e MTT (equação 3.8).

Para uma descrição mais detalhada dessa técnica, incluindo suas aplicações em estudos experimentais com modelos animais e no ambiente clínico, sugere-se a leitura das revisões de Calamante e colaboradores (Calamante *et al.*, 1999) e Barbier e colaboradores (Barbier *et al.*, 2001a).

### 3.2.2. ASL

A ASL é uma técnica que utiliza a água presente no sangue arterial como agente de contraste endógeno, considerando-a um traçador difusível (seção 3.1.1). Seu princípio baseia-se na diferenciação entre os spins fluindo com o sangue marcado e os spins estacionários. À medida que os spins intravasculares magneticamente marcados atingem os capilares e realizam trocas com o tecido através da barreira hemato-encefálica, a magnetização do tecido é alterada e torna-se possível obter imagens cujo contraste é proporcional à perfusão.

Os diferentes métodos de ASL são geralmente divididos em dois grupos dependendo de como o sangue é marcado: ASL contínua (CASL) e ASL pulsada (PASL, do inglês *pulsed ASL*). Em ambos os métodos, as imagens são adquiridas distalmente ao local da marcação após o sangue marcado fluir até o tecido alvo. Essas imagens são alternadas com imagens controles em que a marcação não é aplicada. Assim, a diferença de sinal entre imagens marcadas e controles é proporcional ao sangue entregue na fatia adquirida.

Em IRM, a magnetização  $\vec{M}$  de um sistema de spins sob um campo magnético  $\vec{B}$  é descrita pela equação de Bloch (Bloch, 1946):

$$\frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \vec{M}(t) \times \gamma \vec{B}(t) - \frac{M_x(t)\hat{i} + M_y(t)\hat{j}}{T_2} + \frac{M_0 - M_z(t)}{T_1} \hat{k} \quad [3.10]$$

em que  $\gamma$  é a razão giromagnética do núcleo de hidrogênio,  $M_0$  é o módulo da magnetização no estado de equilíbrio,  $T_1$  e  $T_2$  são os tempos de relaxação longitudinal e transversal, respectivamente.

A equação 3.10 pode ser modificada para incluir os efeitos do fluxo sangüíneo. Assim, a evolução da magnetização longitudinal na fatia da imagem pode ser descrita por (Detre *et al.*, 1992):

$$\frac{dM_t(t)}{dt} = \frac{M_t^0 - M_t(t)}{T_{1t}} + CBF[m_a(t) - m_v(t)] \quad [3.11]$$

em que  $M_t$  é a magnetização longitudinal (por g de tecido);  $m_a$  e  $m_v$  são as magnetizações longitudinais (por mL de sangue) arterial e venosa, respectivamente; e  $T_{1t}$  é o tempo de relaxação longitudinal do tecido.

No equilíbrio, a relação entre as magnetizações do sangue e do tecido envolve o coeficiente de partição cérebro-sangue para a água ( $\lambda$ ):

$$m_a^0 = m_v^0 = \frac{M_t^0}{\lambda} \quad [3.12]$$

Considerando que haja total troca entre a água do tecido e a do sangue, a magnetização venosa é dada por:

$$m_v(t) = \frac{M_t(t)}{\lambda} \quad [3.13]$$

Assim, a equação 3.11 pode ser reescrita como:

$$\frac{dM_t(t)}{dt} = \frac{M_t^0 - M_t(t)}{T_{1app}} - 2\alpha(t) \frac{CBF}{\lambda} M_t^0 \quad [3.14]$$

em que  $T_{1app}$ , o tempo de relaxação longitudinal aparente para a água presente no tecido no caso em que existe perfusão, e  $\alpha(t)$ , o grau de marcação, são definidos por:

$$\frac{1}{T_{1app}} = \frac{1}{T_{1t}} + \frac{CBF}{\lambda} \quad [3.15]$$

$$\alpha(t) = \frac{m_a^0 - m_a(t)}{2m_a^0} \quad [3.16]$$

### 3.2.2.1. CASL

No método de ASL contínua, o sangue fluindo para o cérebro é continuamente marcado até que um estado estacionário seja atingido (Figura 3.2). Inicialmente, foi proposto o uso de um trem de pulsos de RF para saturar repetidamente os spins da água presente no sangue fluindo através do pescoço (Detre *et al.*, 1992). Os spins saturados então fluem para o cérebro, e supondo que a água seja livremente difusível, fazem trocas com a água do tecido cerebral, reduzindo a magnetização. Logo depois, o método de inversão dos spins baseado na técnica conhecida por *flow-driven adiabatic fast passage* foi proposto (Williams *et al.*, 1992). Nesse caso, a magnetização dos spins movendo através de um gradiente de campo magnético  $G$  com velocidade  $v$  é invertida adiabaticamente se um pulso de RF for usado para aplicar um campo  $B_1$  constante perpendicular ao campo principal e se a seguinte condição for satisfeita:

$$\frac{1}{T_{2a}} \ll \frac{G \cdot v}{B_1} \ll \gamma B_1 \quad [3.17]$$

em que  $T_{2a}$  é o tempo de relaxação transversal do sangue arterial. Se esse pulso for aplicado por alguns segundos no plano de marcação, os spins da água

presente no sangue arterial serão invertidos durante esse período, e um estado estacionário relacionado ao fluxo será atingido.

Normalmente, opta-se pela utilização da inversão ao invés da saturação, já que a inversão contínua produz uma variação do sinal no tecido duas vezes maior do que a saturação contínua. Teoricamente, o grau de marcação (equação 3.16) para a inversão contínua é  $\alpha(t) = 1$ , enquanto para a saturação contínua é  $\alpha(t) = 0,5$ .

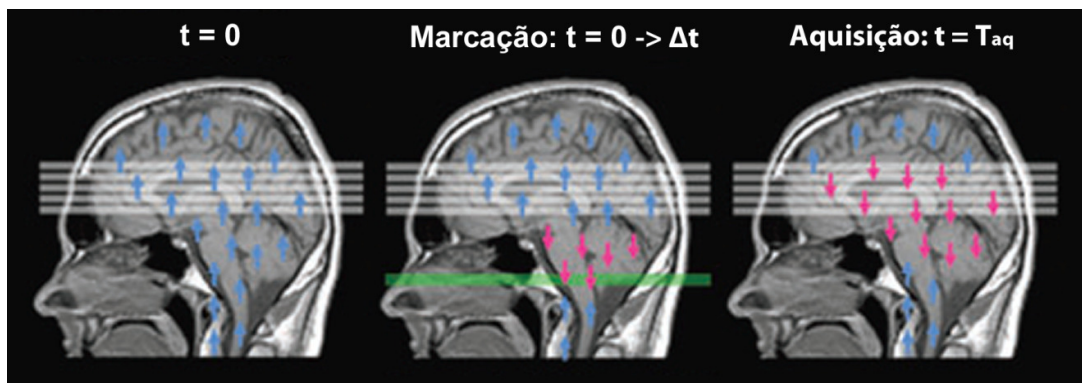


Figura 3.2: Representação esquemática de um experimento de ASL contínua (CASL), em que o sangue é marcado durante um tempo  $\Delta t$  (plano indicado em verde), e as fatias (em branco) são adquiridas no tempo  $T_{aq}$  (adaptada de Petersen *et al.*, 2006).

Devido à relaxação longitudinal que ocorre durante o tempo de trânsito  $\tau$  dos spins desde o plano de marcação até o plano da imagem, o estado de inversão dos spins marcados no plano da imagem não é mais  $\alpha = 1$ . O grau de marcação é dado por:

$$\alpha(\tau) = \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} \quad [3.18]$$

em que  $T_{1a}$  é o tempo de relaxação longitudinal do sangue arterial. Em estudos com pequenos animais,  $\tau$  é pequeno comparado com  $T_{1a}$ , e, portanto não é tão relevante para o cálculo de CBF. Entretanto, em humanos,  $\tau$  não é pequeno

comparado a  $T_{1a}$ , e varia significativamente entre os voxels, criando uma atenuação variável do sinal de ASL. Foi proposto, então, aplicar um tempo de atraso entre a marcação dos spins e a aquisição da imagem, longo o suficiente comparado com os valores de  $\tau$ , para reduzir os efeitos de tempos de trânsito variáveis. Além disso, esse atraso permite que o sangue marcado flua através da fatia da imagem antes da aquisição desta, não havendo contribuição de sangue intravascular para o sinal medido (Alsop; Detre, 1996).

Considerando as soluções da equação 3.14 para os dois estados dos spins, estacionário (spins marcados) e repouso (spins não-marcados), o CBF pode ser calculado por:

$$CBF = \frac{\lambda}{T_{1t}} \frac{M_t^c - M_t^m}{M_t^m + (2\alpha - 1)M_t^c} \quad [3.19]$$

em que  $M_t^c$  e  $M_t^m$  são as magnetizações do tecido durante os períodos de controle (repouso) e marcação dos spins, respectivamente. Nesse caso, todas as grandezas necessárias para calcular o CBF são mensuráveis.

Entretanto, além de ter que considerar o tempo de trânsito nos cálculos de CBF, outro problema surge com o método CASL. A aplicação de um pulso de RF longo, fora da ressonância, causa saturação das macromoléculas do tecido cerebral, que trocam magnetização com a água livre presente no tecido, reduzindo o sinal no plano de aquisição. Algumas alternativas, como a utilização de uma bobina dedicada à marcação, foram propostas para eliminar os efeitos da transferência de magnetização (Detre *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995). No caso da bobina de marcação dedicada, ela é posicionada no pescoço do sujeito. Como o campo  $B_1$  produzido por essa bobina é limitado e não atinge fisicamente o tecido de interesse, nenhum efeito de transferência de magnetização é observado no tecido cerebral, permitindo inclusive a aquisição de múltiplas fatias (Silva *et al.*, 1995).

Observações mais detalhadas sobre os efeitos de transferência de magnetização, determinação do grau de marcação e outros possíveis erros sistemáticos, além das aplicações do método, podem ser encontradas nas revisões de Calamante e colaboradores (Calamante *et al.*, 1999) e Detre e colaboradores (Detre *et al.*, 2009). Apesar dos problemas existentes para quantificar CBF com



CASL, a relação sinal-ruído é maior se comparada com a técnica PASL, descrita a seguir.

### 3.2.2.2. PASL

Os dois maiores problemas encontrados com o uso da técnica CASL (transferência de magnetização e perda da marcação dos spins devido ao tempo de trânsito) são minimizados com a técnica PASL. Ao invés de marcar os spins da água presente no sangue enquanto esse flui através de um plano, PASL consiste em marcar um volume relativamente grande de sangue, em uma região próxima à fatia de interesse, com um pulso de RF curto (Figura 3.3). O volume de sangue então flui em direção ao tecido de interesse durante um tempo TI, após o qual a imagem é adquirida.

Dois métodos foram propostos para a marcação dos spins usando a técnica PASL: FAIR (do inglês *flow-sensitive alternating inversion recovery*) e EPISTAR (do inglês *echo planar imaging and signal targeting with alternating radiofrequency*). No primeiro método, a imagem marcada é adquirida após uma inversão seletiva e a intensidade do sinal é determinada por  $T_{1app}$  (equação 3.15); já a imagem controle é adquirida após uma inversão não-seletiva e não apresenta realce na intensidade do sinal devido ao fluxo (Kwong *et al.*, 1992). Assim, a subtração das duas imagens resulta em um sinal diretamente relacionado com o fluxo (equação 3.20). Com essa técnica, múltiplas fatias podem estar contidas no volume invertido; entretanto, as diferentes fatias estão relacionadas a diferentes tempos de trânsito, o que dificulta a quantificação.

O outro método, EPISTAR, é uma combinação de um pulso de marcação com a aquisição eco-planar. Um volume próximo à fatia da imagem é marcado utilizando um pulso curto de RF de inversão após a fatia de interesse ser saturada. O sangue nesse volume marcado flui em direção à fatia de interesse, e uma imagem é adquirida após um tempo TI. Uma imagem controle é adquirida nas mesmas condições, mas o volume marcado é posicionado distalmente à fatia da imagem ou é realizada uma dupla inversão na mesma região marcada anteriormente (Edelman *et al.*, 1994) (Figura 3.3). Em uma variante desse método, denominado PICORE, a imagem controle é adquirida quando nenhum gradiente de seleção de fatia é usado.

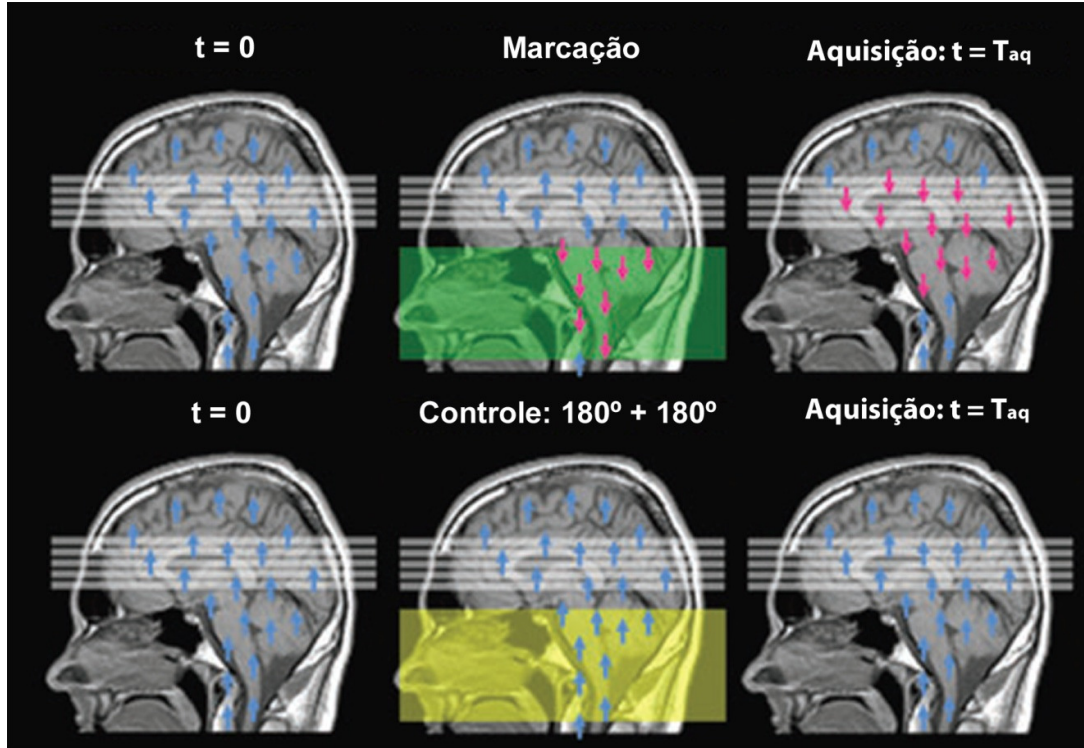


Figura 3.3: Representação esquemática de um experimento de ASL pulsada (PASL - EPISTAR), em que o sangue de um volume relativamente grande é marcado com um pulso de RF curto (plano indicado em verde), e as fatias (em branco) são adquiridas no tempo  $T_{aq} = TI$ . Já as imagens controles são adquiridas após dupla inversão do sangue contido na mesma região marcada anteriormente (adaptada de Petersen *et al.*, 2006).

Com as técnicas de PASL, o método para a quantificação do CBF, levando em consideração as diferenças entre os valores de  $T_1$  do sangue e do tecido, e a eficiência de inversão, é dado por (Calamante *et al.*, 1996):

$$\Delta M_t = 2\alpha_0 M_t^0 \frac{CBF}{\lambda} \left[ \frac{\exp(-TI/T_{1app}) - \exp(-TI/T_{1a})}{1/T_{1a} - 1/T_{1app}} \right] \quad [3.20]$$

Em PASL, a relação sinal-ruído é mais baixa do que em CASL. Entretanto, a eficiência de inversão é mais alta e essencialmente independente da velocidade do fluxo, provavelmente tornando a quantificação do CBF mais precisa (Wong *et al.*, 1998).

### 3.2.2.3. Outros métodos

Outros métodos de ASL foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar as desvantagens dos métodos de CASL e PASL. Um deles é o pCASL (do inglês *pseudocontinuous ASL*) que foi desenvolvido para ter a mesma relação sinal-ruído do método de CASL e mais alta eficiência de marcação, como o método de PASL, reduzindo a deposição de potência (Pollock *et al.*, 2009). Esse método utiliza um trem de pulsos de RF discreto em conjunto com um gradiente aplicado entre dois pulsos consecutivos, para imitar a inversão adiabática usada em CASL. Isso resulta em um equilíbrio melhor entre a eficiência de marcação e a relação sinal-ruído, além de reduzidos efeitos de transferência de magnetização. Entretanto, dependendo da implementação, pCASL é suscetível à homogeneidade de  $B_0$  (Wu *et al.*, 2007).

Enquanto em CASL, PASL e pCASL os spins do sangue fluindo em direção ao cérebro em uma localização específica são invertidos, em VS-ASL (do inglês *velocity-selective ASL*) o sangue que está movendo a uma velocidade maior do que a especificada pelo valor de corte é saturado ou invertido, resultando teoricamente em um menor e mais uniforme atraso para a entrega do sangue no tecido de interesse e permitindo medir CBF em condições de fluxo colateral e mais devagar, como em AVC (Wong *et al.*, 2006). Entretanto, há os problemas de baixa relação sinal-ruído e dificuldade em determinar um valor ideal para a velocidade de corte.

### 3.2.2.4. Considerações Gerais

Como a ASL mede um parâmetro fisiológico independentemente dos parâmetros da seqüência, ela é interessante para estudos multicêntricos ou longitudinais, em sujeitos normais ou em pacientes, e em estudos envolvendo intervenções terapêuticas. Além disso, os magnetos de alto campo e as técnicas mais avançadas para a aquisição das imagens têm melhorado muito a qualidade dos dados de ASL e suas aplicações em ciência básica e clínica.

Recentes revisões discutem com mais detalhes as técnicas de ASL, os problemas envolvidos na quantificação do CBF e suas aplicações (Detre *et al.*, 2009; Petcharunpaisan *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2006; Pollock *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi utilizado o método de ASL contínua (CASL) com uma bobina dedicada à marcação. Dessa maneira, as imagens foram adquiridas com

ótima relação sinal-ruído e sem artefatos devido aos efeitos de transferência de magnetização.

## 4. Fluxo Sangüíneo Cerebral e Territórios Vasculares em Hipertensão

Como discutido no capítulo 2, o rato SHR é um modelo experimental importante no estudo de AVC e outras doenças cerebrovasculares. A presença da hipertensão crônica nesse rato resulta no remodelamento vascular (Amenta *et al.*, 2003), causando alterações nos limites da autoregulação (Fujishima *et al.*, 1984; Harper; Bohlen, 1984) e levando à diminuição da taxa cerebral de utilização de glicose (Katsuta, 1997; Wei *et al.*, 1992), reatividade cerebrovascular ao CO<sub>2</sub> alterada (Nakajima *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 1995), e maior susceptibilidade ao AVC quando comparado com ratos normotensos (Barone *et al.*, 1992; Duverger; MacKenzie, 1988; Hom *et al.*, 2007).

Entretanto, os efeitos crônicos da hipertensão no CBF basal desse modelo animal não são muito claros. Achados contraditórios de valores de CBF basal similares (Tamaki *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1992), menores (Grabowski *et al.*, 1993; Katsuta, 1997) ou maiores (Heinert *et al.*, 1998) em SHR versus WKY foram reportados. Uma razão possível para a discrepância entre esses achados é metodológica. Os vários estudos foram conduzidos sob diferentes condições experimentais, incluindo o uso de animais de diferentes idades e sedados sob diferentes anestésias. Tanto a idade (Dai *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 1991) quanto a anestesia (Hoffman *et al.*, 1991; Scheller *et al.*, 1986; Strebel *et al.*, 1995) tem mostrado afetar o CBF.

Por todas as vantagens discutidas no capítulo anterior, ASL tem emergido como uma ferramenta importante na obtenção de mapas quantitativos de perfusão e no estudo de doenças cerebrovasculares (Detre *et al.*, 1992; Golay *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 1992). Além do CBF, ASL também pode ser usada para mapear os territórios de perfusão das principais artérias cerebrais (Paiva *et al.*, 2007), o que

tem provado ser útil na avaliação da circulação colateral e suas alterações em doença aterosclerótica (Jones *et al.*, 2006) e AVC isquêmico (Hendrikse *et al.*, 2009; van Laar *et al.*, 2007).

Complementar às vantagens da ASL, a angioressonância tem sido usada na identificação de variações patológicas e não-patológicas na anatomia cerebrovascular, em modelos animais (Krucker *et al.*, 2004; Reese *et al.*, 1999) e humanos (Hendrikse *et al.*, 2005; Staroselskaya *et al.*, 2001; van Osch *et al.*, 2006). Assim, a combinação de ASL, para a quantificação do CBF e o mapeamento dos territórios vasculares, e angioressonância pode fornecer informações importantes para o entendimento da vasculatura cerebral e sua resposta a insultos e danos.

Portanto, um dos objetivos do presente estudo foi caracterizar detalhadamente as alterações da morfologia vascular, do CBF basal, da resistência cerebrovascular (RCV) e da reatividade ao CO<sub>2</sub> em ratos hipertensos (SHR), investigando os efeitos da hipertensão e da idade. Tanto o CBF global quanto o regional (no córtex, caudado-putâmen e tálamo) foram quantificados com CASL (capítulo 3), usando uma bobina de marcação dedicada. As medidas foram realizadas durante normocapnia e hipercapnia, com os ratos sob o efeito de dois agentes anestésicos comumente utilizados,  $\alpha$ -chloralose e isoflurano. Além disso, os territórios de perfusão das principais artérias cerebrais também foram obtidos e comparados com variações anatômicas da vasculatura identificadas por angioressonância.

#### 4.1. Territórios Vasculares

O conceito usado para obter a marcação seletiva das artérias está ilustrado na figura 4.1. A combinação do perfil de excitação da bobina de marcação com um plano de marcação oblíquo foi utilizada. O plano de marcação foi definido utilizando um gradiente de marcação  $G_{\text{eff}}$ , que forma com o eixo longitudinal um ângulo  $\theta$ . Devido ao perfil de excitação da bobina de marcação ser limitado, apenas as artérias que passam pela intersecção do plano de marcação com o plano transversal dessa bobina sofrem inversão. Quando um gradiente transversal não é usado ( $\theta = 0^\circ$ ), um experimento regular de CASL é realizado, e as artérias vertebrais e carótidas comuns do lado esquerdo e do direito são submetidas à marcação dos spins.

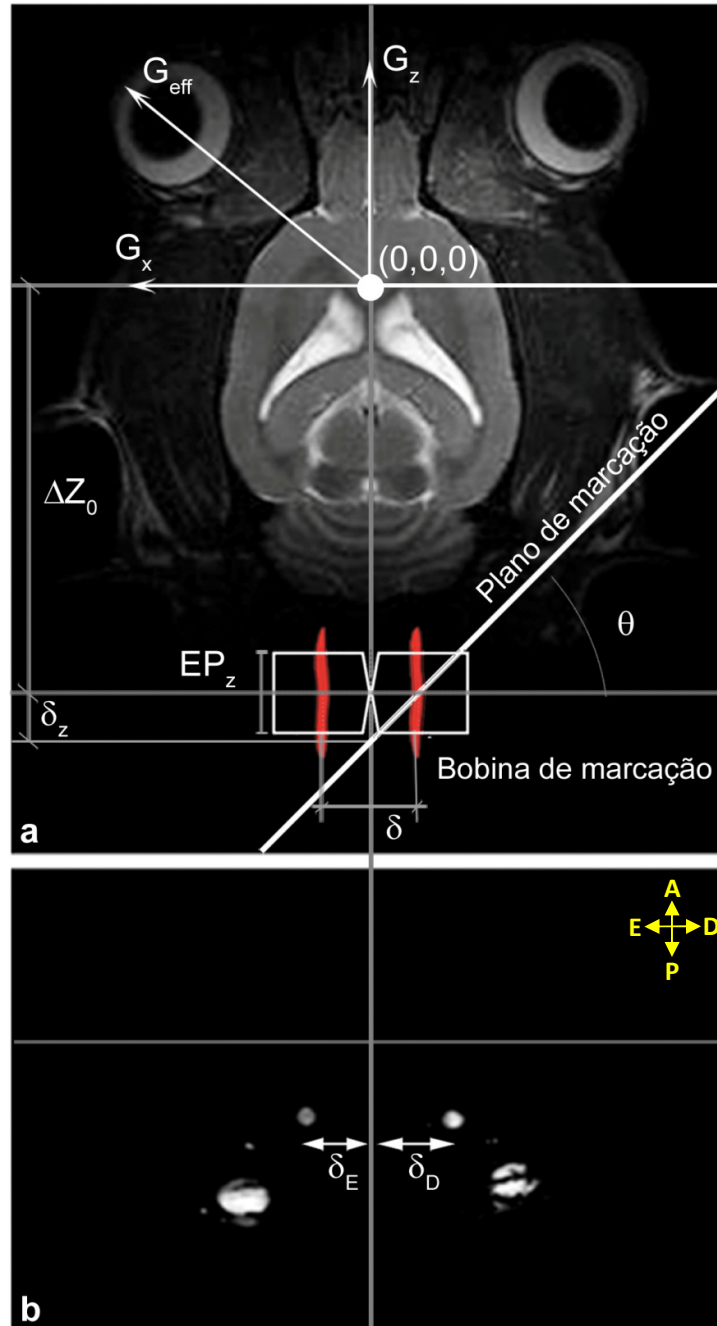


Figura 4.1: (a) Esquema usado para marcar seletivamente o sangue fluindo nas principais artérias que suprem o cérebro. Uma bobina de marcação dedicada (largura  $EP_z$ ) é posicionada sob o pescoço do animal a uma distância  $\Delta z_0$  do isocentro do magneto. O plano de marcação é definido de maneira a marcar apenas as artérias do lado direito ( $\theta > 0^\circ$ ) ou esquerdo ( $\theta < 0^\circ$ ). (b) Imagem do pescoço do rato (corte transversal, no sentido E-D, em relação a (a)), mostrando as artérias carótidas usadas para planejar o esquema de marcação seletiva. ( $\delta$ : distância entre as artérias carótidas comuns, mostradas em vermelho; A: anterior; P: posterior; E: esquerda; D: direita).

Para garantir a validade das condições para eficiente inversão adiabática orientada pelo fluxo, o gradiente de marcação na direção  $z$  foi escolhido para fornecer a melhor eficiência de marcação (Maccotta *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1992) e foi mantido constante em todos os experimentos. Assim, o ângulo  $\theta$  foi definido pela adição de um gradiente na direção  $x$ .

À medida que  $\theta$  aumenta, o sinal de perfusão no hemisfério esquerdo diminui devido à reduzida eficiência de marcação da circulação esquerda; o mesmo princípio pode ser utilizado para reduzir a eficiência de marcação da circulação direita. Assim, quando  $\theta$  é grande o suficiente, apenas as artérias do lado direito ( $\theta > 0^\circ$ ) ou esquerdo ( $\theta < 0^\circ$ ) estão na intersecção entre o plano de marcação e a bobina de marcação, enquanto as artérias localizadas no lado oposto são interceptadas pelo plano de marcação longe e, portanto, fora do alcance da bobina de marcação (Figura 4.1a).

O ângulo mínimo necessário para marcar seletivamente a artéria de interesse depende do perfil de excitação longitudinal efetivo da bobina de marcação,  $EP_z$ , e da distância  $\delta = \delta_E + \delta_D$  entre as artérias de lados opostos (Figura 4.1b). O deslocamento da freqüência do campo de RF utilizado para marcação, considerando a inclinação do plano de marcação é dado por:

$$f_{ASL} = \gamma \cdot G_z \cdot (\Delta z_0 + \delta_z) \quad [4.1]$$

sendo  $\delta_z$  um deslocamento na direção longitudinal calculado a partir de  $\delta_D$  ou  $\delta_E$  de acordo com:

$$\delta_z = \chi \tan\theta, \chi = \begin{cases} \delta_D, & 0^\circ < \theta < 90^\circ \\ \delta_E, & -90^\circ < \theta < 0^\circ \end{cases} \quad [4.2]$$

Como um rato típico de 300g tem suas artérias carótidas comuns separadas por  $\delta = \delta_E + \delta_D \approx 1\text{cm}$  e o perfil de excitação da bobina de marcação é  $EP_z \approx 1.5\text{cm}$ , é necessário utilizar  $\theta > \tan^{-1}\left(\frac{EP_z}{2 \cdot \delta}\right) = 37^\circ$  para começar a diferenciar o território da artéria carótida comum direita do território da artéria esquerda. Em experimentos preliminares, a perfusão no hemisfério contralateral foi em torno de



75% menor do que no hemisfério ipsilateral quando  $\theta = \pm 60^\circ$ . Quando ângulos maiores foram usados, observou-se a introdução de artefatos nas imagens devido à intersecção do gradiente de marcação com a região mais posterior do cérebro. Assim,  $\theta = \pm 60^\circ$  foi utilizado nesses experimentos.

#### 4.2. Teste de Hiperapnia

A hiperapnia é o aumento da pressão parcial de  $\text{CO}_2$  no sangue arterial ( $\text{PaCO}_2$ ), o que leva a uma diminuição do pH perivascular. Como a resistência do músculo liso das paredes dos vasos sangüíneos é sensível a variações do pH na vizinhança, uma diminuição do pH leva a uma diminuição da resistência cerebrovascular, acarretando em vasodilatação. Assim, um aumento da  $\text{PaCO}_2$  causa um aumento global do CBF.

Em estudos de vasorreatividade cerebral, pode-se utilizar o teste de hiperapnia, através de apnéia ou adição de  $\text{CO}_2$  ao gás inalado, com o objetivo de alterar a perfusão cerebral. Dessa forma, utilizando ASL, o CBF pode ser obtido para estados de normocapnia e hiperapnia, e o aumento do CBF devido ao aumento da  $\text{PaCO}_2$  pode ser calculados para diferentes regiões cerebrais.

#### 4.3. Materiais e Métodos

Ratos machos normotensos e hipertensos foram anestesiados com isoflurano (5% para indução, 2% para manutenção), intubados oralmente, ventilados mecanicamente, e equipados com linhas femorais venosa e arterial. Após a cirurgia, os animais foram restritos com a ajuda de pinos de orelha e barra de mordedura, e posicionados no magneto. A temperatura retal foi monitorada e mantida a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  utilizando um sistema com circulação de água. As taxa cardíacas e respiratórias, a concentração de  $\text{CO}_2$  ao final da expiração ( $\text{EtCO}_2$ , do inglês *end tidal CO<sub>2</sub>*), e a saturação de oxigênio arterial ( $\text{SpO}_2$ , do inglês *pulse oximeter oxygen saturation*) foram continuamente monitoradas por meio de oxímetro de pulso (Surgivet, Waukesha, WI, USA).

Os ratos foram separados em dois grupos experimentais. No grupo 1 (N = 12, 6 WKY –  $228 \pm 31$  g, 6 SHR –  $332 \pm 74$  g, 3 – 4 meses de idade), medidas de CBF e

mapeamento dos territórios de perfusão foram realizados sob normocapnia com os ratos anestesiados sob 2% de isoflurano. Angioressonância das artérias cerebrais também foi obtida. No grupo 2, (N = 32, 8 WKY – 235 ± 21 g, 8 SHR – 285 ± 33 g, 3 meses de idade; 8 WKY – 418 ± 23 g, 8 SHR – 402 ± 46 g, 10 meses de idade), mapas de CBF do cérebro todo foram adquiridos durante normocapnia e hipercapnia. Nesse grupo, metade dos animais foi mantida anestesiada sob 2% de isoflurano, e na outra metade, o isoflurano foi substituído por  $\alpha$ -chloralose (80 mg/kg bolus inicial, 27 mg/kg/h infusão contínua) injetada intravenosamente. A concentração de 2% de isoflurano foi necessária para manter os ratos SHR de 10 meses de idade devidamente anestesiados dentro do magneto. Assim, para evitar diferenças introduzidas pelo uso de diferentes níveis de anestesia, essa concentração foi utilizada para todos os ratos anestesiados com isoflurano.

