

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Luiz Antônio Araújo Dias Júnior**

**Avaliação da isquemia focal intermitente e da isquemia focal contínua em ratos, por estudos morfométrico (Tetrazólio) e da apoptose pela imunofluorescência (Tunel)**

**Ribeirão Preto  
2023**

**Luiz Antônio Araújo Dias Júnior**

**Avaliação da isquemia focal intermitente e da isquemia focal contínua em ratos, por estudos morfométrico (Tetrazólio) e da apoptose pela imunofluorescência (Tunel)**

**Versão original**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do **Título de Doutor** em Ciências.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli.

Ribeirão Preto  
2023

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.

Catálogo na publicação  
Biblioteca

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Dias Junior, Luiz Antonio Araujo

Avaliação da isquemia focal intermitente e da isquemia focal contínua em ratos, por estudos morfométrico (Tetrazólio) e da apoptose pela imunofluorescência (Tunel)

80 f. : il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Versão Original

1. Isquemia cerebral focal. 2. Ratos. 3. Morfometria. 4. Apoptose TUNEL.

Nome: Luiz Antônio Araújo Dias Júnior

Título: Avaliação da isquemia focal intermitente e da isquemia focal contínua em ratos, por estudos morfométrico (Tetrazólio) e da apoptose pela imunofluorescência (Tunel).

.

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

Aprovada em: \_\_ / \_\_ / \_\_

Banca examinadora:

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha esposa Fabiana Valeri Araújo Dias pela paciência nas minhas ausências do dia dia, pelo carinho e apoio.

Aos meus filhos Letícia e Gabriel Valeri Araújo Dias, por me proporcionarem a razão de viver. Vocês sempre serão minha motivação, prioridade e orgulho.

À minha mãe Maria de Fátima Weffort Araújo Dias, saiba que esta tese tem muito de você, ela é resultado de grande esforço conjunto e você foi um dos grandes alicerces para esse resultado. Persistência e resiliência.

Ao meu pai Luiz Antônio Araújo Dias, meu mentor, professor, lapidador. Uma pessoa inspiradora que desde cedo me mostra os caminhos a serem seguidos em todos os sentidos da vida, mas principalmente profissional. Trabalhar com você é um aprendizado diário.

Agradeço diariamente o amor, carinho e dedicação incondicional.

Minha eterna Gratidão.

Essa conquista é de vocês

Aos Meus irmãos Fabio José Araújo Dias e Clície Araújo Dias Carabolante, por me apoiarem sempre e tornar nossa família sempre seja forte e unida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto Oscar Colli,

Pela oportunidade, pela confiança, pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo ao meu projeto de pesquisa. Um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha e ao Prof. Dr. Flavio Protasio Veras do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no auxílio e acompanhamento de nossas laminas de imunofluorescência.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli pela ajuda disponibilidade e cordialidade com que me recebeu

Ao Daniel Mazetto, pelo grande auxílio e ensinamentos quanto a manipulação nos procedimentos com os animais

À Sra. Sandra Balero, pela ajuda e ensinamento no processamento das lâminas dos encéfalos

À CAPES - o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código do financiamento 001

## RESUMO

Dias Jr, Luiz Antonio Araujo. **Avaliação da isquemia focal intermitente e da isquemia focal contínua em ratos, por estudos morfométrico (Tetrazólio) e da apoptose pela imunofluorescência (Tunel)**. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

**INTRODUÇÃO:** A clipagem temporária ou definitiva de vasos cerebrais é uma das causas mais comuns de infarto cerebral que ocorre como complicações de cirurgias vasculares intracranianas. A clipagem temporária tem sido utilizada como adjuvante nestas cirurgias, com as vantagens de reduzir o risco intraoperatório de ruptura, de tornar a dissecação mais segura. Entretanto, a clipagem temporária pode ser causa de isquemia cerebral grave no território do vaso ocluído. Para reduzir este efeito adverso durante cirurgias para clipagem de aneurismas intracranianos, a clipagem temporária tem sido efetuada em múltiplos períodos curtos de oclusão intercalados com períodos de restauração do fluxo sanguíneo, e denominada clipagem temporária intermitente. Por outro lado, existem evidências que sugerem que a clipagem temporária intermitente pode não ser tão bem tolerada como um período único de isquemia contínua. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da isquemia focal intermitente e de um período similar de isquemia focal contínua em ratos, através de estudo morfométrico (tetrazólio) e de análise da apoptose nas áreas isquêmicas pela imunohistoquímica (TUNEL), em ratos Wistar Hannover, utilizando como modelo a oclusão da artéria cerebral média, pela introdução de um fio intraluminal. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados 93 ratos Wistar adultos, dos quais 61 foram subdivididos em 3 grupos experimentais: grupo *sham*: animais submetidos a simulação completa do procedimento cirúrgico, sem isquemia. Grupo Isquêmico Contínuo: animais submetidos ao procedimento com isquemia induzida por fio intraluminal por 60 minutos contínuos e sacrifício após 72 horas. Grupo Isquêmico Intermitente: animais submetidos ao procedimento com isquemia por 6 períodos de 15 minutos, intercalados por 10 minutos de reperfusão e sacrifício após 72 horas. Parte dos encéfalos dos grupos experimentais foram avaliados pela coloração de tetrazólio e parte com a marcação por imunofluorescência TUNEL. **RESULTADO:** As médias e os volumes e porcentagem de células em apoptose nas áreas de isquemia nos animais submetidos à isquemia intermitente foram maiores que nos animais submetidos à isquemia cerebral contínua. **CONCLUSÕES:** A isquemia focal intermitente causou mais lesão cerebral quando comparada à isquemia focal contínua e em relação ao grupo controle, contrariando a crença comum de que a clipagem temporária de vasos em cirurgia de aneurismas é benéfica. Entretanto, devido às características do animal e a fatores técnicos do método utilizado, estes resultados devem ser interpretados com cautela ao se fazer a transposição destes resultados para a prática clínica.

**Palavras-chaves:** Isquemia cerebral focal. Ratos. Morfometria. Apoptose TUNEL.

## ABSTRACT

Dias Jr, Luiz Antonio Araujo. **Evaluation of intermittent focal ischemia and continuous focal ischemia in rats, by morphometric studies (Tetrazolium) and of apoptosis by immunofluorescence (Tunel).** Thesis (Doutorado em Clínica Cirúrgica). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

**INTRODUCTION:** In our study in rats, we observed that intermittent focal ischemia caused more ischemia when compared to continuous focal ischemia and compared to the control group, contrary to the common belief that temporary clipping of vessels in aneurysm surgery is temporary. However, due to the characteristics of the animal and the technical factors of the method used, the results must be interpreted with caution when translating these results into clinical practice. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to compare the effects of intermittent focal ischemia and a similar period of continuous focal ischemia in rats, through a morphometric study (tetrazolium) and analysis of apoptosis in ischemic areas by immunohistochemistry (TUNEL), in Wistar rats Hannover, using as a model the occlusion of the middle cerebral artery by the introduction of an intraluminal wire. **MATERIAL AND METHODS:** 93 adult Wistar rats were used, of which 61 were subdivided into 3 experimental groups: sham group: animals submitted to complete simulation of the surgical procedure, without ischemia. Continuous Ischemic Group: animals submitted to the procedure with ischemia induced by intraluminal wire for 60 continuous minutes and sacrifice after 72 hours. Intermittent Ischemic Group: animals submitted to the procedure with ischemia for 6 periods of 15 minutes, interspersed by 10 minutes of reperfusion and sacrifice after 72 hours. Part of the brains of the experimental groups were evaluated using tetrazolium staining and part using TUNEL immunofluorescence staining. **RESULTS:** The means and volumes and percentage of cells undergoing apoptosis in the ischemic areas in animals submitted to intermittent ischemia were greater than in animals submitted to continuous cerebral ischemia. **CONCLUSIONS:** Intermittent focal ischemia caused more brain damage when compared to continuous focal ischemia and in relation to the control group, contrary to the common belief that temporary vessel clipping in aneurysm surgery is beneficial. However, due to the characteristics of the animal and technical factors of the method used, these results must be interpreted with caution when translating these results into clinical practice.

**Key words:** Focal cerebral ischemia. Rats. Morphometry. TUNEL Apoptosis



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema da distribuição dos animais nos grupos de estudo. Os números dos animais previstos para a coloração pela técnica do TUNEL são apresentados inicialmente e entre parênteses os números de animais que foram realizados. ACM. Artéria cerebral média. .... 35
- Figura 2 - Desenho e fotos representando a exposição das artérias carótidas comum esquerda (CCE) (A e C), carótida interna esquerda (CIE) (A) e carótida externa esquerda (CEE) (A e C) com alguns dos seus ramos cervicais, após afastamento da musculatura cervical superficial (B). .... 37
- Figura 3 - Fio obstrutor, extensão de 2,5cm com uma das extremidades espessada com silicone. .... 38
- Figura 4 - A. Desenho ilustrando a clampagem da porção inicial da artéria carótida interna (seta). B. Desenho ilustrando a ligadura da porção proximal da artéria carótida externa esquerda (seta), a clampagem das artérias carótida comum esquerda (1), carótida interna esquerda (2) e pterigopalatina esquerda (3) e secção proximal da artéria carótida externa esquerda (seta). C. Desenho ilustrando a posição correta da artéria carótida externa esquerda (seta) para a introdução do fio obstrutor. .... 38
- Figura 5 - A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da artéria cerebral média esquerda (1) (no detalhe superior direito) e a ligadura da artéria carótida externa esquerda na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da artéria carótida comum esquerda (2) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (3); artéria cerebral anterior esquerda (4); artéria pterigopalatina esquerda (5). B. Foto final do procedimento cirúrgico com a introdução completa do fio obstrutor (seta). .... 38
- Figura 6** - Superior Esquerda. Molde metálico para acomodação e secção do encéfalo (Matrix - ASI –Instruments, CBM2000C. USA). Superior Direita. Encéfalo colocado no molde. Inferior. Corte coronal do encéfalo obtido com o molde. .... 41
- Figura 7** - Corte sagital mediano com visão das principais estruturas observadas no encéfalo de rato adulto. As linhas A - anterior ou rostral (em azul) e B – posterior (em vermelho), indicam os dois níveis de cortes coronais utilizados para avaliação pela imunohistoquímica. Aqueduto cerebral (AC); bulbo olfatório (BO); comissura anterior (CA); corpo caloso (CC); cerebelo (CE); cíngulo (CG); hipocampo (H); glândula pineal (P); ponte (PO); quiasma óptico (QO); tálamo (TA); teto mesencefálico (TE); terceiro ventrículo (III); quarto ventrículo (IV). .... 41
- Figura 8** - Desenhos dos cortes coronais do encéfalo nas regiões avaliadas, mostrando à esquerda a ACM e alguns dos seus ramos e à direita, as três áreas avaliadas neste estudo: córtex dorsolateral (1); córtex lateral (2), e striatum (3). A. Corte coronal anterior ou rostral. Artéria cerebral média (ACM) originando várias pequenas artérias subcorticais perfurantes ou centrais (\*); artéria estriada anterior (AEA) – ramo da ACM. Comissura anterior (CA); ventrículo lateral (VL). B. Corte coronal posterior com ACM emitindo a artéria estriada posterior (AEP). Corpo caloso (CC). Cápsula externa (CE); cápsula interna (CI); terceiro ventrículo (III). .... 42
- Figura 9** - Corte do encéfalo de animal com isquemia cerebral trabalhado no programa ImageJ (domínio público, National Institutes of Health, Mariland, Bethesda, USA),

mostrando a área isquêmica delimitada manualmente. À Direita observa-se a identificação do corte.....	43
<b>Figura 10</b> - ..... Corte coronal do encéfalo demonstrando os campos medial (M) e lateral (L) demarcados para duas áreas de avaliação no estudo pelo TUNEL: área 1 - córtex dorsolateral (em verde) e área 3 - striatum (em azul); e os campos cranial (CR) e caudal (CA) demarcados para a área 2 - córtex lateral (em vermelho)..	46
<b>Figura 11</b> - Médias das áreas totais dos hemisférios direitos dos animais dos grupos GC e GI. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1980$ , teste t não pareado).	50
<b>Figura 12</b> - Média das áreas totais dos hemisférios esquerdos dos animais dos grupos GC e GII. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2919$ , teste t não pareado).	51
<b>Figura 13</b> - Média das áreas isquêmicas dos hemisférios cerebrais direitos dos animais dos grupos GII e GC. Diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos ( $GC < GII$ , $p = 0,0006$ , teste t não pareado).	51
<b>Figura 14</b> - Comparação entre as médias das áreas totais dos animais dos grupos GC e GII. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2244$ , teste t não pareado)	52
<b>Figura 15</b> - Médias dos volumes das áreas isquêmicas nos animais dos grupos GI e GC ( $Ge > GC$ ). Diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0018$ , teste t de Student).	53
<b>Figura 16</b> - Marcação de neurônios do cérebro dos animais estudados pela técnica de TUNEL. A coluna da esquerda não evidencia marcação (neurônios íntegros), a coluna do meio apresenta marcação de neurônios degenerados em vermelho e a coluna da direita mostra a sobreposição das colunas anteriores, evidenciando que o grupo sham tem apenas ruído. DAPI - deoxynucleotidyl transferase.....	54
<b>Figura 17</b> - Porcentagem de células TUNEL+ (apoptóticas), nas áreas 1,2, 3 dos animais dos grupos sham, GC e GI ( $p < 0,0001$ para sham vs GC, sham vs GI e GC vs GI, teste ANOVA one-way, com post teste de multicomparação de Bonferroni).	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Médias das áreas totais, áreas do hemisfério D e áreas isquêmicas dos animais do grupo GC e a espessura das áreas isquêmicas. ....	49
<b>Tabela 2</b> - Médias das áreas totais, áreas do hemisfério D e áreas isquêmicas dos animais do grupo GI e a espessura das áreas isquêmicas.....	50
<b>Tabela 3</b> - Médias dos volumes das áreas isquêmicas nos animais dos grupos GC e grupo GI .....	52
<b>Tabela 4</b> - Soma das células apoptóticas nas áreas 1, 2 e 3 dos animais dos grupos sham, GC e GI. ....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AC</b> -	Aqueduto cerebral;
<b>ACCE</b> -	Artéria carótida comum esquerda
<b>ACI</b> -	Artéria carótida interna
<b>ACIE</b> -	Artéria carótida interna esquerda
<b>AEA</b> -	Artéria estriada anterior;
<b>AIF</b> -	Apoptosis-inducing factor (AIF);
<b>ANOVA</b> -	Análise de Variância;
<b>APP</b> -	Artéria pterigopalatina esquerda;
<b>ATP</b> -	Adenosina trifosfato;
<b>AVC</b> -	Acidente vascular cerebral;
<b>AVCs</b> -	Acidentes vasculares cerebrais;
<b>AVE</b> -	Acidente vascular encefálico;
<b>BCL2</b> -	Otherwise B-cell lymphoma 2 gene;
<b>BO</b> -	Bulbo olfatório;
<b>CA</b> -	Campo caudal;
<b>CA</b> -	Comissura anterior;
<b>CC</b> -	Corpo caloso;
<b>CCE</b> -	Artérias carótidas comum esquerda;
<b>CG</b> -	Cíngulo;
<b>CI</b> -	Cápsula interna;
<b>CR</b> -	Campo cranial;
<b>CR</b> -	Cerebelo;
<b>CS</b> -	Cirurgia simulada;
<b>DAPI</b> -	Deoxynucleotidyl transferase;
<b>DIABLO</b> -	Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI;
<b>DISC</b> -	Death Inducing Signaling Complex;
<b>DNA</b> -	Ácido desoxirribonucleico;
<b>DNases</b> -	Desoxirribonucleases;
<b>EEG</b> -	Eletroencefalograma;
<b>EUA</b> -	Estados Unidos da América;
<b>FAS</b> -	Conhecido como CD95 e Apo-1. Membro da família de receptores TNF;
<b>FSC</b> -	Fluxo sanguíneo cerebral;
<b>GABA</b> -	Ácido gama-aminobutírico;
<b>GC</b> -	Grupo isquêmico contínuo;
<b>GI</b> -	Grupo isquêmico intermitente;
<b>H</b> -	Hipocampo;
<b>HE</b> -	Hematoxilina e eosina;
<b>IBGE</b> -	Instituto brasileiro de geografia e estatística;
<b>III</b> -	Terceiro ventrículo;
<b>IV</b> -	Quarto ventrículo
<b>K</b> -	Potássio ;
<b>L</b> -	Lateral;
<b>M</b> -	Medial;
<b>Na</b> -	Sódio;
<b>NMDA</b> -	N-metil D-Aspartato;
<b>OACM</b> -	Oclusão da artéria cerebral média
<b>OACM</b> -	Oclusão da Artéria cerebral média;