A hipercapnia foi alcançada pela adição de 1,5%, 3%, 4,5%, 6% e 10% de CO<sub>2</sub> ao gás inalado. Um período de cinco minutos entre a troca do nível de CO<sub>2</sub> e o início da aquisição da imagem foi usado. Os gases do sangue arterial foram amostrados no final de cada nível de CO<sub>2</sub> através do cateter inserido na artéria femoral.

Os experimentos de ressonância magnética foram conduzidos em um sistema horizontal de 7T/30cm AVIII (Bruker-Biospin Inc., Billerica, MA), equipado com gradientes com capacidade de 450 mT/m de amplitude (Resonance Research Inc., Billerica, MA). Um sistema com três bobinas construídas no próprio laboratório foi utilizado: uma bobina de transmissão do tipo gaiola com 12 cm de diâmetro interno; uma bobina de superfície para recepção do sinal; e uma bobina de marcação posicionada sob o pescoço do animal (Silva *et al.*, 1995). Todas as bobinas foram equipadas com circuitos de desacoplamento ativo para minimizar as interferências entre elas durante os períodos de marcação e aquisição da imagem, e para minimizar os efeitos da saturação da água na região de aquisição (Zhang *et al.*, 1995).

A posição da bobina de marcação em relação ao isocentro do magneto foi definida através da aquisição de uma imagem sagital e outra coronal do pescoço do animal. A posição  $\Delta z_0$  foi então definida para o pico do perfil longitudinal do sinal gerado pela bobina de marcação. Uma fatia axial adquirida no centro da bobina de marcação, usando uma seqüência gradiente eco com compensação de fluxo (TR =

20 ms, TE = 4,3 ms, ângulo de excitação = 90°), foi usada para determinar as distâncias das carótidas esquerda ( $\delta_E$ ) e direita ( $\delta_D$ ) em relação ao plano  $x = 0$  (Figura 4.1b).

Imagens de perfusão foram adquiridas utilizando CASL-EPI, single-shot, com os seguintes parâmetros: TR = 10000 ms, TE = 28 ms, FOV = 32 x 32 mm<sup>2</sup>, matriz = 64 x 64, largura da fatia = 2 mm, número de fatias = 5. Esses parâmetros resultam em uma resolução espacial de 500  $\mu$ m. Um pulso de radiofrequência de 8183 ms foi aplicado na presença de um gradiente longitudinal de  $G_z = 1$  G/cm na frequência de marcação  $f_{ASL}$  apropriada. Um tempo pós-marcação de 994 ms foi empregado para evitar contaminação intravascular. A potência ideal para conseguir a máxima eficiência de marcação de  $75 \pm 2\%$  foi 2 W. As fatias contíguas foram adquiridas em uma seqüência anterior-posterior para evitar interferências da aquisição na magnetização do sangue marcado. Dezesesseis médias foram adquiridas resultando em um tempo de aquisição de 5 min 30 s.

A angiressonância do cérebro todo foi adquirida usando uma seqüência gradiente eco 2D com compensação de fluxo com os seguintes parâmetros: TR = 30 ms, TE = 4,5 ms, FOV = 19,2 x 19,2 mm<sup>2</sup>, matriz = 192 x 192, ângulo de excitação = 90°. Um conjunto de 218 fatias axiais de 1 mm de espessura, cada uma deslocada ao longo do eixo longitudinal por 0,1 mm em relação à fatia anterior, foi adquirido, resultando em uma resolução isotrópica efetiva de 100  $\mu$ m. Um algoritmo de projeção da máxima intensidade (MIP, do inglês *maximum intensity projection*) foi usado para produzir uma imagem tridimensional.

Mapas quantitativos de CBF, em mL/100g/min, foram calculados para cada nível de CO<sub>2</sub>, utilizando o MATLAB R2009a (The MathWorks, Natick, MA, USA). Para isso, a intensidade do sinal de cada pixel da imagem, durante os períodos de marcação e controle, foram utilizados para o cálculo de CBF pela equação 3.19. A eficiência de marcação foi determinada experimentalmente, e  $\lambda = 0,9$  mL/g (Herscovitch; Raichle, 1985) e  $T_1 = 1,75$  s (Tsekos *et al.*, 1998) foram utilizados nos cálculos.

A RCV, em mmHg/mL/100g/min, foi calculada usando a equação 4.3:

$$RCV = \frac{\text{Pressão Arterial Média}}{CBF} \quad [4.3]$$

A reatividade cerebrovascular ao  $CO_2$ , em %/mmHg, foi calculada usando a equação 4.4:

$$\text{Reatividade ao } CO_2 = 100 \frac{\Delta CBF / CBF_0}{\Delta PaCO_2} \quad [4.4]$$

sendo  $CBF_0$  o valor do fluxo sangüíneo cerebral medido sob normocapnia, e  $CBF$  e  $PaCO_2$  os valores de CBF e da pressão parcial arterial de  $CO_2$  para cada nível de hipercapnia.

Além do CBF global (valor médio obtido de todas as fatias), os fluxos sangüíneos em outras três regiões de interesse (córtex, caudado-putâmen e tálamo), segmentadas manualmente, também foram quantificados (Figura 4.2). Para cada rato, o CBF e a RCV foram calculados para cada nível de  $CO_2$  (seis níveis, de 0 a 10%); já a reatividade foi calculada para  $CO_2$  de 1,5 a 10%, tendo o valor basal (0%  $CO_2$ ) como referência. Depois, os valores foram divididos em dois grupos (normocapnia, para  $PaCO_2 \leq 45$  mmHg; e hipercapnia, para  $PaCO_2 > 60$  mmHg), e as médias foram calculadas para cada grupo de ratos.

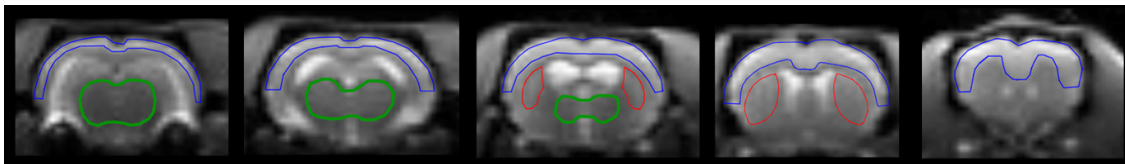


Figura 4.2: Imagens EPI de um rato hipertenso sob isoflurano. Sobrepostas às cinco fatias adjacentes de 2 mm de espessura estão mostradas três regiões de interesse: córtex (azul), caudado-putâmen (vermelho) e tálamo (verde).

Os parâmetros fisiológicos e os valores de CBF, reatividade ao  $CO_2$  e RCV foram comparados por análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc de Bonferroni, ou testes não-paramétricos correspondentes, usando o SYSTAT 12 2007 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). Todos os valores e as barras de erro representam a média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística foi definida em  $P < 0,05$ .

#### 4.4. Resultados e Discussão

##### 4.4.1. Territórios Vasculares

A figura 4.3 mostra imagens anatômicas de um rato SHR adquiridas pela seqüência EPI cobrindo grande parte do cérebro da região posterior para a anterior. Os mapas de CBF adquiridos com  $\theta = 0^\circ$  (Figura 4.3b) apresentaram igual sensibilidade à perfusão nos dois hemisférios, bom contraste entre substância branca e cinzenta, e heterogeneidade em diferentes regiões do cérebro, refletindo provavelmente as diferenças regionais na taxa metabólica (Sokoloff *et al.*, 1977). Os territórios de perfusão esquerdo ( $\theta = -60^\circ$ ) e direito ( $\theta = +60^\circ$ ) estão mostrados na figura 4.3c-d.

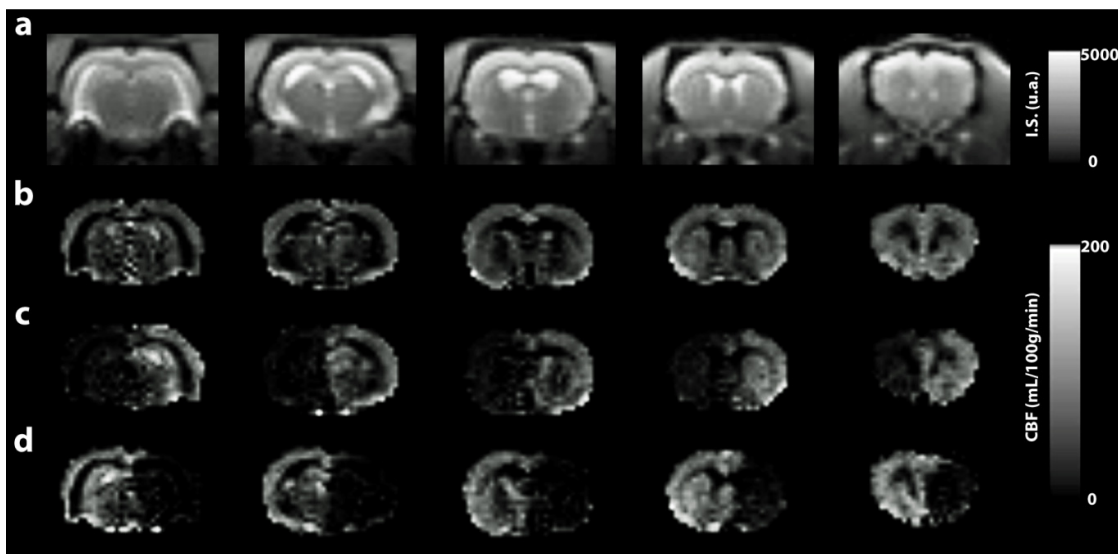


Figura 4.3: (a) Imagens EPI de um rato SHR típico sem marcação. Imagens de perfusão adquiridas usando (b)  $\theta = 0^\circ$ , (c)  $\theta = +60^\circ$  e (d)  $\theta = -60^\circ$ . As barras em tons de cinza expressam os valores da intensidade do sinal em unidades arbitrárias (a) e de CBF em mL/100g/min (b-d).

Os valores de CBF nos hemisférios esquerdo e direito foram similares quando  $\theta = 0^\circ$  (Tabela 4.1;  $P > 0,45$ ), indicando um desempenho uniforme da bobina de

marcação. Entretanto, o uso de  $\theta = \pm 60^\circ$  diminuiu o CBF no lado contralateral, enquanto manteve os valores normais no hemisfério ipsilateral ( $P < 0,01$ ). A atenuação do sinal no hemisfério contralateral variou de 58% a 77%, e foi suficiente para delinear os territórios de perfusão das artérias carótidas comuns em ambos os ratos normotensos e hipertensos.

Tabela 4.1: Fluxo sangüíneo cerebral, em mL/100g/min, nos territórios esquerdo e direito, para  $\theta = 0^\circ$ ,  $-60^\circ$  and  $+60^\circ$ , em ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e hipertensos (SHR) do grupo 1.

|            | $\theta = 0^\circ$ |                | $\theta = -60^\circ$ |                | $\theta = +60^\circ$ |                 |
|------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|-----------------|
|            | <i>Esquerdo</i>    | <i>Direito</i> | <i>Esquerdo*</i>     | <i>Direito</i> | <i>Esquerdo</i>      | <i>Direito*</i> |
| <b>WKY</b> | 86 ± 17            | 84 ± 17        | 80 ± 18              | 32 ± 6         | 34 ± 8               | 80 ± 19         |
| <b>SHR</b> | 147 ± 25           | 147 ± 25       | 144 ± 21             | 38 ± 9         | 35 ± 5               | 149 ± 25        |

\*  $P < 0,01$ , hemisfério marcado versus não-marcado.

Em concordância com estudos recentes em humanos (Hendrikse *et al.*, 2004; van Laar *et al.*, 2006), houve uma grande variabilidade nos territórios de perfusão da circulação anterior e média tanto em ratos normotensos quanto em ratos hipertensos. Como mostrado na figura 4.3, os territórios são complementares, mas não inteiramente simétricos. Para entender se as variações observadas nos territórios poderiam ser atribuídas a variações na vasculatura arterial do cérebro, os mapas de perfusão de cada rato do grupo 1 foram comparados com os respectivos resultados da angioressonância.

A figura 4.4 mostra exemplos da variabilidade dos territórios de perfusão e os angiogramas em cinco ratos, ressaltando a assimetria observada nas regiões das artérias cerebral anterior e talâmica. Na figura 4.4a, um rato WKY apresentou dominância direita das artérias cerebral anterior (ACA) e talâmica (flechas, coluna da direita), evidenciada por uma invasão do território de perfusão direito (verde) sobre o hemisfério esquerdo. Nesse caso, o angiograma mostrou a ACA direita com calibre aumentado (Figura 4.4a, flechas, coluna do meio). Um padrão similar de dominância direita foi observado em um rato SHR (Figura 4.4c, flechas, coluna da direita);

porém, nesse caso, o angiograma mostrou a formação de uma “casa de botão” na ACA direita.

Um padrão diferente observado foi uma dominância alternada na região da ACA de um SHR, em que fatias mais posteriores mostraram uma invasão do território esquerdo sobre o hemisfério direito, enquanto fatias mais anteriores apresentaram padrão inverso (Figura 4.4d, flechas, coluna da direita). O angiograma desse rato mostrou a formação de uma “casa de botão” na ACA direita, explicando a dominância encontrada em fatias mais anteriores, mas não nas posteriores. Entretanto, essa inversão nas fatias posteriores pode estar relacionada com vasos menores contribuindo assimetricamente para o lado esquerdo da ACA.

Outro padrão de assimetria é a significativa contribuição da ACA esquerda na perfusão do hemisfério direito (dominância esquerda), observado em WKY (Figura 4.4b) e SHR (Figura 4.4e). Os respectivos angiogramas mostraram maior calibre ou formação de uma “casa de botão” na ACA esquerda. Além disso, esses dois ratos também apresentaram assimetrias na região da artéria talâmica.

Portanto, como houve uma boa correlação entre as variações dos territórios e as variações no círculo de Willis identificadas por angioressonância, os dados sugerem que as assimetrias nos territórios vasculares são provavelmente causadas por variações anatômicas do círculo de Willis.

Todas as variações anatômicas observadas estavam presentes em ratos normotensos e hipertensos. Levando em consideração o tamanho limitado do grupo de ratos, a assimetria mais comumente observada foi no território da ACA (10/12 animais). No geral, seis animais (4 WKY e 2 SHR) apresentaram dominância direita, enquanto outros três animais (2 WKY e 1 SHR) apresentaram dominância esquerda. Um SHR apresentou dominância alternada e os dois SHR restantes não apresentaram dominância na região da ACA. Esses resultados são relevantes, pois, no caso da oclusão da artéria cerebral média (ACM), a ACA é a principal artéria no fornecimento de fluxo colateral aos territórios isquêmicos nos ratos. Assim, o entendimento da configuração do círculo de Willis pode ser importante para elucidar ou mesmo prever variações na extensão da região isquêmica após insulto. Outra assimetria interessante foi observada no território dos núcleos periventriculares do tálamo e hipotálamo (5/12 animais: 3 WKY e 2 SHR); entretanto, os dados de angirressonância não puderam elucidar variações anatômicas naquela região. Angiogramas com melhor resolução espacial serão necessários para esse fim.

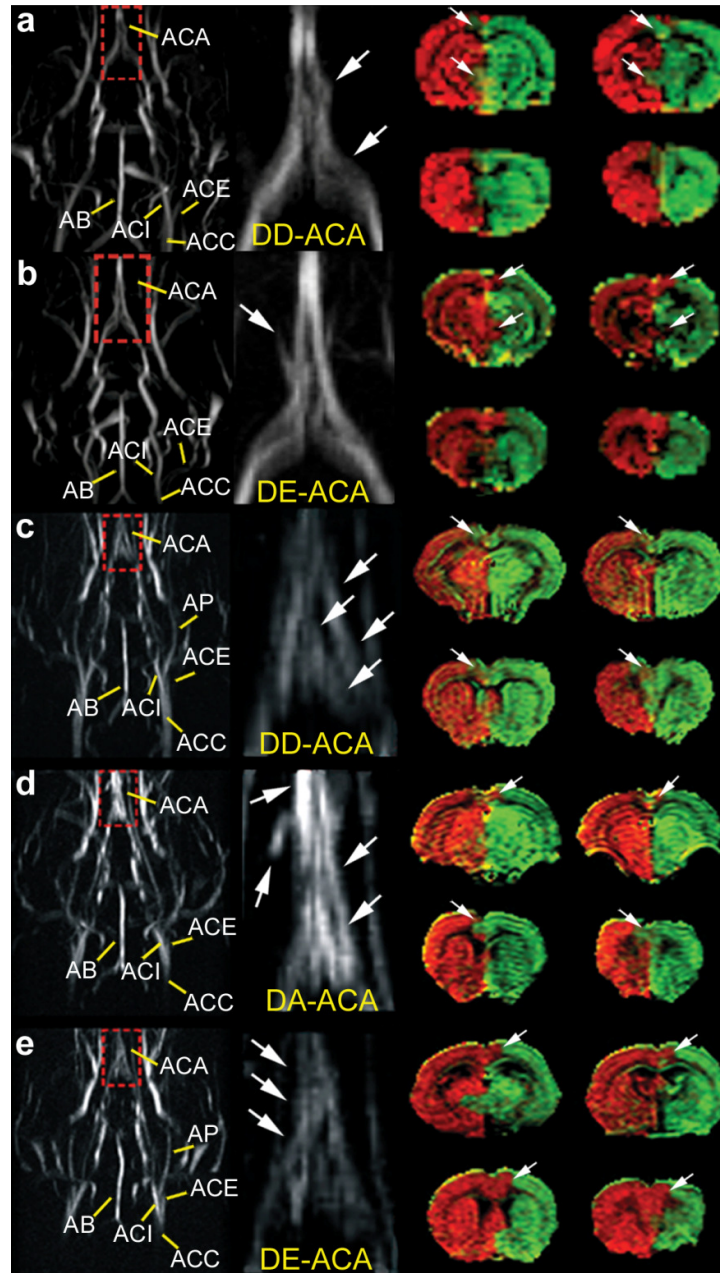


Figura 4.4: Comparação dos territórios de perfusão com os angiogramas de ratos (a-b) WKY e (c-e) SHR. A primeira coluna mostra os angiogramas. Imagens mais detalhadas da parte anterior do círculo de Willis (coluna do meio) mostram variações (flechas) que podem explicar as assimetrias observadas nos mapas dos territórios vasculares (coluna da direita, flechas). Verde: território de perfusão direito; vermelho: território de perfusão esquerdo; DE: dominância esquerda; DD: dominância direita; DA: dominância alternada; ACA: artéria cerebral anterior; AB: artéria basilar; ACC: artéria carótida comum; ACE: artéria carótida externa; ACI: artéria carótida interna; AP: artéria pterigopalatina.



#### 4.4.2. CBF, RCV e Reatividade ao CO<sub>2</sub>

Para avaliar o efeito da hipertensão e da idade na reatividade e na resistência cerebrovasculares, diferentes níveis de CO<sub>2</sub> foram adicionados ao gás respirado pelos ratos. Uma vez que os ratos estavam dentro do magneto, a taxa respiratória e a quantidade de oxigênio no gás respirado foram ajustadas para cada animal para trazer os gases do sangue arterial para condições fisiológicas normais. Posteriormente, os parâmetros de respiração foram fixos e, durante o restante do experimento, a taxa cardíaca, a temperatura retal, SpO<sub>2</sub> e EtCO<sub>2</sub> foram monitorados continuamente. Os gases do sangue arterial foram periodicamente analisados após a medida de CBF para cada nível de CO<sub>2</sub>.

Os parâmetros fisiológicos sob normocapnia (PaCO<sub>2</sub> ≤ 45 mmHg) e hipercapnia (PaCO<sub>2</sub> > 60 mmHg) estão listados na tabela 4.2. A pressão sangüínea arterial média foi mais alta em SHR do que em WKY (P < 0,05), e para todos os grupos de ratos esses valores sob α-chloralose foram mais altos do que sob isoflurano (P < 0,05). Durante hipercapnia, PaCO<sub>2</sub> aumentou e o pH do sangue diminuiu quando comparados com os valores durante normocapnia (P < 0,05).

A reprodutibilidade das medidas de CBF no mesmo animal foi avaliada medindo o CBF duas vezes em cada rato sob normocapnia. As diferenças percentuais médias foram similares entre os grupos de ratos e as anestésias, com médias globais de 9% e 13% para ratos sob α-chloralose e isoflurano, respectivamente. A consistência das medidas de CBF entre os animais no mesmo grupo também foram similares entre os grupos de ratos e as anestésias, sendo 16% para ratos sob α-chloralose e 20% para ratos sob isoflurano. Esses valores indicam boa reprodutibilidade das medições de CBF (Danker; Duong, 2007; Duong *et al.*, 2000).

Adição de CO<sub>2</sub> aumentou significativamente o CBF em todos os grupos de animais sob ambas as anestésias (Figura 4.5). Sob α-chloralose, uma relação linear entre CBF e PaCO<sub>2</sub> foi observada para todas as regiões analisadas. A figura 4.5a mostra as curvas para o CBF global nos quatro grupos de animais. Durante normocapnia, não houve diferença no CBF entre as regiões cerebrais ou entre os ratos normotensos e hipertensos (Figura 4.6a). Esse resultado está de acordo com estudos anteriores com animais anestesiados sob chloralose-uretano (Alson *et al.*, 1985) ou barbitúricos (Tamaki *et al.*, 1995), e indica autoregulação cerebral normal

em SHR sob  $\alpha$ -chloralose. Os valores médios de CBF global foram  $61 \pm 3$  mL/100g/min para WKY jovens,  $62 \pm 4$  mL/100g/min para WKY adultos;  $70 \pm 9$  mL/100g/min para SHR jovens, e  $69 \pm 8$  mL/100g/min para SHR adultos.

Tabela 4.2: Parâmetros fisiológicos em condições basais ( $\text{PaCO}_2 \leq 45$  mmHg) e sob hipercapnia ( $\text{PaCO}_2 > 60$  mmHg), para os quatro grupos de ratos, sob as duas diferentes anestésias.

|                                       | Nível de<br>CO <sub>2</sub> | pH                         | PaCO <sub>2</sub><br>(mmHg) | PaO <sub>2</sub><br>(mmHg) | SPO <sub>2</sub> | Pressão arterial<br>média (mmHg) |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|
| <i><math>\alpha</math>-Chloralose</i> |                             |                            |                             |                            |                  |                                  |
| WKY jovem                             | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 42 $\pm$ 3                  | 111 $\pm$ 7                | 88 $\pm$ 5       | 137 $\pm$ 11                     |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 83 $\pm$ 19 <sup>§</sup>    | 120 $\pm$ 9                | 84 $\pm$ 11      | 117 $\pm$ 15                     |
| WKY adulto                            | Normocapnia                 | 7,5 $\pm$ 0,1              | 38 $\pm$ 5                  | 134 $\pm$ 24               | 92 $\pm$ 1       | 150 $\pm$ 6                      |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,3 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 81 $\pm$ 16 <sup>§</sup>    | 130 $\pm$ 20               | 93 $\pm$ 4       | 118 $\pm$ 9 <sup>§</sup>         |
| SHR jovem                             | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 38 $\pm$ 5                  | 141 $\pm$ 14               | 95 $\pm$ 2       | 176 $\pm$ 11 <sup>†</sup>        |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 81 $\pm$ 17 <sup>§</sup>    | 135 $\pm$ 11               | 92 $\pm$ 1       | 143 $\pm$ 12 <sup>‡§</sup>       |
| SHR adulto                            | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 35 $\pm$ 15                 | 136 $\pm$ 9                | 95 $\pm$ 1       | 193 $\pm$ 17 <sup>†</sup>        |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 79 $\pm$ 14 <sup>§</sup>    | 128 $\pm$ 12               | 93 $\pm$ 2       | 159 $\pm$ 15 <sup>‡§</sup>       |
| <i>Isoflurano</i>                     |                             |                            |                             |                            |                  |                                  |
| WKY jovem                             | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 37 $\pm$ 5                  | 152 $\pm$ 16 <sup>†</sup>  | 94 $\pm$ 4       | 68 $\pm$ 8 <sup>†</sup>          |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 79 $\pm$ 17 <sup>§</sup>    | 159 $\pm$ 12 <sup>†</sup>  | 90 $\pm$ 5       | 64 $\pm$ 7 <sup>†</sup>          |
| WKY adulto                            | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 37 $\pm$ 4                  | 146 $\pm$ 15               | 94 $\pm$ 4       | 93 $\pm$ 18 <sup>†</sup>         |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 78 $\pm$ 16 <sup>§</sup>    | 137 $\pm$ 9                | 94 $\pm$ 3       | 83 $\pm$ 8 <sup>†</sup>          |
| SHR jovem                             | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 36 $\pm$ 3                  | 156 $\pm$ 14               | 94 $\pm$ 1       | 116 $\pm$ 25 <sup>††</sup>       |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 72 $\pm$ 15 <sup>§</sup>    | 134 $\pm$ 19 <sup>‡§</sup> | 90 $\pm$ 4       | 114 $\pm$ 12 <sup>††</sup>       |
| SHR adulto                            | Normocapnia                 | 7,4 $\pm$ 0,1              | 38 $\pm$ 4                  | 127 $\pm$ 11 <sup>†</sup>  | 93 $\pm$ 2       | 104 $\pm$ 22 <sup>†</sup>        |
|                                       | Hipercapnia                 | 7,2 $\pm$ 0,1 <sup>§</sup> | 73 $\pm$ 12 <sup>§</sup>    | 146 $\pm$ 7                | 94 $\pm$ 1       | 107 $\pm$ 11 <sup>†</sup>        |

\* versus ratos jovens da mesma raça; <sup>†</sup> versus ratos normotensos da mesma idade; <sup>§</sup> versus ratos do mesmo grupo sob normocapnia; <sup>††</sup> versus  $\alpha$ -chloralose; P < 0,05.

Durante hipercapnia, os valores médios de CBF para todas as regiões do cérebro aumentaram significativamente em relação à normocapnia, porém os

valores novamente não foram diferentes entre os grupos de ratos (CBF global – WKY jovens:  $108 \pm 21$  mL/100g/min; WKY adultos:  $98 \pm 16$  mL/100g/min; SHR jovens:  $131 \pm 39$  mL/100g/min; SHR adultos:  $114 \pm 25$  mL/100g/min).

Sob isoflurano, houve uma clara saturação do CBF para níveis de PaCO<sub>2</sub> maiores do que 70 mmHg em ambos os ratos jovens e adultos (Figura 4.5b), independentemente dos valores absolutos de CBF, sugerindo que 2% de isoflurano interfere com os mecanismos vasodilatadores do CO<sub>2</sub>. O mesmo comportamento foi observado para o córtex, caudado-putâmen e tálamo. Suportando esses resultados, Sicard e colaboradores observaram uma atenuação da resposta do CBF a 5% e 10% de CO<sub>2</sub> em ratos anestesiados com 2% de isoflurano comparados com ratos acordados (Sicard *et al.*, 2003), e concluíram que a reatividade cerebrovascular ao CO<sub>2</sub> é fortemente inibida pelo isoflurano. McPherson e colaboradores também observaram resistência e reatividade ao CO<sub>2</sub> reduzidas em cachorros anestesiados com concentração de isoflurano maior do que 2% (McPherson *et al.*, 1989).

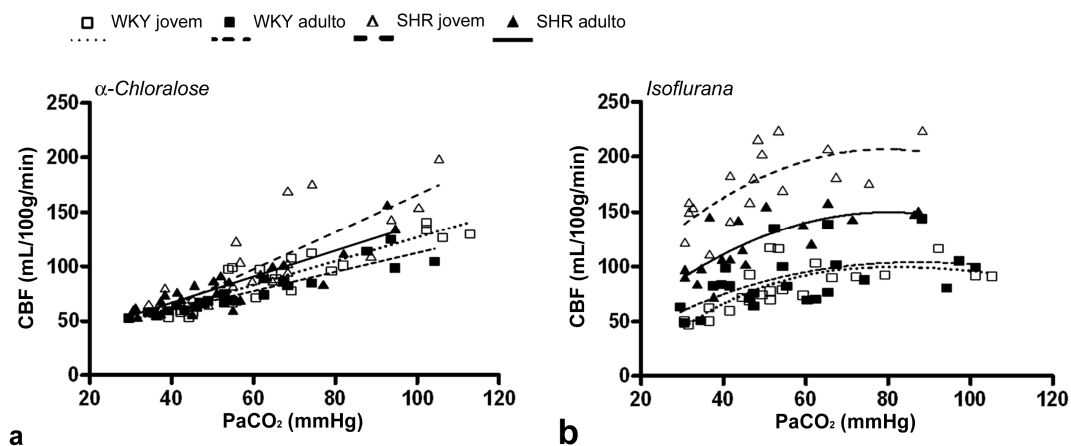


Figura 4.5: Relação entre o fluxo sangüíneo cerebral (CBF) global e a pressão parcial arterial de CO<sub>2</sub> (PaCO<sub>2</sub>) em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) anestesiados com (a)  $\alpha$ -chloralose e (b) isoflurano. Enquanto o CBF aumenta linearmente com a PaCO<sub>2</sub> em ratos sob  $\alpha$ -chloralose ( $r > 0.8$ ), é notável uma saturação do CBF para níveis de PaCO<sub>2</sub> maiores que 70 mmHg em ratos sob isoflurano (ajuste polinomial).

Os valores basais de CBF obtidos sob isoflurano foram consistentes com valores medidos em estudos anteriores (Danker; Duong, 2007; Heinert *et al.*, 1998; Kusuda *et al.*, 1996). Durante normocapnia, os valores de CBF nos grupos de SHR jovens e adultos sob isoflurano foram significativamente mais altos do que nos respectivos grupos de ratos sob  $\alpha$ -chloralose (Figura 4.6b), indicando que o isoflurano interfere com a autoregulação cerebral. Porém, não houve diferença entre as duas anestésias nos valores de CBF em ratos WKY sob normocapnia, sugerindo que os efeitos do isoflurano são mais relevantes nos animais hipertensos.

Os ratos SHR jovens apresentaram valores de CBF significativamente mais altos do que ratos WKY em todas as regiões cerebrais analisadas, durante normocapnia (Figura 4.6b) (CBF global – SHR jovens:  $139 \pm 25$  mL/100g/min; WKY jovens:  $55 \pm 9$  mL/100g/min; WKY adultos:  $71 \pm 19$  mL/100g/min,  $P < 0,05$ ), e durante hipercapnia (CBF global – SHR jovens:  $194 \pm 22$  mL/100g/min; WKY jovens:  $91 \pm 12$  mL/100g/min; WKY adultos:  $94 \pm 26$  mL/100g/min,  $P < 0,05$ ). Por outro lado, o grupo de SHR adultos apresentou valor médio de CBF similar ao de SHR jovens sob normocapnia ( $104 \pm 23$  mL/100g/min, para o cérebro todo;  $P < 0,05$ ); porém, menor sob hipercapnia ( $135 \pm 15$  mL/100g/min, para o cérebro todo;  $P < 0,05$ ). Esse resultado indica que a idade aumenta os efeitos da hipertensão no comprometimento da reatividade cerebrovascular ao  $\text{CO}_2$ .

Em relação aos valores médios da RCV, nenhuma diferença significativa foi observada entre as regiões cerebrais para os ratos sob  $\alpha$ -chloralose (Figura 4.6c) e isoflurano (Figura 4.6d). Sob  $\alpha$ -chloralose, o valor médio global da resistência em SHR adultos, durante normocapnia ( $2,8 \pm 0,4$  mmHg/mL/100g/min), foi significativamente maior do que em ratos normotensos jovens ( $2,2 \pm 0,2$  mmHg/mL/100g/min,  $P < 0,05$ ); porém, não foi diferente do que nos outros grupos (WKY adultos:  $2,4 \pm 0,2$  mmHg/mL/100g/min; SHR jovens:  $2,5 \pm 0,2$  mmHg/mL/100g/min).

O aumento na resistência cerebrovascular em animais hipertensos foi reportado recentemente como um mecanismo protetor do cérebro (Gonzalez *et al.*, 2008). Ele desempenha um papel importante na manutenção do CBF dentro de valores normais, protegendo o cérebro contra o desenvolvimento de AVC hemorrágico. De fato, no presente estudo, quando a resistência cerebrovascular foi reduzida devido ao uso de isoflurano, os valores de CBF aumentaram substancialmente em SHR (Figura 3b).

Já durante hipercapnia, a pressão sangüínea arterial diminuiu enquanto o CBF aumentou, diminuindo significativamente a RCV em todos os grupos de ratos quando comparada com os valores sob normocapnia (média global – WKY jovens:  $1,1 \pm 0,3$  mmHg/mL/100g/min; WKY adultos:  $1,2 \pm 0,3$  mmHg/mL/100g/min; SHR jovens:  $1,2 \pm 0,4$  mmHg/mL/100g/min; SHR adultos:  $1,5 \pm 0,4$  mmHg/mL/100g/min,  $P < 0,05$ ).

Sob isoflurano (Figura 4.6d), os valores da RCV foram significativamente mais baixos do que os valores em ratos anestesiados com  $\alpha$ -chloralose ( $P < 0,05$ ). Além disso, a resistência dos SHR e WKY de ambas as idades não foram diferentes durante normocapnia ou hipercapnia, mostrando que 2% de isoflurano mascararam completamente os efeitos da hipertensão na elevação da RCV.

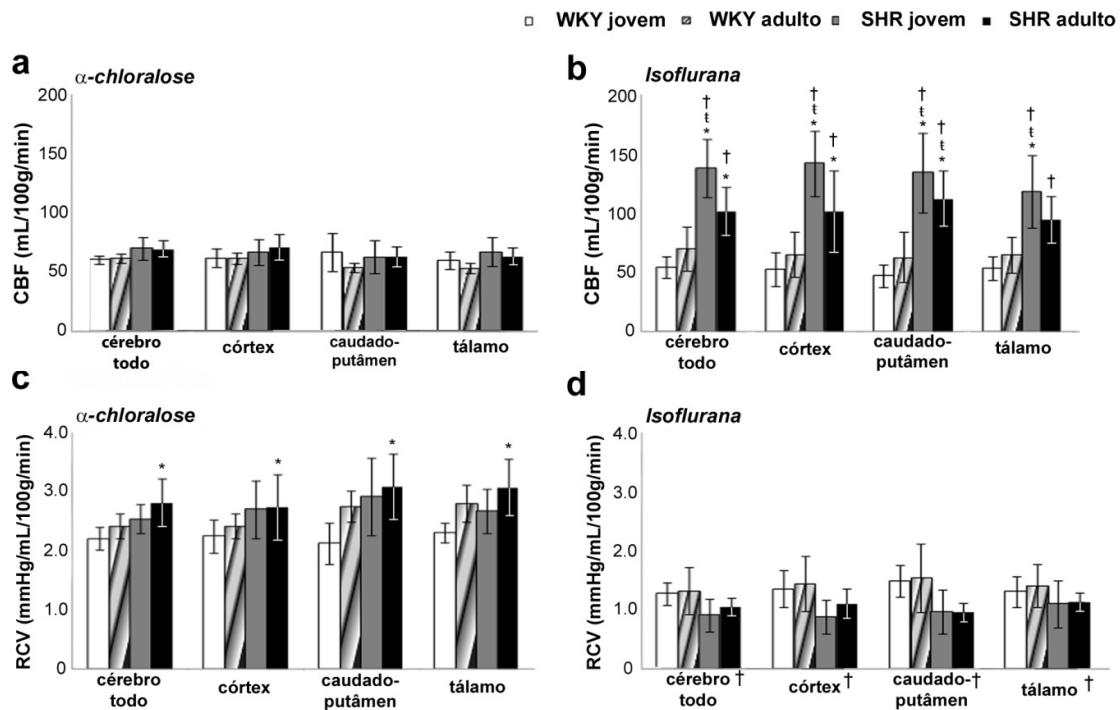


Figura 4.6: Valores médios de CBF (a-b) e resistência cerebrovascular (c-d) para ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR), sob  $\alpha$ -chloralose e isoflurano. (\* vs. WKY jovem; † vs. WKY adulto; † vs.  $\alpha$ -chloralose;  $P < 0,05$ ).

Os valores médios da reatividade ao CO<sub>2</sub>, calculados pela equação 4.4, estão mostrados na Figura 4.7. Sob  $\alpha$ -chloralose, os valores estão de acordo com a literatura (Bakalova *et al.*, 2001); porém, nenhuma diferença foi observada entre as regiões cerebrais, diferentemente de um estudo recente que mostrou reatividade maior no córtex do que em estruturas subcorticais (Lu *et al.*, 2009). Entretanto, sob isoflurano, a reatividade no caudado-putâmen foi significativamente menor do que no córtex, mas apenas para ratos hipertensos adultos (P < 0,05). Além disso, sob ambas as anestésias, a reatividade ao CO<sub>2</sub> nesses ratos foi significativamente menor (P < 0,05), indicando um comprometimento da reatividade cerebrovascular relacionado ao envelhecimento em ratos hipertensos.

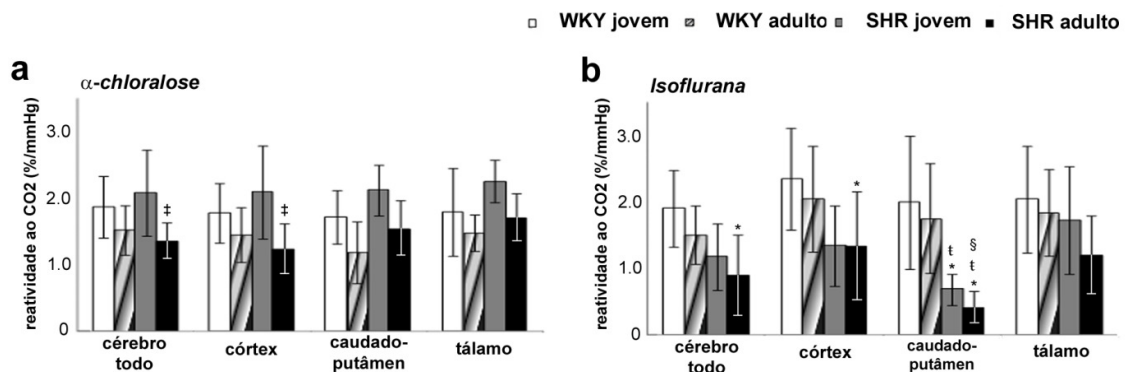


Figura 4.7: Valores médios da reatividade cerebrovascular ao CO<sub>2</sub> para ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR), sob (a)  $\alpha$ -chloralose e (b) isoflurano. (\* vs. WKY jovem; † vs. WKY adulto; ‡ vs. SHR jovem; § vs. córtex do mesmo grupo de ratos; P < 0,05).

#### 4.5. Considerações Gerais

Modelos animais de hipertensão, como o SHR, têm um papel importante no estudo de AVC e outras doenças cerebrovasculares (Amenta *et al* 2003; Mitschelen *et al* 2009). Contudo, um estudo detalhado dos territórios vasculares em SHR, e os efeitos da anestesia no CBF basal e na reatividade ao dióxido de carbono ainda estava para ser realizado. No presente estudo, a técnica de ASL foi utilizada em conjunto com a angioressonância para a realização de um mapeamento dos

territórios de perfusão, e obtenção dos valores quantitativos de CBF, RCV e reatividade ao CO<sub>2</sub>, em ratos normotensos e hipertensos, sob duas anestésias comumente utilizadas,  $\alpha$ -chloralose e isoflurano. Os principais resultados foram: (1) ambos WKY e SHR possuem territórios de perfusão das carótidas comuns complementares, porém assimétricos e correlacionados com variações no círculo de Willis; (2)  $\alpha$ -chloralose e isoflurano exercem efeitos diferentes na fisiologia e no CBF dos animais, e (3) hipertensão e idade alteram significativamente a resistência e a reatividade cerebrovasculares.

O mapeamento do território vascular é uma ferramenta promissora no estudo de doenças cerebrovasculares (Paiva *et al.*, 2007; van Laar *et al.*, 2008). Nesse contexto, o uso de ASL tem as vantagens de não requerer injeção de agentes de contraste e permitir medições múltiplas em uma única visita clínica ou em várias visitas. O método descrito aqui tem sido aplicado com sucesso em humanos (Paiva *et al.* 2008). Um fator determinante da qualidade na obtenção dos territórios de perfusão é a seletividade da marcação. A alta seletividade do método utilizado permitiu ótima separação dos territórios esquerdo e direito do cérebro do rato na mesma sessão experimental e sem a necessidade de reposicionar o animal, já que a bobina de marcação cobriu ambas as carótidas esquerda e direita do pescoço.

Além disso, o presente estudo foi desenvolvido com os animais sob efeito de anestésias. A anestesia é uma ferramenta necessária na preparação experimental para garantir a complacência e aliviar a dor dos animais. Entretanto, agentes anestésicos têm efeitos na fisiologia sistêmica e no estado fisiológico do cérebro, introduzindo alterações e dificultando a interpretação dos dados. Enquanto o isoflurano é uma anestesia comumente usada nas pesquisas experimentais, ele diminui a pressão sangüínea sistêmica, reduzindo significativamente a resistência vascular (Eger, 1984). Consistente com seu potente efeito sistêmico, pressões arteriais mais baixas foram observadas em ambas as raças de ratos anestesiados com isoflurano, quando comparadas com  $\alpha$ -chloralose, uma anestesia que preserva a pressão arterial sistêmica. Além disso, o isoflurano eliminou a diferença nas pressões arteriais entre SHR e WKY adultos. Por outro lado, sob  $\alpha$ -chloralose, os grupos de SHR de ambas as idades apresentaram pressão sangüínea arterial mais alta do que seus respectivos grupos de WKY, demonstrando que, aos três meses de idade, a hipertensão nos SHR já está completamente estabelecida.

Os diferentes efeitos das duas anestésias na fisiologia sistêmica foram traduzidos em diferentes efeitos cerebrovasculares. Sob  $\alpha$ -chloralose, não houve diferença no CBF basal entre ratos normotensos e hipertensos, indicando que essa anestesia não prejudica a autoregulação em SHR. Por outro lado, o isoflurano aumentou o CBF basal em SHR, reduziu significativamente a RCV em todos os ratos e mascarou os efeitos da hipertensão na sua elevação. Em conjunto, esses achados indicam que o isoflurano altera a autoregulação cerebral, o que está de acordo com estudos anteriores em ratos (Hoffman *et al.*, 1991), cachorros (McPherson *et al.*, 1989; McPherson; Traystman, 1988), macacos (Van Aken *et al.*, 1986) e humanos (Strebel *et al.*, 1995); e mostram a importância em usar cautela na interpretação de resultados obtidos sob essa anestesia.

Em relação aos efeitos da hipertensão e da idade na resposta cerebrovascular, há evidências de que o envelhecimento normal leva à redução da resposta vascular aos estímulos vasodilatadores (Riecker *et al.*, 2003; Tamaki *et al.*, 1995), ao mesmo tempo em que a hipertensão acelera o enrijecimento vascular que ocorre naturalmente devido ao envelhecimento (Feihl *et al.*, 2009). Comparados com os WKY jovens, os WKY adultos mostraram uma tendência à elevada RCV e reduzida reatividade ao CO<sub>2</sub>, porém os resultados não foram estatisticamente significativos. Entretanto, SHR adultos apresentaram reatividade ao CO<sub>2</sub> significativamente reduzida sob ambas as anestésias, o que pode ser explicado pela combinação dos efeitos da hipertensão e do envelhecimento em limitar as respostas dos vasos cerebrais. Esses resultados foram publicados recentemente (Leoni *et al.*, 2011).



## 5. CBF Funcional

Métodos modernos de neuroimagem, como a imagem por ressonância magnética funcional (IRMf) (Ogawa *et al.*, 1992), a tomografia por emissão de pósitrons (Phelps *et al.*, 1982) e a imagem óptica de sinais intrínsecos (Lieke *et al.*, 1989), têm um papel significativo na investigação da organização do cérebro em relação às unidades funcionais do córtex cerebral. Essas modalidades de imagem baseiam-se no acoplamento neurovascular para indiretamente mapear a atividade neural medindo variações hemodinâmicas no fluxo, volume ou oxigenação do sangue no cérebro (Villringer; Dirnagl, 1995). Por ainda não estar claro até que ponto os sinais hemodinâmicos são capazes de mapear populações neuronais, contínuos estudos para o entendimento da evolução espacial e temporal da resposta hemodinâmica são essenciais para aumentar a aplicabilidade das neuroimagens no estudo da organização funcional cerebral.

A habilidade de medir e quantificar corretamente o CBF através de IRM é um fator importante para o entendimento da função cerebral. A ASL, descrita detalhadamente no capítulo 3, é uma técnica que permite medições quantitativas do CBF basal do cérebro todo e o mapeamento dos territórios de perfusão das principais artérias cerebrais (Golay *et al.*, 2007; Leoni *et al.*, 2011; Paiva *et al.*, 2008). Entretanto, em ASL, os parâmetros necessários para calcular o CBF são normalmente medidos em experimentos separados, dificultando a análise dinâmica de variações rápidas no fluxo como aquelas associadas com a ativação funcional do cérebro.

Uma maneira de obter medidas rápidas de CBF é usar a técnica de ASL dinâmica (DASL) (Barbier *et al.*, 2001b; Silva; Paiva, 2009), que tem melhor resolução temporal, permitindo medir variações nas respostas hemodinâmicas devido à estimulação. No presente estudo, DASL foi usada para simultaneamente medir o CBF basal, os territórios de perfusão, o tempo de trânsito do sangue

marcado desde o plano de marcação até o local da aquisição, e as respostas hemodinâmicas à estimulação somatosensorial em ratos, normotensos e hipertensos, anestesiados com  $\alpha$ -chloralose.

### 5.1. DASL

Em ASL, a magnetização longitudinal do tecido cerebral pode ser descrita pela equação de Bloch, modificada para incluir os efeitos do CBF, que já foi apresentada no capítulo 3 (equação 3.14):

$$\frac{dM_t(t)}{dt} = \frac{M_t^0 - M_t(t)}{T_{1app}} - 2\alpha(t) \frac{CBF}{\lambda} M_t^0 \quad [5.1]$$

sendo  $M_t$  a magnetização do tecido cerebral por grama de tecido;  $M_t^0$  o valor de equilíbrio de  $M_t$ ;  $\lambda$  o coeficiente de partição da água entre o tecido e o sangue, definido como a razão da quantidade de água por grama de tecido pela quantidade de água por mL de sangue; e  $T_{1app}$  o tempo de relaxação longitudinal aparente para a água no tecido na presença de perfusão (equação 3.15).

Uma maneira eficiente de conseguir medir dinamicamente o CBF com ASL é impor uma variação sistemática e periódica do grau de marcação  $\alpha(t)$  (Barbier *et al.*, 1999; Barbier *et al.*, 2001b). Essa variação periódica em  $\alpha(t)$  causa variação periódica na magnetização do tecido, e uma análise temporal da resposta do tecido fornece uma quantificação dinâmica de  $T_{1app}$ , tempo de trânsito  $\tau$  e CBF. A análise dinâmica pode ser introduzida simplesmente permitindo que o grau de marcação  $\alpha(t)$  seja uma função periódica dependente do tempo. Assim, a evolução da magnetização do tecido cerebral, depois do estado estacionário ser atingido, de um sistema sujeito a uma variação temporal da função de marcação é dada por (Barbier *et al.*, 1999):

$$M_t(t) = M_t^0 - 2\alpha(t)M_t^0 \frac{CBF}{\lambda} e^{-\tau/T_{1a}} \otimes e^{-(t-\tau)/T_{1app}} \quad [5.2]$$

sendo que  $\otimes$  indica a convolução. É importante notar que independentemente da função de marcação, a resposta do tecido tem um deslocamento temporal introduzido pelo tempo de trânsito  $\tau$ .

Teoricamente, a função de marcação pode ser definida arbitrariamente desde que os spins arteriais possam ser invertidos adequadamente. Assim, ela pode ser escolhida de acordo com o objetivo do experimento. Por exemplo, o uso de uma função de marcação quadrada periódica, com período  $2\Delta$ , definida como:

$$\alpha(t) = \begin{cases} \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} & , \quad 0 < t \leq \Delta \\ 0 & , \quad \Delta < t \leq 2\Delta \end{cases} \quad [5.3]$$

irá produzir uma resposta na magnetização do tecido dada por:

$$\begin{aligned} M_t(\tau < t \leq \Delta + \tau) &= M_t^0 \left\{ 1 - 2T_{1app} \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} \frac{CBF}{\lambda} \times \right. \\ &\quad \left. \left[ \frac{(1 - e^{-\Delta/T_{1app}}) e^{-(t-\tau)/T_{1app}}}{e^{\Delta/T_{1app}} - e^{-\Delta/T_{1app}}} + (1 - e^{-(t-\tau)/T_{1app}}) \right] \right\} \\ M_t(\Delta + \tau < t \leq \Delta + \tau) &= M_t^0 \left\{ 1 - 2T_{1app} \alpha_0 e^{-\tau/T_{1a}} \frac{CBF}{\lambda} \times \right. \\ &\quad \left. \left[ \frac{(1 - e^{-\Delta/T_{1app}}) e^{-\Delta/T_{1app}}}{e^{\Delta/T_{1app}} - e^{-\Delta/T_{1app}}} + (1 - e^{-\Delta/T_{1app}}) \right] e^{-(t-\Delta-\tau)/T_{1app}} \right\} \end{aligned} \quad [5.4]$$

Seqüências rápidas de aquisição de imagens, como EPI e espiral, podem ser combinadas com pulsos de RF curtos para adquirir dados com alta taxa de amostragem, enquanto o estado da magnetização cerebral oscila entre condições de controle e de estado estacionário induzidas pela função de marcação periódica.

## 5.2. Materiais e Métodos

Ratos machos adultos, SHR (N = 48, 3-4 meses,  $288 \pm 42$  g) e WKY (N = 38, 3-4 meses,  $263 \pm 36$  g) foram primeiramente anestesiados com isoflurano (5% indução, 2% manutenção), intubados oralmente e ventilados mecanicamente com ar

enriquecido de oxigênio. Eles foram equipados com linhas femorais arterial e venosa para a monitoração da pressão sangüínea, amostragem de sangue arterial para análise de pH, PaO<sub>2</sub> e PaCO<sub>2</sub>, e administração de drogas. A temperatura retal foi mantida a 37 ± 1°C. Depois da cirurgia para a colocação das linhas femorais, a anestesia foi trocada para α-chloralose (bolus inicial de 80 mg/kg, infusão contínua de 27 mg/kg/h) injetada intravenosamente.

Os animais foram então restritos com o auxílio de pinos de orelha e barra de mordedura. Uma vez posicionados no magneto, a taxa respiratória e a quantidade de oxigênio no gás respirado foram ajustadas para cada animal para trazer os gases do sangue arterial para as condições fisiológicas normais (pH = 7,42 ± 0,05, PaCO<sub>2</sub> = 34 ± 4 mmHg; PaO<sub>2</sub> = 106 ± 17 mmHg). As taxas cardíacas e respiratórias, EtCO<sub>2</sub> e SpO<sub>2</sub> foram monitorados continuamente através de oxímetro de pulso (Surgivet, Waukesha, WI, USA). A pressão sangüínea arterial também foi monitorada durante todo o experimento (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA).

Os experimentos de ressonância magnética foram conduzidos no mesmo sistema horizontal de 7T e com o mesmo conjunto de bobinas descritos no capítulo anterior. Imagens de uma única fatia cobrindo o córtex somatosensorial foram adquiridas com a técnica DASL, usando uma seqüência *gradient-recalled echo* (GRE) EPI com os seguintes parâmetros: TR = 250 ms, TE = 15 ms, FOV = 25,6 x 25,6 mm<sup>2</sup>, matriz = 64 x 64, espessura da fatia = 2,0 mm, e tempo de marcação = 217,60 ms.

Dois métodos utilizando DASL foram realizados. No primeiro método, uma função de marcação quadrada periódica (equação 5.4) com freqüência de 0,0167 Hz, correspondendo a meio período de 30 s, foi usada (Figura 5.1a). No segundo método, a freqüência da função de marcação quadrada foi 0,05Hz, correspondendo a meio período de 10 s (Figura 5.1b). Para a estimulação somatosensorial, eletrodos foram inseridos em ambas as patas dianteiras do animal, e o estímulo bilateral (pulsos de 333 µs, 2 mA de amplitude, 3 Hz) foi apresentado por 5 s (método 1, Figura 5.1a) ou 60 s (método 2, Figura 5.1b).

Para obter os mapas dos territórios de perfusão (N = 6 ratos), as artérias individuais foram marcadas seletivamente, combinando uma bobina de marcação dedicada de perfil de excitação limitado com um plano de marcação oblíquo, como descrito no capítulo anterior (Figura 4.1). Ângulos  $\theta = \pm 60^\circ$  foram utilizados juntamente com DASL (método 1, Figura 5.1a).

Os dados foram processados e analisados usando o MATLAB R2009a (The MathWorks, Natick, MA, USA). Primeiramente, todas as imagens foram realinhadas para correção de movimento. Após o realinhamento, a evolução temporal do sinal em cada voxel foi ajustada ao modelo descrito pela equação 5.5 e filtrada. O processo de filtragem consistiu em utilizar uma transformada de Fourier (FT, do inglês *Fourier transform*) simples do modelo para determinar o espectro de frequências permitidas, e uma FT dos dados para revelar as perturbações periódicas presentes neles. Um filtro complexo com componentes real e imaginária presentes no espectro de frequências permitidas foi utilizado para eliminar cada frequência que não fosse prevista pelo modelo. Após a filtragem, as curvas temporais foram ajustadas novamente à equação 5.5 para obter os mapas de CBF,  $T_{1app}$  e  $\tau$ . Para os cálculos, foram utilizados  $\lambda = 0,9$  (Herscovitch; Raichle, 1985) e  $T_{1a} = 1,75$  s (Tsekos *et al.*, 1998). O grau de marcação foi medido para cada experimento no plano da imagem.

As respostas hemodinâmicas, CBF e BOLD, evocadas pela estimulação foram analisadas para a região do córtex somatosensorial primário associada às patas dianteiras (S1FL, do inglês *primary somatosensorial forelimb*) escolhida bilateralmente baseando-se no atlas estereotáxico (Paxinos; Watson, 1998). No primeiro método, a resposta BOLD foi obtida da fase controle do ciclo DASL (marcação OFF na Figura 5.1a), normalizada para a média do sinal do período de pré-estímulo. O CBF foi calculado pela subtração em par das imagens marcadas e controles do ciclo DASL. A curva obtida foi então deconvoluída com os 10 s iniciais do decaimento da magnetização no período controle para remover a latência da resposta de CBF imposta pela evolução do sinal de ressonância magnética.

No segundo método, a resposta BOLD foi obtida da fase controle do ciclo DASL (marcação OFF na Figura 5.1b), calculando o aumento percentual do sinal durante a estimulação (estimulação ON na Figura 5.1b) comparado com o sinal no período de repouso (estimulação OFF na Figura 5.1b). Para obter o CBF funcional, as curvas de tempo durante o repouso (estimulação OFF na Figura 5.1b) e a estimulação (estimulação ON na Figura 5.1b) foram ajustadas separadamente à equação 5.5, como descrito anteriormente, e então o aumento percentual no CBF foi calculado.

Os resultados estão apresentados como média das amplitudes  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatísticas foram testadas por teste-t ou ANOVA e teste *post-hoc* de Bonferroni, usando o programa SYSTAT 12 2007 (Systat Software Inc., Chicago, IL). A significância foi fixada em  $P < 0,05$ .

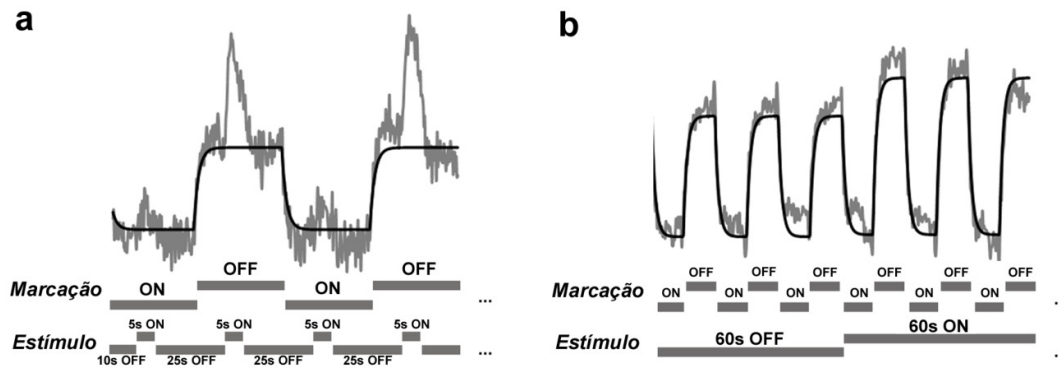


Figura 5.1: Representação esquemática dos experimentos funcionais utilizando a técnica de ASL dinâmica (DASL) para medir simultaneamente CBF basal, e respostas BOLD e de CBF evocadas pela estimulação somatosensorial. (a) Método 1: estimulação em DASL. Dois intervalos da curva temporal (cinza) e respectiva curva de ajuste (preta) estão mostradas. (b) Método 2: DASL na estimulação. Um intervalos da curva temporal (cinza) e respectiva curva de ajuste (preta) está mostrada.

### 5.3. Resultados e Discussão

Com a técnica DASL, a repetição periódica da função de marcação possibilitou múltiplas amostragens dos dados de ASL, aumentando a relação sinal-ruído das medidas de CBF. Apesar da boa relação sinal-ruído, flutuações indesejadas no sinal ainda foram observadas (Figura 5.2a). Os resultados mostraram a eficácia do processo de filtragem em remover essas flutuações (Figura 5.2b) devido à natureza periódica da resposta do tecido à função de marcação periódica. A figura 5.2c mostra um mapa de CBF basal típico em uma fatia de 2 mm do cérebro do rato, apresentando boa relação sinal-ruído, e excelente contraste entre matéria branca e cinzenta. As figuras 5.2d-e mostram os mapas de  $T_{1app}$  e  $\tau$ .

Os valores médios para a fatia toda de CBF,  $T_{1app}$  e  $\tau$ , para todos os ratos, foram  $65 \pm 13$  mL/100g/min,  $1405 \pm 355$  ms e  $586 \pm 106$  ms, respectivamente.

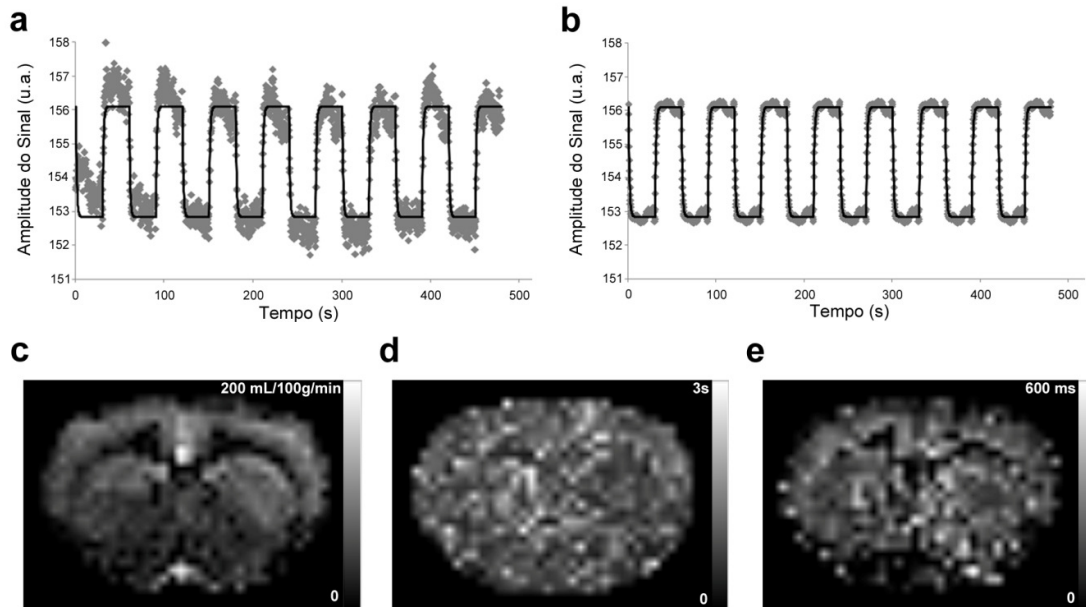


Figura 5.2: (a) Curva de tempo original média para toda a fatia de uma rato representativo anestesiado sob  $\alpha$ -chloralose. (b) Curva de tempo filtrada baseada apenas nas freqüências permitidas pelo modelo descrito pela equação 5.5. Mapas correspondentes de (c) CBF, (d)  $T_{1app}$  e (e) tempo de trânsito.

No capítulo anterior, foi mostrado que é possível combinar a técnica CASL com o uso de um plano de marcação oblíquo para determinar os territórios de perfusão das principais artérias cerebrais (Figura 4.3). No entanto, o mesmo conceito de marcação seletiva das artérias também foi utilizado com sucesso em combinação com a técnica DASL, resultando em territórios de perfusão com boa delimitação (Figura 5.3a). Os valores médios do CBF basal foram  $67 \pm 16$  mL/100g/min e  $74 \pm 13$  mL/100g/min para os territórios esquerdo e direito, respectivamente ( $N = 6$  ratos). Esses valores não diferiram entre si, e também não foram diferentes do valor obtido quando  $\theta = 0^\circ$  ( $P > 0,05$ ), mostrando marcação eficiente e boa seletividade do território.

Além disso, o mapa de CBF da Figura 5.3a mostra a assimetria dos territórios em relação à linha média, como mostrada no capítulo anterior (Figura 4.3). As figuras 5.3b-c mostram as curvas de tempo médias para as regiões de S1FL esquerdo e direito, respectivamente. Como  $\theta = \pm 60^\circ$  foi usado, observa-se que os períodos de controle e de marcação estão invertidos. Portanto, os resultados mostraram que é possível selecionar os territórios vasculares esquerdo e direito durante o mesmo scan e com a mesma eficiência da obtenção do mapa de perfusão para a fatia toda. Enquanto outros métodos de ASL têm sido desenvolvidos para o mapeamento dos territórios vasculares, nenhum deles até hoje apresentou resolução temporal suficiente que permitisse a caracterização detalhada das variações nos padrões de perfusão vasculares associados com doenças cerebrovasculares. A técnica DASL é então interessante para essas aplicações em que variações nos territórios vasculares são acompanhadas por alterações nos tempos de trânsito devido a alterações nos padrões de perfusão.