<b>P -</b>	Glândula pineal;
<b>PARP-1 -</b>	Enzima reparadora do DNA (poli ADP ribose polimerase);
<b>PBS -</b>	Phosphate Buffer Solution;
<b>pCO2 -</b>	Pressão parcial de CO <sub>2</sub> no sangue arterial;
<b>PET-Scan -</b>	Tomografia por emissão de pósitron;
<b>pH -</b>	Escala numérica adimensional;
<b>PO -</b>	Ponte;
<b>pO2 -</b>	Pressão parcial de O <sub>2</sub> ;
<b>QO -</b>	Quiasma óptico;
<b>RM -</b>	Ressonância Nuclear Magnética;
<b>ROS -</b>	Radicais livres de oxigênio;
<b>SMAC -</b>	Second mitochondria-derived activator of caspase;
<b>TA -</b>	Tálamo;
<b>TC -</b>	Tomografia Computadorizada de crânio;
<b>TdT -</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase
<b>TE -</b>	Teto mesencefálico;
<b>TNF -</b>	Fator de necrose tumoral;
<b>TUNEL -</b>	dUTP nick end labeling;
<b>VL -</b>	Ventrículo lateral;

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Revisão da Literatura .....	18
1.1.1	Aspectos Gerais da Isquemia Cerebral .....	18
1.1.2	Classificação dos AVCs .....	19
1.1.3	Isquemia Cerebral.....	20
1.1.4	Aspectos Fisiopatológicos da Isquemia Cerebral .....	21
1.1.5	Mecanismos de Morte Celular.....	23
1.1.6	Modelos Experimentais de Isquemia e Reperusão.....	26
1.1.7	Métodos de Avaliação da Isquemia Cerebral .....	27
1.1.7.1	Análise Histopatológica .....	28
1.1.7.2	Análise por Tetrazólio.....	28
1.1.7.3	Análise Imunohistoquímica .....	29
1.1.8	Justificativa da Proposição .....	29
2	OBJETIVOS.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Animais .....	34
3.2	Protocolo Experimental .....	34
3.3	Procedimentos Gerais .....	36
3.4	Procedimentos Cirúrgicos .....	36
3.4.1	Oclusão Temporária da ACM por Fio Intraluminal .....	36
3.4.2	Avaliação da Isquemia Cerebral Experimental .....	39
3.4.2.1	Extração do Encéfalo .....	39
3.4.2.2	Processamento Pós-Extração do Encéfalo .....	40
3.4.2.3	Análise pelo TTC .....	42
3.4.2.4	Análise Morfométrica .....	42
3.4.2.5	Análise pela técnica de TUNEL .....	44
3.4.3	Análise Estatística.....	45

4	RESULTADOS .....	48
4.1	Procedimento cirúrgico .....	48
4.1.1	Animais.....	48
4.1.2	Tempo cirúrgico médio por grupo.....	48
4.1.3	Parâmetros Fisiológicos.....	49
4.2	Análise Morfométrica .....	49
4.3	Análise do Tunel .....	53
5	DISCUSSÃO.....	57
6	CONCLUSÕES .....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
	ANEXOS.....	78

# ***1. INTRODUÇÃO***

---



# 1 INTRODUÇÃO

A clipagem temporária ou definitiva de vasos cerebrais é uma das causas mais comuns de infarto cerebral que ocorre como complicações de cirurgias vasculares intracranianas. A clipagem temporária tem sido utilizada como adjuvante nestas cirurgias desde a sua introdução por Pool em 1961, com as vantagens de reduzir o risco intraoperatório de ruptura, de tornar a dissecação mais segura, e de permitir o controle de hemorragias por rupturas precoces de aneurismas e vasos (AKYÜZ *et al.*, 2002; ARAKI *et al.*, 1999; BATJER *et al.*, 1988; DRAKE, 1979; HEROS *et al.*, 1983; HINDMAN *et al.*, 2010; JABRE; SYMON, 1987; KETT-WHITE *et al.*, 2002; KRISHT; KADRI, 2005; MIYAZAWA *et al.*, 2000; MORLEY; BARR, 1969; PEERLESS; DRAKE, 1990; SAMSON *et al.*, 1994, SCHICK *et al.*, 2005; SUZUKI; YOSHIMOTO; KAYAMA, 1984; TAYLOR *et al.*, 1996). Entretanto, a clipagem temporária pode ser causa de isquemia cerebral grave no território do vaso ocluído. Para reduzir este efeito adverso durante cirurgias para clipagem de aneurismas intracranianos a clipagem temporária tem sido efetuada em múltiplos períodos curtos de oclusão intercalados com períodos de restauração do fluxo sanguíneo, e denominada clipagem temporária intermitente (PEERLESS; DRAKE, 1990). Por outro lado, existem evidências que sugerem que a clipagem temporária intermitente pode não ser tão bem tolerada como um período único de isquemia contínua (SAMSON *et al.*, 1994).

Existem consideráveis evidências experimentais de que episódios repetitivos de isquemia global aumentam a extensão das lesões neuronais quando comparadas a um único período equivalente de isquemia (ARAKI; KATO; KOGURE, 1990; INOUE *et al.*, 1992; KATO; KOGURE, 1990; LIN *et al.*, 1992; TOMIDA *et al.*, 1987; WIDMANN *et al.*, 1992). Entretanto, com relação à isquemia focal intermitente, poucos dados experimentais são disponíveis na literatura. Além disso, a maioria destes estudos utilizou protocolos experimentais que não reproduzem as características temporais mais prováveis de ocorrer durante os procedimentos cirúrgicos (DAVID; PRADO; DIETRICH, 1996). e os poucos estudos encontrados na literatura são da década de 90 e referem-se apenas a observações de alterações histopatológicas convencionais (DAVID; PRADO; DIETRICH, 1996; GOLDMAN; ANDERSON; MEYER, 1992; SELMAN *et al.*, 1994, STEINBERG *et al.*, 1994). David, Prado e Dietrich (1996), utilizaram um modelo experimental de oclusão contínua ou intermitente da artéria cerebral do rato, efetuando a clipagem temporária da porção proximal deste vaso, através de uma abordagem direta do vaso por alargamento do forame oval e abertura da dura-máter.

Este modelo é o que mais se aproxima das situações encontradas durante procedimentos cirúrgicos. Os autores mostraram de maneira inequívoca, através de estudo histopatológico e de medidas das áreas e volumes das regiões que sofreram isquemia, um efeito protetor cerebral da isquemia intermitente quando comparada à isquemia contínua por um período equivalente. Entretanto, estes dados conflitam com outros da literatura (GOLDMAN; ANDERSON; MEYER, 1992; SELMAN *et al.*, 1994) e a diferença pode ser atribuída a diferenças entre as espécies dos ratos estudados (Sprague-Dawley vs Wistar) e entre os métodos utilizados para provocar a isquemia.

Após os estudos da década de 90, não foram acrescentados novos dados experimentais que contribuíssem para esclarecer a controvérsia a respeito das evidências experimentais da neuroproteção proporcionada pela clipagem temporária intermitente de artérias cerebrais. Este estudo tem por objetivo comparar a isquemia temporária intermitente com um período de isquemia temporária contínua em ratos, através de estudo morfométrico (tetrazólio), e de análise da apoptose nas áreas isquêmicas por imunohistoquímica (TUNEL), em ratos Wistar Hannover.

## **1.1 Revisão da Literatura**

### **1.1.1 Aspectos Gerais da Isquemia Cerebral**

O acidente vascular cerebral ou encefálico como se prefere denominar atualmente, ou simplesmente AVC ou AVE, respectivamente, constitui-se de entidades patológicas de elevadas taxas de morbidade e mortalidade, apesar dos avanços terapêuticos decorrentes do progressivo conhecimento científico (CHAVES, 2000; CONWAY *et al.*, 2003; SHALAK; PERLMAN, 2004). Apesar de sua gravidade, está entre as enfermidades mais frequentes, sobremaneira no campo da Neurologia Clínica e Cirúrgica, e constitui-se em um grande desafio para o tratamento e pesquisa científica, devido a seus amplos espectros de apresentações clínicas, decorrentes da diversidade de territórios anatômicos envolvidos, da intensidade da isquemia e de suas diferentes etiologias (BRATINA *et al.*, 1995; COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr, 1998; CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001).

Segundo dados da Sociedade Americana de Cardiologia, nos Estados Unidos da América a cada ano, aproximadamente 795 000 indivíduos nos Estados Unidos apresentam um acidente vascular cerebral, dos quais 87% (690 000) são isquêmicos e 185 000 são

recorrentes (VIRANI *et al.*, 2021). Em 2009 que correspondeu a um caso a cada 40 segundos, acarretando um custo estimado da ordem de 68,9 bilhões de dólares (LLOYD-JONES *et al.*, 2009; ENGEL-NITZ *et al.*, 2010). Além disso, estão entre as principais causas de invalidez, acarretando déficits neurológicos dos mais diversos, dependendo da extensão e localização da área envolvida (ROPPER; SAMUELS, 2009). Cerca de um terço daqueles que sobrevivem ao AVC, após seis meses do *ictus*, estão dependentes de outros (WARLOW, 1998). Nos EUA, em meados da década passada, havia cerca de três milhões de sobreviventes de AVC com algum grau de dependência (CHAVES, 2000).

No Brasil não existem dados precisos, mas possivelmente a prevalência deva ser parecida, dada a semelhança do perfil epidemiológico entre as duas populações, no que tange a eventos cardiocirculatórios. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2019, as doenças do aparelho circulatório, nelas incluídos os AVCs, constituíram a principal causa de mortalidade no país, à frente das doenças neoplásicas.

Por sua elevada frequência e gravidade, justificam-se todos os esforços científicos no sentido de elucidação dos aspectos histopatológicos, bioquímicos e moleculares dos acidentes vasculares cerebrais, não só para que futuros tratamentos possam advir, mas também para que outras formas, medicamentosas ou não, de profilaxia possam surgir. Recentemente os AVCs vem sendo alvo de intensos estudos (648030 citações no <http://www.pubmed.com>, em 10 de dezembro de 2022, para o termo *stroke*).

### 1.1.2 Classificação dos AVCs

Os AVCs podem ser classificados de diversas formas. A primeira divisão que se faz é separá-los em isquêmicos e hemorrágicos, sendo que 85-90% são isquêmicos (ROPPER; SAMUELS, 2009).

Os AVCs isquêmicos podem ser categorizados considerando-se a localização (global ou focal), o tempo (permanente ou transitório), e a intensidade (total ou parcial). Combinando-se tais variáveis das mais diversas formas, obtém-se a já aludida gama de manifestações clínico-laboratoriais e os mais variados modelos experimentais (COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr, 1998).

A isquemia cerebral global decorre de causas que reduzem a perfusão ou oxigenação cerebral globalmente, em todos os seus territórios vasculares, como no choque circulatório ou na parada cardíaca ou outras situações em que ocorra aumento da pressão

intracraniana, ou através da obstrução de duas, três ou até quatro artérias principais (GINSBERG; BUSTO, 1989).

Já a isquemia cerebral focal, decorre de causas que envolvem isoladamente ramos arteriais do cérebro, como nas obstruções por eventos tromboembólicos (CHAVES, 2000; ROPPER; SAMUELS, 2009) ou por manipulação cirúrgica, tal quando se realiza uma clipagem temporária de um vaso para controle de sangramento ou para melhor dissecação de um aneurisma ou, após a ruptura deste, por vasoespasm (TAYLOR *et al.*, 1996; RADANOVIC; SCAFF, 2001). Para o neurocirurgião as duas situações de isquemia cerebral focal mais frequentes em sua atividade diária são o vasoespasm, que geralmente ocorre após hemorragia subaracnóidea, na maioria dos casos decorrente de rotura de aneurismas cerebrais, e a oclusão temporária de um vaso sanguíneo em microneurocirurgias vasculares (POOL, 1961).

Trataremos mais especificamente da isquemia cerebral focal, que é a forma mais prevalente e que tem maior incidência entre todos os tipos de AVCs, sendo mais frequentemente encontrada no território da artéria cerebral média (ACM), nos seres humanos (DURUKAN; TATLISUMAK, 2009).