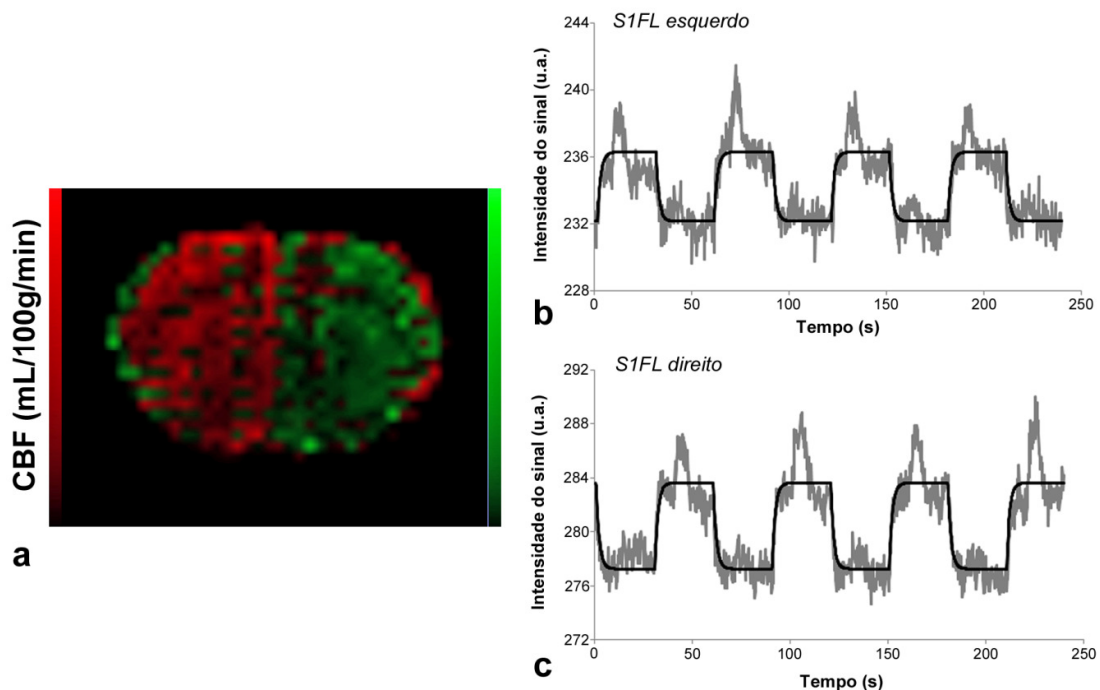


Figura 5.3: (a) Mapa dos territórios de perfusão esquerdo (vermelho) e direito (verde), e curvas de tempo para a região do S1FL (b) esquerdo e (c) direito de um rato típico anestesiado sob  $\alpha$ -chloralose.



Outra vantagem importante da técnica DASL é que a resposta BOLD pode ser obtida da fase de controle da curva de ASL, de maneira que as variações no CBF funcional podem ser diretamente comparadas com esse mecanismo de contraste mais popular em imagens funcionais por ressonância magnética. Respostas hemodinâmicas robustas, BOLD e CBF, evocadas pela estimulação de 5 s (15 pulsos; método 1) estavam presentes no córtex somatosensorial primário em ambos os hemisférios esquerdo e direito (Figura 5.4a). A figura 5.4b mostra a curva de tempo média da combinação de DASL e estimulação sensorial para uma região de interesse que inclui S1FL de ambos os hemisférios da fatia mostrada na figura 5.4a. Os períodos de estimulação estão indicados por barras horizontais embaixo da resposta hemodinâmica, que está sobreposta na curva de evolução DASL. As variações do sinal funcional foram menores durante os meio-ciclos de marcação do que durante os meio-ciclos de controle. A resposta robusta mostrada durante a fase de controle é resultado apenas do contraste BOLD, enquanto há uma mistura de contraste BOLD em anti-fase com o aumento de CBF durante a fase de marcação. Como os aumentos funcionais de CBF levam a reduções no sinal em ASL, as alterações do sinal funcional são menores durante os meio-ciclos de marcação.

A figura 5.4c mostra a resposta de CBF, evocada pela estimulação, obtida da curva de tempo da figura 5.4b. Para obter as características temporais verdadeiras das variações de CBF devido à estimulação (curva preta), uma deconvolução temporal foi necessária já que as curvas de tempos medidas por ressonância magnética estavam atrasadas (curva cinza). Variações instantâneas no CBF produzidas por estimulação focal no cérebro são refletidas apenas alguns segundos depois na magnetização do tecido. A função de transferência que governa o atraso da resposta medida em relação a variações no CBF está presente na própria curva de tempo, na forma de evolução do sinal do estado de magnetização de equilíbrio para o novo estado estacionário. Assim, o atraso na resposta de CBF imposto pela evolução do sinal de ressonância magnética pode ser removido pela deconvolução da curva obtida (cinza) com a curva de evolução do sinal do estado de magnetização de equilíbrio para o novo estado estacionário (Silva; Paiva, 2009). Uma desvantagem do processo de deconvolução é que ele adiciona ruído oscilatório aos dados. Entretanto, como as variações de CBF nesses experimentos foram bem robustas, elas não foram muito afetadas pela pequena quantidade de ruído

introduzido pela deconvolução. As respostas médias de CBF e BOLD evocadas pela estimulação, para todos os ratos, foram  $87 \pm 37 \%$  e  $2,5 \pm 0,8 \%$ , respectivamente.

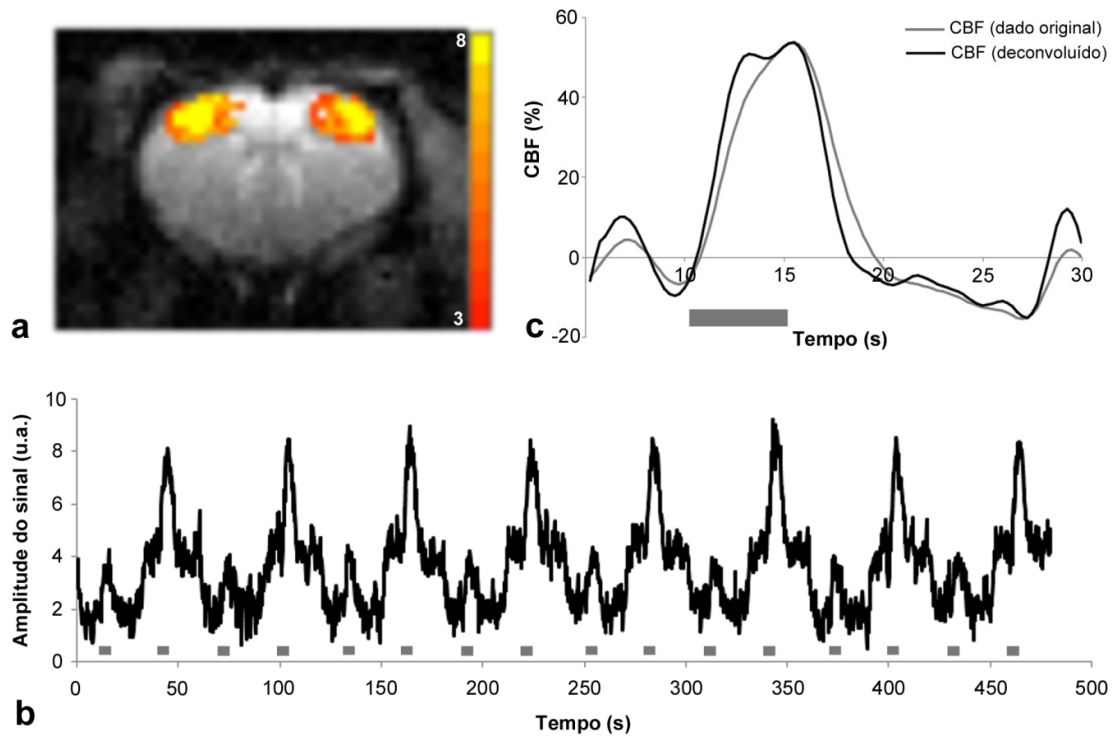


Figura 5.4: Experimento com a combinação de DASL e estimulação somatosensorial de um rato WKY representativo. (a) Mapa da resposta BOLD. Ativação robusta no córtex somatosensorial primário em ambos os hemisférios esquerdo e direito após estimulação bilateral das patas dianteiras. (b) Curva de tempo original mostrando oito intervalos marcação-reposo. (c) Respostas de CBF medida (cinza) e deconvoluída (preta). Os períodos de estimulação estão indicados pelas barras horizontais cinzas (b-c).

Para comparar os valores de  $T_{1app}$  e  $\tau$  entre os períodos de repouso e estimulação, o método 2 (Figura 5.1b) foi implementado. O valor médio de CBF para a fatia toda foi de  $60 \pm 11$  mL/100g/min ( $N = 8$  ratos), similar ao valor obtido com o método 1 (Figura 5.1a). Respostas BOLD e de CBF à estimulação de 60 s estavam presentes no córtex somatosensorial primário em ambos os hemisférios esquerdo e direito (Figura 5.5a-b). Nenhuma diferença significativa no valor médio de  $T_{1app}$  foi

observada entre os períodos de repouso ( $1314 \pm 240$  ms) e estimulação ( $1211 \pm 243$  ms,  $P > 0,05$ ). Entretanto, devido ao aumento no CBF funcional de  $62 \pm 11$  %, o valor do tempo de trânsito nas regiões ativadas, incluindo S1FL esquerdo e direito, foi significativamente reduzido de  $625 \pm 98$  ms (período de repouso) para  $442 \pm 110$  ms (período de estímulo) ( $N = 8$ ; teste-t pareado,  $P < 0,05$ ). Essa redução do tempo de trânsito foi observada em ambos os hemisférios (Figura 5.5c) e está de acordo com estudos anteriores (Francis *et al.*, 2008; Hendrikse *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2000), mostrando que essa técnica é sensível o bastante para detectar alterações nos tempos de trânsito associadas com alterações funcionais no CBF.

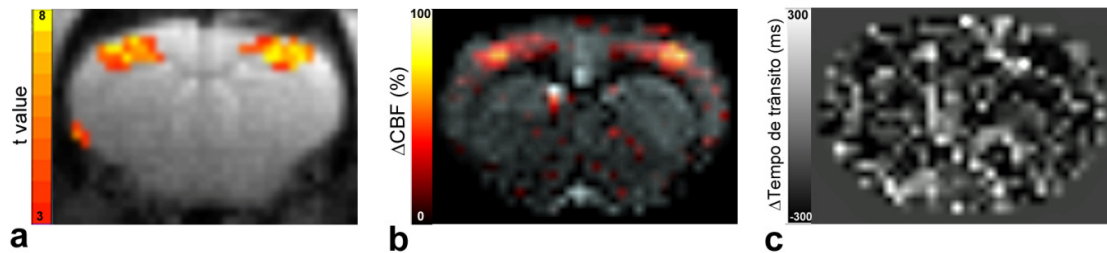


Figura 5.5: (a) Resposta BOLD sobreposta à imagem anatômica. (b) Resposta do CBF funcional sobreposta ao mapa de CBF basal. (c) Mapa da variação do tempo de trânsito devido à estimulação somatosensorial.

Em suma, a técnica de ASL dinâmica foi utilizada em combinação com a estimulação somatosensorial em ratos anestesiados com  $\alpha$ -chloralose para simultaneamente medir CBF basal, territórios de perfusão, tempos de trânsito e respostas hemodinâmicas (BOLD e CBF) à ativação cerebral. Quando comparada com outras técnicas de ASL, DASL apresentou melhor resolução temporal que possibilitou a sua aplicação no presente estudo funcional. Portanto, DASL é um método eficiente de obter informações de múltiplos aspectos da hemodinâmica cerebral em um único experimento, o que torna essa técnica atrativa para ambos os estudos científicos da função cerebral e estudos clínicos de doenças cerebrovasculares.

## *6. Aplicação do Método DASL para Medir a Resposta Hemodinâmica Funcional em SHR*

Como discutido anteriormente no capítulo 2, a hipertensão causa alterações estruturais e funcionais nos vasos sanguíneos cerebrais, modificando os mecanismos de regulação do CBF. De acordo com os resultados do capítulo 4, os ratos hipertensos (SHR), principalmente os adultos, apresentam autoregulação cerebral alterada, resistência cerebrovascular aumentada, além de reatividade vascular prejudicada. Essas alterações podem refletir na hiperemia funcional, ou seja, sujeitos hipertensos podem apresentar respostas hemodinâmicas evocadas por ativação neuronal diferentes de sujeitos normotensos.

Portanto, os experimentos descritos no capítulo anterior (seção 5.2), utilizando a técnica DASL combinada com estimulação somatosensorial, foram realizados tanto em ratos normotensos (WKY) quanto em ratos hipertensos (SHR) com o objetivo de avaliar os efeitos da hipertensão na resposta funcional evocada pela atividade neuronal.

### 6.1. Resposta Hemodinâmica Funcional Negativa em SHR

Os parâmetros fisiológicos medidos durante o experimento, tais como temperatura, oximetria, dióxido de carbono, e gases sanguíneos não foram diferentes entre os dois grupos de ratos anestesiados sob  $\alpha$ -chloralose (N = 48 SHR, N = 38 WKY), exceto pela pressão sanguínea arterial que foi maior em SHR ( $163 \pm 17$  mmHg) do que em WKY ( $121 \pm 16$  mmHg;  $P < 0,05$ ). Os valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros fisiológicos estão mostrados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Parâmetros fisiológicos de ratos WKY (N = 38) e SHR (N = 48), anestesiados sob  $\alpha$ -chloralose, durante o experimento de DASL combinado com estimulação somatosensorial.

|            | HR       | RR     | pH          | PaCO <sub>2</sub><br>(mmHg) | PaO <sub>2</sub><br>(mmHg) | T (°C)     | Pressão<br>arterial<br>média<br>(mmHg) |
|------------|----------|--------|-------------|-----------------------------|----------------------------|------------|--|
| <b>WKY</b> | 345 ± 11 | 53 ± 2 | 7,44 ± 0,5  | 33 ± 5                      | 102 ± 16                   | 37,0 ± 1,0 | 121 ± 16                               |
| <b>SHR</b> | 349 ± 4  | 54 ± 2 | 7,41 ± 0,04 | 35 ± 4                      | 109 ± 17                   | 37,4 ± 0,8 | 163 ± 17*                              |

\*P < 0,05, versus resposta positiva.

Os mapas de ativação da resposta BOLD evocada por estimulação bilateral das patas dianteiras, seguindo o método 1 da técnica DASL (Figura 5.1a), mostraram respostas positivas robustas em S1FL tanto em SHR (Figura 6.1a) quanto em WKY (Figura 6.1b), com nenhuma diferença significativa das amplitudes das respostas entre os grupos de ratos (Tabela 6.2).

Entre os SHR, 38/48 ratos também apresentaram respostas hemodinâmicas (CBF e BOLD) negativas em regiões em torno de S1FL, enquanto apenas 4/38 WKY mostraram respostas negativas (Tabela 6.2). Para a análise da resposta negativa, uma região de interesse adjacente a S1FL, incluindo parte do córtex somatosensorial primário associado às vibrissas (S1BF, do inglês *primary somatosensorial barrel field*), foi escolhida bilateralmente, contendo o mesmo número de pixels das regiões de interesse escolhidas para a análise da resposta positiva.

A redução nas respostas de CBF e BOLD em relação à linha de base, ou seja, a resposta hemodinâmica negativa, pode ser explicada por dois mecanismos (Shmuel *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004). Primeiramente, uma redução ou supressão da atividade neuronal pode ocorrer, resultando em decréscimo de CBF (Boorman *et al.*, 2010; Bressler *et al.*, 2007; Devor *et al.*, 2007). Entretanto, o efeito pode ser puramente hemodinâmico em que o fluxo sanguíneo é redistribuído para áreas mais ativas enquanto regiões adjacentes são submetidas a uma redução de fluxo. Esse efeito é denominado, em inglês, *blood steal effect* (Boas *et al.*, 2008; Harel *et al.*, 2002; Kannurpatti; Biswal, 2004; Woolsey *et al.*, 1996). Nesse caso, não há redução ou supressão da atividade neuronal.

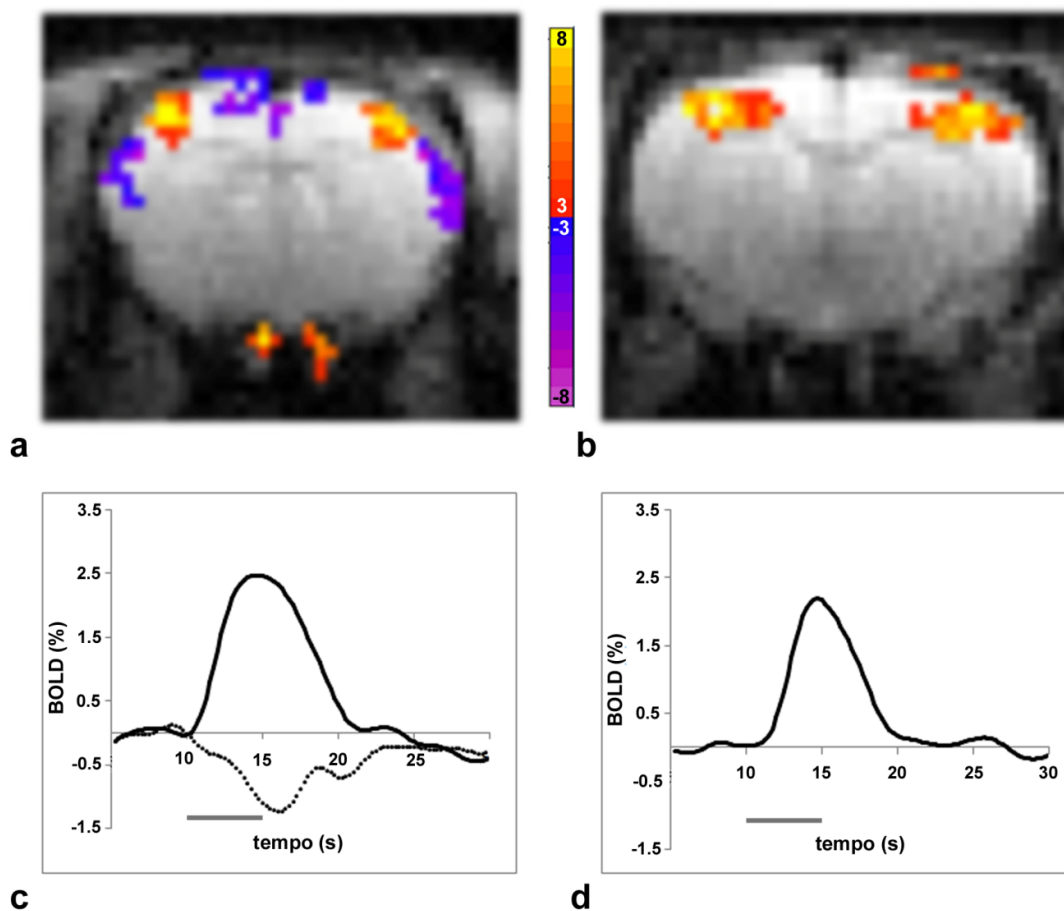


Figura 6.1: Mapas representativos da resposta funcional BOLD à estimulação bilateral das patas dianteiras de um (a) SHR e um (b) WKY. Respostas robustas positivas foram observadas em S1FL de ambos os hemisférios nos dois grupos de ratos. Entretanto, repostas negativas foram observadas principalmente em SHR. Curvas da resposta BOLD estão mostradas para o (c) SHR e o (d) WKY. As curvas das respostas positivas e negativas correspondem à média das respostas obtidas em regiões de interesse, escolhidas bilateralmente, que incluem S1FL e S1BF, respectivamente. As barras horizontais cinzas indicam o período de estimulação.

No presente estudo, apenas 4 de 38 WKY mostraram respostas funcionais negativas (Tabela 6.2). Além disso, em outros estudos do nosso grupo utilizando o mesmo tipo de estímulo somatosensorial, nenhuma resposta funcional negativa foi observada em ratos Sprague-Dawley, outra raça de ratos normotensos (Hirano *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2007). Portanto, nossos resultados sugerem que a resposta

negativa observada em SHR está relacionada com o aumento da pressão arterial, e é causada por um efeito puramente hemodinâmico. A resistência vascular aumentada (ladecola; Davisson, 2008) e a reserva vascular diminuída observadas em sujeitos hipertensos podem explicar a redistribuição de fluxo sanguíneo de regiões com menos demanda para regiões de maior demanda de CBF, resultando na resposta negativa observada no presente estudo funcional.

Tabela 6.2: Respostas hemodinâmicas, CBF e BOLD, evocadas por estimulação somatosensorial em ratos normotensos (WKY) e hipertensos (SHR).

|                          | WKY          |             | SHR          |             |
|--------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
|                          | CBF (%)      | BOLD (%)    | CBF (%)      | BOLD (%)    |
| <b>Resposta Positiva</b> | 74 ± 32      | 2,3 ± 0,9   | 72 ± 35      | 2,6 ± 0,9   |
| <i>Incidência</i>        | 38/38 (100%) |             | 48/48 (100%) |             |
| <b>Resposta Negativa</b> | -60 ± 10     | -1,0 ± 0,4* | -41 ± 16*    | -1,1 ± 0,5* |
| <i>Incidência</i>        | 4/38 (11%)   |             | 38/48 (73%)  |             |

\* P < 0,05, versus resposta positiva.

## 6.2. Estudo Farmacológico

Para investigar o efeito da pressão sanguínea arterial nas respostas hemodinâmicas evocadas pela estimulação somatosensorial, a pressão foi variada de forma aguda em dois subgrupos dos ratos citados acima. Para reduzir a pressão arterial, o subgrupo de ratos SHR (N = 10) recebeu a administração intravenosa de esmolol (bolus de 10 mg/kg de massa corporal, 20 min de injeção contínua de 10 mg/kg de massa corporal/h). Já o subgrupo de WKY (N = 10) recebeu a administração intravenosa de norepinefrina (NE, bolus de 0,2 mg/kg de massa corporal, 20 min de injeção contínua de 0,1-0,6 mg/kg de massa corporal/h) para aumentar a pressão arterial. O mesmo método da técnica DASL (Figura 5.1a) combinado com a estimulação bilateral das patas dianteiras dos animais, conforme

realizado anteriormente, foi utilizado para adquirir as imagens de perfusão antes e durante a injeção da droga, e 30 minutos após o término da injeção.

O esmolol é um antagonista de adrenoreceptores  $\beta_1$  que possui início rápido da atividade após injeção intravenosa e eliminação rápida, além de não cruzar a barreira hemato-encefálica, não alterando a circulação cerebral (Goyagi *et al.*, 2006; Heinke *et al.*, 2005). No presente estudo, a administração de esmolol não afetou os parâmetros fisiológicos medidos, exceto pela pressão sanguínea arterial ( $164 \pm 17$  mmHg antes da droga vs.  $125 \pm 17$  mmHg depois da injeção da droga;  $P < 0,05$ ) (Tabela 6.3).

Tabela 6.3: Parâmetros fisiológicos de ratos SHR (N = 10), anestesiados sob  $\alpha$ -chloralose, antes e após a administração de esmolol.

| HR                                 | RR     | pH          | PaCO <sub>2</sub><br>(mmHg) | PaO <sub>2</sub><br>(mmHg) | T (°C)     | Pressão<br>Arterial<br>Média<br>(mmHg) |
|------------------------------------|--------|-------------|-----------------------------|----------------------------|------------|--|
| <i>Antes da injeção de esmolol</i> |        |             |                             |                            |            |  |
| 349 ± 2                            | 54 ± 2 | 7,40 ± 0,02 | 35 ± 3                      | 109 ± 17                   | 37,7 ± 0,6 | 164 ± 17                               |
| <i>Após da injeção de esmolol</i>  |        |             |                             |                            |            |  |
| 350 ± 1                            | 53 ± 2 | 7,39 ± 0,03 | 35 ± 3                      | 112 ± 16                   | 37,5 ± 0,7 | 125 ± 17*                              |

\*P < 0,05, versus antes da injeção de esmolol.

Nenhum efeito do esmolol foi observado no CBF basal ( $61 \pm 11$  mL/100g/min antes da droga vs.  $69 \pm 13$  mL/100g/min depois da injeção da droga;  $P > 0,05$ ). Dez minutos após a injeção de esmolol, as respostas hemodinâmicas negativas em regiões circundantes às respostas positivas não foram mais observadas nos mapas de ativação (Figura 6.2). Além disso, as amplitudes das respostas hemodinâmicas positivas foram significativamente reduzidas em S1FL (CBF:  $69 \pm 40\%$  antes da droga vs.  $36 \pm 18\%$  depois da injeção da droga; BOLD:  $2,3 \pm 0,8\%$  antes da droga vs.  $1,6 \pm 0,6\%$  depois da injeção da droga;  $P < 0,05$ ) (Figuras 6.3).

Essa redução nas amplitudes das respostas hemodinâmicas devido ao esmolol pode estar relacionada com a dose utilizada. Um estudo anterior reportou



que doses terapêuticas de esmolol não afetam a vasorreatividade cerebral (Heinke *et al.*, 2005), já que o esmolol sendo um bloqueador seletivo  $\beta_1$  supostamente deve agir no coração e nos rins. Entretanto, em altas doses, ele pode perder sua seletividade e agir com um bloqueador  $\beta_2$  no músculo liso dos vasos sanguíneos, interferindo com o fluxo sanguíneo cerebral e afetando as respostas hemodinâmicas evocadas pela atividade neuronal. Portanto, estudos futuros devem ser realizados com diferentes doses de esmolol ou diferentes drogas para melhor caracterizar o efeito da dose, e portanto da variação da pressão arterial, nas respostas hemodinâmicas.

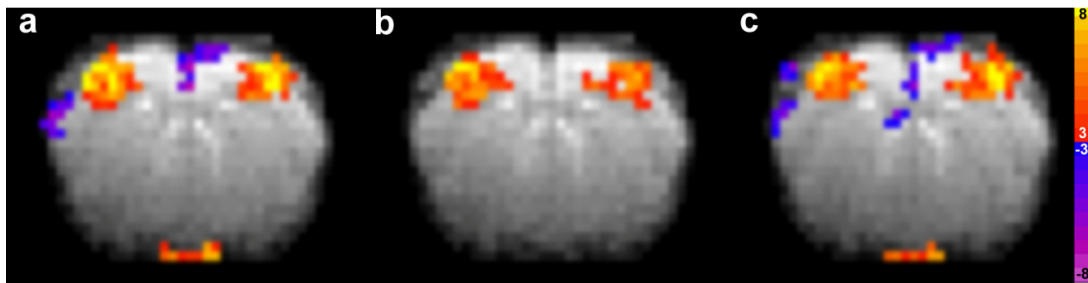


Figura 6.2: Mapas da resposta BOLD em um SHR representativo adquiridos (a) antes da injeção de esmolol (pressão arterial alta), (b) durante a injeção de esmolol (pressão arterial baixa) e (c) 30 min após descontinuar a administração da droga (pressão arterial alta).

Trinta minutos após do término da administração de esmolol, a pressão arterial aumentou significativamente ( $149 \pm 14$  mmHg;  $P < 0,05$ ). As respostas positivas de CBF ( $72 \pm 23\%$ ) e BOLD ( $2,8 \pm 0,7\%$ ) também aumentaram significativamente em S1FL, e as respostas negativas voltaram a ser observadas em 75% dos ratos (Figuras 6.2 e 6.3).

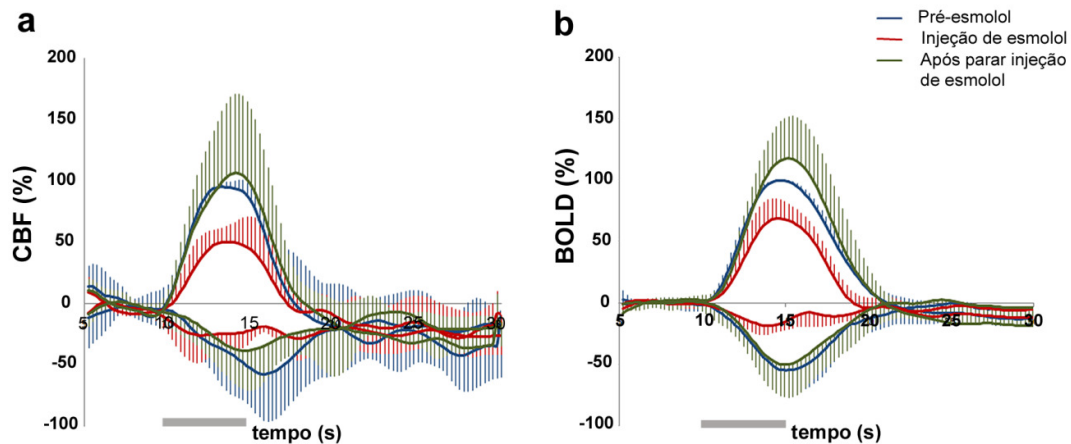


Figura 6.3: Respostas médias normalizadas de (a) CBF e (b) BOLD evocadas por estimulação bilateral das patas dianteiras para o grupo de SHR tratados com esmolol para redução da pressão sanguínea arterial, durante três intervalos farmacológicos: pré-droga, injeção de esmolol, e 30 min após descontinuar a administração da droga. As barras horizontais cinzas indicam o período de estimulação.

Para aumentar a pressão arterial de WKY, utilizamos NE, um agonista  $\alpha$ -adrenérgico que produz vasoconstrição periférica intensa e não cruza a barreira hemato-encefálica (Gozzi *et al.*, 2007). A administração de NE não afetou os parâmetros fisiológicos do grupo de WKY, exceto pela pressão sanguínea arterial ( $118 \pm 16$  mmHg antes da droga vs.  $146 \pm 7$  mmHg depois da injeção da droga;  $P < 0,05$ ) (Tabela 6.4).

O CBF basal aumentou significativamente após a administração de NE ( $64 \pm 14$  mL/100g/min antes da droga vs.  $96 \pm 24$  mL/100g/min após da injeção da droga;  $P < 0,05$ ). Já o CBF funcional ( $63 \pm 18\%$  antes da droga vs.  $29 \pm 18\%$  após da injeção da droga;  $P < 0,05$ ) e a resposta BOLD ( $1,8 \pm 0,7\%$  antes da droga vs.  $0,9 \pm 0,4\%$  após da injeção da droga;  $P < 0,05$ ) evocados pela estimulação reduziram significativamente. Essa redução das respostas hemodinâmicas está provavelmente relacionada ao aumento do CBF basal. De acordo com estudos anteriores, variações do CBF basal podem alterar as respostas hemodinâmicas à estimulação (Cohen *et al.*, 2002; Vazquez *et al.*, 2006). Portanto, um aumento significativo do CBF basal, como observado no presente estudo após a administração de NE, pode acarretar em uma atenuação significativa das respostas hemodinâmicas medidas.

Tabela 6.4: Parâmetros fisiológicos de ratos WKY (N = 10), anestesiados sob  $\alpha$ -chloralose, antes e após a administração de norepinefrina.

| HR                                       | RR     | pH          | PaCO <sub>2</sub><br>(mmHg) | PaO <sub>2</sub><br>(mmHg) | T (°C)     | Pressão<br>arterial<br>média<br>(mmHg) |
|--|--------|-------------|-----------------------------|----------------------------|------------|--|
| <i>Antes da injeção de norepinefrina</i> |        |             |                             |                            |            |  |
| 343 ± 11                                 | 53 ± 3 | 7,41 ± 0,02 | 35 ± 3                      | 109 ± 20                   | 37,3 ± 0,6 | 118 ± 16                               |
| <i>Após da injeção de norepinefrina</i>  |        |             |                             |                            |            |  |
| 350 ± 1                                  | 58 ± 2 | 7,30 ± 0,1  | 37 ± 6                      | 102 ± 29                   | 38,1 ± 1,5 | 146 ± 7*                               |

\*P &lt; 0,05, versus antes da injeção de NE.

Além disso, nenhuma resposta hemodinâmica negativa foi observada após o aumento da pressão sangüínea dos WKY com NE. Contrário à hipertensão crônica que resulta em problemas vasculares, o aumento agudo da pressão arterial não afeta as características estruturais e funcionais dos vasos sangüíneos cerebrais dos WKY; assim, a reserva vascular desses ratos deve estar intacta e nenhuma redistribuição de CBF é necessária. Portanto, a resposta funcional de WKY após aumentar a pressão sangüínea cronicamente deve ser avaliada em estudos futuros.

Apesar dos problemas envolvendo estudos farmacológicos, como dose e efeitos desconhecidos da droga, é fato que os resultados apresentados nesse capítulo indicam que as respostas hemodinâmicas negativas em áreas circundantes àquelas ativadas positivamente estão relacionadas à redistribuição do fluxo sangüíneo de áreas com menor demanda para áreas mais ativadas, devido à reserva cerebrovascular prejudicada dos ratos hipertensos. Entretanto, estudos futuros variando cronicamente a pressão sangüínea arterial de ratos normotensos e hipertensos serão importantes para comprovar o efeito da hipertensão nas respostas hemodinâmicas evocadas por atividade neuronal.

## 7. Inibição de COX e Regulação do CBF Funcional

A hiperemia funcional é o resultado de múltiplos agentes vasoativos liberados por neurônios ativos e glia que agem conjuntamente para produzir vasodilatação e aumento local de CBF em resposta à atividade neuronal. Entre esses agentes, estão os produtos das ciclooxigenases (Bakalova *et al.*, 2002b; Girouard; Iadecola, 2006).

A ciclooxigenase (COX), ou prostaglandina H<sub>2</sub> sintase (PGHS), é a enzima envolvida na conversão de ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PGs), metabólitos lipídicos relacionados a vários processos fisiológicos e patológicos, como regulação do fluxo sanguíneo e inflamação (Brenneis *et al.*, 2006; Dogne *et al.*, 2008). COX catalisa as duas primeiras etapas na biossíntese das PGs: oxidação do AA, liberado dos fosfolípidios da membrana celular pela fosfolipase A<sub>2</sub>, em endoperóxido PGG<sub>2</sub>; e sua subsequente redução a hidroxila PGH<sub>2</sub>. Através de uma série de enzimas, PGH<sub>2</sub> é transformada nos prostanóides PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, and TXA<sub>2</sub> (Figura 7.1) (Vane, 1998).

Há duas isoformas distintas de COX, COX-1 e COX-2, que possuem cerca de 70% de seus aminoácidos em uma seqüência idêntica, mas têm padrões diferentes de expressão e regulação (Chang; Harris, 2005). COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos; enquanto COX-2 pode ser induzida por vários agentes, incluindo fatores de crescimento e citocinas (Brian *et al.*, 1998), e é expressa em diversas doenças cerebrais. Recentemente, foi demonstrado que COX-2 é constitutivamente expressa em alguns órgãos, entre eles rins e cérebro. Nos rins, COX-2 é amplamente expressa, e sua inibição é responsável pela elevação da pressão sanguínea através da redução da filtração glomerular, e retenção de sal e água (Dogne *et al.*, 2008).

No sistema nervoso central, COX-1 e COX-2 diferem em termos de mecanismos regulatórios, distribuição nos tecidos, e acoplamento preferencial a diferentes enzimas. COX-1 localiza-se predominantemente em microglias, tendo

papel importante em processos neuroinflamatórios (Choi *et al.*, 2009); enquanto COX-2 localiza-se em neurônios (Dogne *et al.*, 2008). A principal característica da COX-2 no cérebro é sua indução em condições basais e também durante a atividade neural, o que sugere um papel fisiológico de seus produtos (PGs) na hiperemia funcional (Hetu; Riendeau, 2005; Niwa *et al.*, 2000) e a possibilidade de seus inibidores modularem a função cerebral (Vane, 1998).

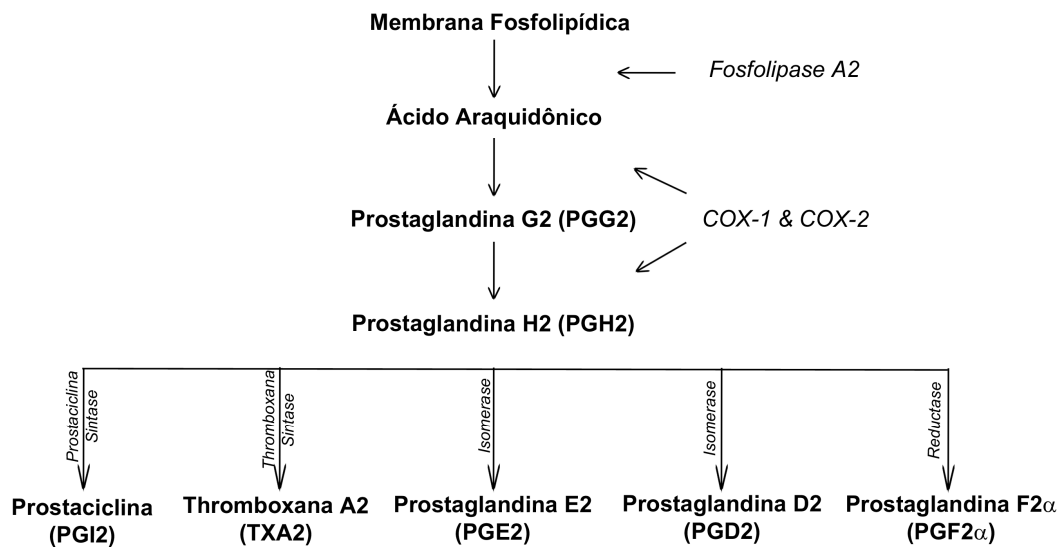


Figura 7.1: Via das ciclooxygenases (COX-1 e COX-2). A partir do ácido araquidônico, produção das prostaglandinas PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, e subsequente produção dos prostanóides (prostaciclina – PGI<sub>2</sub>; prostaglandinas – PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ; e thromboxana – TXA<sub>2</sub>).

Estudos recentes em roedores demonstraram que inibidores seletivos de COX-2, como rofecoxib, NS-398 e meloxicam, atenuam o aumento de CBF evocado por estimulação, sugerindo que COX-2 é a principal isoforma envolvida na hiperemia funcional (Bakalova *et al.*, 2002a; Niwa *et al.*, 2000; Stefanovic *et al.*, 2006). Por outro lado, a administração de um inibidor seletivo de COX-1 (SC-560) não afetou a resposta hemodinâmica induzida por estimulação, mas atenuou as respostas iniciadas em nível vascular, como o aumento de CBF produzido por hipercapnia (Niwa *et al.*, 2001).

O aumento nas expressões de COX-1 (Denniss; Rush, 2009; Feletou *et al.*, 2009; Vanhoutte, 2009) e COX-2 (Alvarez *et al.*, 2007; Hernanz *et al.*, 2004) tem sido mostrado em vasos sanguíneos de SHR. Nesses ratos, a liberação de fatores constritores pela COX é elevada, resultando em um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadores e vasoconstritoras que leva a alterações na relaxação das artérias (Hernanz *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006; Tang; Vanhoutte, 2008). Como a proporção entre fatores constritores e dilatadores é importante na regulação do CBF evocado durante estimulação neuronal (Bakalova *et al.*, 2002a), um desequilíbrio nessa proporção pode estar relacionado com a hiperemia funcional prejudicada observada em sujeitos hipertensos (Jennings *et al.*, 2005). Além disso, alterações na via da COX nas células endoteliais de SHR podem levar a diferentes ações dos fatores mediadores da resposta hemodinâmica evocada por estimulação se comparadas com resultados em animais normotensos (Bakalova *et al.*, 2002a; Stefanovic *et al.*, 2006).

No presente estudo, investigamos o papel de ambas as isoformas da COX, COX-1 e COX-2, no acoplamento cerebrovascular dos SHR. Utilizamos a técnica DASL descrita no capítulo 5 para medir simultaneamente CBF basal e as respostas hemodinâmicas (CBF e BOLD) evocadas por estimulação somatosensorial, em SHR e WKY, antes e após a inibição de cada isoforma da COX.

## 7.1. Materiais e Métodos

### 7.1.1. IRMf

Ratos machos adultos, SHR (N = 12, 3-4 meses, 309 ± 29 g) e WKY (N = 12, 3-4 meses, 300 ± 32 g) foram primeiramente anestesiados com isoflurano (5% indução, 2% manutenção), intubados oralmente e ventilados mecanicamente com ar enriquecido de oxigênio. Eles foram equipados com linhas femorais arterial e venosa para a monitoração da pressão sanguínea, amostragem de sangue arterial para análise de pH, PaO<sub>2</sub> e PaCO<sub>2</sub>, e administração das drogas. A temperatura retal foi mantida a 37 ± 1°C. Depois da cirurgia para a colocação das linhas femorais, a anestesia foi trocada para α-chloralose (bolus inicial de 80 mg/kg, infusão contínua de 27 mg/kg/h) injetada intravenosamente. Taxas cardíacas e respiratórias, EtCO<sub>2</sub> e SpO<sub>2</sub> foram monitorados continuamente através de oxímetro de pulso (Surgivet,

Waukesha, WI, USA). A pressão sangüínea arterial também foi monitorada durante todo o experimento (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA).

Os animais foram então restritos com o auxílio de pinos de orelha e barra de mordedura, e posicionados no magneto. Os experimentos de ressonância magnética foram conduzidos no mesmo sistema horizontal de 7T e com o mesmo conjunto de bobinas descritos no capítulo 4. Imagens de uma única fatia cobrindo o córtex somatosensorial foram adquiridas com a técnica DASL, usando uma seqüência GRE-EPI com os seguintes parâmetros: TR = 250 ms, TE = 15 ms, FOV = 25,6 x 25,6 mm<sup>2</sup>, matriz = 64 x 64, espessura da fatia = 2,0 mm, e tempo de marcação = 217,60 ms. Para a estimulação somatosensorial, eletrodos foram inseridos em ambas as patas dianteiras do animal, e o estímulo (pulsos de 333 µs, 2 mA de amplitude, 3 Hz) foi apresentado por 5 s em cada meio-intervalo de 30 s. O paradigma consistiu em 60 intervalos de 120 imagens marcadas e 120 imagens de controle, totalizando 1 h de aquisição.

Os animais foram divididos em dois grupos. No grupo 1 (N = 4 SHR, N = 4 WKY), um inibidor seletivo de COX-1, SC-560 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) foi administrado intravenosamente (12 mg/kg de massa corporal) após 5 min do início do scan, seguido por infusão contínua de 55 minutos (12 mg/kg de massa corporal/h) (Figura 7.2a). No grupo 2 (N = 8 SHR, N = 8 WKY), um inibidor seletivo de COX-2, Meloxicam (Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi administrado intravenosamente (5 mg/kg de massa corporal) após 5 min do início do scan, seguido por infusão contínua de 55 minutos (5 mg/kg de massa corporal/h) (Figura 7.2b). Em ambos os grupos, 25 min antes do final do scan, um bolus de 0,5 mL contendo 10 µg de PGE<sub>2</sub> (Sigma Chemical, St. Louis, MO) foi administrado intravenosamente.

As imagens funcionais foram processadas e analisadas da mesma forma descrita no capítulo 5. Os valores de CBF basal e das respostas hemodinâmicas (CBF e BOLD) evocadas pela estimulação foram determinados para S1FL em ambos os hemisférios, escolhido baseando-se no atlas estereotáxico (Paxinos; Watson, 1998). Para cada rato, as amplitudes e magnitudes médias da resposta hemodinâmica foram calculadas para três intervalos: pré-droga (basal), infusão do inibidor de COX (meloxicam ou SC-560), e pós-bolus de PGE<sub>2</sub>. A magnitude foi determinada através do método mostrado na figura 7.3 (Bakalova *et al.*, 2002a). Todos os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. As diferenças

estatísticas foram testadas por teste-t ou ANOVA e teste *post-hoc* de Bonferroni, usando o programa SYSTAT 12 2007 (Systat Software Inc., Chicago, IL). A significância foi fixada em  $P < 0,05$ .

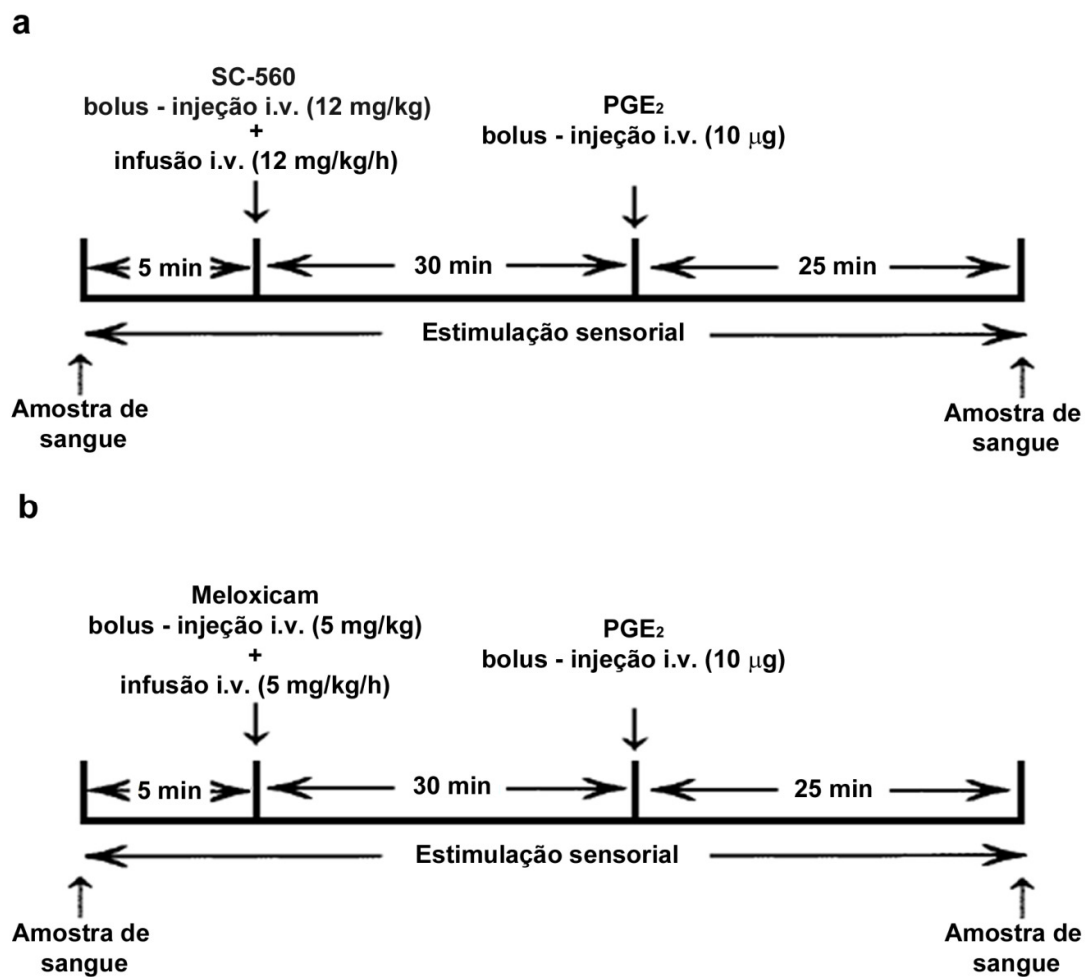


Figura 7.2: Protocolo experimental com a inibição de (a) COX-1 e (b) COX-2.



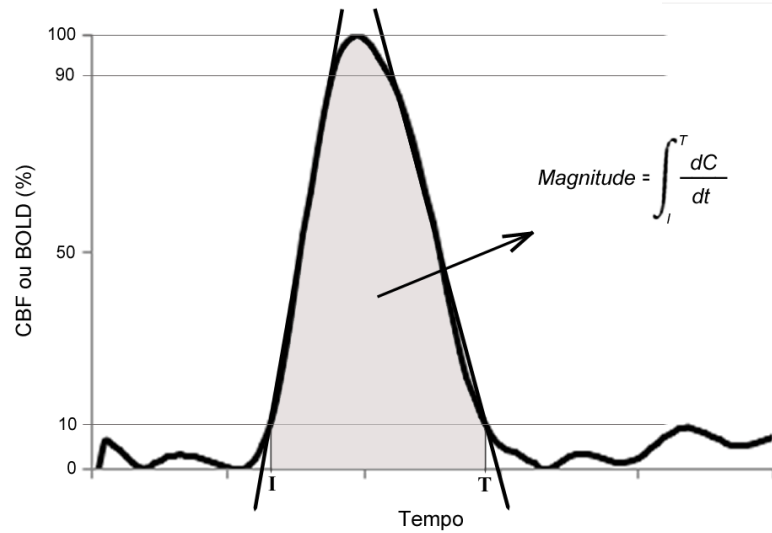


Figura 7.3: Diagrama ilustrativo do cálculo da magnitude da resposta hemodinâmica. Os tempos de início (I) e término (T) da resposta hemodinâmica são definidos como os tempos na intersecção das retas extrapoladas, desenhadas na curva de resposta entre 10% e 90% do pico, com a linha de base. A magnitude (área cinza) foi calculada como a integral da curva (C) da resposta desde o tempo de início até o tempo de término.

### 7.1.2. Atividade Enzimática

Para investigar o efeito da dose utilizada do inibidor de COX na atividade de cada enzima, COX-1 e COX-2, 64 ratos (N = 32 SHR,  $281 \pm 14$  g; N = 32 WKY,  $280 \pm 29$  g; 3-4 meses de idade) foram anestesiados com  $\alpha$ -chloralose e receberam um bolus de SC-560 ou meloxicam (ou o respectivo placebo) seguido de uma infusão contínua de 55 minutos. Dezesesseis ratos (8 SHR, 8 WKY) foram tratados com SC-560, outros dezesesseis (8 SHR, 8 WKY) com meloxicam, enquanto os restantes receberam os respectivos placebos de SC-560 ou meloxicam. As doses administradas foram as mesmas usadas nos experimentos de IRMf.

Ao final da administração da droga ou placebo, os animais foram decapitados e os cérebros extraídos, prontamente congelados em 2-metilbutano a  $-50^\circ\text{C}$  e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  para uso posterior. Para medir a atividade enzimática, o cérebro foi então homogeneizado em 15 mL de solução HIP (3 Hexano : 2 Propanol) para cada 0,6-0,8 g de tecido, e centrifugado a 1300 rpm em temperatura ambiente por 10 min. O supernatante obtido foi transferido, e o tecido restante

lavado com solução HIP e centrifugado nas mesmas condições. O novo supernatante obtido foi então extraído, combinado com o produto da primeira extração e evaporado sob um fluxo suave de nitrogênio. Finalmente, o material resultante foi resuspenso em 3 mL de solução HIP e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para determinar a quantidade de prostanóides produzidos pelas enzimas, o material resultante foi evaporado sob um fluxo suave de nitrogênio e depois resuspenso em 1 mL de buffer EIA (do inglês *Enzyme Immuno Assay*), sonificado por 10 min, e analisado utilizando o kit de imunoenensaio enzimático específico para cada prostanóide (Oxford Biomedical, Oxford, MI). A atividade enzimática foi reportada em massa de produto ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{TXB}_2$ ) formado por massa de tecido cerebral (dada em g). Novamente a análise estatística foi feita utilizando ANOVA e teste *post-hoc* de Bonferroni para significância em  $P < 0,05$ .

## 7.2. Resultados e Discussão

Antes de iniciar a aquisição das imagens funcionais, o volume de ar fornecido ao animal e a taxa respiratória foram ajustados de tal maneira que os parâmetros fisiológicos ficassem dentro do intervalo normal ( $\text{pH} = 7,42 \pm 0,05$ ;  $\text{PaCO}_2 = 33 \pm 5$  mmHg;  $\text{PaO}_2 = 102 \pm 13$  mmHg;  $\text{Hct} = 38 \pm 3\%$ ). A taxa cardíaca,  $\text{EtCO}_2$  e  $\text{SpO}_2$  foram monitorados durante todo o experimento e não sofreram alterações. Os gases do sangue arterial analisados no início e ao final do experimento não foram diferentes e estavam dentro dos valores normais. Nenhuma diferença nesses parâmetros foi observada entre SHR e WKY; entretanto, a pressão sangüínea arterial média do grupo de SHR ( $173 \pm 18$  mmHg) foi maior do que do grupo de WKY ( $129 \pm 19$  mmHg;  $P < 0,05$ ).

Uma das causas para a hipertensão, citada no capítulo 2, é o desequilíbrio na produção de substâncias vasodilatadores (ex.  $\text{PGI}_2$ ) e vasoconstritoras (ex.  $\text{TXA}_2$ ) pelo endotélio (Feletou *et al.*, 2009; Hocherl *et al.*, 2002). No presente estudo, os níveis de  $\text{PGI}_2$  no cérebro não diferiram entre SHR e WKY dos grupos controles (que receberam placebo); entretanto, a produção cerebral de  $\text{TXA}_2$  foi significativamente maior em SHR ( $1,2 \pm 0,9$  ng  $\text{TXA}_2/\text{g}$  de cérebro) do que em WKY ( $0,7 \pm 0,3$  ng  $\text{TXA}_2/\text{g}$  de cérebro;  $P < 0,05$ ), em concordância com resultados reportados recentemente em células endoteliais da aorta desses animais (Tang; Vanhoutte,

2008). Portanto, a razão  $TXA_2/PGI_2$  estava elevada nos SHR, contribuindo para a elevação da pressão sangüínea nesses ratos.

Ainda nos grupos de ratos controles,  $PGE_2$  foi o prostanóide mais abundante observado em ambas as raças de ratos, o que está de acordo com a literatura que reportou o  $PGE_2$  como um dos principais prostanóides no sistema nervoso central de mamíferos, incluindo humanos, macacos e ratos (Vane, 1998).

Nenhum efeito dos inibidores de COX foi observado nos parâmetros fisiológicos dos ratos normotensos e hipertensos. Tanto a pressão arterial quanto o CBF basal não foram afetados significativamente pela administração dos inibidores. Em todos os ratos, CBF basal se manteve dentro de 20% e 10% do valor inicial medido antes da administração de meloxicam e SC-560, respectivamente.

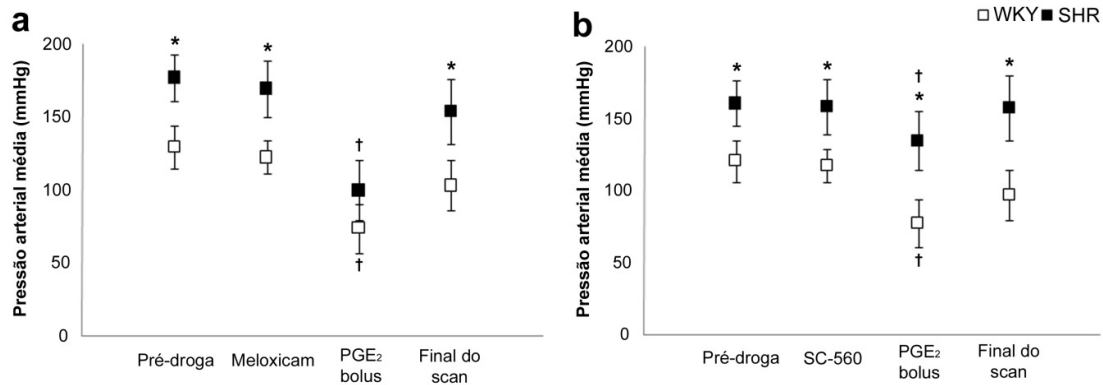


Figura 7.4: Pressão sangüínea arterial média de SHR e WKY tratados com (a) meloxicam e (b) SC-560 para quatro períodos: pré-droga, infusão do inibidor de COX, bolus de  $PGE_2$ , e final do experimento. Ambos os inibidores de COX, SC-560 e meloxicam, não afetaram a pressão sangüínea; entretanto, a injeção do bolus de  $PGE_2$  causou uma queda transiente na pressão de todos os ratos (\* vs. WKY; † vs. outros períodos farmacológicos;  $P < 0,05$ ).

Entretanto, uma queda transiente (durante aproximadamente 40 segundos) da pressão arterial foi observada depois da administração do bolus de  $PGE_2$  (Figura 7.4), levando à exclusão das imagens adquiridas durante esse período. Além disso, o bolus de  $PGE_2$  aumentou significativamente o CBF basal dos ratos SHR e WKY em aproximadamente 52% quando administrado após meloxicam, e 33% quando

administrado após SC-560. Esses resultados indicam que o PGE<sub>2</sub> tem efeitos diretos na resistência vascular de SHR e WKY, agindo como um potente vasodilatador no cérebro e causando hipotensão.

Em SHR e WKY, a dose administrada de SC-560 significativamente inibiu a produção de PGI<sub>2</sub> em ~ 64% e TXA<sub>2</sub> em ~ 83%; porém, nenhum efeito significativo foi observado na produção de PGE<sub>2</sub> (Figura 7.5b). Esses resultados são compatíveis com a alta seletividade do SC-560 à COX-1, que produz PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>; já PGE<sub>2</sub> é principalmente produzida pela COX-2.

A administração de SC-560 não afetou a resposta hemodinâmica evocada pela estimulação somatosensorial em SHR e WKY (Figura 7.6c-d), indicando que COX-1 não está envolvida com a hiperemia funcional desses ratos. Esse resultado está de acordo com o estudo de Niwa e colaboradores em animais normotensos que mostrou um papel importante da COX-1 na vasodilatação produzida por algumas substâncias vasodilatadoras, como o CO<sub>2</sub>, mas nenhuma contribuição para as respostas vasculares iniciadas pela atividade neural (Niwa *et al.*, 2001).

A dose administrada de meloxicam significativamente inibiu a produção cerebral de PGI<sub>2</sub> em ~ 64%, PGD<sub>2</sub> em ~ 39% e TXA<sub>2</sub> em ~ 93% em SHR e WKY (Figura 7.5a). Além disso, ela significativamente inibiu a produção de PGE<sub>2</sub> nos WKY em 67% ( $3 \pm 2$  ng PGE<sub>2</sub>/g de cérebro ratos tratados vs.  $10 \pm 5$  ng PGE<sub>2</sub>/g de cérebro ratos controles;  $P < 0,05$ ), mas não nos SHR ( $8 \pm 3$  ng PGE<sub>2</sub>/g de cérebro ratos tratados vs.  $9 \pm 3$  ng PGE<sub>2</sub>/g de cérebro ratos controles).

Em ratos normotensos, tanto os produtos da COX-2 (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>), quanto os da COX-1 (PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>), foram inibidos por meloxicam, indicando que com essa dose a meloxicam perde sua seletividade. Como foi demonstrado anteriormente que a inibição seletiva de COX-1 não altera a resposta funcional, o fato de a meloxicam ter perdido sua seletividade à COX-2 não influencia os resultados que serão apresentados a seguir.

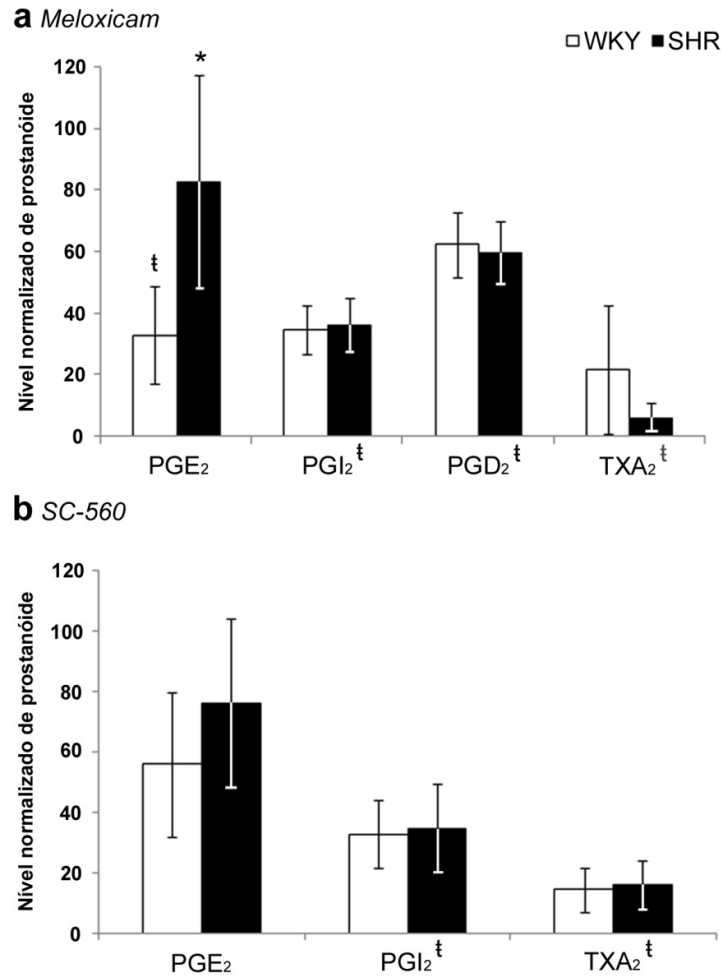


Figura 7.5: Níveis dos prostanóides produzidos pelas isoformas da COX no cérebro de SHR e WKY após inibição com (a) meloxicam e (b) SC-560. Os valores foram normalizados para o grupo controle, considerando o valor médio dos níveis de prostanóides produzidos em ratos não-tratados como sendo 100% (\* vs. WKY; † vs. grupo controle;  $P < 0,05$ ). Não foi medido o nível de PGD<sub>2</sub> em ratos que receberam SC-560.

A administração de meloxicam atenuou significativamente as respostas produzidas pelo estímulo somatosensorial em WKY (CBF: atenuação de 72 %; BOLD: atenuação de 56 %;  $P < 0,05$ ) (Figura 7.6a-b), confirmando o envolvimento da COX-2 na regulação do fluxo sanguíneo cerebral durante a atividade neuronal. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores de IRMf e fluxometria por *laser-Doppler* (LDF, do inglês *laser-Doppler flowmetry*) em roedores normotensos anestesiados (Bakalova *et al.*, 2002a; Niwa *et al.*, 2000; Stefanovic *et al.*, 2006).

Nesses estudos, apesar de diferentes inibidores de COX-2 (rofecoxib, NS-398 e meloxicam) e diferentes paradigmas experimentais terem sido utilizados, todos reportaram atenuação de 50% na resposta hemodinâmica após administração do inibidor em estudos de LDF e de ~ 70% no estudo de IRMf (Stefanovic *et al.*, 2006). Essa atenuação da resposta hemodinâmica foi reportada como resultado de uma alteração no acoplamento cerebrovascular, e não da inibição da atividade neuronal, já que variações significativas na resposta neuronal à estimulação, medida por eletrofisiologia, não foram observadas após administração de inibidor de COX-2 (Stefanovic *et al.*, 2006).

Além disso, Stefanovic e colaboradores mostraram que essa atenuação da resposta hemodinâmica pode ser revertida, pelo menos parcialmente, em ratos normotensos Sprague-Dawleys, com administração sistêmica de PGE<sub>2</sub>, o principal produto da COX-2, mostrando que ele age como modulador do acoplamento cerebrovascular desses ratos (Stefanovic *et al.*, 2006). Entretanto, no presente estudo, o bolus de PGE<sub>2</sub> não recuperou a resposta hemodinâmica em WKY. Pelo contrário, a resposta após a injeção de PGE<sub>2</sub> foi ainda mais atenuada (Figura 7.6a-b). Diferentemente do estudo em Sprague-Dawleys, observamos um grande efeito vasodilatador do PGE<sub>2</sub> em WKY que aumentou significativamente o CBF basal desses ratos. Como variações no CBF basal causam alterações na resposta BOLD à estimulação (Cohen *et al.*, 2002; Vazquez *et al.*, 2006), o potente efeito vasodilatador do PGE<sub>2</sub> pode ter atenuado a resposta hemodinâmica, mascarando a ação moduladora desse agente.

Já em SHR, a atenuação produzida pela inibição de COX-2 foi significativamente menor (CBF: atenuação de 40 %; BOLD: atenuação de 24 %) do que em WKY (Figura 7.6a-b; P < 0,05). Além disso, como já citado anteriormente, níveis de PGE<sub>2</sub> não foram significativamente inibidos por meloxicam. Esses resultados indicam que outro agente vasoativo está mais diretamente envolvido no acoplamento neurovascular do SHR. Um candidato potencial seria a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>); porém, sua produção foi significativamente inibida por SC-560 sem atenuação da resposta hemodinâmica. Assim, outros agentes vasoativos, como o PGD<sub>2</sub> e o óxido nítrico, devem ser mais relevantes para o acoplamento cerebrovascular do SHR. Entretanto, estudos futuros serão necessários para responder a essa questão.

Em suma, os resultados apresentados nesse capítulo mostram diferenças no acoplamento neurovascular de ratos hipertensos, quando comparados com ratos normotensos. Dados de IRMf com estimulação somatosensorial e inibição de COX confirmaram o papel da isoforma COX-2 na hiperemia funcional, porém outras substâncias vasoativas, além de PGE<sub>2</sub>, são mais relevantes na modulação do acoplamento neurovascular em sujeitos hipertensos.