### 1.1.3 Isquemia Cerebral

A isquemia resulta da interrupção do fluxo sanguíneo a órgão ou tecido, com consequente cessação do suprimento de oxigênio (hipóxia) e glicose, além de outros substratos essenciais ao metabolismo celular e manutenção da homeostase, disparando uma cascata de eventos bioquímicos e reações patológicas que culminam com a morte celular (HACHIMI-IDRISSI *et al.*, 2004). Tais eventos incluem a glicólise anaeróbia, acarretando redução na síntese de ATP e acidose láctica; desequilíbrio iônico por interrupção do funcionamento de bombas iônicas; formação de radicais livres; atividade inflamatória, com liberação de seus mediadores, como as citocinas; liberação de aminoácidos excitatórios, em decorrência da despolarização das membranas; e indução da apoptose, ou morte celular programada (HACHIMI-IDRISSI *et al.*, 2004). A redução do fluxo para níveis que comprometem a integridade celular pode levar à necrose, à apoptose ou a ambas (SELMAN; LUST; PUNDIK, 1992)

### 1.1.4 Aspectos Fisiopatológicos da Isquemia Cerebral

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

Histopatologicamente, na isquemia focal são definidas três áreas relativamente concêntricas: a zona isquêmica central, a zona de penumbra e a zona de tecido normal de permeio (ASTRUP; SIESJO; SYMON, 1981). Durante a isquemia, após alguns minutos haverá morte celular na zona central (necrose). Na zona de penumbra, inicialmente a célula mantém sua integridade, mas sua função elétrica é abolida, caracterizando um eletrencefalograma isoeletrico e, dependendo do tempo de isquemia, e do aparecimento ou não do fluxo sanguíneo por anastomoses, haverá também morte celular (SAKAKI *et al*, 1993; SWEENEY *et al*, 1995). Em tal zona a perfusão é reduzida, e por um tempo limitado e variável, as células ainda são viáveis. A perfusão nesta área tem uma velocidade de 15-18ml/100g/minuto (PULSINELLI, 1992; LEKER; SHOHAMI, 2002), e pode ser um local de ampliação da área isquêmica, já que é o local mais frequente do processo apoptótico (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIRI, 2007). Por outro lado, tal área é passível de salvamento quando estratégias de neuroproteção são adotadas, ao contrário da zona isquêmica central.

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

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

de segundo mensageiro em vários níveis de cascatas de ativação enzimáticas (HU; WIELOCH, 1995).

O glutamato é o mais importante fator de agravamento da perda da homeostase de íons principalmente durante a encefalopatia hipóxico-isquêmica. (GRAHAM *et al*, 1993). Ele aumenta o influxo de sódio e principalmente cálcio, principalmente através do canal de íons que tem como agonista o N-metil-D-Aspartato (NMDA). A expressão “toxicidade excitatória”, foi criada para descrever esta excessiva ativação dos receptores glutamatérgicos, configurando-se via comum de lesão neuronal (ROTHMAN; OLNEY, 1986; DIAS *et al*, 2000). O glutamato pode levar a um dano cerebral em um processo de três estágios, em que se pode haver intervenção com fármacos: indução, amplificação e expressão (ZIVIN; CHOI, 1991). Ondas de depressão (despolarização) cortical, no sentido da zona necrótica para a zona de penumbra, decorrentes da ação glutamatérgica, causam estresse metabólico e podem conduzir à indução de vários mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e proteínas de choque térmico em áreas topograficamente não relacionadas ao infarto (LEKER; SHOHAMI, 2002).

Concomitantemente, se o insulto isquêmico persiste, ocorre a necrose na região isquêmica central, processo este passivo, sem gasto de energia, e as vias de apoptose são ativadas, no ambiente intracelular, sobretudo na área de penumbra. Tal processo, ativado grandemente pelo influxo de cálcio, requer energia, e, portanto, a mitocôndria não deve estar irreversivelmente lesada, o que acontece na necrose (STELLER, 2007).

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

São descritas também, no insulto isquêmico, vias alternativas de morte celular programada. Uma delas é a via apoptótica independente das proteínas caspases, que também é dependente da mitocôndria. Nesta, há liberação mitocondrial da proteína AIF, que por sua vez desestabiliza uma proteína intranuclear denominada PARP-1, um dos chamados guardiões do genoma, o que acaba por alterar a estabilidade do DNA celular. A outra forma é um fenômeno denominado necroptose, uma espécie de necrose, de receptores de membrana e de energia, que é inibido por uma proteína denominada necrostatina (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIRI, 2007).

A reperfusão, definida como a restauração do fluxo sanguíneo após a isquemia, pode contribuir para o agravamento das condições teciduais, fenômeno denominado “lesão da

reperfusão” (ARONOWSKI; STRONG; GROTTA, 1997; DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003). Neste tipo de insulto ocorre a exacerbação dos fenômenos isquêmicos: depleção de adenosina-trifosfato (ATP), degradação dos fosfolípidos, acidose intracelular, liberação rápida de neurotransmissores como o glutamato e o GABA, alteração na homeostasia do cálcio e, em consequência ativação das proteases cálcio-dependentes e fosfolipases, levando à lesão das membranas e perda da função das organelas (DUARTE; CAMPOS; COLLI, 2003). Além disso, há produção em larga escala de radicais livres de oxigênio (ROS), a partir da ativação de proteases (lipases).

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

### 1.1.5 Mecanismos de Morte Celular

O conhecimento dos complexos mecanismos de morte celular é extenso e de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando sua prevenção ou tratamento. Existem entre outros, como a autofagia, dois tipos fundamentais de morte celular de interesse para este estudo: 1. necrose: um processo mais fulminante; e 2. apoptose: um processo mais elaborado, complexamente regulado (SNIDER; GOTTRON; CHOI, 1999).

Dentro de minutos de uma isquemia focal cerebral, o núcleo isquêmico sofre uma redução drástica de seu suprimento sanguíneo, levando à morte celular por necrose. A região peri-infarto, ou zona de penumbra, que é a região de fluxo sanguíneo restrito, mas não tão dramaticamente reduzido, mantém-se metabolicamente ativa. Muitos neurônios nesta região entram, após algumas horas, num processo de morte por apoptose (BROUGHTON; REUTENS; SOBEY, 2009).

Acreditava-se, até bem pouco tempo atrás, que a morte celular nas áreas de infarto cerebral era quase que exclusivamente realizada através de necrose. As principais características da necrose são o precoce edema celular e das organelas, a rápida perda da integridade da membrana citoplasmática e a desintegração celular. Mais tardiamente, na necrose, a cromatina pode desaparecer completamente. Como neste processo a célula perde sua integridade e libera seus componentes no meio extracelular, há proeminente infiltrado inflamatório acompanhando a necrose. Já a apoptose, conhecida como morte celular programada, ocorre quando a célula sofreu a agressão de forma mais branda ou mais lenta. Desta forma, há tempo para as alterações metabólicas consequentes à isquemia provocarem a ativação de genes e proteínas que culminam com a morte da célula, mas de forma mais organizada e menos deletéria para seus arredores. Assim, na apoptose, há preservação das organelas, condensação da cromatina e do citoplasma e convolução das membranas nuclear e citoplasmática (SNIDER; GOTTRON; CHOI, 1999).

Embora se acredite correntemente que a necrose ocorre quando há insulto celular grave, por perturbação extrema das condições ambientais do meio, por exemplo, estes dois tipos de morte celular coexistem em uma determinada área, ou mesmo seus mecanismos estão presentes ao mesmo tempo em uma mesma célula (SNIDER; GOTTRON; CHOI, 1999).

O dano isquêmico ao cérebro intacto pode causar tanto a morte de neurônios seletivamente quanto indistintamente, envolvendo os astrócitos e outros tipos celulares também. Tipicamente, há morte neuronal seletiva na isquemia global transitória, comumente após parada cardíaca ou choque circulatório grave, quando há perda dos grandes neurônios piramidais da região do hipocampo, mais sensíveis à isquemia (SNIDER; GOTTRON; CHOI, 1999).

De especial interesse, na prevenção do dano neuronal consequente à isquemia, figura a apoptose, visto acreditar-se ser mais frequente na área de penumbra e, por ter um processo de instalação mais gradual e complexo, possa ser passível de ser revertida (LINNIK; ZOBRIST; HATFIELD, 1993; GUEGAN *et al.*, 1998). A apoptose ocorre, basicamente, através da ativação de uma de duas vias principais, a intrínseca (ou mitocondrial) e a extrínseca (ou do receptor de morte).

Apoptose é um termo derivado de uma palavra grega antiga que se referia a queda da folha das árvores, fazendo uma relação com o tipo de morte celular programada, ou seja, que tem um substrato genético (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Uma característica importante da apoptose é a clivagem de proteínas do citoesqueleto pelas proteases aspartato-específicas, as caspases (HOTCHKISS *et al.*, 2009).



Sucintamente, a ativação das caspases ocorre através de uma de duas vias distintas, mas convergentes: a via do receptor de morte, ou extrínseca, e a via mitocondrial, ou intrínseca. A via do receptor de morte é ativada quando membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) ligam-se ao receptor de morte na superfície da célula (que é da família dos receptores de TNF). Esta ligação inicia a formação de um complexo sinalizador indutor de morte celular multiprotéico (DISC). A agregação deste complexo causa mudanças conformacionais em seus componentes que desencadeiam a atividade catalítica da caspase 8, um mediador central da apoptose (BROUGHTON; REUTENS; SOBEY, 2009).

A via mitocondrial é controlada pelo equilíbrio de ações pré e anti-apoptóticas de membros da família da BCL2. A caspase 9 regula esta via, que começa a ser ativada quando sensores intracelulares indicam dano celular ameaçador. Iniciadores desta via incluem espécies reativas de oxigênio, DNA danificado e privação de fatores de crescimento, entre outros. Estes iniciadores levam a aumento da permeabilidade mitocondrial, promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas (p. ex. citocromo c) do espaço intermembrana da mitocôndria para o citosol. Outras destas proteínas, como SMAC/DIABLO, antagonizam inibidores citosólicos das proteínas pró-apoptóticas, permitindo a ativação das caspases e, deste modo, a progressão da apoptose. A caspase 8 ativada (via receptor de morte) e a caspase 9 ativada (via mitocondrial) mobilizam as caspases 3, 6 e 7, proteases que anunciam o início da demolição celular pela clivagem de numerosas proteínas e ativando DNAases (HOTCHKISS *et al.*, 2009; TIRAPELLI, 2007), que levam à fragmentação do DNA, expondo suas terminações 3'-OH que são identificadas na técnica de TUNEL (ATTANASIO; SCHIFFER, 1995).

Vasto conhecimento já foi obtido no estudo dos mecanismos envolvidos na morte celular, mas um detalhamento mais pormenorizado destas complexas cascatas bioquímicas foge ao escopo deste trabalho (BROUGHTON; REUTENS; SOBEY, 2009; HOTCHKISS *et al.*, 2009; TIRAPELLI, 2007; YUAN; YANKNER, 2000).

### 1.1.6 Modelos Experimentais de Isquemia e Reperfusão

Os modelos experimentais da isquemia cerebral são importantes para melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos implicados e para a avaliação de novas estratégias terapêuticas (BARDUTZKY *et al.*, 2005). Além disto, em condições experimentais, há maior padronização dos procedimentos, o que torna os resultados obtidos mais fidedignos. Porém, tais resultados devem ser transpostos com cautela para os seres humanos, devido às diferenças intrínsecas entre as espécies (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001).

Pode-se obter, experimentalmente, isquemia focal cerebral através de diversas técnicas, em diversas espécies animais, com intuito de estudar os fenômenos morfológicos, fisiopatológicos e biomoleculares envolvidos no processo de lesão tecidual decorrentes da isquemia. Tais como modelos de isquemia para primatas não-humanos, gatos e ratos (BOYKO *et al.*, 2010).

Como o uso de ratos, em laboratório, tem inúmeras vantagens quando comparado à utilização de outras espécies - maior praticidade e velocidade na criação, manutenção, manejo e maior aceitação por parte de comitês de ética em experimentação com animais - e pela grande semelhança anatômica entre as circulações cerebrais desta espécie com a do ser humano, a maioria dos trabalhos envolve a utilização de modelos de isquemia cerebral nesta espécie (GINSBERG; BUSTO, 1989; COLLI; SILVA; CARLOTTI Jr, 1998).

Em estudos com ratos, principalmente duas linhagens, ou raças, são mais comumente usadas para experimentação nesta área de pesquisa: Sprague-Dawley e Wistar Hannover, havendo diferenças de suscetibilidade à isquemia cerebral entre ambas, conforme demonstrou estudo comparativo que avaliou a obtenção de infarto da ACM por técnica de fio intraluminal através de coloração por TTC e por técnicas de ressonância magnética, como perfusão e difusão, alcançando-se isquemia mais facilmente e de forma mais homogênea nos animais da linhagem Sprague-Dawley, tendo-se atribuída a maior resistência à isquemia na raça Wistar Hannover à provável nutrição colateral mais exuberante nos animais deste subtipo (BARDUTZKY *et al.*, 2005).

Existem modelos de obtenção de isquemia focal, em ratos, que promovem a interrupção da circulação sanguínea permanente ou temporariamente, cada qual com suas vantagens e aplicações (DUARTE, CAMPOS; COLLI, 2003).

As técnicas de oclusão focal temporária, com ou sem reperfusão, simulam as situações observadas nas microcirurgias vasculares intracranianas, obtendo-se isquemia a partir de: 1. Coagulação da artéria cerebral média (ACM) em ratos, com conseqüente obstrução

permanente do fluxo sanguíneo em seu território (TAMURA *et al.*, 1981); 2. Oclusão da ACM associada à ligadura sucessiva das artérias carótidas comuns (ACCs) (CHEN *et al.*, 1986); e, finalmente, 3. Oclusão da ACM (OACM), através da introdução do fio intraluminal (KOIZUMI *et al.*, 1986; CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; BOYKO *et al.*, 2010).

Neste último modelo, empregado no presente estudo, a OACM é obtida introduzindo-se fio de sutura de nylon 4-0, por exemplo, com 2,5 cm de comprimento e com êmbolo em uma de suas extremidades (que é constituído de uma fina camada de silicone em sua ponta, deixando-a com diâmetro de 0,25-0,30mm, ou cortado a fogo, de forma que sua ponta fique bojuda, com o diâmetro acima referido, a depender da técnica empregada - através da ligadura e secção da artéria carótida externa, que é rebatida, permitindo que o fio ascenda pela artéria carótida interna (ACI) até sua bifurcação, obstruindo, desta forma, o óstio da ACM (KOIZUMI *et al.*, 1986; CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; BOYKO *et al.*, 2010).

Em trabalho recente, descreveu-se, ainda, a introdução do fio diretamente através da ACI, contando-se com a circulação colateral, através do polígono de Willis para que não ocorresse isquemia em todo o território da ACI, mas apenas no território da ACM, como os resultados mostraram (BOYKO *et al.*, 2010).