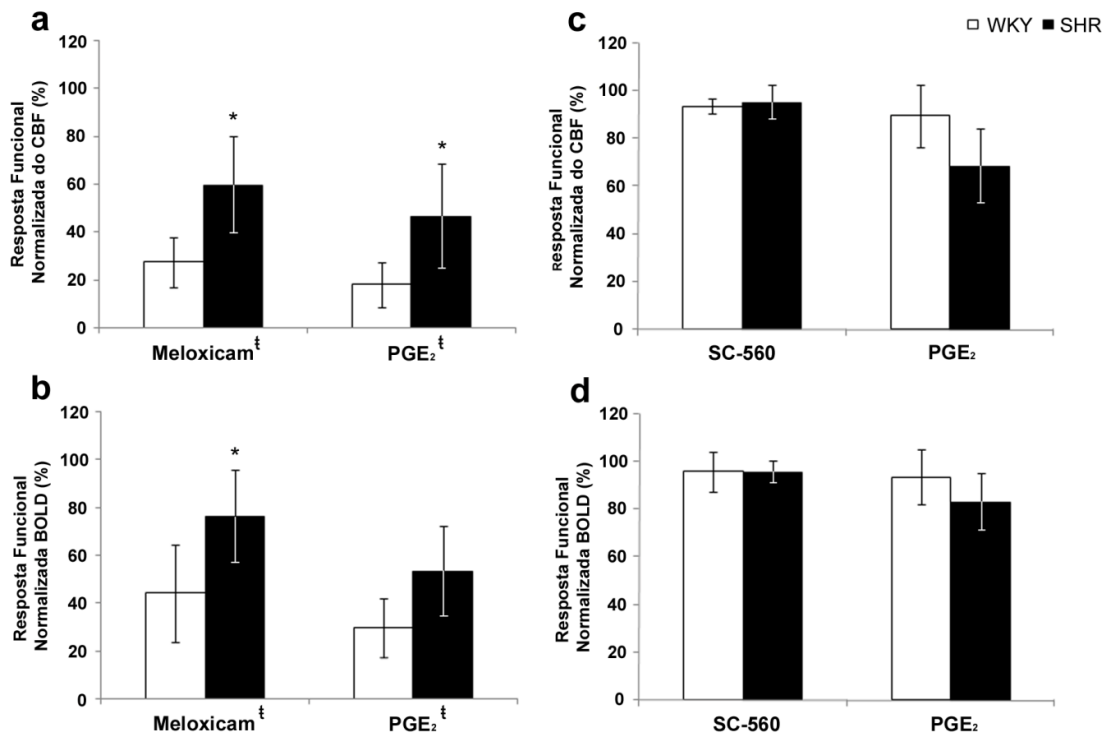


Figura 7.6: Magnitude média das respostas hemodinâmicas (CBF e BOLD) normalizadas para o período pré-droga, ou seja, considerando os valores basais médios iguais a 100%, em SHR e WKY tratados com (a-b) meloxicam e (c-d) SC-560 (\* vs. WKY; † vs. pré-droga;  $P < 0,05$ ).

## 8. Hipertensão Arterial e Acidente Vascular Cerebral

O acidente vascular cerebral é considerado um grande problema de saúde mundial devido a sua incidência e suas conseqüências. A incidência anual de AVC no mundo é de cerca de 15 milhões, dos quais um terço consiste de casos fatais e outro um terço de casos em que os pacientes irão sofrer deficiências permanentes. O AVC isquêmico é o tipo mais comum, constituindo cerca de 80% do total, dos quais 60% são atribuídos à isquemia de artérias grandes (Feigin *et al.*, 2003). Mesmo que muitos tratamentos têm mostrado ser eficientes em modelos animais de AVC isquêmico, a transferência para a situação clínica não acontece com a mesma eficiência (O'Collins *et al.*, 2006). Um dos motivos para isso é que a maioria dos estudos pré-clínicos é realizada em animais jovens e saudáveis, não levando em consideração importantes fatores de risco como a hipertensão arterial crônica.

A hipertensão arterial é um dos principais fatores de risco para AVC isquêmico e está associada com prognóstico ruim, incluindo morte prematura ou tardia, deficiência neurológica, edema, hemorragia cerebral, e recorrência (Leonardi-Bee *et al.*, 2002). Como discutido no capítulo 2, a pressão sangüínea elevada altera a estrutura e a função das artérias cerebrais, tornando o cérebro mais susceptível à diminuição severa da perfusão arterial (Iadecola; Davisson, 2008). Apesar da diminuição progressiva da pressão sangüínea reduzir a incidência de AVC através da administração em longo prazo de agentes anti-hipertensos, o manejo da hipertensão pré-existente é ainda controverso em pacientes com AVC isquêmico agudo (Adams *et al.*, 2007).

Durante o AVC isquêmico, manter a hipertensão elevada pode aumentar o edema ou causar hemorragia, piorando os danos cerebrais secundários (Ayata; Ropper, 2002). Por outro lado, a rápida redução da pressão sangüínea pode piorar as conseqüências do AVC ao reduzir a perfusão nos tecidos afetados, devido à autoregulação cerebral prejudicada dos pacientes hipertensos (Geeganage; Bath,



2009; Moustafa; Baron, 2008). Estudos recentes em animais mostraram que a hipertensão, induzida por drogas durante a oclusão ou a reperfusão, é benéfica para reduzir a área isquêmica (Ishikawa *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2008), sugerindo que manter a hipertensão durante o AVC isquêmico pode ter efeitos positivos em pacientes hipertensos.

Portanto, investigamos os efeitos da hipertensão no volume da lesão, edema cerebral, deficiência neurológica, CBF e fluxo sanguíneo colateral em ratos hipertensos (SHR) submetidos à oclusão temporária da ACM. Além disso, verificamos a influência de manter a hipertensão nas conseqüências do AVC isquêmico.

### 8.1. Materiais e Métodos

Ratos machos normotensos e hipertensos ( $305 \pm 32$  g, 3 – 4 meses de idade) foram anestesiados com 5% de isoflurano e mantidos durante o procedimento cirúrgico sob 2,5% da anestesia entregues em uma mistura de 2:2:1 de ar, nitrogênio e oxigênio através de uma máscara facial. A temperatura corporal, as taxas cardíaca e respiratória, EtCO<sub>2</sub> e SpO<sub>2</sub> foram continuamente monitorados. A artéria femoral ou da cauda do animal foi canulada para o contínuo monitoramento da pressão sanguínea arterial e para amostragem do sangue arterial antes, durante e depois da oclusão da ACM. A veia da cauda do animal também foi canulada para administração de solução salina ou fenilefrina.

Os ratos foram divididos em três grupos. O grupo 1 foi formado por ratos normotensos WKY (N = 6). O grupo 2 foi composto por ratos SHR (N = 6) em que a pressão arterial estava mais baixa do que a normal devido ao uso de isoflurano. Assim, esses animais estavam normotensos (SHRn) durante a indução do AVC. Já no grupo 3, também composto por ratos SHR (N = 6), a hipertensão foi induzida durante a isquemia através da injeção intravenosa contínua de fenilefrina (15 a 20 µg/kg/min) (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL), que foi descontinuada após a reperfusão. Portanto, esses ratos estavam hipertensos (SHRh) durante a oclusão da ACM.

A isquemia cerebral foi induzida temporariamente utilizando o método intraluminal para ocluir a ACM direita (Lecrux *et al.*, 2007; Longa *et al.*, 1989). Após a preparação dos ratos como descrita acima, eles eram posicionados no magneto

para a aquisição dos mapas de CBF e dos territórios vasculares. Ao final da sessão de IRM, o animal era trazido de volta à mesa de cirurgia e colocado na posição supina. A parte ventral do pescoço era depilada e limpa assepticamente. Uma incisão na linha média era feita para expor a ACC direita e o bulbo da carótida direita. A ACE direita era cortada transversalmente e a ACI isolada cuidadosamente. A ACC era pinçada, e uma sutura revestida de silicone (Doccol Corporation, Redlands, CA) inserida na ACI direita até uma resistência ser sentida devido ao posicionamento da ponta da sutura na bifurcação da ACI com a ACM e a ACA no círculo de Willis. Imediatamente após a oclusão, a pinça da ACC era removida, o corte no pescoço fechado e o animal posicionado no magneto para aquisição de imagens ponderadas em difusão, mapas de CBF e dos territórios vasculares. Nenhum outro vaso era cortado ou ocluído. Ao final da sessão de IRM, que normalmente durava de 35 a 40 minutos, o animal era trazido de volta à mesa de cirurgia. Uma hora após a oclusão da ACM, a sutura era retirada permitindo a reperfusão. A sutura era totalmente removida da ACI, e a ACE era firmemente suturada para prevenir sangramento. O corte do pescoço era suturado e tratado com lidocaína. Depois da última amostragem do sangue arterial, os cateteres eram retirados e era permitido que os ratos se recuperassem da anestesia.

A deficiência neurológica dos ratos foi avaliada 1, 4 e 7 dias após a oclusão da ACM usando uma escala categórica (Chu *et al.*, 2008). A pontuação foi realizada para reflexos posturais (0 – nenhum déficit, 1 – flexão do membro anterior quando suspenso pela causa, 1 – resistência reduzida à pressão lateral para o lado contralateral); movimento circulatório (0 – ausente, 2 – presente); e colocações tátil e proprioceptiva dos membros anteriores e posteriores (0 – colocação imediata completa, 1 – colocação tardia e/ou incompleta (< 2 segundos), 2 – ausência). De acordo com essa escala, um rato completamente normal teria uma pontuação de 0, e um rato com o déficit mais severo teria uma pontuação total de 8.

As imagens por ressonância magnética foram adquiridas em cinco sessões: antes e durante a oclusão da ACM, e 1, 4 e 7 dias após a reperfusão. Durante as aquisições, a anestesia foi mantida a 2% e os parâmetros fisiológicos monitorados continuamente. No magneto, os animais foram restritos com a ajuda de pinos de orelha e barra de mordedura. Os experimentos foram conduzidos no mesmo sistema horizontal de 7T e com o mesmo conjunto de bobinas descritos no capítulo 4.

Para cada seqüência de imagens, 15 fatias de 1 mm de espessura foram adquiridas. Imagens ponderadas em difusão (DWI, do inglês *diffusion weighted imaging*) foram adquiridas durante a oclusão da ACM por uma seqüência spin-eco EPI com os seguintes parâmetros: TR = 6000 ms, TE = 30 ms, FOV = 25.6 x 25.6 mm<sup>2</sup>, matriz = 64 x 64, 1 direção, valores de b = 0, 1600 s/mm<sup>2</sup>. A partir dessas imagens, os mapas do coeficiente de difusão aparente (ADC, do inglês *apparent diffusion coefficient*) foram calculados (DPTtools, Denis Ducreux, Paris, France). Para checar a presença de hemorragias durante a oclusão da ACM, imagens ponderadas em T2\* foram adquiridas com os seguintes parâmetros: TR = 665 ms, 1º TE = 3 ms, 12 ecos, espaço entre ecos = 3 ms, FOV = 25,6 x 25,6 cm<sup>2</sup>, matriz = 128 x 128. Para a avaliação da evolução temporal da lesão, imagens ponderadas em T2 foram adquiridas 1, 4 e 7 dias após a reperfusão por uma seqüência do tipo RARE (do inglês *rapid acquisition with refocused echoes*) com os seguintes parâmetros: TR = 12000 ms, TE = 74 ms, FOV = 25,6 x 25,6 mm<sup>2</sup>, matriz = 128 x 128.

As imagens de perfusão foram adquiridas em todas as cinco sessões através da técnica CASL, descrita anteriormente no capítulo 3, com os seguintes parâmetros: TR = 10000 ms, TE = 30 ms, FOV = 25,6 x 25,6 mm<sup>2</sup>, matriz = 64 x 64. De acordo com o método descrito no capítulo 4, mapas dos territórios vasculares também foram obtidos utilizando  $\theta = \pm 60^\circ$ . Através do MATLAB (The MathWorks, Natick, MA), mapas quantitativos de CBF foram calculados utilizando a equação 3.19. Terminada a aquisição das imagens 7 dias após o AVC, os ratos foram sacrificados com 100 mg/kg de cloreto de potássio (APP Pharmaceuticals, Schaumburg, IL) injetado intravenosamente.

As imagens foram analisadas com o programa MIPAV (Biomedical Imaging Research Services Section, National Institutes of Health, Bethesda, MD). O volume da lesão isquêmica durante a oclusão foi determinado nos mapas de ADC como as regiões com 23% de redução do valor médio de ADC do hemisfério contralateral (McCabe *et al.*, 2009). Essa redução de 23% é comumente utilizada na literatura. Após a oclusão, o volume da lesão foi determinado manualmente nas áreas isquêmicas hiperintensas nas imagens ponderadas em T2. O edema cerebral também foi determinado (Gerriets *et al.*, 2004).

As regiões com déficit de perfusão foram determinadas em todas as fatias dos mapas de CBF durante a oclusão da ACM como sendo as áreas com 57% de redução do CBF em relação ao valor médio do hemisfério contralateral (Meng *et al.*,

2004). Essa redução de 57% é comumente utilizada na literatura. A região de interesse obtida foi transferida para os outros mapas de CBF adquiridos em diferentes sessões. Os valores de CBF regional foram medidos dentro e fora da lesão e nas áreas correspondentes do hemisfério contralateral.

Além disso, para calcular a penumbra isquêmica, utilizamos o conceito da diferença entre o volume de tecido com deficiência de perfusão e o volume de tecido com ADC reduzido (Olivot; Marks, 2008).

Os volumes obtidos das lesões foram corrigidos considerando o edema cerebral e foram expressos em porcentagem do volume hemisférico (Gerriets *et al.*, 2004). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e comparados por ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni, ou testes não-paramétricos correspondentes, usando o SYSTAT 12 2007 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). A significância estatística foi definida em  $P < 0,05$ .

## 8.2. Resultados e Discussão

Nos três grupos de ratos, os parâmetros fisiológicos foram mantidos dentro dos valores normais antes, durante e depois da oclusão da ACM (Tabela 8.1). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos exceto para a pressão sangüínea arterial durante a oclusão da ACM. Como discutido no capítulo 4, a isoflurano reduz a pressão arterial tanto de WKY quanto de SHR de tal maneira que não houve diferença de pressão entre esses três grupos de ratos antes da oclusão da ACM e depois da reperfusão. Entretanto, durante a oclusão da ACM, a pressão arterial do grupo SHRh estava elevada em relação aos outros dois grupos ( $P < 0,05$ ) devido à administração intravenosa de fenilefrina.

A fenilefrina é um agonista seletivo do receptor adrenérgico  $\alpha$ -1 que aumenta a pressão sangüínea arterial através da vasoconstrição periférica. Apesar da preocupação de que a fenilefrina possa induzir vasoconstrição cerebral, ela tem sido usada com segurança em vários experimentos de AVC, inclusive em pacientes, com o objetivo de aumentar a pressão sangüínea (Chalela *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2009; Rordorf *et al.*, 2001). Estudos em ratos mostraram que há poucos receptores adrenérgicos  $\alpha$ -1 no cérebro e que a fenilefrina não afeta o CBF (Sokrab; Johansson, 1989). No presente estudo, após a administração de fenilefrina, a pressão arterial foi rapidamente aumentada e o CBF não diminuiu no hemisfério não

afetado, contralateral à lesão, mostrando que a fenilefrina não age como um agente vasoconstritor em WKY e SHR. Porém, os efeitos da administração de fenilefrina no CBF serão discutidos com mais detalhes posteriormente.

Tabela 8.1: Parâmetros fisiológicos medidos antes, durante e após a oclusão da artéria cerebral média (OACM) de ratos WKY e SHR.

|                        | Pressão arterial média (mmHg) | pH          | PaO <sub>2</sub> (mmHg) | PaCO <sub>2</sub> (mmHg) | Temperatura (°C) |
|------------------------|-------------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| <i>Antes da OACM</i>   |                               |             |                         |                          |                  |
| <b>WKY</b>             | 91 ± 20                       | 7,44 ± 0,03 | 162 ± 17                | 27 ± 4                   | 37,6 ± 0,4       |
| <b>SHRn</b>            | 125 ± 27                      | 7,43 ± 0,04 | 176 ± 11                | 25 ± 2                   | 38,2 ± 0,5       |
| <b>SHRh</b>            | 107 ± 22                      | 7,39 ± 0,04 | 166 ± 9                 | 29 ± 2                   | 37,8 ± 0,2       |
| <i>Durante da OACM</i> |                               |             |                         |                          |                  |
| <b>WKY</b>             | 84 ± 10                       | 7,40 ± 0,03 | 157 ± 18                | 29 ± 3                   | 38,2 ± 0,3       |
| <b>SHRn</b>            | 119 ± 23*                     | 7,37 ± 0,03 | 165 ± 18                | 31 ± 5                   | 38,2 ± 0,4       |
| <b>SHRh</b>            | 144 ± 20* <sup>†</sup>        | 7,37 ± 0,04 | 150 ± 27                | 34 ± 4                   | 38,3 ± 0,4       |
| <i>Reperusão</i>       |                               |             |                         |                          |                  |
| <b>WKY</b>             | 87 ± 6                        | 7,39 ± 0,03 | 154 ± 17                | 33 ± 4                   | 38,0 ± 0,6       |
| <b>SHRn</b>            | 111 ± 22                      | 7,36 ± 0,05 | 169 ± 17                | 35 ± 7                   | 38,4 ± 0,5       |
| <b>SHRh</b>            | 103 ± 21                      | 7,35 ± 0,03 | 166 ± 10                | 36 ± 5                   | 37,7 ± 0,7       |

SHRn: SHR normotenso, SHRh: SHR hipertenso. \* P < 0,01 vs. WKY; <sup>†</sup> P < 0,05 vs. SHRn.

Durante a oclusão da ACM, o volume da lesão obtido pelos mapas de ADC foi significativamente menor no grupo WKY (16 ± 4%) do que nos dois grupos de SHR (SHRn: 26 ± 3%; SHRh: 23 ± 2%; P < 0,05); entretanto, não houve diferença dos volumes de tecido com deficiência de perfusão calculados pelos mapas de CBF (WKY: 32 ± 5%; SHRn: 33 ± 4%; SHRh: 34 ± 2%; P > 0,05).

A área de penumbra foi significativamente maior no grupo WKY (15 ± 6%) do que no SHRn (7 ± 5%; P < 0,05); porém, o valor obtido para o grupo SHRh (11 ± 1%; P > 0,05) não foi diferente dos outros dois grupos. Para calcular a penumbra isquêmica, utilizamos o conceito da diferença entre o volume de tecido com

deficiência de perfusão e o volume de tecido com ADC reduzido. Apesar desse método não ser considerado robusto por provavelmente superestimar a área de penumbra, ele tem sido cada vez mais usado clinicamente (Olivot; Marks, 2008). Esses primeiros resultados mostram a influência da hipertensão crônica na fase aguda do AVC, reduzindo o volume de tecido com potencial para ser salvo, como mostrado em um estudo recente (McCabe *et al.*, 2009).

A figura 8.1 mostra imagens ponderadas em T2 de um rato representativo de cada grupo (WKY, SHRn, SHRh), adquiridas um dia após a oclusão da ACM, mostrando as diferenças entre os volumes das lesões nos diferentes ratos. Nos três grupos, as lesões foram observadas em áreas corticais e subcorticais. A figura 8.2 consiste de imagens ponderadas em T2 (uma fatia) dos mesmos ratos representativos da figura anterior, mostrando a evolução temporal das lesões isquêmicas (dias 1, 4 e 7). A compressão dos ventrículos e o deslocamento da linha média devido ao edema cerebral foram mais proeminentes no grupo SHRn.

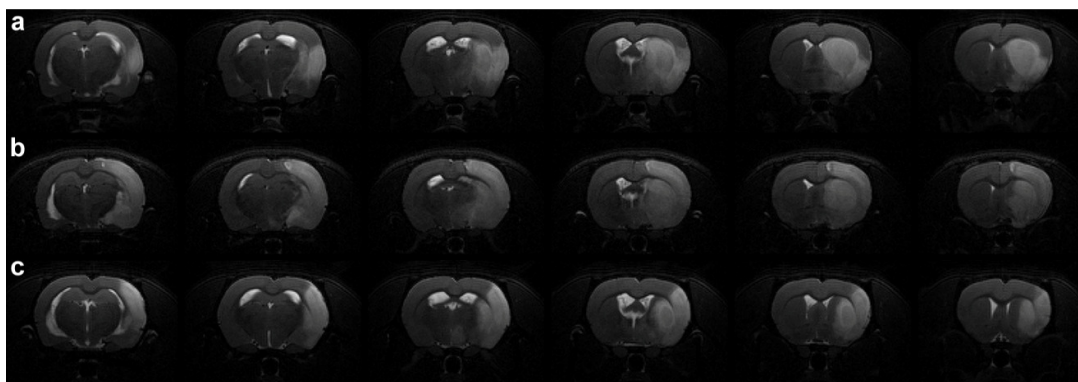


Figura 8.1: Imagens ponderadas em  $T_2$ , adquiridas um dia após a oclusão da artéria cerebral média, em ratos representativos dos grupos de (a) WKY, (b) SHR com pressão arterial baixa (SHRn), e (c) SHR em que a pressão arterial foi mantida elevada (SHRh).

Não houve diferença significativa nos volumes das lesões entre os diferentes dias de medições para cada um dos três grupos de ratos ( $P > 0,05$ ). Porém, como ocorreu durante a oclusão da ACM, o volume da lesão do grupo SHRn foi significativamente maior do que no grupo WKY nos dias 1, 4 e 7 após a indução do

AVC ( $P < 0,05$ ; Figura 8.3a). Nos dias 4 e 7, o volume da lesão do grupo SHRn também foi significativamente maior do que no grupo SHRh ( $P < 0,05$ ). Os volumes máximos foram observados no dia 4 (WKY:  $16 \pm 11\%$ ; SHRn:  $34 \pm 4\%$ ; SHRh:  $26 \pm 3\%$ ).

Como esperado, edema cerebral não foi observado nos três grupos de ratos durante a oclusão da ACM; entretanto, ele ocorreu em todos os ratos após a reperfusão. O grupo SHRn apresentou edemas cerebrais significativamente maiores do que o grupo SHRh nos dias 1 e 4 ( $P < 0,05$ ; Figura 8.3b); porém os valores não foram maiores do que no grupo WKY, provavelmente devido à grande variabilidade observada nesses ratos. No dia 7, o edema diminuiu significativamente nos três grupos e os valores não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ).

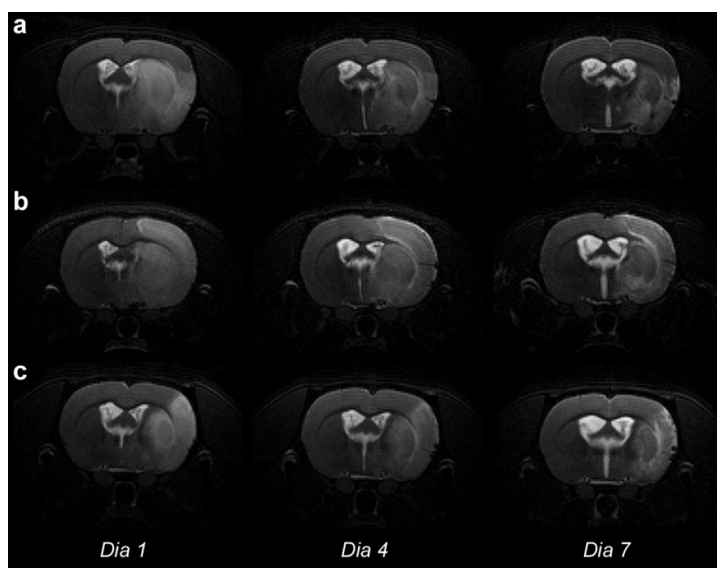


Figura 8.2: Imagens ponderadas em  $T_2$  mostram a evolução temporal das lesões isquêmicas obtidas em ratos representativos dos grupos de (a) WKY, (b) SHR com pressão arterial baixa (SHRn), e (c) SHR em que a pressão arterial foi mantida elevada (SHRh).

Déficits neurológicos foram observados após a reperfusão na maioria dos ratos, exceto em dois WKY, tendo valores máximos um dia após a oclusão (WKY:  $3,7 \pm 3,1$ ; SHRn:  $6,7 \pm 0,8$ ; SHRh:  $4,0 \pm 1,5$ ). A pontuação foi significativamente maior, correspondendo a maiores déficits, no grupo SHRn comparado com o SHRh,

nos três dias em que a avaliação neurológica foi realizada ( $P < 0,05$ ); porém foi apenas significativamente maior em relação ao grupo WKY no dia 7 ( $P < 0,05$ ; Figura 8.3c). Apesar dos déficits neurológicos terem melhorado gradualmente com o tempo, as diferenças nas pontuações não foram significativas entre os dias das avaliações.

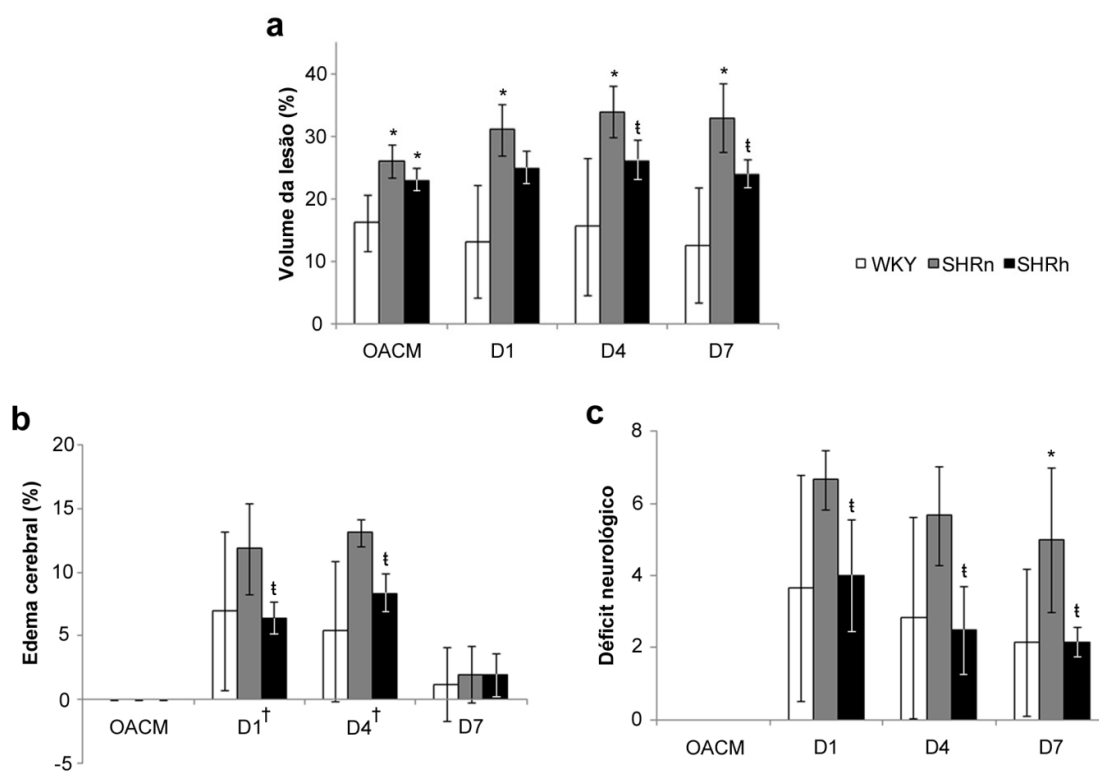


Figura 8.3: Evolução temporal do (a) volume da lesão, (b) edema cerebral e (c) déficit neurológico obtidos após isquemia temporária em WKY e SHR com (SHRh) ou sem (SHRn) a manutenção da hipertensão durante a oclusão da artéria cerebral média (OACM). (\*vs. WKY; <sup>†</sup> vs. SHRn; <sup>†</sup> vs. OACM;  $P < 0,05$ ).

Esses resultados sugerem que as alterações estruturais e funcionais na vasculatura cerebral induzidas pela hipertensão arterial resultou em maior susceptibilidade do tecido cerebral a danos isquêmicos, aumentando a lesão cerebral e acelerando a evolução da penumbra isquêmica em lesão irreversível em SHR (Letourneur *et al.*, 2011). Já a manutenção da pressão elevada nesses ratos



significativamente melhorou o déficit neurológico, diminuindo a lesão isquêmica e o edema cerebral. Como a autoregulação cerebral está prejudicada em SHR, a redução da pressão arterial desses ratos, nesse caso com a isoflurano, pode piorar a hipoperfusão induzida pela oclusão arterial. Portanto, manter a pressão elevada contribuiu para um melhor prognóstico em SHR.

### 8.2.1. CBF e Circulação Colateral

Um importante mecanismo de defesa do cérebro para se proteger de um AVC é a circulação colateral, definida como uma rede vascular suplementar que mantém o CBF quando os principais vasos falham (Liebeskind, 2003). A circulação colateral desempenha um papel compensatório fornecendo um caminho alternativo para o sangue alcançar o tecido cerebral quando as principais vias estão comprometidas. A circulação colateral é composta por anastomoses entre os segmentos da vasculatura cerebral, sendo a circulação colateral primária consistida por segmentos do círculo de Willis.

Ao afetar a função das artérias cerebrais, a hipertensão arterial prejudica o desenvolvimento da circulação colateral (Omura-Matsuoka *et al.*, 2011; Tuttle *et al.*, 2002). No entanto, a manutenção da pressão elevada na fase aguda do AVC tem mostrado ser efetiva na diminuição da lesão isquêmica ao facilitar a circulação colateral e a redistribuição do CBF na área afetada (Ishikawa *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2008). Como a maioria dos estudos avaliou o CBF usando técnicas invasivas ou que requerem agente de contraste, no presente estudo utilizamos a técnica CASL com o método de marcação seletiva das carótidas comuns (capítulo 4) para avaliar a evolução do CBF dentro e fora da região isquêmica, e o desenvolvimento do fluxo colateral.

Antes da isquemia, o valor do CBF não foi diferente para os três grupos de ratos (WKY:  $84 \pm 12$  mL/100g/min; SHRn:  $97 \pm 11$  mL/100g/min; SHRh:  $87 \pm 10$  mL/100g/min;  $P > 0,05$ ). Entretanto, a oclusão da ACM reduziu significativamente o CBF na região afetada em 71%, 82% e 72% dos valores pré-isquêmicos em WKY, SHRn e SHRh, respectivamente ( $P < 0,05$ ); e o valor do CBF foi significativamente menor em SHRn do que nos outros dois grupos ( $P < 0,05$ ; Figura 8.4a).

Mesmo um dia após a reperusão, o CBF não havia sido restaurado a valores pré-isquêmicos nos dois grupos de SHR (SHRn:  $48 \pm 13$  mL/100g/min; SHRh:  $61 \pm$

19 mL/100g/min), ao contrário do grupo de WKY ( $75 \pm 26$  mL/100g/min). Como a lesão isquêmica e o edema cerebral foram mais proeminentes nos grupos de SHR, especialmente SHRn, a quantidade relativamente maior de metabólitos isquêmicos do tecido afetado e a resistência vascular aumentada pelo edema podem ter ajudado na indução de hipoperfusão pós-isquêmica dos grupos de SHR.