### 1.1.7 Métodos de Avaliação da Isquemia Cerebral

A avaliação das alterações decorrentes da isquemia cerebral pode ser feita de diversas formas, a depender do intuito do avaliador: 1. alterações funcionais clínicas (SHIRASHI; SIMON, 1989); 2. alterações funcionais metabólicas, como pela medida da respiração mitocondrial (ALMEIDA *et al.*, 1995; CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; DUARTE, CAMPOS; COLLI, 2003) ou por métodos bioquímicos para aferição da atividade enzimática (FOLBERGROVÁ *et al.*, 1993); 3. alterações funcionais hemodinâmicas, medindo-se o fluxo sanguíneo regional (CHEN *et al.*, 1986); 4. avaliação morfométrica por meio de corantes supravitais, como o TTC (BEDERSON *et al.*, 1986; JOSHI; JAIN; MURTHY, 2004); 5. estudo anatomopatológico (BUCHAN, 1992); 6. estudos por técnicas de imagem, como por exemplo com RM, TC, PET-Scan, etc. (BARDUTZKY *et al.*, 2005); 7. outras técnicas para análise biomolecular, como na avaliação da fragmentação do DNA, responsável pela detecção do processo de apoptose celular (KURE *et al.*, 1991; NEGOESCU *et al.*, 1996; DIDENKO *et al.*, 2002), ou na avaliação da expressão gênica ou de proteínas (ESTUS *et al.*, 1994; UMEMURA *et al.*, 2007); e 8. avaliação eletrofisiológica (HARA *et al.*, 1990).

### 1.1.7.1 Análise Histopatológica

Tradicionalmente, a constatação das lesões isquêmicas aos tecidos é realizada através de colorações de cortes histológicos, corados com hematoxilina e eosina (HE) ou outras como *Luxolfast blue*, por exemplo, encontrando-se precoce tumefação celular e de organelas, com eventual perda da integridade citoplasmática, destruição da arquitetura tecidual e presença de infiltrado inflamatório proeminente, na necrose (SNIDER; GOTTRON; CHOI, 1999).

Na apoptose, encontram-se células com redução de suas dimensões, núcleos picnóticos por condensação da cromatina e fragmentação citoplasmática em corpos apoptóticos (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Porém, a distinção de células apoptóticas na microscopia óptica não é fácil, pois pode haver confusão com outros elementos com cromatina condensada, como células em telófase (NEGOESCU *et al.*, 1996).

### 1.1.7.2 Análise por Tetrazólio

Mostrou-se que o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ou simplesmente tetrazólio (TTC), era capaz de delimitar a área de isquemia em miocárdio canino de forma negativa, ou seja, o tecido viável era corado de vermelho, enquanto a área de infarto não se corava. Ocorre que o TTC, que é incolor em solução, atua comoceptor de prótons para muitas desidrogenases piridina-nucleotídeo-ligadas da cadeia respiratória da parte interna da membrana mitocondrial, levando à produção de um composto: o formazan, que é o responsável pela profunda coloração avermelhada conferida aos tecidos viáveis do ponto de vista de seu metabolismo energético (ISAYAMA; PITTS; NISHIMURA, 1991; JOSHI; JAIN; MURTHY, 2004).

Surpreendentemente, esta marcação ocorria bastante precocemente, o que entusiasmou os pesquisadores, que acreditaram que seria possível identificar a área de infarto cerebral após um breve intervalo do início da isquemia. Posteriormente, observou-se que tal propriedade do TTC também se manifestava em cortes de cérebro, mas não tão prontamente quanto ocorria com amostras de miocárdio (BEDERSON *et al.*, 1986).

Não ficou claro, contudo, porque há este atraso na marcação da área isquêmica no tecido cerebral. Porém, com isquemia acentuada por período de 90 minutos, evidenciou-se nítida lesão tecidual após 6 horas de reperfusão (DU *et al.*, 1996).

### 1.1.7.3 Análise Imunohistoquímica

Como não se obteve marcação precoce da área de isquemia com o TTC, diversas outras formas de coloração ou marcação vêm sendo testadas. Dentre estas, vem se destacando a utilização de uma técnica denominada TUNEL (acrônimo para *terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP biotin nick end labeling*), que através do emprego da 2-deoxinucleotidina 5-trifosfato-biotina, marca as terminações livres 3'-OH do DNA degradado com nucleotídeos modificados. Estas novas terminações do DNA, que são geradas pela fragmentação do DNA, são identificáveis em núcleos e corpos apoptóticos. Em contraste, os núcleos de células que não estão em apoptose, usualmente, têm poucas terminações 3'-OH, não sendo marcados pelo TUNEL. Desta forma, pode-se identificar a apoptose em seu estágio precoce, quando a condensação da cromatina está apenas começando e as quebras de fitas de DNA são poucas, bem antes mesmo que o núcleo sofra maiores alterações morfológicas (ATTANASIO; SCHIFFER, 1995).

Diversos trabalhos vêm utilizando estas técnicas, histopatologia por microscopia óptica, análise pelo TTC e por imunohistoquímica (TUNEL), para a determinação de isquemia. Em recente trabalho de nosso grupo foi demonstrada, utilizando a técnica do TUNEL, a presença de células em apoptose não somente na área de penumbra, mas também em menor quantidade na área central de necrose (PICONE Jr., 2007).

### 1.1.8 Justificativa da Proposição

A clipagem temporária intermitente de vasos intracranianos tem sido utilizada com frequência em cirurgias neurovasculares, especialmente no tratamento de aneurismas intracranianos baseada em evidências clínicas e laboratoriais de que ela reduz o impacto do fenômeno isquêmico ao tecido cerebral em relação à clipagem temporária contínua. Entretanto, esta assertiva não tem respaldo cabal em evidências experimentais, pois, existem poucos trabalhos específicos na literatura e com alguma divergência entre eles, explicadas por uso de diferentes espécies animais ou mesmo de diferentes linhagens de ratos e pelo uso de diferentes métodos utilizados para causar a isquemia, que podem provocar diferentes intensidades de isquemia. Em nosso biotério temos disponível o *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar Hannover e estamos habituados a utilizá-lo para a execução de modelo de isquemia temporária por oclusão da artéria ACM com um fio intraluminal. Um único estudo da literatura (SELMAN

*et al.*, 1994), mostrou que, nesses animais, utilizando o modelo que utilizamos, não foi observada proteção maior da isquemia temporária intermitente em relação à contínua. Por outro lado, o modelo de isquemia temporária que mais reproduz as situações vivenciadas durante procedimentos neurocirúrgicos é o modelo da clipagem temporária da ACM por abordagem intracraniana direta.

Pelos motivos expostos, neste estudo pretendemos comparar os efeitos das isquemias cerebrais temporárias intermitente e contínua no *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar Hannover, utilizando o modelo de oclusão temporária da ACM por oclusão intraluminal de forma contínua e a oclusão de forma intermitente, avaliando os volumes das áreas de infarto e a presença de células apoptóticas nas áreas de infarto e de penumbra.

## ***2. OBJETIVOS***

---

## 2 OBJETIVOS

Utilizando dois modelos experimentais de isquemia temporária focal obtida pela oclusão da ACM por técnica de fio intra-luminal, de forma contínua e de forma intermitente, em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar Hannover este estudo tem por objetivos:

1. Geral: Comparar a eficácia da oclusão temporária intermitente em relação à oclusão temporária contínua na redução da lesão cerebral

2. Específicos:

2.1. Comparar a extensão das isquemias focais temporária intermitente e contínua, através de morfometria realizada em cérebros corados por TTC;

2.2 Efetuar e comparar a contagem de células marcadas pela técnica de TUNEL nas áreas isquêmicas nas diferentes situações experimentais.



### ***3. MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados 93 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar Hannover, pesando entre 270-310 gramas. Os animais que foram submetidos a isquemia por obstrução da ACM com fio intraluminal, e foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas durante o período pré-operatório, com livre acesso à água, ração balanceada e luz, em estufa climatizada com ciclo de 12 horas de claro-escuro e temperatura controlada em 22° C, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. As gaiolas foram trocadas e limpas em dias alternados.

Durante todos os procedimentos foram observadas as normas técnicas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*, visando manter um procedimento ético em todas as etapas do estudo. Dentre estas normas destacam-se: evitar o desconforto, o estresse, a angústia, a dor e as más condições de confinamento e de alimentação; todos os procedimentos com animais que possam causar dor ou angústia precisam se desenvolver com sedação, analgesia ou anestesia adequada; os animais que sofram dor ou angústia intensa ou crônica, que não possam se aliviar e os que não foram utilizados devem ser sacrificados por método indolor e que não cause estresse (FLECKNELL, 1993; MORTON, 1990; SIMÕES, 1998). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 087/2012).

### 3.2. Protocolo Experimental

Os animais foram alocados em 5 grupos, de forma aleatória sugerida no site RANDOM.ORG (Figura 1).

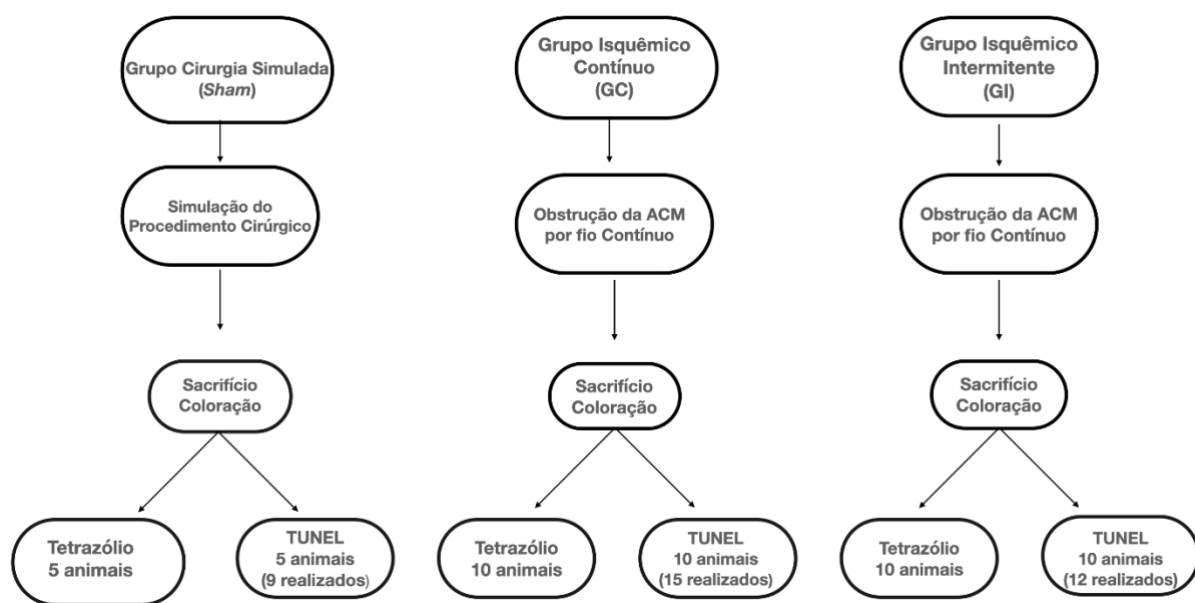
Grupo Cirurgia Simulada (*sham*): 10 animais que foram submetidos à anestesia, estabilizados como acima, logo em seguida iniciamos o procedimento cirúrgico com uma incisão na região cervical média e dissecação da artéria carótida esquerda, neste grupo não

realizamos a isquemia. Em seguida, iniciamos o fechamento da ferida operatória com sutura. Após o período de reperfusão de 72 horas os animais foram sacrificados e 5 cérebros foram corados pelo TTC e os outros 5 cérebros foram corados pelo TUNEL. Devido a problemas no fornecimento do material para realização do TUNEL foram efetuados o total de 9 animais neste subgrupo.

Grupo Isquêmico Contínuo (GC): 20 animais que foram submetidos a procedimento semelhante aos animais do grupo *sham*, com introdução de fio intraluminal na ACI para provocar isquemia durante 90 minutos. Em seguida, o fio foi retirado e a ferida operatória suturada. Após um período de reperfusão de 72 horas, os animais foram sacrificados e subdivididos em dois subgrupos de 10 animais: subgrupo TTC e subgrupo TUNEL, de acordo com a técnica empregada para avaliação do tecido cerebral.

Grupo Isquêmico Intermitente (GI): 20 animais que foram submetidos a procedimento semelhante aos animais do grupo *sham* para provocar isquemia durante 6 períodos de 15 minutos, intercalados com períodos de 10 minutos de reperfusão. Ao término do último período de isquemia, o fio foi retirado e a ferida operatória suturada. Após um período de reperfusão de 72 horas, os animais foram sacrificados e subdivididos em dois subgrupos de maneira semelhante aos do grupo *Sham*. Devido a problemas no fornecimento do material para realização do TUNEL foram efetuados 12 animais neste subgrupo.

**Figura 1** - Esquema da distribuição dos animais nos grupos de estudo. Os números dos animais previstos para a coloração pela técnica do TUNEL são apresentados inicialmente e entre parênteses os números de animais que foram realizados. ACM. Artéria cerebral média.



Fonte: Arquivo do autor

### 3.3. Procedimentos Gerais

Os procedimentos gerais básicos foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia do Bloco de Cirurgia Experimental, Anexos B e C, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Seguindo-se os passos técnicos descritos no trabalho de Carlotti, Colli e Kazuo (2001), os animais foram submetidos à indução anestésica por inalação de isoflurano em câmpnula de plástico. Em seguida foram transferidos para uma prancha de madeira, em decúbito dorsal horizontal, onde foram submetidos à intubação orotraqueal após tração digital da língua. Os animais foram, então, conectados através da cânula orotraqueal a ventilador mecânico desenvolvido pela Oficina de Precisão do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para animais de pequeno porte. Manteve-se nebulização contínua do isoflurano através da cânula com oxigênio.

A artéria caudal foi canulada a fim de monitorizar a frequência cardíaca, bem como permitir a coleta de amostras de sangue arterial para gasometria, e dosagem de eletrólitos séricos. Os parâmetros monitorizados foram pH,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$ , Na, K, peso e temperatura. O kit utilizado para as dosagens e análise destes parâmetros foi o GEM Premier 3500, em equipamento GEM 3000 (Werfen, Barcelona, Espanha).

A coleta de sangue foi feita 15 minutos após a estabilização e 15 minutos antes do término da isquemia. A taxa de oxigênio foi monitorizada utilizando um oxímetro de pulso. A temperatura corporal foi mantida entre 36 e 37° C, aferida com termômetro retal, utilizando-se aquecimento com incidência de fonte de calor (lâmpada 220 V).

### 3.4 Procedimentos Cirúrgicos

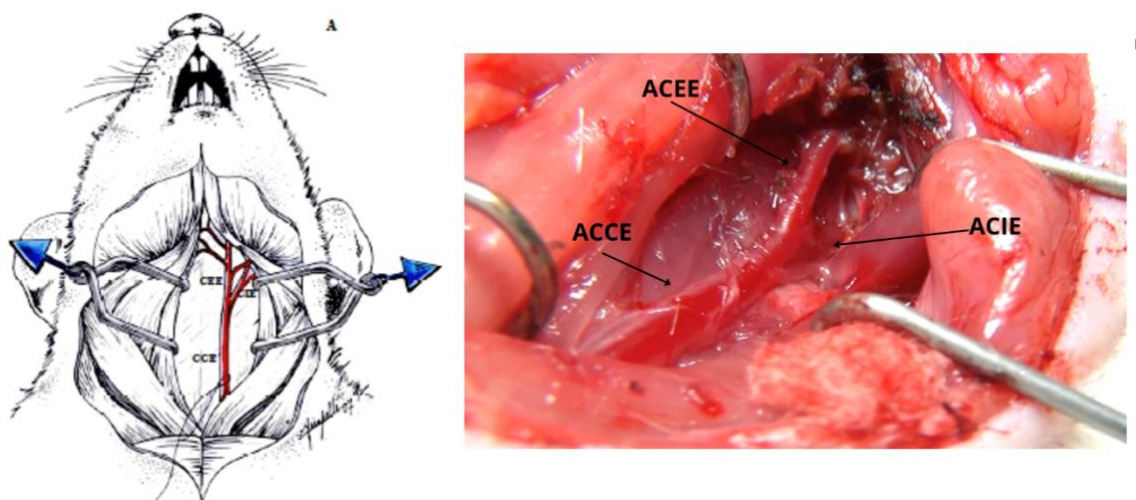
#### 3.4.1 Oclusão Temporária da ACM por Fio Intraluminal

A exposição da ACM para obstrução por fio intraluminal foi realizada empregando-se a técnica descrita por Koizumi *et al.* (1986), modificada por Carlotti, Colli e Kazuo, 2001.

Após a tricotomia da região cervical anterior, realizou-se uma incisão longitudinal mediana da fúrcula esternal até a região submentoniana, através da pele, tela subcutânea e platisma. Em seguida, realiza-se dissecação roma, através de tração digital, a fim de afastar as

glândulas submandibulares, permitindo a visibilização do músculo esternomastóide, ínfero-lateralmente, do omo-hióide, látero-superiormente, e do esterno-hióide, medialmente, que eram rebatidos com auxílio de ganchos retratores. Auxiliado por microscópio cirúrgico (DF - Vasconcellos S.A.), identificou-se a artéria carótida comum E (ACCE), em sua bainha. A dissecação prosseguiu até a identificação da bifurcação da ACCE em artéria carótida externa esquerda (ACEE) e artéria carótida interna esquerda (ACIE) (Figura 2). Os ramos da ACEE foram coagulados e seccionados. A ACIE foi dissecada até a identificação da artéria pterigopalatina e a entrada da ACIE no crânio. A ACEE foi ligada o mais cranialmente possível e as ACCE e ACIE clipadas com cliques neurocirúrgicos temporários para impedir refluxo sanguíneo, seccionada, deixando-se um laço em torno dela para ligadura após introdução e posicionamento do fio obstrutor (Figura 3).

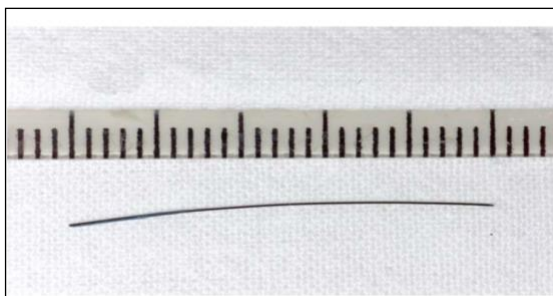
**Figura 2** - Desenho e fotos representando a exposição das artérias carótidas comum esquerda (CCE) (A e B), carótida interna esquerda (CIE) (A) e carótida externa esquerda (CEE), com alguns dos seus ramos cervicais, após afastamento da musculatura cervical superficial (B).



**Fonte:** A. Reproduzido com permissão de Tirapelli, 2007. B. Arquivo do autor.

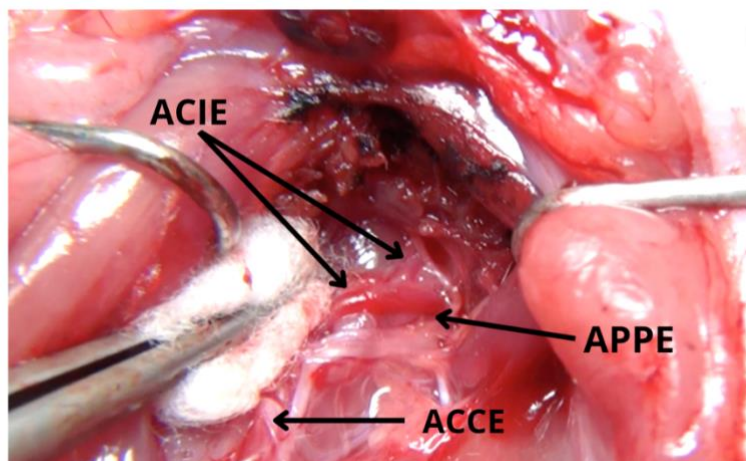
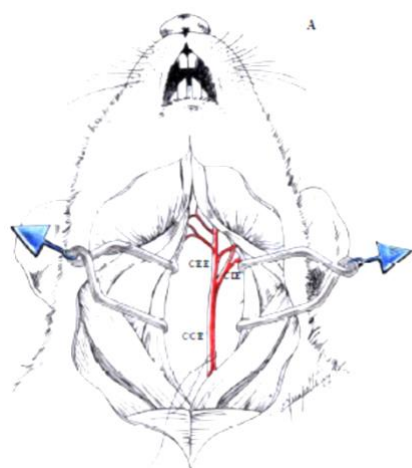
O coto da ACCE foi então rebatido e, através dele, introduzido fio intraluminal descrito em Carlotti, Colli e Kazuo, 2001 (Figura 5), até sentir-se suave resistência à sua progressão. O remanescente do fio que resta para fora do coto da ACEE foi medido, aceitando-se como controle uma sobra de 0,5-0,7 cm (Figura 5). Após o término do tempo de 90 minutos de isquemia contínua ou dos 6 períodos de isquemia intermitente, retirou-se o fio da luz da ACEE, que foi ligada com fio de algodão 3-0 (KOIZUMI *et al.*, 1986; CARLOTTI; COLLI; KAZUO 2001), e, em seguida, a ferida foi suturada.

**Figura 3** - Fio obstrutor, extensão de 2,5cm com uma das extremidades espessada com silicone.



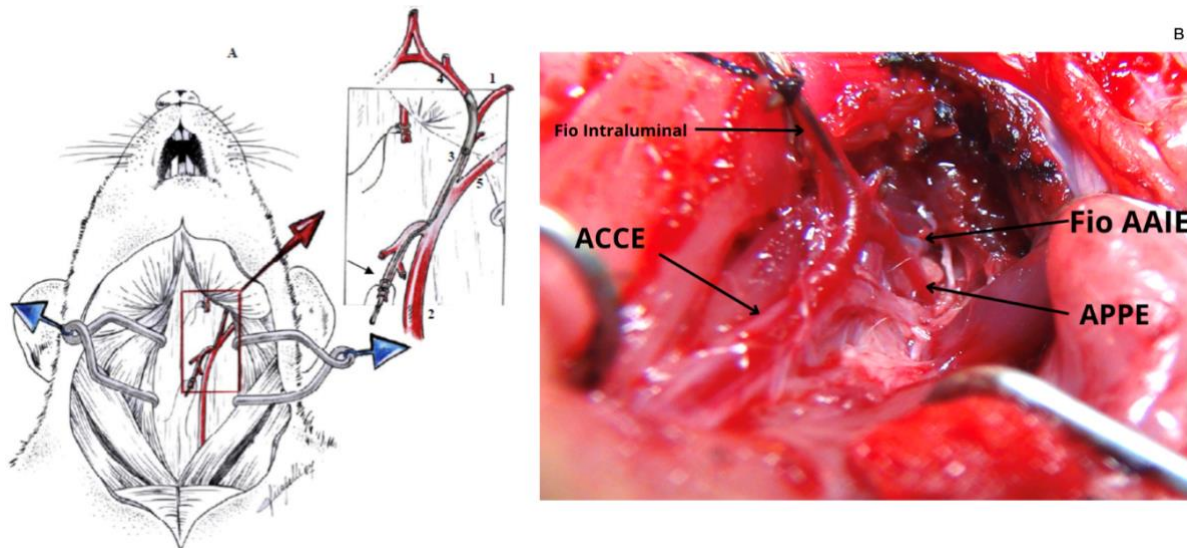
**Fonte:** Reproduzido com permissão de Tirapelli, 2007

**Figura 4** - A. Desenho ilustrando a porção inicial da artéria carótida interna. B. Foto ilustrando a porção proximal da artéria carótida externa esquerda, a artérias carótida comum esquerda, carótida interna esquerda e pterigopalatina esquerda. Desenho ilustrando a posição correta da artéria carótida externa esquerda.



**Fonte:** A. Reproduzido com autorização de Tirapelli, 2007. B. Arquivo do autor.

**Figura 5** - A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da artéria cerebral média esquerda (1) (no detalhe superior direito) e a ligadura da artéria carótida externa esquerda na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da artéria carótida comum esquerda (2) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (3); artéria cerebral anterior esquerda (4); artéria pterigopalatina esquerda (5). B. Foto final do procedimento cirúrgico com a introdução completa do fio obstrutor (seta).



**Fonte:** A. Reproduzido com permissão de Tirapelli, 2007. B. Arquivo do autor.

### 3.4.2 Avaliação da Isquemia Cerebral Experimental

#### 3.4.2.1 Extração do Encéfalo

Decorrido o período de reperfusão previsto ( horas - exceto para o grupo controle), os animais foram sacrificados através de inalação de halotano, em câmpula plástica, até parada da ventilação. Através de corte transversal com tesoura Mayo curva, na região nugal, o escalpo foi retirado, expondo o crânio do animal desde a transição crânio-cervical até a porção inter-orbital, seguida de um corte separando o crânio da coluna cervical e de outro inter-orbital. Dois pequenos cortes foram realizados lateralmente, um de cada lado, no forame magno para servir de fulcro para a craniectomia. O crânio foi seccionado na linha média com tesoura de Metsembaum, iniciando no forame magno, em direção rostral, com o cuidado de bascular a ponta da tesoura contra o crânio, para fora, para reduzir a possibilidade de lesões ao encéfalo.

As metades do crânio separadas pela incisão medial foram afastadas com tração digital cuidadosa para expor o encéfalo, que foi retirado gentilmente com auxílio de pinça angulada delicada, para liberá-lo dos nervos cranianos.

O encéfalo extraído foi acomodado em molde (Figura 5), confeccionado em aço (Matrix - ASI - Instruments - CBM - 2000C USA), que apresenta fendas transversais paralelas a cada 1 mm, permitindo o encaixe de lâminas para fatiá-lo (Figura 6).

#### 3.4.2.2 *Processamento Pós-Extração do Encéfalo*

Os encéfalos dos animais do subgrupo destinado a avaliação pelo TTC foram cortados em fatias de 2 mm de espessura, introduzindo-se lâminas de barbear paralelas a partir de 3 mm do pólo frontal até 11mm do mesmo. A seguir foram acondicionados, a fresco, em placa de Petri e incubados, a 37° C, com TTC a 2% em salina por 30 minutos (BEDERSON *et al.*,1986), obtendo-se forte marcação em vermelho profundo das áreas de tecido cerebral viável e desta forma a área isquêmica, que permanece pálida, fica negativamente marcada.

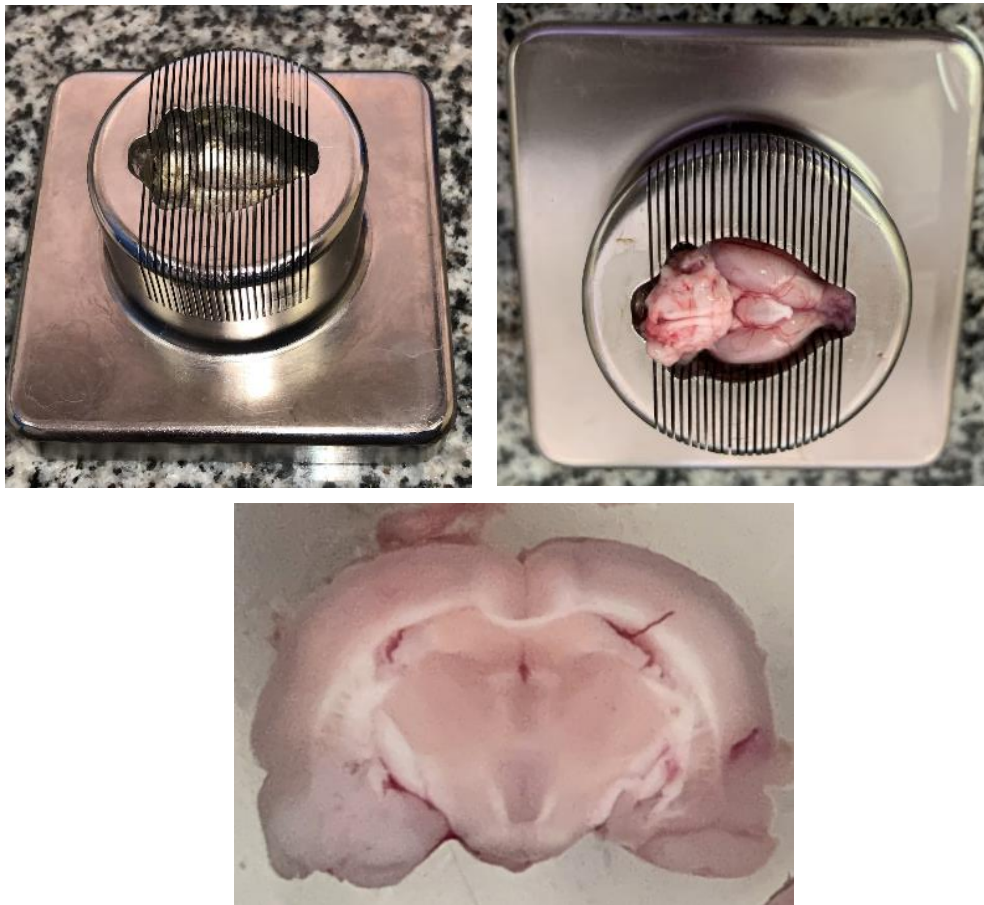
Os encéfalos dos animais do subgrupo destinados à avaliação pela imunohistoquímica por TUNEL foram cortados a fresco, em fatias 4 mm, de maneira semelhante aos cérebros dos animais do subgrupo TTC. Em seguida os espécimes de cérebros foram acondicionados em solução fixadora e processados.