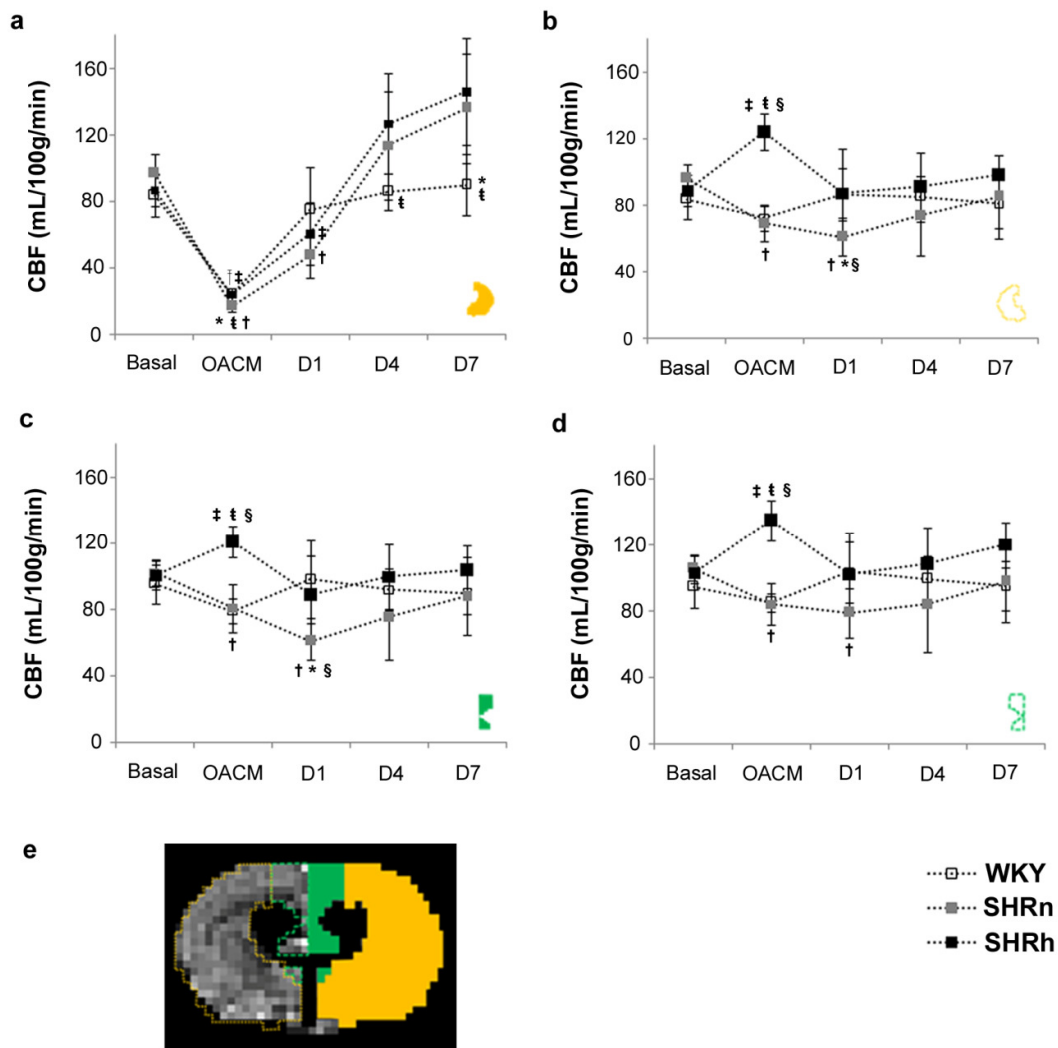


Figura 8.4: Evolução temporal do CBF medido (a) dentro e (b) fora da lesão com déficit de perfusão no hemisfério ipsilateral. Valores de CBF nas regiões correspondentes, (c) dentro e (d) fora da lesão, no hemisfério contralateral. (e) Mapa de CBF representativo mostrando as quatro regiões de interesse em que CBF foi medido. (\* WKY vs. SHRn; <sup>‡</sup> WKY vs. SHRh; <sup>§</sup> SHRn vs. SHRh; vs. basal WKY; <sup>†</sup> vs. basal SHRn, e <sup>‡</sup> vs. basal SHRh; P < 0,05).

Fora da região com deficiência de perfusão, mas ainda no hemisfério ipsilateral, o CBF em SHRh aumentou significativamente durante a injeção intravenosa de fenilefrina ( $121 \pm 9$  mL/100g/min;  $P < 0,01$ ), sendo restaurado para valores pré-isquêmicos após a reperfusão (Figura 8.4c). Por outro lado, CBF diminuiu significativamente em SHRn durante a oclusão da ACM ( $81 \pm 11$  mL/100g/min;  $P < 0,05$ ), e não foi restaurado para os valores pré-isquêmicos até o dia 1 ( $61 \pm 11$  mL/100g/min;  $P < 0,01$ ), mesmo com a reperfusão. Já no grupo WKY, não houve diferenças significativas do CBF entre os cinco dias de medições.

O CBF nessa região foi fornecido principalmente pela circulação colateral das artérias cerebrais do hemisfério esquerdo, como mostrado pelos mapas dos territórios vasculares (Figura 8.5). Em todos os ratos, após a oclusão da ACM, alterações nos territórios de perfusão foram observadas. Os ratos que apresentaram dominância esquerda do território da ACA antes da oclusão da ACM mostraram um aumento da invasão do território esquerdo no hemisfério direito após a oclusão. Por outro lado, os ratos que apresentaram dominância direita pré-isquemia passaram a apresentar dominância esquerda após a oclusão da ACM. Esses achados mostraram o desenvolvimento do fluxo sanguíneo colateral em WKY e SHR, independentemente da presença da hipertensão.

A figura 8.5 mostra os mapas dos territórios de perfusão de um rato SHR. Antes da oclusão da ACM (Figura 8.5a), dominância direita do território da ACA foi observada. Durante a oclusão (Figura 8.5b), a dominância foi invertida e a circulação esquerda passou a suprir parte do hemisfério direito. Após a reperfusão, a dominância esquerda persistiu.

Nos três grupos de ratos, o desenvolvimento do fluxo sanguíneo colateral foi observado após a oclusão da ACM, independentemente da dominância do território de perfusão antes da oclusão. Além disso, o aumento do volume do território esquerdo invadindo o hemisfério direito não diferiu entre os grupos. Entretanto, como dito anteriormente, durante a oclusão da ACM e mesmo um dia após a reperfusão, o CBF no hemisfério direito, fora da lesão, fornecido pela circulação esquerda (Figura 8.4 c) foi significativamente menor do que o CBF medido antes da oclusão no grupo SHRn. Esse resultado sugere que a presença da hipertensão prejudica o fornecimento de fluxo sanguíneo colateral para o hemisfério afetado. No entanto, no grupo SHRh, o CBF nessa região foi significativamente maior do que o

CBF medido antes da oclusão, indicando que manter a pressão sangüínea elevada ajudou no desenvolvimento do fluxo colateral.

Quando o CBF foi medido no hemisfério contralateral nas regiões correspondentes a dentro (Figura 8.4b) e fora (Figura 8.4d) da lesão com déficit de perfusão, nenhuma diferença de CBF entre os diferentes dias de medições foi observada no grupo WKY. Entretanto, no grupo SHRn, o CBF estava significativamente reduzido no hemisfério contralateral durante a oclusão da ACM em relação ao valor pré-isquêmico ( $P < 0,05$ ), e não foi restaurado até o primeiro dia após a reperfusão ( $P < 0,05$ ). Esse resultado sugere que a autoregulação foi perdida na área não afetada do SHR quando sua pressão sangüínea foi mantida em níveis normotensos durante a oclusão. Portanto, a perda de autoregulação no hemisfério contralateral pode ter ajudado no decréscimo da circulação colateral para o hemisfério isquêmico (Figura 8.4c). Já no grupo SHRh, o CBF estava aumentado significativamente em relação ao valor pré-isquêmico ( $P < 0,01$ ), novamente indicando que manter a pressão sangüínea elevada tem efeito positivo no desenvolvimento do fluxo colateral para o hemisfério afetado.

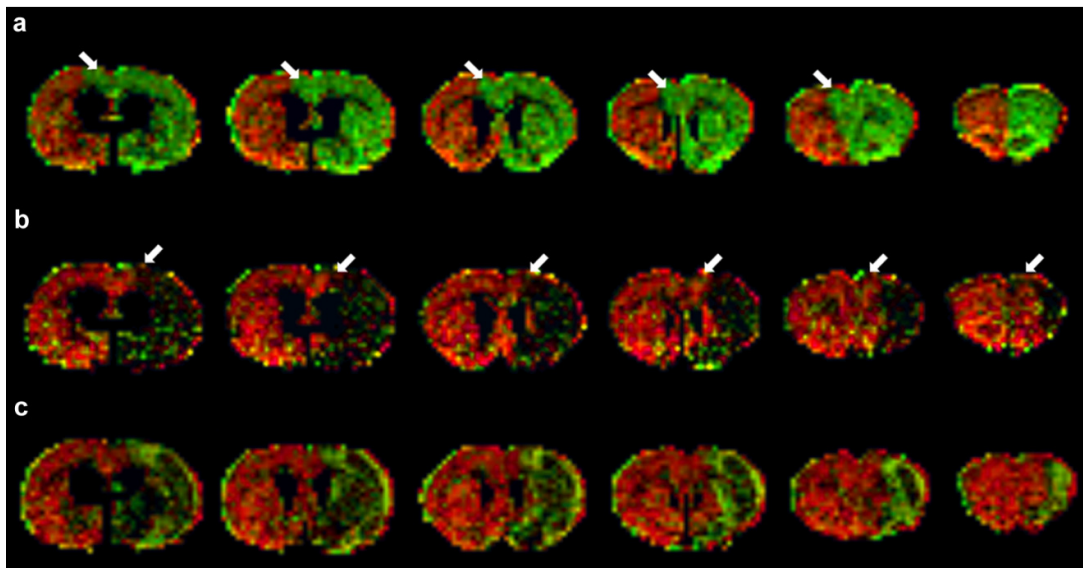


Figura 8.5: Territórios de perfusão esquerdo (vermelho) e direito (verde) de um rato SHR representativo (a) antes e (b) durante a oclusão da ACM, e (c) depois da reperfusão.

### 8.3. Considerações Gerais

Em resumo, os resultados apresentados neste capítulo mostraram que, comparados com os ratos normotensos WKY, os SHR que tiveram a pressão arterial reduzida durante a indução da isquemia apresentaram desenvolvimento prejudicado do fluxo colateral, resultando em lesões isquêmicas e edemas cerebrais maiores, além de piores déficits neurológicos. Entretanto, manter a hipertensão pré-existente nesses ratos com a administração de fenilefrina, durante a oclusão arterial, aumentou a circulação colateral para o hemisfério afetado e promoveu rápida restauração do CBF após a reperfusão, resultando em volume da lesão isquêmica, edema cerebral, e déficits neurológicos reduzidos.

Os efeitos positivos da hipertensão induzida por fenilefrina têm sido reportados em alguns estudos (Ishikawa *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2008). Entretanto, a maioria desses estudos induz hipertensão após a reperfusão e em animais normotensos. Dois estudos avaliaram os efeitos de manter a hipertensão durante a oclusão em ratos hipertensos (Cole *et al.*, 1990; Harms *et al.*, 2000) e, apesar das diferenças metodológicas, ambos estão de acordo com os resultados do presente estudo, sugerindo que manter a hipertensão pré-existente deve contribuir para um melhor prognóstico em pacientes hipertensos que sofrem AVC isquêmico agudo.

No entanto, o presente estudo tem algumas limitações que podem influenciar nos resultados com pacientes. Primeiramente, a duração da oclusão da ACM e da manutenção da hipertensão foi relativamente curta. Em pacientes, é difícil identificar e tratar o AVC em apenas uma hora após o acontecimento do evento. A infusão de agentes trombolíticos dentro de três horas após o início dos sintomas tem mostrado ser eficaz na restauração do fluxo sanguíneo e melhoramento das condições do paciente pós-isquemia (Adams *et al.*, 2007). Portanto, o efeito de um longo período (até três horas) de manutenção da hipertensão deve ser avaliado futuramente. Outra limitação foi a redução da pressão arterial a níveis normotensos utilizando isoflurano e não um hipotensor. Para reproduzir a situação clínica, a utilização de hipotensor combinado com uma anestesia que tem pouca influência na pressão arterial deve ser considerada em estudos futuros.

## *9. Conclusões e Perspectivas*

A hipertensão arterial é uma doença que progressivamente altera a estrutura e a função dos vasos sanguíneos cerebrais, alterando os mecanismos de regulação do CBF. Devido a sua alta demanda energética, o cérebro é criticamente dependente de um fornecimento contínuo de CBF para garantir sua funcionalidade. Dessa maneira, ele é o principal órgão alvo de doenças associadas à hipertensão, como AVC e demência. Portanto, entender os mecanismos de regulação do CBF e suas alterações sob pressão sanguínea elevada não é apenas de interesse científico, mas também tem grande importância clínica, justificando os estudos contínuos nessa área e a busca por técnicas que permitam quantificar o CBF não-invasivamente.

Nesse contexto, a ASL é uma ferramenta importante que permite a obtenção de mapas quantitativos de perfusão sem a necessidade de administração de contraste ou uso de radiação ionizante; assim, ela é mais segura e possibilita estudos longitudinais. Dentre os diferentes métodos de ASL, CASL, quando combinada com uma bobina dedicada à marcação, possibilita a quantificação do CBF do cérebro todo, com boa reprodutibilidade das medidas, ótima relação sinal-ruído e baixa deposição de potência no sujeito. Além disso, esse método pode ser usado na obtenção dos mapas dos territórios vasculares com alta seletividade, sendo importante na avaliação do fluxo sanguíneo colateral, principalmente em estudos de doenças cerebrovasculares.

No entanto, em estudos funcionais, é interessante utilizar a técnica DASL, que possui resolução temporal adequada para medir variações rápidas nas respostas hemodinâmicas, com boa relação sinal-ruído. Essa técnica tem a grande vantagem de fornecer o valor do CBF basal, da resposta BOLD e do CBF funcional simultaneamente, o que torna desejável sua utilização clinicamente. Essa vantagem é particularmente interessante na investigação dos efeitos de tratamentos

farmacológicos na perfusão e função cerebrais. Como as respostas hemodinâmicas (BOLD e CBF funcional) dependem do CBF basal, e este pode ser alterado com a administração de drogas, os resultados obtidos podem estar relacionados a diferentes fatores, como alterações da perfusão basal, da atividade neuronal ou do acoplamento neurovascular. Assim, a técnica DASL permite avaliar os efeitos do tratamento em diferentes aspectos da função cerebrovascular. Além disso, a técnica DASL permite o cálculo do tempo de trânsito e o considera na quantificação do CBF. Essa característica é bastante interessante nos estudos de doenças cerebrovasculares, em que o tempo de trânsito em regiões afetadas pode estar bastante alterado em relação aos valores normais.

Além de uma técnica adequada para a aquisição dos dados, os modelos animais desempenham um papel fundamental em neurociência básica e em estudos pré-clínicos, sendo amplamente utilizados. No caso dos estudos da hipertensão arterial, o modelo mais utilizado é o SHR. Nesses ratos, a hipertensão, quando combinada com a idade, aumenta a resistência cerebrovascular e reduz a vasorreatividade ao CO<sub>2</sub>. A resistência cerebrovascular elevada desempenha um papel importante no cérebro do SHR, evitando um grande aumento do CBF e possível ocorrência de um AVC hemorrágico. Por outro lado, a reduzida vasorreatividade ao CO<sub>2</sub> mostra que os vasos sangüíneos cerebrais do SHR possuem uma menor capacidade de resposta a estímulos vasodilatadores.

Além disso, a resposta hemodinâmica à atividade neuronal é alterada pela hipertensão. Em áreas cerebrais ativadas positivamente por estimulação somatosensorial, as amplitudes da resposta BOLD e do CBF funcional não são menores em SHR quando comparados a WKY. Entretanto, contrário aos WKY, a maioria dos SHR também apresentam respostas hemodinâmicas negativas em regiões circundantes às áreas ativadas positivamente. Apesar de essas repostas negativas poderem estar relacionadas à redução ou supressão da atividade neuronal, os resultados mostram que nesse caso o efeito é puramente hemodinâmico, relacionado à pressão arterial elevada e a reserva vasomotora diminuída do SHR.

Esse resultado ressalta a importância em se usar cautela ao analisar os dados de estudos funcionais, tanto em modelos experimentais quanto clinicamente. No caso de um sujeito hipertenso, a resposta hemodinâmica negativa pode estar relacionada à hipertensão crônica, mas provavelmente será associada

erroneamente à redução da atividade neuronal. É importante citar que não apenas a hipertensão arterial, mas também outros parâmetros fisiológicos como taxas cardíaca e respiratória, além do estresse e do uso de medicamentos podem influenciar nos resultados dos estudos funcionais. Portanto, considerar as condições fisiológicas do sujeito na análise dos dados ajuda na interpretação mais correta dos resultados, além de reduzir a variabilidade normalmente observada nos estudos com humanos, tornando-os mais confiáveis.

Outra diferença encontrada em SHR é em relação à modulação do acoplamento neurovascular. Em ratos normotensos, os produtos da COX-2 estão relacionados à hiperemia funcional, sendo o PGE<sub>2</sub> um agente modulador do acoplamento neurovascular. Em SHR, a COX-2 também está relacionada à hiperemia funcional; porém, outros agentes vasoativos, como por exemplo, o óxido nítrico, parecem ser mais relevantes para a modulação do acoplamento cerebrovascular.

Como vários agentes vasoativos são liberados por neurônios e glia e agem conjuntamente para aumentar o CBF local em resposta à atividade neuronal, o estudo do acoplamento neurovascular é bastante complexo, mesmo em sujeitos saudáveis. Portanto, ainda são muitos os experimentos que devem ser realizados para elucidar as questões relacionadas à modulação do acoplamento vascular em sujeitos hipertensos. Um ponto importante a ser considerado é a utilização de drogas, como os inibidores enzimáticos, que sejam bastante específicos e não alterem outros aspectos da função cerebral, como a resposta neuronal ou o CBF basal.

Por fim, SHR sujeitos à oclusão temporária da artéria cerebral média apresentam lesões isquêmicas e edemas cerebrais maiores, além de piores déficits neurológicos do que WKY, principalmente quando suas pressões arteriais estão reduzidas durante a oclusão. Por outro lado, a manutenção da hipertensão durante a oclusão ajuda no desenvolvimento mais eficiente do fluxo sanguíneo colateral, resultando em lesões isquêmicas e edemas cerebrais menores, além de melhores condições neurológicas. A avaliação da circulação colateral é possível através da aquisição dos mapas dos territórios vasculares utilizando ASL. Esse método já está sendo utilizado em estudos com humanos; porém, sua aplicação na avaliação do fluxo colateral em doenças cerebrovasculares, como estenose ou oclusão vascular, ainda pode ser bastante explorada.



Apesar de serem amplamente utilizados em estudos experimentais e fornecerem importantes informações sobre a hemodinâmica cerebral, os modelos animais apresentam algumas limitações. No caso dos roedores, a falta de similaridades entre esses animais e os humanos reduz a aplicabilidade desses modelos em estudos translacionais. Dessa forma, os primatas, como por exemplo, os macacos rhesus, se tornam mais interessantes devido a suas similaridades genéticas com os humanos, apresentando efeitos colaterais similares e podendo ser utilizados em estudos comportamentais. Entretanto, diversas espécies de primatas exigem manutenção mais cara e maiores espaços para moradia, além de apresentarem taxa de reprodução mais baixa, quando comparadas aos roedores.

Esse não é o caso dos sagüis, animais pequenos que não necessitam de grandes espaços para moradia, são fáceis de transportar e manusear, se reproduzem bem em cativeiro, tornam-se sexualmente maduros aos 18 meses de vida, e vivem de 8 a 12 anos. Suas características são vantajosas para o estudo envolvendo IRM, animais transgênicos e estudos longitudinais em que o envelhecimento é um fator importante. Entretanto, o cérebro pequeno do sagüi não é capaz de desempenhar funções psicológicas e cognitivas complexas como outros primatas maiores, limitando alguns estudos funcionais.

Além das similaridades genéticas com os humanos, os modelos animais podem também incorporar outros fatores que tornem a transferência mais eficiente dos estudos experimentais para a situação clínica. No caso de estudos de doenças cerebrovasculares, é importante considerar não somente a hipertensão arterial, mas também a obesidade, a inatividade física e a dieta, aproximando o modelo animal da condição clínica real, levando a resultados mais relevantes.

Outra limitação dos estudos com modelos animais é o uso de anestésias. No presente estudo, os experimentos foram realizados com os animais sob efeito de duas diferentes anestésias, isoflurano e  $\alpha$ -chloralose. Apesar de ser muito usada em pesquisas experimentais, a isoflurano é um potente vasodilatador que reduz significativamente a pressão sanguínea sistêmica, interfere com os mecanismos vasodilatadores do CO<sub>2</sub> e mascara os efeitos da hipertensão na elevação da resistência cerebrovascular. Por outro lado, a  $\alpha$ -chloralose não interfere com a pressão sistêmica e a função cerebrovascular; porém, é tóxica, podendo ser utilizada apenas em experimentos terminais.

Uma alternativa ao uso de anestésias é o desenvolvimento de protocolos que permitam a realização dos experimentos com os animais acordados, eliminando a interferência da anestesia na função cerebral e a necessidade de manter a fisiologia do animal. Entretanto, em IRM, é importante que o animal seja posicionado e restrito dentro do magneto de tal maneira que o movimento seja minimizado e o conforto seja maximizado. O protocolo experimental deve então incluir um período de aclimatização e treinamento do animal para que ele possa se sentir relaxado durante a aquisição das imagens. Dessa maneira, os experimentos estariam mais próximos do que ocorre no ambiente clínico, onde os voluntários e a maioria dos pacientes estão acordados durante a aquisição das imagens, aumentando a sua aplicabilidade no entendimento da organização e do funcionamento do cérebro humano.

Em suma, os resultados apresentados nesse trabalho mostram a ampla aplicabilidade das técnicas de ASL no estudo quantitativo e não-invasivo da perfusão cerebral. Analisados em conjunto, os achados mostram que a hipertensão arterial crônica altera a reserva vasomotora, resultando em diferentes respostas hemodinâmicas a estímulos vasodilatadores e mais suscetibilidade ao acidente vascular cerebral isquêmico.

## REFERÊNCIAS

Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, v. 30. n. 12, p. 2752-8. 1999.

Adams, H. P., Jr.; Del Zoppo, G.; Alberts, M. J.; Bhatt, D. L.; Brass, L.; Furlan, A.; Grubb, R. L.; Higashida, R. T.; Jauch, E. C.; Kidwell, C.; Lyden, P. D.; Morgenstern, L. B.; Qureshi, A. I.; Rosenwasser, R. H.; Scott, P. A.; Wijndicks, E. F. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke*, v. 38. n. 5, p. 1655-711. 2007.

Alson, R. L.; Dusseau, J. W.; Hutchins, P. M. Arteriolar and systemic autoregulatory responses during the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 180. n. 1, p. 62-71. 1985.

Alsop, D. C.; Detre, J. A. Reduced transit-time sensitivity in noninvasive magnetic resonance imaging of human cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 16. n. 6, p. 1236-49. 1996.

Alvarez, Y.; Perez-Giron, J. V.; Hernanz, R.; Briones, A. M.; Garcia-Redondo, A.; Beltran, A.; Alonso, M. J.; Salaices, M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 321. n. 1, p. 381-8. 2007.

Amenta, F.; Di Tullio, M. A.; Tomassoni, D. Arterial hypertension and brain damage--evidence from animal models (review). *Clin Exp Hypertens*, v. 25. n. 6, p. 359-80. 2003.

Axel, L. Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis. *Radiology*, v. 137. n. 3, p. 679-86. 1980.

Ayata, C.; Ropper, A. H. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci*, v. 9. n. 2, p. 113-24. 2002.

Bakalova, R.; Matsuura, T.; Kanno, I. The cyclooxygenase inhibitors indomethacin and Rofecoxib reduce regional cerebral blood flow evoked by somatosensory stimulation in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 227. n. 7, p. 465-73. 2002a.

Bakalova, R.; Matsuura, T.; Kanno, I. Frequency dependence of local cerebral blood flow induced by somatosensory hind paw stimulation in rat under normo- and hypercapnia. *Jpn J Physiol*, v. 51. n. 2, p. 201-8. 2001.

Bakalova, R. A.; Matsuura, T.; Kanno, I. Cyclooxygenase-pathway participates in the regulation of regional cerebral blood flow in response to neuronal activation under normo- and hypercapnia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 67. n. 6, p. 379-88. 2002b.

Barbier, E. L.; Lamalle, L.; Decorps, M. Methodology of brain perfusion imaging. *J Magn Reson Imaging*, v. 13. n. 4, p. 496-520. 2001a.

Barbier, E. L.; Silva, A. C.; Kim, H. J.; Williams, D. S.; Koretsky, A. P. Perfusion analysis using dynamic arterial spin labeling (DASL). *Magn Reson Med*, v. 41. n. 2, p. 299-308. 1999.

Barbier, E. L.; Silva, A. C.; Kim, S. G.; Koretsky, A. P. Perfusion imaging using dynamic arterial spin labeling (DASL). *Magn Reson Med*, v. 45. n. 6, p. 1021-9. 2001b.

Barone, F. C.; Price, W. J.; White, R. F.; Willette, R. N.; Feuerstein, G. Z. Genetic hypertension and increased susceptibility to cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 16. n. 2, p. 219-33. 1992.

Baumbach, G. L.; Heistad, D. D. Cerebral circulation in chronic arterial hypertension. *Hypertension*, v. 12. n. 2, p. 89-95. 1988.

Baumbach, G. L.; Heistad, D. D. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*, v. 13. n. 6 Pt 2, p. 968-72. 1989.

Bloch, F. Nuclear Induction. *Physical Review*, v.69, n.3-4, p.127-127. 1946.

Boas, D. A.; Jones, S. R.; Devor, A.; Huppert, T. J.; Dale, A. M. A vascular anatomical network model of the spatio-temporal response to brain activation. *Neuroimage*, v. 40. n. 3, p. 1116-29. 2008.

Boorman, L.; Kennerley, A. J.; Johnston, D.; Jones, M.; Zheng, Y.; Redgrave, P.; Berwick, J. Negative blood oxygen level dependence in the rat: a model for investigating the role of suppression in neurovascular coupling. *J Neurosci*, v. 30. n. 12, p. 4285-94. 2010.

Brayden, J. E.; Earley, S.; Nelson, M. T.; Reading, S. Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 35. n. 9, p. 1116-20. 2008.

Brenneis, C.; Maier, T. J.; Schmidt, R.; Hofacker, A.; Zulauf, L.; Jakobsson, P. J.; Scholich, K.; Geisslinger, G. Inhibition of prostaglandin E2 synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition. *FASEB J*, v. 20. n. 9, p. 1352-60. 2006.

Bressler, D.; Spotswood, N.; Whitney, D. Negative BOLD fMRI response in the visual cortex carries precise stimulus-specific information. *PLoS One*, v. 2. n. 5, p. e410. 2007.

Brian, J. E., Jr.; Moore, S. A.; Faraci, F. M. Expression and vascular effects of cyclooxygenase-2 in brain. *Stroke*, v. 29. n. 12, p. 2600-6. 1998.

Calamante, F.; Thomas, D. L.; Pell, G. S.; Wiersma, J.; Turner, R. Measuring cerebral blood flow using magnetic resonance imaging techniques. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 19. n. 7, p. 701-35. 1999.

Calamante, F.; Williams, S. R.; Van Bruggen, N.; Kwong, K. K.; Turner, R. A model for quantification of perfusion in pulsed labelling techniques. *NMR Biomed*, v. 9. n. 2, p. 79-83. 1996.

Chalela, J. A.; Dunn, B.; Todd, J. W.; Warach, S. Induced hypertension improves cerebral blood flow in acute ischemic stroke. *Neurology*, v. 64. n. 11, p. 1979. 2005.

Chang, I. J.; Harris, R. C. Are all COX-2 inhibitors created equal? *Hypertension*, v. 45. n. 2, p. 178-80. 2005.

Choi, S. H.; Aid, S.; Bosetti, F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci*, v. 30. n. 4, p. 174-81. 2009.

Chou, T. C.; Yen, M. H.; Li, C. Y.; Ding, Y. A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*, v. 31. n. 2, p. 643-8. 1998.

Chu, X.; Qi, C.; Zou, L.; Fu, X. Intraluminal suture occlusion and ligation of the distal branch of internal carotid artery: an improved rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *J Neurosci Methods*, v. 168. n. 1, p. 1-7. 2008.

Chui, H. C. Subcortical ischemic vascular dementia. *Neurol Clin*, v. 25. n. 3, p. 717-40, vi. 2007.

Clements, K. M.; Wainwright, P. E. Spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rats differ in performance on a win-shift task in the water radial arm maze. *Behav Brain Res*, v. 167. n. 2, p. 295-304. 2006.

Cohen, E. R.; Ugurbil, K.; Kim, S. G. Effect of basal conditions on the magnitude and dynamics of the blood oxygenation level-dependent fMRI response. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 22. n. 9, p. 1042-53. 2002.

Cole, D. J.; Drummond, J. C.; Osborne, T. N.; Matsumura, J. Hypertension and hemodilution during cerebral ischemia reduce brain injury and edema. *Am J Physiol*, v. 259. n. 1 Pt 2, p. H211-7. 1990.

Dahlof, B. Prevention of stroke in patients with hypertension. *Am J Cardiol*, v. 100. n. 3A, p. 17J-24J. 2007.

Dai, W.; Lopez, O. L.; Carmichael, O. T.; Becker, J. T.; Kuller, L. H.; Gach, H. M. Abnormal regional cerebral blood flow in cognitively normal elderly subjects with hypertension. *Stroke*, v. 39. n. 2, p. 349-54. 2008.

Danker, J. F.; Duong, T. Q. Quantitative regional cerebral blood flow MRI of animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Brain Res*, v. 1150. p. 217-24. 2007.

Denniss, S. G.; Rush, J. W. Impaired hemodynamics and endothelial vasomotor function via endoperoxide-mediated vasoconstriction in the carotid artery of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 296. n. 4, p. H1038-47. 2009.

Detre, J. A.; Leigh, J. S.; Williams, D. S.; Koretsky, A. P. Perfusion imaging. *Magn Reson Med*, v. 23. n. 1, p. 37-45. 1992.

Detre, J. A.; Wang, J.; Wang, Z.; Rao, H. Arterial spin-labeled perfusion MRI in basic and clinical neuroscience. *Curr Opin Neurol*, v. 22. n. 4, p. 348-55. 2009.

Devor, A.; Tian, P.; Nishimura, N.; Teng, I. C.; Hillman, E. M.; Narayanan, S. N.; Ulbert, I.; Boas, D. A.; Kleinfeld, D.; Dale, A. M. Suppressed neuronal activity and concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-dependent signal. *J Neurosci*, v. 27. n. 16, p. 4452-9. 2007.

Dogne, J. M.; Thiry, A.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibition: insight into non-COX-2 pharmacological effect of some coxibs. *Curr Pharm Des*, v. 14. n. 7, p. 679-84. 2008.

Duong, T. Q.; Silva, A. C.; Lee, S. P.; Kim, S. G. Functional MRI of calcium-dependent synaptic activity: cross correlation with CBF and BOLD measurements. *Magn Reson Med*, v. 43. n. 3, p. 383-92. 2000.

Duverger, D.; Mackenzie, E. T. The quantification of cerebral infarction following focal ischemia in the rat: influence of strain, arterial pressure, blood glucose concentration, and age. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 8. n. 4, p. 449-61. 1988.

Edelman, R. R.; Siewert, B.; Darby, D. G.; Thangaraj, V.; Nobre, A. C.; Mesulam, M. M.; Warach, S. Qualitative mapping of cerebral blood flow and functional localization with echo-planar MR imaging and signal targeting with alternating radio frequency. *Radiology*, v. 192. n. 2, p. 513-20. 1994.

Eger, E. I., 2nd. The pharmacology of isoflurane. *Br J Anaesth*, v. 56 Suppl 1. p. 71S-99S. 1984.

Ellis, J. A.; Stebbing, M.; Harrap, S. B. Association of the human Y chromosome with high blood pressure in the general population. *Hypertension*, v. 36. n. 5, p. 731-3. 2000.

Ely, D.; Underwood, A.; Dunphy, G.; Boehme, S.; Turner, M.; Milsted, A. Review of the Y chromosome, Sry and hypertension. *Steroids*, v. 75. n. 11, p. 747-53. 2010.

Feigin, V. L.; Lawes, C. M.; Bennett, D. A.; Anderson, C. S. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol*, v. 2. n. 1, p. 43-53. 2003.

Feihl, F.; Liaudet, L.; Waeber, B. The macrocirculation and microcirculation of hypertension. *Curr Hypertens Rep*, v. 11. n. 3, p. 182-9. 2009.