Para o estudo pela imunohistoquímica (TUNEL), foi selecionado apenas um dos cortes coronais (2 mm) cuja secção foi realizada: na região anterior ou rostral passando (1) inferiormente através do quiasma óptico; (2) imediatamente anterior à comissura anterior e terceiro ventrículo; (3) superiormente através do tronco do corpo caloso e porção central do ventrículo lateral (Figura 7). É importante ressaltar que os cortes (3µm) para a análise pela técnica com TUNEL foram realizados a partir desta região rostral em direção posterior. Basicamente, dois níveis padrões de cortes coronais foram utilizados para a avaliação imunohistoquímica.

Três regiões específicas delineadas, na figura 8, foram avaliadas quanto à frequência de células marcadas pelo TUNEL, pois correspondem às principais regiões do cérebro correspondente aos locais de irrigação a partir da ACM.

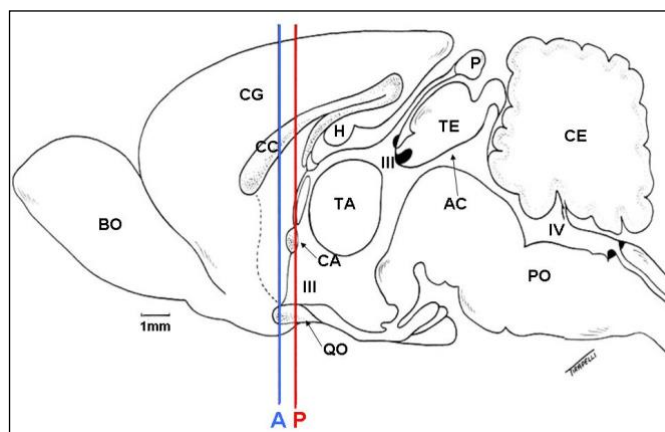


**Figura 6 - Superior Esquerda.** Molde metálico para acomodação e secção do encéfalo (Matrix - ASI – Instruments, CBM2000C. USA). **Superior Direita.** Encéfalo colocado no molde. **Inferior.** Corte coronal do encéfalo obtido com o molde.



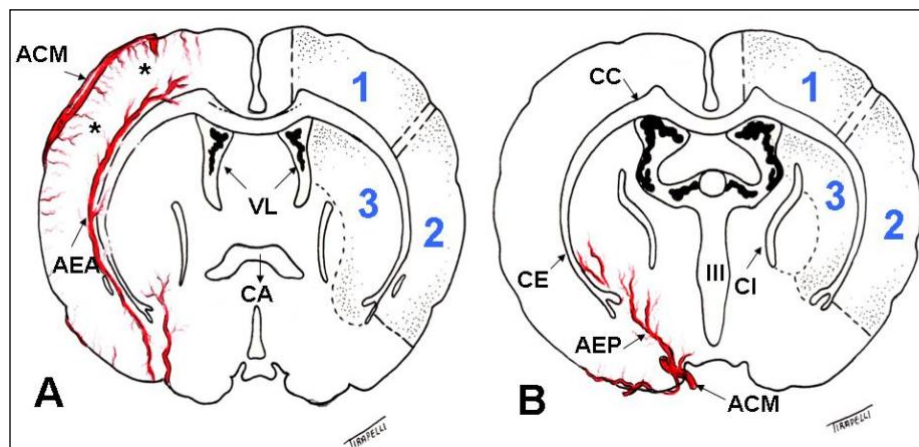
Fonte: Arquivo do autor.

**Figura 7 -** Corte sagital mediano com visão das principais estruturas observadas no encéfalo de rato adulto. As linhas A - anterior ou rostral (em azul) e B – posterior (em vermelho), indicam os dois níveis de cortes coronais utilizados para avaliação pela imunohistoquímica. Aqueduto cerebral (AC); bulbo olfatório (BO); comissura anterior (CA); corpo caloso (CC); cerebelo (CE); cíngulo (CG); hipocampo (H); glândula pineal (P); ponte (PO); quiasma óptico (QO); tálamo (TA); teto mesencefálico (TE); terceiro ventrículo (III); quarto ventrículo (IV).



Fonte: Reproduzido com permissão de Tirapelli, 2007

**Figura 8** - Desenhos dos cortes coronais do encéfalo nas regiões avaliadas, mostrando à esquerda a ACM e alguns dos seus ramos e à direita, as três áreas avaliadas neste estudo: córtex dorsolateral (1); córtex lateral (2), e *striatum* (3). A. Corte coronal anterior ou rostral. Artéria cerebral média (ACM) originando várias pequenas artérias subcorticais perfurantes ou centrais (\*); artéria estriada anterior (AEA) – ramo da ACM. Comissura anterior (CA); ventrículo lateral (VL). B. Corte coronal posterior com ACM emitindo a artéria estriada posterior (AEP). Corpo caloso (CC). Cápsula externa (CE); cápsula interna (CI); terceiro ventrículo (III).



**Fonte:** Reproduzido com permissão de Tirapelli, 2011

#### 3.4.2.3 Análise pelo TTC

As secções coronais dos encéfalos dos animais submetidos ao TTC foram fotografadas na visão anterior e posterior. As imagens foram obtidas por câmera digital Sony HDR-TD10, com lente Sony Lins G 12x. Ópticas. 1,8/2,9-34,8 para processamento e medição da área de isquemia das imagens dos cortes coronais dos encéfalos dos ratos deste grupo.

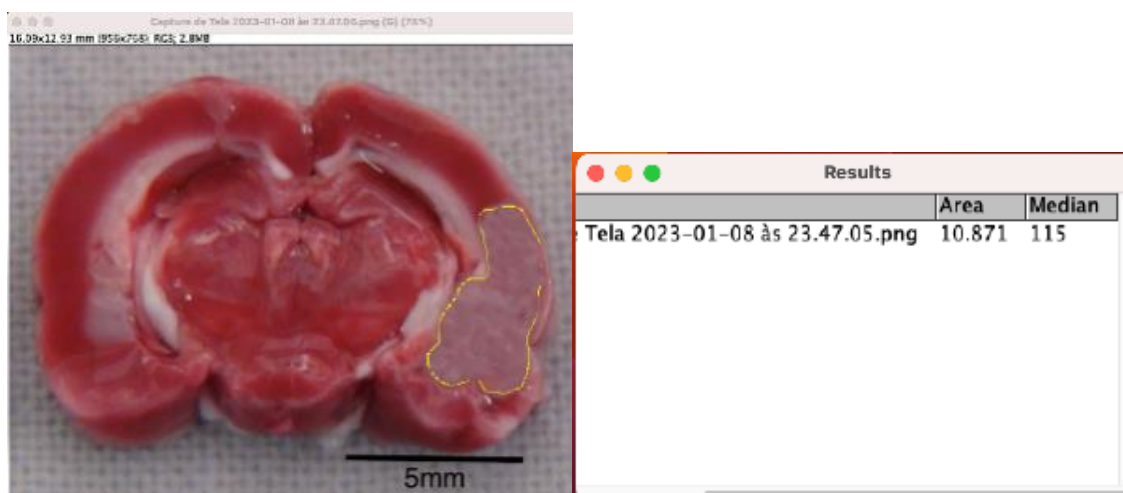
Destas imagens, avaliando-se a similaridade entre as estruturas anatômicas, descritas acima, que estavam presentes nos níveis dos cortes avaliados pelo TUNEL, foram obtidos os valores das áreas isquêmicas e dos hemisférios cerebrais esquerdos dos animais deste grupo, nos dois níveis (ou cortes), em suas faces anterior e posterior. A partir destes valores, foram calculadas a média aritmética das áreas hemisférica e isquêmica nas faces anterior e posterior e, a partir destas médias, foi obtido o valor percentual da área do hemisfério cerebral esquerdo acometido pela isquemia.

#### 3.4.2.4 Análise Morfométrica

O primeiro passo foi a digitalização de cada corte contido nas lâminas. Nesta fase foi utilizada câmera digital Sony HDR-TD10, com lente Sony Lins G 12x, ópticas 1,8/2,9-34,8. A câmera foi fixada em suporte vertical, instalada em módulo de captura de imagens, equipado com fonte de luz própria. Após a captura, todas as imagens foram armazenadas.

Para analisar as áreas dos tecidos cerebrais utilizamos o programa ImageJ (domínio público, [National Institutes of Health](https://www.nih.gov/), Mariland, Bethesda, USA). As áreas dos hemisférios cerebrais esquerdos e direitos e as áreas de infartos delineadas pelo TTC foram acentuadas à caneta eletrônica e em cada corte para execução da morfometria (Figura 9). Foram efetuadas as medidas. Foram realizadas as médias das áreas de cada hemisfério cerebral e a área da região isquêmica para cada animal. Com tais médias foram calculadas as razões das médias (hemisfério esquerdo (isquêmico) / hemisfério direito) para possibilitar a comparação estatística entre os diferentes grupos.

**Figura 9** - Corte do encéfalo de animal com isquemia cerebral trabalhado no programa ImageJ (domínio público, [National Institutes of Health](https://www.nih.gov/), Mariland, Bethesda, USA), mostrando a área isquêmica delineada manualmente. À Direita observa-se a identificação do corte.



**Fonte:** Arquivo do autor

A partir de medidas dessas áreas, da espessura de cada secção e do número de secções, foi possível o cálculo do volume da isquemia nos respectivos hemisférios isquêmicos, segundo a equação abaixo (BARTUS *et al.*, 1994):

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

onde, a extensão máxima do infarto resulta da multiplicação do número de cortes com isquemia por 0,01 (espessura do corte = 10  $\mu\text{m}$  = 0,01 mm).

Foram calculados os volumes isquêmicos parciais, correspondentes aos cortes submetidos a morfometria, de cada animal.

Para a análise final foram calculadas as somas das contagens de células marcadas pelo TUNEL das áreas, 1, 2, e 3 de cada animal.

#### 3.4.2.5 *Análise pela técnica de TUNEL*

Os espécimes de encéfalo destinados ao TUNEL foram fixados em formol tamponado a 10%, durante 24 horas. Em seguida, as peças foram submetidas a alcoolização progressiva em álcool 50% até 100%, diafanização em xilol e inclusão em parafina fundida a 60° C para serem emblocadas.

Cortes de 3µm de espessura foram obtidos com um micrótomo rotativo Reichert Jung 2040 (Reichert Microscope Services, Depew, Nova Iorque, EUA), montados em lâminas histológicas pré-tratadas com silano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) diluído em acetona, e submetidos à coloração com TUNEL, conforme instruções do fabricante do produto Invitrogen™ Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor Imaging Assays for Microscopy & HCS.

As lâminas foram colocadas em estufas a 58°C por no máximo 18 horas e posteriormente desparafinizadas em xilol I, II e III com banhos de 10 minutos cada. Em seguida foram hidratadas em álcoois decrescentes (álcool absoluto, 95°, 80° 70°) com banhos de 5 minutos cada. Após, foram lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Realizado, então, o pré-tratamento-tripsina 0,25% (tripsina sigma-T7409), digestão protéica, por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas duas vezes com água destilada com banhos de 2 minutos cada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 30V Merck a 3% por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS (Phosphate Buffer Solution), com banhos de 5 minutos cada e aplicado o tampão de equilíbrio fornecido pelo kit por 10 segundos em temperatura ambiente. O excesso de tampão foi sugado e, em seguida, aplicada a enzima TdT (fornecida pelo kit) e incubadas em câmara úmida a 37°C por uma hora. O excesso de enzima foi sugado e aplicado o tampão para parada da reação (fornecido no kit) durante 10 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS por quatro vezes de 2 minutos cada, o excesso de PBS foi aspirado e aplicado o DAB (3,3'-diaminobenzidina, sigma D-5637) por 6 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água corrente. Em seguida foram contra-coradas com hematoxilina de Harris sem ácido acético por 3 segundos, lavadas em água corrente e azuladas com NH<sub>3</sub>-gotas, para posterior desidratadção e montagem com Permount Fischer.

A leitura da marcação positiva das células à técnica de TUNEL foi realizada no microscópio de epifluorescência Leica DM 4000B com magnificação de 200x.

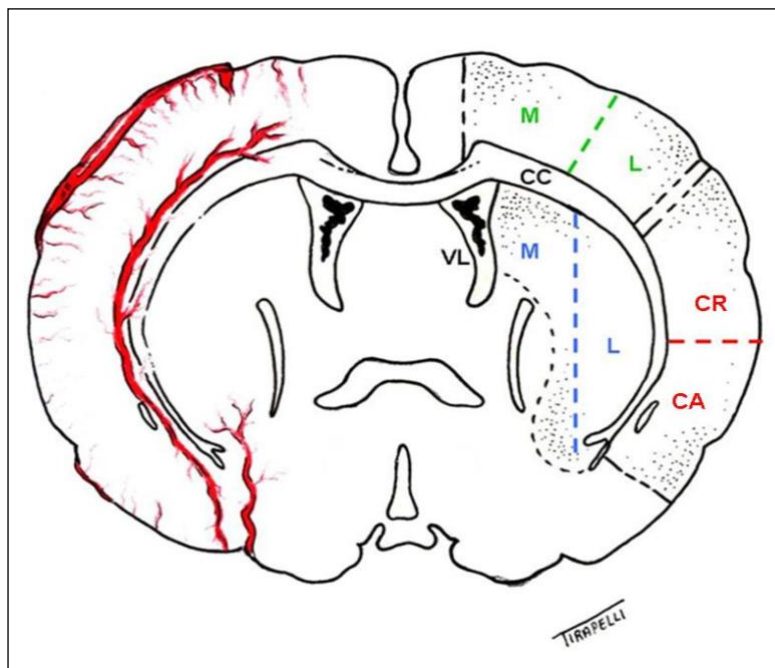
A) Para o cálculo da porcentagem de células positivamente marcadas (neurônios) na área 1 (córtex dorsolateral) e área 2 (córtex lateral), ambos do hemisfério cerebral esquerdo foi efetuada a contagem, de quatro campos em aumento de 400x, para cada área em estudo (áreas 1 e 2 - Figura 10). Os campos foram escolhidos nas regiões do córtex (camadas): dois campos mediais e dois campos laterais para a área 1 e dois campos craniais e dois campos caudais para a área 2. Em cada campo escolhido, a contagem foi realizada onde houve maior marcação positiva (regiões de *hot spot*) para o TUNEL. A partir da contagem do número total de células positivas e negativas, foi calculada a porcentagem de células positivas.

B) Porcentagem de células positivamente marcadas (neurônios) no corpo estriado (*striatum* - área 3) do hemisfério cerebral esquerdo. A contagem das células foi efetuada de maneira similar ao item A, nos campos medial e lateral.