Feletou, M.; Verbeuren, T. J.; Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol*, v. 156. n. 4, p. 563-74. 2009.

Francis, S. T.; Bowtell, R.; Gowland, P. A. Modeling and optimization of Look-Locker spin labeling for measuring perfusion and transit time changes in activation studies taking into account arterial blood volume. *Magn Reson Med*, v. 59. n. 2, p. 316-25. 2008.

Fujishima, M.; Sadoshima, S.; Ogata, J.; Yoshida, F.; Shiokawa, O.; Ibayashi, S.; Omae, T. Autoregulation of cerebral blood flow in young and aged spontaneously hypertensive rats (SHR). *Gerontology*, v. 30. n. 1, p. 30-6. 1984.

Geeganage, C. M.; Bath, P. M. Relationship between therapeutic changes in blood pressure and outcomes in acute stroke: a metaregression. *Hypertension*, v. 54. n. 4, p. 775-81. 2009.

Gerriets, T.; Stolz, E.; Walberer, M.; Muller, C.; Kluge, A.; Bachmann, A.; Fisher, M.; Kaps, M.; Bachmann, G. Noninvasive quantification of brain edema and the space-occupying effect in rat stroke models using magnetic resonance imaging. *Stroke*, v. 35. n. 2, p. 566-71. 2004.

Girouard, H.; Iadecola, C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol*, v. 100. n. 1, p. 328-35. 2006.

Golay, X.; Hendrikse, J.; Lim, T. C. Perfusion imaging using arterial spin labeling. *Top Magn Reson Imaging*, v. 15. n. 1, p. 10-27. 2004.

Golay, X.; Petersen, E. T.; Zimine, I.; Lim, T. C. Arterial Spin Labeling: a one-stop-shop for measurement of brain perfusion in the clinical settings. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, v. 2007. p. 4320-3. 2007.

Gonzalez, J. M.; Somoza, B.; Conde, M. V.; Fernandez-Alfonso, M. S.; Gonzalez, M. C.; Arribas, S. M. Hypertension increases middle cerebral artery resting tone in spontaneously hypertensive rats: role of tonic vasoactive factor availability. *Clin Sci (Lond)*, v. 114. n. 10, p. 651-9. 2008.

Goyagi, T.; Kimura, T.; Nishikawa, T.; Tobe, Y.; Masaki, Y. Beta-adrenoreceptor antagonists attenuate brain injury after transient focal ischemia in rats. *Anesth Analg*, v. 103. n. 3, p. 658-63. 2006.

Gozzi, A.; Ceolin, L.; Schwarz, A.; Reese, T.; Bertani, S.; Crestan, V.; Bifone, A. A multimodality investigation of cerebral hemodynamics and autoregulation in pharmacological MRI. *Magn Reson Imaging*, v. 25. n. 6, p. 826-33. 2007.

Grabowski, M.; Mattsson, B.; Nordborg, C.; Johansson, B. B. Brain capillary density and cerebral blood flow after occlusion of the middle cerebral artery in normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, v. 11. n. 12, p. 1363-8. 1993.

Harel, N.; Lee, S. P.; Nagaoka, T.; Kim, D. S.; Kim, S. G. Origin of negative blood oxygenation level-dependent fMRI signals. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 22. n. 8, p. 908-17. 2002.

Harms, H.; Wiegand, F.; Megow, D.; Prass, K.; Einhaupl, K. M.; Dirnagl, U. Acute treatment of hypertension increases infarct sizes in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport*, v. 11. n. 2, p. 355-9. 2000.

Harper, S. L.; Bohlen, H. G. Microvascular adaptation in the cerebral cortex of adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 6. n. 3, p. 408-19. 1984.

Heagerty, A. M.; Heerkens, E. H.; Izzard, A. S. Small artery structure and function in hypertension. *J Cell Mol Med*, v. 14. n. 5, p. 1037-43. 2010.

Heinert, G.; Casadei, B.; Paterson, D. J. Hypercapnic cerebral blood flow in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, v. 16. n. 10, p. 1491-8. 1998.

Heinke, W.; Zysset, S.; Hund-Georgiadis, M.; Olthoff, D.; Von Cramon, D. Y. The effect of esmolol on cerebral blood flow, cerebral vasoreactivity, and cognitive performance: a functional magnetic resonance imaging study. *Anesthesiology*, v. 102. n. 1, p. 41-50. 2005.

Hendrikse, J.; Lu, H.; Van Der Grond, J.; Van Zijl, P. C.; Golay, X. Measurements of cerebral perfusion and arterial hemodynamics during visual stimulation using TURBO-TILT. *Magn Reson Med*, v. 50. n. 2, p. 429-33. 2003.

Hendrikse, J.; Petersen, E. T.; Cheze, A.; Chng, S. M.; Venketasubramanian, N.; Golay, X. Relation between cerebral perfusion territories and location of cerebral infarcts. *Stroke*, v. 40. n. 5, p. 1617-22. 2009.

Hendrikse, J.; Van Der Grond, J.; Lu, H.; Van Zijl, P. C.; Golay, X. Flow territory mapping of the cerebral arteries with regional perfusion MRI. *Stroke*, v. 35. n. 4, p. 882-7. 2004.

Hendrikse, J.; Van Raamt, A. F.; Van Der Graaf, Y.; Mali, W. P.; Van Der Grond, J. Distribution of cerebral blood flow in the circle of Willis. *Radiology*, v. 235. n. 1, p. 184-9. 2005.

Hernanz, R.; Briones, A. M.; Alonso, M. J.; Vila, E.; Salaices, M. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 287. n. 1, p. H225-34. 2004.

Herscovitch, P.; Raichle, M. E. What is the correct value for the brain--blood partition coefficient for water? *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 5. n. 1, p. 65-9. 1985.

Hetu, P. O.; Riendeau, D. Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. *Biochem J*, v. 391. n. Pt 3, p. 561-6. 2005.

Hirano, Y.; Stefanovic, B.; Silva, A. C. Spatiotemporal evolution of the functional magnetic resonance imaging response to ultrashort stimuli. *J Neurosci*, v. 31. n. 4, p. 1440-7. 2011.

Hocheil, K.; Endemann, D.; Kammerl, M. C.; Grobecker, H. F.; Kurtz, A. Cyclo-oxygenase-2 inhibition increases blood pressure in rats. *Br J Pharmacol*, v. 136. n. 8, p. 1117-26. 2002.

Hoffman, W. E.; Edelman, G.; Kochs, E.; Werner, C.; Segil, L.; Albrecht, R. F. Cerebral autoregulation in awake versus isoflurane-anesthetized rats. *Anesth Analg*, v. 73. n. 6, p. 753-7. 1991.

Hom, S.; Fleegal, M. A.; Egleton, R. D.; Campos, C. R.; Hawkins, B. T.; Davis, T. P. Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 292. n. 5, p. R1881-92. 2007.

Iadecola, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 5. n. 5, p. 347-60. 2004.

Iadecola, C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci*, v. 16. n. 6, p. 206-14. 1993.

Iadecola, C.; Davisson, R. L. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. *Cell Metab*, v. 7. n. 6, p. 476-84. 2008.

Iadecola, C.; Gorelick, P. B. Hypertension, angiotensin, and stroke: beyond blood pressure. *Stroke*, v. 35. n. 2, p. 348-50. 2004.

Iadecola, C.; Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, v. 10. n. 11, p. 1369-76. 2007.

Iadecola, C.; Park, L.; Capone, C. Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension. *Stroke*, v. 40. n. 3 Suppl, p. S40-4. 2009.

Ibarra, M.; Lopez-Guerrero, J. J.; Mejia-Zepeda, R.; Villalobos-Molina, R. Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. *Arch Med Res*, v. 37. n. 3, p. 334-41. 2006.

Ishikawa, S.; Ito, H.; Yokoyama, K.; Makita, K. Phenylephrine ameliorates cerebral cytotoxic edema and reduces cerebral infarction volume in a rat model of complete unilateral carotid artery occlusion with severe hypotension. *Anesth Analg*, v. 108. n. 5, p. 1631-7. 2009.

Jennings, J. R.; Muldoon, M. F.; Ryan, C.; Price, J. C.; Greer, P.; Sutton-Tyrrell, K.; Van Der Veen, F. M.; Meltzer, C. C. Reduced cerebral blood flow response and compensation among patients with untreated hypertension. *Neurology*, v. 64. n. 8, p. 1358-65. 2005.

Jennings, J. R.; Zanstra, Y. Is the brain the essential in hypertension? *Neuroimage*, v. 47. n. 3, p. 914-21. 2009.

Jones, C. E.; Wolf, R. L.; Detre, J. A.; Das, B.; Saha, P. K.; Wang, J.; Zhang, Y.; Song, H. K.; Wright, A. C.; Mohler, E. M., 3rd; Fairman, R. M.; Zager, E. L.; Velazquez, O. C.; Golden, M. A.; Carpenter, J. P.; Wehrli, F. W. Structural MRI of carotid artery atherosclerotic lesion burden and characterization of hemispheric cerebral blood flow before and after carotid endarterectomy. *NMR Biomed*, v. 19. n. 2, p. 198-208. 2006.

Kannurpatti, S. S.; Biswal, B. B. Negative functional response to sensory stimulation and its origins. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 24. n. 6, p. 703-12. 2004.

Katsuta, T. Decreased local cerebral blood flow in young and aged spontaneously hypertensive rats. *Fukuoka Igaku Zasshi*, v. 88. n. 3, p. 65-74. 1997.

Kelley, B. J.; Petersen, R. C. Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin*, v. 25. n. 3, p. 577-609, v. 2007.

Kennan, R. P.; Zhong, J.; Gore, J. C. Intravascular susceptibility contrast mechanisms in tissues. *Magn Reson Med*, v. 31. n. 1, p. 9-21. 1994.

Kety, S. S.; Schmidt, C. F. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man; theory, procedure and normal values. *J Clin Invest*, v. 27. n. 4, p. 476-83. 1948.

Krucker, T.; Schuler, A.; Meyer, E. P.; Staufenbiel, M.; Beckmann, N. Magnetic resonance angiography and vascular corrosion casting as tools in biomedical research: application to transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Neurol Res*, v. 26. n. 5, p. 507-16. 2004.

Kusuda, K.; Ibayashi, S.; Sadoshima, S.; Ishitsuka, T.; Fujishima, M. Brain ischemia following bilateral carotid occlusion during development of hypertension in young spontaneously hypertensive rats--importance of morphologic changes of the arteries of the circle of Willis. *Angiology*, v. 47. n. 5, p. 455-65. 1996.

Kwong, K. K.; Belliveau, J. W.; Chesler, D. A.; Goldberg, I. E.; Weisskoff, R. M.; Poncelet, B. P.; Kennedy, D. N.; Hoppel, B. E.; Cohen, M. S.; Turner, R.; Et Al. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89. n. 12, p. 5675-9. 1992.

Lang, M. G.; Noll, G.; Luscher, T. F. Effect of aging and hypertension on contractility of resistance arteries: modulation by endothelial factors. *Am J Physiol*, v. 269. n. 3 Pt 2, p. H837-44. 1995.

Langheinrich, M.; Lee, M. A.; Bohm, M.; Pinto, Y. M.; Ganten, D.; Paul, M. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)<sup>27</sup> in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens*, v. 9. n. 5, p. 506-12. 1996.

Laurent, S.; Boutouyrie, P. Arterial stiffness and stroke in hypertension: therapeutic implications for stroke prevention. *CNS Drugs*, v. 19. n. 1, p. 1-11. 2005.

Lecrux, C.; Nicole, O.; Chazalviel, L.; Catone, C.; Chuquet, J.; Mackenzie, E. T.; Touzani, O. Spontaneously hypertensive rats are highly vulnerable to AMPA-induced brain lesions. *Stroke*, v. 38. n. 11, p. 3007-15. 2007.

Leonardi-Bee, J.; Bath, P. M.; Phillips, S. J.; Sandercock, P. A. Blood pressure and clinical outcomes in the International Stroke Trial. *Stroke*, v. 33. n. 5, p. 1315-20. 2002.

Leoni, R. F.; Paiva, F. F.; Henning, E. C.; Nascimento, G. C.; Tannus, A.; De Araujo, D. B.; Silva, A. C. Magnetic resonance imaging quantification of regional cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity to carbon dioxide in normotensive and hypertensive rats. *Neuroimage*, v. p. 2011.

Letourneur, A.; Roussel, S.; Toutain, J.; Bernaudin, M.; Touzani, O. Impact of genetic and renovascular chronic arterial hypertension on the acute spatiotemporal evolution of the ischemic penumbra: a sequential study with MRI in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 31. n. 2, p. 504-13. 2011.

Liebeskind, D. S. Collateral circulation. *Stroke*, v. 34. n. 9, p. 2279-84. 2003.

Lieke, E. E.; Frostig, R. D.; Arieli, A.; Ts'o, D. Y.; Hildesheim, R.; Grinvald, A. Optical imaging of cortical activity: real-time imaging using extrinsic dye-signals and high resolution imaging based on slow intrinsic-signals. *Annu Rev Physiol*, v. 51. p. 543-59. 1989.

Longa, E. Z.; Weinstein, P. R.; Carlson, S.; Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, v. 20. n. 1, p. 84-91. 1989.

Lu, J.; Dai, G.; Egi, Y.; Huang, S.; Kwon, S. J.; Lo, E. H.; Kim, Y. R. Characterization of cerebrovascular responses to hyperoxia and hypercapnia using MRI in rat. *Neuroimage*, v. 45. n. 4, p. 1126-34. 2009.

Maccotta, L.; Detre, J. A.; Alsop, D. C. The efficiency of adiabatic inversion for perfusion imaging by arterial spin labeling. *NMR Biomed*, v. 10. n. 4-5, p. 216-21. 1997.

Martin, A. J.; Friston, K. J.; Colebatch, J. G.; Frackowiak, R. S. Decreases in regional cerebral blood flow with normal aging. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 11. n. 4, p. 684-9. 1991.

Mccabe, C.; Gallagher, L.; Gsell, W.; Graham, D.; Dominiczak, A. F.; Macrae, I. M. Differences in the evolution of the ischemic penumbra in stroke-prone

spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Stroke*, v. 40. n. 12, p. 3864-8. 2009.

Mcpherson, R. W.; Briar, J. E.; Traystman, R. J. Cerebrovascular responsiveness to carbon dioxide in dogs with 1.4% and 2.8% isoflurane. *Anesthesiology*, v. 70. n. 5, p. 843-50. 1989.

Mcpherson, R. W.; Traystman, R. J. Effects of isoflurane on cerebral autoregulation in dogs. *Anesthesiology*, v. 69. n. 4, p. 493-9. 1988.

Meier, P.; Zierler, K. L. On the theory of the indicator-dilution method for measurement of blood flow and volume. *J Appl Physiol*, v. 6. n. 12, p. 731-44. 1954.

Meng, X.; Fisher, M.; Shen, Q.; Sotak, C. H.; Duong, T. Q. Characterizing the diffusion/perfusion mismatch in experimental focal cerebral ischemia. *Ann Neurol*, v. 55. n. 2, p. 207-12. 2004.

Moustafa, R. R.; Baron, J. C. Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br J Pharmacol*, v. 153 Suppl 1. p. S44-54. 2008.

Nakajima, S.; Kondoh, T.; Morishita, A.; Yamashita, H.; Kohmura, E.; Sakurai, T.; Yokono, K.; Umetani, K. Loss of CO<sub>2</sub>-induced distensibility in cerebral arteries with chronic hypertension or vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Kobe J Med Sci*, v. 53. n. 6, p. 317-26. 2007.

Nascimento, A. R.; Lessa, M. A.; Sabino, B.; Bousquet, P.; Tibirica, E. Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 55. n. 3, p. 240-7. 2010.

Niwa, K.; Araki, E.; Morham, S. G.; Ross, M. E.; Iadecola, C. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci*, v. 20. n. 2, p. 763-70. 2000.



Niwa, K.; Haensel, C.; Ross, M. E.; Iadecola, C. Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ Res*, v. 88. n. 6, p. 600-8. 2001.

Niwa, K.; Kazama, K.; Younkin, L.; Younkin, S. G.; Carlson, G. A.; Iadecola, C. Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 283. n. 1, p. H315-23. 2002.

Novak, V.; Hajjar, I. The relationship between blood pressure and cognitive function. *Nat Rev Cardiol*, v. 7. n. 12, p. 686-98. 2010.

O'collins, V. E.; Macleod, M. R.; Donnan, G. A.; Horvath, L. L.; Van Der Worp, B. H.; Howells, D. W. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol*, v. 59. n. 3, p. 467-77. 2006.

Ogawa, S.; Tank, D. W.; Menon, R.; Ellermann, J. M.; Kim, S. G.; Merkle, H.; Ugurbil, K. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89. n. 13, p. 5951-5. 1992.

Okamoto, K.; Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, v. 27. p. 282-93. 1963.

Okuda, T.; Sumiya, T.; Iwai, N.; Miyata, T. Difference of gene expression profiles in spontaneous hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats from two sources. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 296. n. 3, p. 537-43. 2002.

Olivot, J. M.; Marks, M. P. Magnetic resonance imaging in the evaluation of acute stroke. *Top Magn Reson Imaging*, v. 19. n. 5, p. 225-30. 2008.

Omura-Matsuoka, E.; Yagita, Y.; Sasaki, T.; Terasaki, Y.; Oyama, N.; Sugiyama, Y.; Todo, K.; Sakoda, S.; Kitagawa, K. Hypertension impairs leptomeningeal collateral growth after common carotid artery occlusion: restoration by antihypertensive treatment. *J Neurosci Res*, v. 89. n. 1, p. 108-16. 2011.

Oparil, S.; Zaman, M. A.; Calhoun, D. A. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med*, v. 139. n. 9, p. 761-76. 2003.

Paiva, F. F.; Tannus, A.; Silva, A. C. Measurement of cerebral perfusion territories using arterial spin labelling. *NMR Biomed*, v. 20. n. 7, p. 633-42. 2007.

Paiva, F. F.; Tannus, A.; Talagala, S. L.; Silva, A. C. Arterial spin labeling of cerebral perfusion territories using a separate labeling coil. *J Magn Reson Imaging*, v. 27. n. 5, p. 970-7. 2008.

Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Academic Press, 1998. p.

Pedelty, L.; Gorelick, P. B. Management of hypertension and cerebrovascular disease in the elderly. *Am J Med*, v. 121. n. 8 Suppl, p. S23-31. 2008.

Petcharunpaisan, S.; Ramalho, J.; Castillo, M. Arterial spin labeling in neuroimaging. *World J Radiol*, v. 2. n. 10, p. 384-98. 2010.

Petersen, E. T.; Zimine, I.; Ho, Y. C.; Golay, X. Non-invasive measurement of perfusion: a critical review of arterial spin labelling techniques. *Br J Radiol*, v. 79. n. 944, p. 688-701. 2006.

Phelps, M. E.; Mazziotta, J. C.; Huang, S. C. Study of cerebral function with positron computed tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 2. n. 2, p. 113-62. 1982.

Pollock, J. M.; Tan, H.; Kraft, R. A.; Whitlow, C. T.; Burdette, J. H.; Maldjian, J. A. Arterial spin-labeled MR perfusion imaging: clinical applications. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, v. 17. n. 2, p. 315-38. 2009.

Reese, T.; Bochen, D.; Sauter, A.; Beckmann, N.; Rudin, M. Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR Biomed*, v. 12. n. 4, p. 189-96. 1999.

Riecker, A.; Grodd, W.; Klose, U.; Schulz, J. B.; Groschel, K.; Erb, M.; Ackermann, H.; Kastrup, A. Relation between regional functional MRI activation and vascular reactivity to carbon dioxide during normal aging. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 23. n. 5, p. 565-73. 2003.

Rizzoni, D.; De Ciuceis, C.; Porteri, E.; Paiardi, S.; Boari, G. E.; Mortini, P.; Cornali, C.; Cenzato, M.; Rodella, L. F.; Borsani, E.; Rizzardi, N.; Platto, C.; Rezzani, R.; Rosei, E. A. Altered structure of small cerebral arteries in patients with essential hypertension. *J Hypertens*, v. 27. n. 4, p. 838-45. 2009.

Robertson, B. A.; Clements, K. M.; Wainwright, P. E. The working memory capabilities of the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Behav*, v. 94. n. 3, p. 481-6. 2008.

Rordorf, G.; Koroshetz, W. J.; Ezzeddine, M. A.; Segal, A. Z.; Buonanno, F. S. A pilot study of drug-induced hypertension for treatment of acute stroke. *Neurology*, v. 56. n. 9, p. 1210-3. 2001.

Ruiz-Ortega, M.; Esteban, V.; Ruperez, M.; Sanchez-Lopez, E.; Rodriguez-Vita, J.; Carvajal, G.; Egido, J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 15. n. 2, p. 159-66. 2006.

Sarikonda, K. V.; Watson, R. E.; Opara, O. C.; Dipette, D. J. Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens*, v. 3. n. 3, p. 158-65. 2009.

Scheller, M. S.; Todd, M. M.; Drummond, J. C. Isoflurane, halothane, and regional cerebral blood flow at various levels of PaCO<sub>2</sub> in rabbits. *Anesthesiology*, v. 64. n. 5, p. 598-604. 1986.

Schwaiger, M.; Pirich, C. [Positron emission tomography]. *Z Kardiol*, v. 89 Suppl 1. p. 59-66. 2000.

Shimokama, T.; Haraoka, S.; Horiguchi, H.; Sugiyama, F.; Murakami, K.; Watanabe, T. The Tsukuba hypertensive mouse (transgenic mouse carrying human

genes for both renin and angiotensinogen) as a model of human malignant hypertension: development of lesions and morphometric analysis. *Virchows Arch*, v. 432. n. 2, p. 169-75. 1998.

Shin, H. K.; Nishimura, M.; Jones, P. B.; Ay, H.; Boas, D. A.; Moskowitz, M. A.; Ayata, C. Mild induced hypertension improves blood flow and oxygen metabolism in transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, v. 39. n. 5, p. 1548-55. 2008.

Shmuel, A.; Yacoub, E.; Pfeuffer, J.; Van De Moortele, P. F.; Adriany, G.; Hu, X.; Ugurbil, K. Sustained negative BOLD, blood flow and oxygen consumption response and its coupling to the positive response in the human brain. *Neuron*, v. 36. n. 6, p. 1195-210. 2002.

Sicard, K.; Shen, Q.; Brevard, M. E.; Sullivan, R.; Ferris, C. F.; King, J. A.; Duong, T. Q. Regional cerebral blood flow and BOLD responses in conscious and anesthetized rats under basal and hypercapnic conditions: implications for functional MRI studies. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 23. n. 4, p. 472-81. 2003.

Silva, A.; Zhang, W.; Williams, D.; Koretsky, A. Multi-slice MRI of rat brain perfusion during amphetamine stimulation using arterial spin labeling. *Magn Reson Med*, v. 33. p. 209-14. 1995.

Silva, A. C.; Koretsky, A. P.; Duyn, J. H. Functional MRI impulse response for BOLD and CBV contrast in rat somatosensory cortex. *Magn Reson Med*, v. 57. n. 6, p. 1110-8. 2007.

Silva, A. C.; Paiva, F. F. Dynamic magnetic resonance imaging of cerebral blood flow using arterial spin labeling. *Methods Mol Biol*, v. 489. p. 277-95. 2009.

Skoog, I.; Gustafson, D. Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol Res*, v. 28. n. 6, p. 605-11. 2006.

Smith, A. T.; Williams, A. L.; Singh, K. D. Negative BOLD in the visual cortex: evidence against blood stealing. *Hum Brain Mapp*, v. 21. n. 4, p. 213-20. 2004.

Sokoloff, L.; Reivich, M.; Kennedy, C.; Des Rosiers, M. H.; Patlak, C. S.; Pettigrew, K. D.; Sakurada, O.; Shinohara, M. The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*, v. 28. n. 5, p. 897-916. 1977.

Sokrab, T. E.; Johansson, B. B. Regional cerebral blood flow in acute hypertension induced by adrenaline, noradrenaline and phenylephrine in the conscious rat. *Acta Physiol Scand*, v. 137. n. 1, p. 101-6. 1989.

Staroselskaya, I. A.; Chaves, C.; Silver, B.; Linfante, I.; Edelman, R. R.; Caplan, L.; Warach, S.; Baird, A. E. Relationship between magnetic resonance arterial patency and perfusion-diffusion mismatch in acute ischemic stroke and its potential clinical use. *Arch Neurol*, v. 58. n. 7, p. 1069-74. 2001.

Stefanovic, B.; Bosetti, F.; Silva, A. C. Modulatory role of cyclooxygenase-2 in cerebrovascular coupling. *Neuroimage*, v. 32. n. 1, p. 23-32. 2006.

Strebel, S.; Lam, A. M.; Matta, B.; Mayberg, T. S.; Aaslid, R.; Newell, D. W. Dynamic and static cerebral autoregulation during isoflurane, desflurane, and propofol anesthesia. *Anesthesiology*, v. 83. n. 1, p. 66-76. 1995.

Tamaki, K.; Nakai, M.; Yokota, T.; Ogata, J. Effects of aging and chronic hypertension on cerebral blood flow and cerebrovascular CO<sub>2</sub> reactivity in the rat. *Gerontology*, v. 41. n. 1, p. 11-7. 1995.

Tang, E. H.; Vanhoutte, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics*, v. 32. n. 3, p. 409-18. 2008.

Triantafyllidi, H.; Arvaniti, C.; Lekakis, J.; Ikonomidis, I.; Sifakas, N.; Tzortzis, S.; Trivilou, P.; Zerva, L.; Stamboulis, E.; Kremastinos, D. T. Cognitive impairment is related to increased arterial stiffness and microvascular damage in patients with never-treated essential hypertension. *Am J Hypertens*, v. 22. n. 5, p. 525-30. 2009.

Tsekos, N. V.; Zhang, F.; Merkle, H.; Nagayama, M.; Iadecola, C.; Kim, S. G. Quantitative measurements of cerebral blood flow in rats using the FAIR technique: correlation with previous iodoantipyrine autoradiographic studies. *Magn Reson Med*, v. 39. n. 4, p. 564-73. 1998.

Turner, M. E.; Farkas, J.; Dunmire, J.; Ely, D.; Milsted, A. Which Sry locus is the hypertensive Y chromosome locus? *Hypertension*, v. 53. n. 2, p. 430-5. 2009.

Turner, M. E.; Johnson, M. L.; Ely, D. L. Separate sex-influenced and genetic components in spontaneously hypertensive rat hypertension. *Hypertension*, v. 17. n. 6 Pt 2, p. 1097-103. 1991.

Tuttle, J. L.; Sanders, B. M.; Burkhart, H. M.; Fath, S. W.; Kerr, K. A.; Watson, W. C.; Herring, B. P.; Dalsing, M. C.; Unthank, J. L. Impaired collateral artery development in spontaneously hypertensive rats. *Microcirculation*, v. 9. n. 5, p. 343-51. 2002.

Unoki, H.; Furukawa, K.; Yonekura, H.; Ueda, Y.; Katsuda, S.; Mori, M.; Nakagawara, K.; Mabuchi, H.; Yamamoto, H. Up-regulation of *cyr61* in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest*, v. 83. n. 7, p. 973-82. 2003.

Van Aken, H.; Fitch, W.; Graham, D. I.; Brussel, T.; Themann, H. Cardiovascular and cerebrovascular effects of isoflurane-induced hypotension in the baboon. *Anesth Analg*, v. 65. n. 6, p. 565-74. 1986.

Van Laar, P. J.; Hendrikse, J.; Golay, X.; Lu, H.; Van Osch, M. J.; Van Der Grond, J. In vivo flow territory mapping of major brain feeding arteries. *Neuroimage*, v. 29. n. 1, p. 136-44. 2006.

Van Laar, P. J.; Hendrikse, J.; Klijn, C. J.; Kappelle, L. J.; Van Osch, M. J.; Van Der Grond, J. Symptomatic carotid artery occlusion: flow territories of major brain-feeding arteries. *Radiology*, v. 242. n. 2, p. 526-34. 2007.

Van Laar, P. J.; Van Der Grond, J.; Hendrikse, J. Brain perfusion territory imaging: methods and clinical applications of selective arterial spin-labeling MR imaging. *Radiology*, v. 246. n. 2, p. 354-64. 2008.

Van Osch, M. J.; Hendrikse, J.; Golay, X.; Bakker, C. J.; Van Der Grond, J. Non-invasive visualization of collateral blood flow patterns of the circle of Willis by dynamic MR angiography. *Med Image Anal*, v. 10. n. 1, p. 59-70. 2006.

Vane, S. J. Differential inhibition of cyclooxygenase isoforms: an explanation of the action of NSAIDs. *J Clin Rheumatol*, v. 4. n. 5 Suppl, p. s3-10. 1998.

Vanhoutte, P. M. COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther*, v. 86. n. 2, p. 212-5. 2009.

Vazquez, A. L.; Cohen, E. R.; Gulani, V.; Hernandez-Garcia, L.; Zheng, Y.; Lee, G. R.; Kim, S. G.; Grotberg, J. B.; Noll, D. C. Vascular dynamics and BOLD fMRI: CBF level effects and analysis considerations. *Neuroimage*, v. 32. n. 4, p. 1642-55. 2006.

Veglio, F.; Paglieri, C.; Rabbia, F.; Bisbocci, D.; Bergui, M.; Cerrato, P. Hypertension and cerebrovascular damage. *Atherosclerosis*, v. 205. n. 2, p. 331-41. 2009.

Villringer, A.; Dirnagl, U. Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, v. 7. n. 3, p. 240-76. 1995.

Villringer, A.; Rosen, B. R.; Belliveau, J. W.; Ackerman, J. L.; Lauffer, R. B.; Buxton, R. B.; Chao, Y. S.; Wedeen, V. J.; Brady, T. J. Dynamic imaging with lanthanide chelates in normal brain: contrast due to magnetic susceptibility effects. *Magn Reson Med*, v. 6. n. 2, p. 164-74. 1988.

Wei, L.; Lin, S. Z.; Tajima, A.; Nakata, H.; Acuff, V.; Patlak, C.; Pettigrew, K.; Fenstermacher, J. Cerebral glucose utilization and blood flow in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 20. n. 4, p. 501-10. 1992.

Williams, D. S.; Detre, J. A.; Leigh, J. S.; Koretsky, A. P. Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 89. n. 1, p. 212-6. 1992.

Wong, E. C.; Buxton, R. B.; Frank, L. R. A theoretical and experimental comparison of continuous and pulsed arterial spin labeling techniques for quantitative perfusion imaging. *Magn Reson Med*, v. 40. n. 3, p. 348-55. 1998.

Wong, E. C.; Cronin, M.; Wu, W. C.; Inglis, B.; Frank, L. R.; Liu, T. T. Velocity-selective arterial spin labeling. *Magn Reson Med*, v. 55. n. 6, p. 1334-41. 2006.

Woolsey, T. A.; Rovainen, C. M.; Cox, S. B.; Henegar, M. H.; Liang, G. E.; Liu, D.; Moskalenko, Y. E.; Sui, J.; Wei, L. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. *Cereb Cortex*, v. 6. n. 5, p. 647-60. 1996.

Wu, W. C.; Fernandez-Seara, M.; Detre, J. A.; Wehrli, F. W.; Wang, J. A theoretical and experimental investigation of the tagging efficiency of pseudocontinuous arterial spin labeling. *Magn Reson Med*, v. 58. n. 5, p. 1020-7. 2007.

Yamakawa, H.; Jezova, M.; Ando, H.; Saavedra, J. M. Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 23. n. 3, p. 371-80. 2003.

Yang, Y.; Engelen, W.; Xu, S.; Gu, H.; Silbersweig, D. A.; Stern, E. Transit time, trailing time, and cerebral blood flow during brain activation: measurement using multislice, pulsed spin-labeling perfusion imaging. *Magn Reson Med*, v. 44. n. 5, p. 680-5. 2000.

Zhang, W.; Silva, A. C.; Williams, D. S.; Koretsky, A. P. NMR measurement of perfusion using arterial spin labeling without saturation of macromolecular spins. *Magn Reson Med*, v. 33. n. 3, p. 370-6. 1995.