### 3.4.3 Análise Estatística

Para a análise estatística dos valores dos parâmetros fisiológicos dos animais (ph, pCO<sup>2</sup>, pO<sup>2</sup>, Na, K, peso e temperatura) foi aplicado o teste *t* de Student. A comparação entre as mortalidades os tempos médios cirúrgicos entre os grupos GC e GI foi efetuado utilizando o teste exato de Fisher. Para a comparação global das médias das áreas das secções (mm<sup>2</sup>) e dos volumes (mm<sup>3</sup>) de cada hemisfério cerebral e dos percentuais do hemisfério cerebral esquerdo em relação ao hemisfério direito de cada animal nos diferentes grupos experimentais, para as áreas em azul (substância branca) e em vermelho (corpos neuronais), foi utilizado o teste *t* não pareado de Student. Para a comparação entre as porcentagens de células em apoptose observadas nas áreas isquêmicas entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA. Foi adotado o nível de significância  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma IV for MAC (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

**Figura 10** - Corte coronal do encéfalo demonstrando os campos medial (M) e lateral (L) demarcados para duas áreas de avaliação no estudo pelo TUNEL: área 1 - córtex dorsolateral (em verde) e área 3 - *striatum* (em azul); e os campos cranial (CR) e caudal (CA) demarcados para a área 2 - córtex lateral (em vermelho).



**Fonte:** Reproduzido com permissão de Tirapelli, 2011

## ***4. RESULTADOS***

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Procedimento cirúrgico

#### 4.1.1 Animais

Para realização deste estudo foram utilizados 82 animais. Oito animais foram excluídos durante o procedimento cirúrgico por alterações dos parâmetros laboratoriais, sobretudo gasométricos e por não se conseguir manter a temperatura corporal adequada. Além disso, outros 16 animais foram a óbito durante o procedimento cirúrgico, 12 deles do grupo GI e 4 animais do grupo GC. Na fase pós-operatória 9 animais do grupo GI e 5 do grupo GC foram óbito. Os animais excluídos e os óbitos foram repostos para manutenção do número original dos grupos.

A mortalidade observada nos animais do *sham* foi zero, no grupo GC foi 25.9% e no grupo GI foi 45% (diferença não significativa, teste exato de Fisher,  $p = 0,1275$ ).

#### 4.1.2 Tempo cirúrgico médio por grupo

No grupo controle foi realizado apenas a abordagem cirúrgica e o fechamento da ferida operatória num tempo médio de vinte minutos, dos quais, quinze minutos foram utilizados para o acesso e cinco minutos de síntese.

O grupo isquêmico contínuo (GC) teve uma média de tempo total de 110 minutos dos quais, foram utilizados quinze minutos para o acesso cirúrgico, noventa minutos de isquemia contínua e cinco minutos de síntese. O grupo isquêmico intermitente (GI) teve uma média de tempo total de 170 minutos dos quais quinze minutos foram utilizados para o acesso cirúrgico, noventa minutos de isquemia realizada em 6 períodos de 15 minutos intercalados com dez minutos de reperfusão e cinco minutos de síntese. O tempo cirúrgico médio foi significativamente maior no grupo GI que no grupo GC ( $p = 0,0149$ , teste exato de Fisher).



### 4.1.3 Parâmetros Fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos (ph, pCO<sup>2</sup>, pO<sup>2</sup>, Na, K, peso e temperatura) dos animais foram mantidos durante os procedimentos cirúrgicos. Os resultados desta monitorização seguiram a padronização pré-estabelecida.

Não houve diferença significativa entre os parâmetros fisiológicos entre os animais dos diferentes grupos (teste t Student p = 0.0001). Os resultados dos exames laboratoriais são apresentados no anexo 1.

## 4.2 Análise Morfométrica

Para a análise morfométrica foram utilizados 20 animais, 10 animais alocados no grupo intermitente e 10 animais alocados do grupo contínuo.

Para ambos os grupos foram calculadas com o programa ImageJ a área total da secção, a área do hemisfério direito, a área do hemisfério esquerdo e a área isquêmica neste hemisfério. As médias das áreas analisadas na morfometria dos cérebros dos animais do grupo GC impregnados com tetrazólio e nos cérebros dos animais do grupo I são apresentadas nas tabelas 1 e 2 respectivamente, as quais apresentaram distribuição normal (teste de correlação de D' Agostino & Pearson).

**Tabela 1** - Médias das áreas totais, áreas do hemisfério D e áreas isquêmicas dos animais do grupo GC e a espessura das áreas isquêmicas.

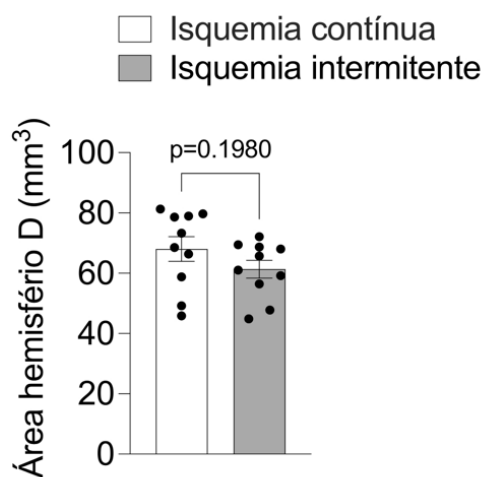
Encéfalo	Áreas Hemisfério D mm <sup>2</sup>	Áreas Hemisfério E mm <sup>2</sup>	Áreas Isquêmicas mm <sup>2</sup>	Áreas Totais mm <sup>2</sup>	Cortes Coronais
01	69.443	74.293	9.264	143.736	3mm
02	56.475	62.479	10.745	118.954	3mm
03	65.741	71.563	8.941	137.304	3mm
04	44.908	51074	14.384	95.982	2mm
05	59.239	61.726	8.408	120.965	2mm
06	68.688	82.638	14.678	151.326	3mm
07	47.772	59.203	11.370	106.975	2mm
08	72.116	76.819	22.293	148.935	3mm
09	68.021	79.432	23.002	147.453	3mm
10	61.012	77.337	14.342	138.349	3mm
			137,43 (10.49%)	1309.979	

**Tabela 2** - Médias das áreas totais, áreas do hemisfério D e áreas isquêmicas dos animais do grupo GI e a espessura das áreas isquêmicas.

Encéfalo	Áreas HemifériosD mm <sup>2</sup>	Área Hemisférios E mm <sup>2</sup>	Área Isquêmicas mm <sup>2</sup>	Area Totais mm <sup>2</sup>	Cortes coronais
1	73.271	85.012	40.102	158.283	3mm
2	58.802	64.197	16.220	122.999	3mm
3	78.655	78.730	32.954	157.385	3mm
4	79.703	90.123	49.374	169.826	3mm
5	81.264	77.659	35.487	158.923	3mm
6	45.887	53.235	13.536	99.112	2mm
7	66.409	67.655	29.061	134.064	3mm
8	68.557	93.543	28.025	162.100	3mm
9	49.234	61.120	19.308	110.354	2mm
10	78.993	83.261	36.573	162.254	3mm
			300.64 (21,47%)	1400.300	

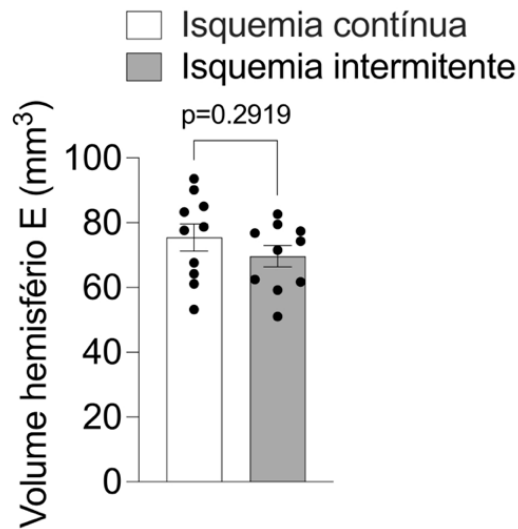
As figuras 11 e 12 apresentam as médias das áreas totais dos hemisférios direitos dos animais dos grupos dos grupos GC e GI.

**Figura 11** - Médias das áreas totais dos hemisférios direitos dos animais dos grupos GC e GI. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1980$ , teste t não pareado).



Fonte: Arquivo do autor

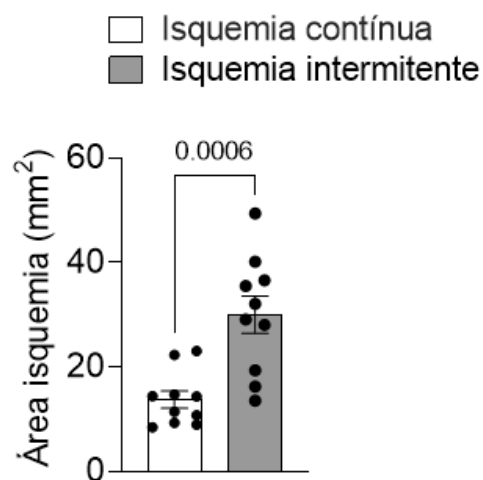
**Figura 12** - Média das áreas totais dos hemisférios esquerdos dos animais dos grupos GC e GII. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2919$ , teste t não pareado).



Fonte: Arquivo do autor

A porcentagem média de isquemias nos animais dos grupos GC e GI foram respectivamente 10,49% e 21,47%. A figura 13 apresenta a comparação entre as áreas isquêmicas dos animais dos grupos GC e GI.

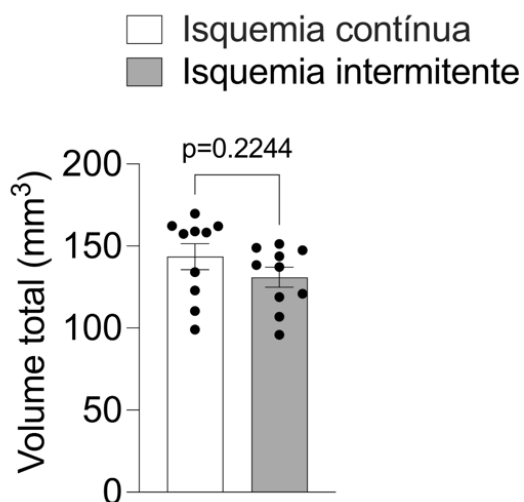
**Figura 13** - Média das áreas isquêmicas dos hemisférios cerebrais direitos dos animais dos grupos GII e GC. Diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos (GC < GII,  $p = 0,0006$ , teste t não pareado).



Fonte: Arquivo do autor

A figura 14 apresenta a comparação entre as áreas totais dos grupos GI e GC.

**Figura 14** - Comparação entre as médias das áreas totais dos animais dos grupos GC e GII. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2244$ , teste t não pareado)



Fonte: Arquivo do autor

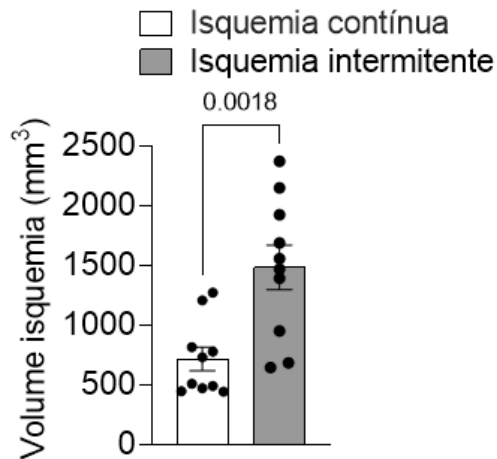
A tabela 3 apresenta as médias dos volumes das áreas isquêmicas nos animais dos grupos GC e grupo GI.

**Tabela 3** - Médias dos volumes das áreas isquêmicas nos animais dos grupos GC e grupo GI

Animal	Isquemia Contínua	Isquemia Intermitente
1	488,78	1921,37
2	440,54	643,15
3	469,06	1476,05
4	814,26	2369,51
5	727,23	682,78
6	508,10	1554,40
7	1204,57	1391,30
8	1269,18	949,01
9	775,68	1686,62
Volume médio mm <sup>3</sup>	744,15	1408,24

A figura 15 apresenta a distribuição das médias dos volumes das áreas isquêmicas nos grupos GC e GI.

**Figura 15** - Médias dos volumes das áreas isquêmicas nos animais dos grupos GI e GC (Ge>GC). Diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.0018$ , teste t de Student).

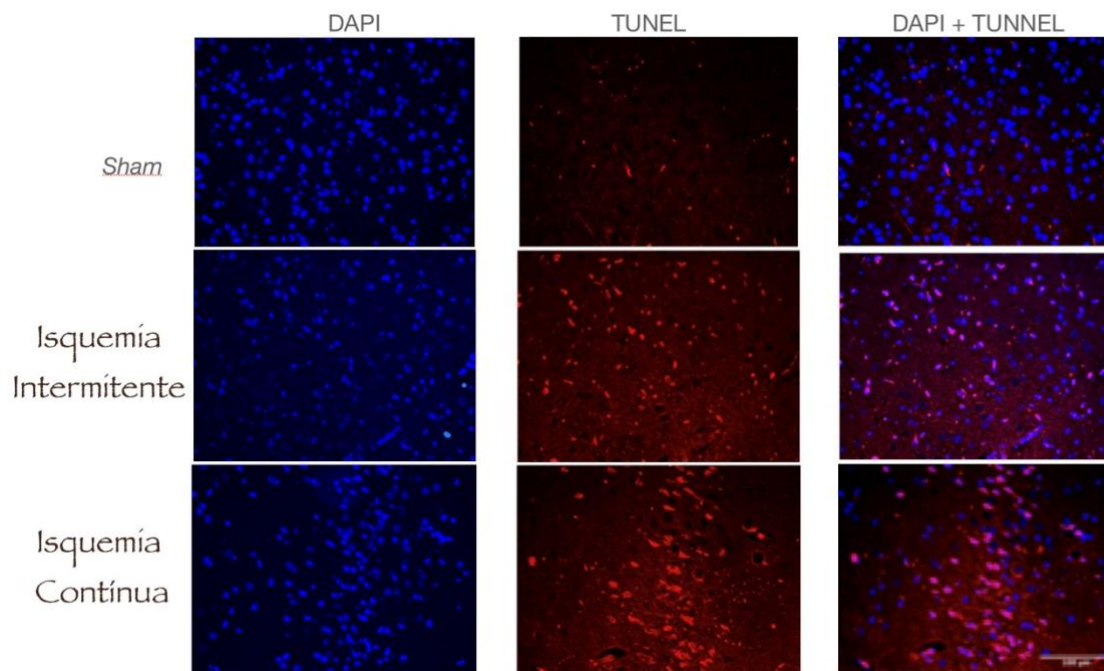


Fonte: Arquivo do autor

### 4.3 Análise do Tunel

A figura 16 apresenta as marcações dos neurônios pela técnica de TUNEL nas áreas 1,2 3 selecionadas dos animais dos grupos estudados. Os neurônios íntegros não apresentam marcação e os neurônios degenerados são marcados em vermelho pelo TUNEL.

**Figura 16** -Marcação de neurônios do cérebro dos animais estudados pela técnica de TUNEL. A coluna da esquerda não evidencia marcação (neurônios íntegros), a coluna do meio apresenta marcação de neurônios degenerados em vermelho e a coluna da direita mostra a sobreposição das colunas anteriores, evidenciando que o grupo *sham* tem apenas ruído. DAPI - deoxynucleotidyl transferase.



Fonte: Arquivo do autor

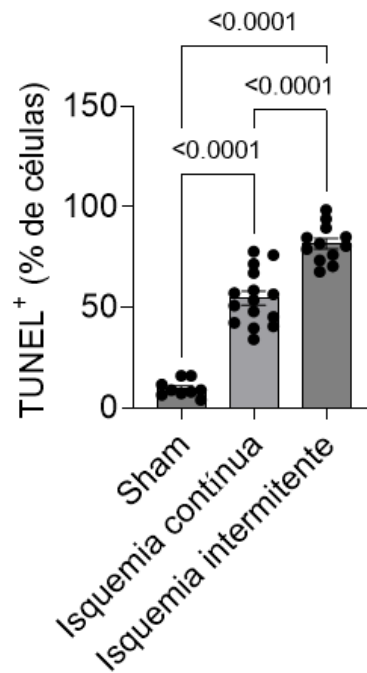
A tabela 4 apresenta a soma das contagens das células apoptóticas marcadas pelo TUNEL nas áreas 1, 2 e 3 nos animais dos grupos sham, GI e GC.

**Tabela 4** - Soma das células apoptóticas nas áreas 1, 2 e 3 dos animais dos grupos sham, GC e GI.

Animais	Sham	Grupo Isquemia Contínua	Grupo Isquemia Intermitente
1	11,70	58,57	80,61
2	8,90	34,24	85,09
3	16,00	57,21	89,58
4	16,00	40,68	94,06
5	4,12	77,78	98,55
6	8,93	67,15	70,60
7	8,12	71,64	73,41
8	7,31	76,64	76,22
9	6,51	41,46	79,04
10		45,27	81,85
11		48,09	84,66
12		50,90	67,78
13		53,72	
14		56,53	
15		39,65	
Média	9,7	51,24	75,2

A análise das marcações pelo TUNEL das células apoptóticas nas áreas 1, 2 é apresentada na figura 17.

**Figura 17** - Porcentagem de células TUNEL+ (apoptóticas), nas áreas 1,2, 3 dos animais dos grupos sham, GC e GI ( $p < 0,0001$  para shamvsGC, ahamvsGI e GCvsGI, teste ANOVA one-way, com post teste de multicomparação de Bonferroni).



Fonte: Pró Arquivo do prio autor

## ***5. DISCUSSÃO***

---



## 5 DISCUSSÃO

O estudo da isquemia cerebral temporária reveste-se de grande importância por ser este o tipo de isquemia mais frequente observado na prática clínica, com o objetivo de reduzir o risco intra-operatório de ruptura, de tornar a dissecação mais segura, e de permitir o controle de hemorragias por rupturas precoces de aneurismas e vasos intracranianos em outras cirurgias, como por exemplo na ressecção de tumores da base do crânio que invadem a ACI (AKYÜZ *et al.*, 2002; ARAKI *et al.*, 1999; BATJER *et al.*, 1988; DRAKE, 1979; HEROS *et al.*, 1983; HINDMAN *et al.*, 2010; JABRE; SYMON, 1987; KETT-WHITE *et al.*, 2002; KRISHT; KADRI, 2005; MIYAZAWA *et al.*, 2002; MORLEY; BARR, 1969; PEERLESS; DRAKE, 1990; SAMSON *et al.*, 1994, SCHICK *et al.*, 2005; SUZUKI; YOSHIMOTO; KAYAMA, 1984; TAYLOR *et al.*, 1996, CÓRDOVA *et al.* 2022, Ha SK *et al.*, 2009; DUTTA *et al.*, 2021; KUMAR; SAHANA; MENON, 2021).

Com o intuito de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos da isquemia cerebral temporária em humanos e para avaliação de novas estratégias terapêuticas, o estudo deste tipo de isquemia em animais de experimentação é de fundamental importância (BARDUTZKY *et al.*, 2005; (BOYKO *et al.*, 2010).). Se por um lado, em condições experimentais, há maior padronização dos procedimentos, o que torna os resultados obtidos mais fidedignos, os resultados obtidos em estudos experimentais devem ser transpostos com cautela para os seres humanos, devido às diferenças intrínsecas entre as espécies (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001).

A escolha do rato como modelo para o estudo da isquemia experimental deveu-se a uma série de fatores como a facilidade e velocidade de criação e a facilidade do manuseio do animal criado em biotérios, a possibilidade de padronização das características do animal (sexo e peso e/ou idade, tamanho, estado de saúde), e a possibilidade de trabalhar-se com o animal anestesiado com intubação orotraqueal e com controle dos parâmetros fisiológicos (temperatura corporal, gases sanguíneo e glicemia) do animal, dados estes interferem com a instalação de processos cerebrais isquêmicos. (GINSBERG; BUSTO, 1989; COLLI; SILVA; CARLOTTI, 1998).

Duas raças de ratos são mais comumente usadas para obtenção de isquemia cerebral experimental, a Sprague-Dawley e a Wistar Hannover. Existem diferenças de suscetibilidade à isquemia cerebral entre ambas demonstrado em estudo prévio que revelou

maior resistência à isquemia na raça wistar em comparação à Sprague-Dawley, atribuída à provável nutrição colateral mais exuberante naqueles animais (BARDUTZKY *et al.*, 2005).

As técnicas de oclusão focal temporária da ACM em ratos, com ou sem reperfusão intermitente, simulam as situações observadas nas microcirurgias vasculares intracranianas. A isquemia é obtida a partir de: 1. Obstrução permanente do fluxo por coagulação da ACM (TAMURA *et al.*, 1981); 2. Oclusão da ACM associada à ligadura sucessiva das ACCs (CHEN *et al.*, 1986); e, 3. Oclusão da ACM, através da introdução do fio intraluminal (KOIZUMI *et al.*, 1986; CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001; BOYKO *et al.*, 2010).

Em nosso laboratório temos padronizado o modelo de isquemia cerebral temporária focal, com ou sem reperfusão, em ratos, obtido por oclusão da ACM com um fio intraluminal introduzido pela ACI. (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; CARVALHO *et al.*, 2016; COLLI; SILVA; CARLOTTI JR *et al.*, 1998; COLLI, TIRAPELLI; CARLOTTI JR *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2000; DUARTE, CAMPOS; COLLI, 2003; DEZENA *et al.*, 2012; SCHIAVONE *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2019; TIRAPELLI *et al.*, 2010; 2012).

Neste estudo, efetuamos uma análise comparativa da isquemia cerebral focal intermitente com a isquemia contínua. O modelo empregado foi o de oclusão ACM com um fio intraluminal que, na isquemia intermitente, foi parcialmente removido em intervalos de tempo para reperfusão (6 ciclos de 15 minutos de oclusão intercalados com reperfusão de 10 minutos. Todos os animais tiveram um período de reperfusão final de 72 horas para que houvesse instalação das lesões da isquemia que pudessem ser detectadas pelos métodos morfológicos utilizados (CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001).

Evidências experimentais da década de 90 mostraram que episódios repetidos de isquemia global aumentam a extensão das lesões neuronais experimentais quando comparadas a um único período equivalente de isquemia (ARAKI; KATO; KOGURE, 1990; INOUE *et al.*, 1992; KATO; KOGURE, 1990; LIN *et al.*, 1992; TOMIDA *et al.*, 1987; WIDMANN *et al.*, 1992).

Existem poucos dados com relação à isquemia focal experimental disponíveis na literatura. Os poucos estudos encontrados são da década de 90 e referem-se a observações de alterações histopatológicas convencionais em isquemia focal contínua e intermitente por obstrução da ACM com fio intraluminal em ratos Wistar (GOLDMAN; ANDERSON; MEYER, 1992 e SELMAN *et al.*, 1994), e em isquemia focal contínua e intermitente em coelhos (STEINBERG *et al.*, 1994), e em ratos (DAVID; PRADO; DIETRICH, 1996), por clipagem intermitente da ACM. A maioria destes estudos utilizou protocolos experimentais que

não reproduzem as características temporais mais prováveis de ocorrer durante os procedimentos cirúrgicos (DAVID; PRADO; DIETRICH, 1996).

Selman, Lust e Pundik, *et al.* (1992), compararam as isquemias focal contínua e intermitente por oclusão direta da ACM através de uma craniotomia basal em ratos Wistar (raça não especificada) normotensos e hipertensos e mostraram áreas de isquemia semelhante nos dois grupos (49,4mm<sup>2</sup> vs. 42,9mm<sup>2</sup>, e menor volume de isquemia nos animais hipertensos submetidos à oclusão intermitente que nos submetidos à isquemia contínua (126,7mm<sup>3</sup> vs. 163,4mm<sup>3</sup>).

Goldman, Anderson e Meyer (1992), em estudo comparativo de isquemia cerebral focal contínua e intermitente por obstrução da ACM com fio intraluminal em ratos Wistar (raça não especificada), observaram que as áreas totais de infarto foram significativamente menores nos animais submetidos à isquemia intermitente que no grupo de animais submetidos a isquemia contínua (áreas totais de infarto aos 60-minutos, 90-minutos e 120-minutos de 1,8, 1,08, 8,7mm<sup>2</sup> e 12,02, 11,54 e 30,43 mm<sup>2</sup>, respectivamente).

Steinberg *et al.*, (1994) observaram uma redução nas áreas isquêmicas (área cortical 24,4% vs. 10,0%; área estriatal 38,1% vs 37,4%) e nas áreas de edema cortical (14,6% x 12,5%) e hemisférico (11,6 vs. 9,9%), verificados em ressonância magnética do encéfalo de coelhos submetidos à isquemia por clipagem transorbital intermitente comparadas à clipagem contínua da ACI, ACM e artéria cerebral anterior, porém, sem diferença significativa.

David, Prado e Dietrich (1996), compararam a isquemia cerebral em ratos Sprague-Dawley por oclusão contínua ou intermitente da ACM por clipagem direta efetuada por alargamento do forame oval e abertura da dura-máter. Os autores verificaram, através de estudo histopatológico e de medidas das áreas de secções coronais do encéfalo irrigadas pela ACM e dos volumes das regiões isquêmicas, um efeito protetor cerebral da isquemia intermitente quando comparada à isquemia contínua por um período equivalente (50mm<sup>3</sup> vs 8,7mm<sup>3</sup>). Este modelo é o que mais se aproxima das situações encontradas durante procedimentos cirúrgicos. Estes resultados conflitam com outros dados da literatura (GOLDMAN; ANDERSON; MEYER, 1992; SELMAN *et al.*, 1994; STEINBERG *et al.*, 1994) e a diferença pode ser atribuída a diferenças entre os animais utilizados (ratos Sprague-Dawley Wistar, ratos wista não especificados e coelhos) e entre os métodos utilizados para provocar a isquemia.

As lesões causadas pela isquemia muitas vezes são sobrepostas por lesões causadas pela reperfusão, o que pode piorar o quadro isquêmico inicial (KALOGERIS *et al.*, 2016; KUMAR; SAHANA; MENON, 2021).

Ha *et al.* (2009), observaram em humanos, que a clipagem temporária intermitente de vasos cerebrais em cirurgias de aneurisma causa menos isquemia que a clipagem contínua (15 % vs 31% de pacientes com manifestações clínicas e 35% vs 50% de sinais radiológicos de isquemia). A clipagem temporária intermitente é considerada menos lesiva que a clipagem temporária contínua e isto é atribuído à reperfusão (KUMAR; SAHANA; MENON, 2021). ARAKI *et al.* (1999) observaram que a reperfusão aumenta a incidência de lesões isquêmicas por clipagem temporária de vaso em cirurgia de aneurismas e que o tempo total de clipagem (31.9 vs. 13.9 minutos), e o tempo máximo de clipagem única (18.4 vs. 8.6 minutos), foram maiores em pacientes com reperfusão do que em pacientes sem reperfusão.

A oclusão da ACM com fio intraluminal e períodos reperfusão tem o viés da inclusão da reperfusão e no processo e isto pode ser difícil de ser diferenciado nos resultados.

Percie du Sert *et al.* 2017, publicaram as recomendações de um grupo de trabalho criado com a finalidade de rever os modelos mais comuns de indução de isquemia em roedores (camundongos e ratos) e recomendar oportunidades os seus refinamentos e promover estas recomendações e estratégias na comunidade de pesquisa de AVC internacional para melhorar a qualidade científica dos resultados.

Frequentemente ocorre uma grande heterogeneidade nos resultados de morbidade de mortalidade num grupo de animais submetidos à isquemia, principalmente em modelos de isquemia transitória por oclusão da ACM em relação a oclusões permanentes porque as oclusões transitórias podem causar lesão endotelial e a reperfusão secundária pode adicionar variabilidade (PERCIE du SERT *et al.*, 2017).

Nos modelos de oclusão ACM pela introdução de fio intraluminal em ratos, o acesso do fio pela ACE exige ligadura e interrupção do fluxo deste vaso, incluindo a irrigação da musculatura facial, e causa dificuldade na mastigação e na ingestão de líquidos com consequente perda de peso. Existe uma correlação linear entre a perda de peso 72 horas após a oclusão da ACM por 60 minutos e o aumento de tamanho do infarto (DIRNAGL, 2010). Evitar a ligadura da ACE é um refinamento e a introdução do fio pode ser feita pela ACC ou pela ACI, o que não altera o tamanho ou a variabilidade do volume infarto em ratos (PERCIE du SERT *et al.*, 2017).

O modelo de oclusão da ACM com filamento intraluminal causa um aumento oclusão-dependente na gravidade da hipoperfusão cerebral dentro e ao redor do território MCA. A obstrução pode ocorrer além do território da ACM (regiões do tálamo, hipotálamo e hipocampo) como consequência da oclusão de artérias originárias mais proximais na ACI pelo filamento, como a artéria coróidea anterior e artéria hipotalâmica, ou porque os animais têm um

polígono de Willis incompleto hereditário, aumentando a área de isquemia (PERCIE du SERT *et al.*, 2017). A extensão e a distribuição das lesões isquêmicas são altamente sensíveis ao aumento da duração da oclusão e a participação de tecidos fora do território da ACM produz um aumento agudo do volume da lesão (McCOLL *et. al.*, 2004).

O fio intraluminal utilizado deve ter o menor diâmetro e o mais curto encapamento da sua extremidade para produzir infartos consistentes no território da ACM (PERCIE du SERT *et al.*, 2017). Até recentemente, a maioria dos laboratórios produzia o seu próprio fio, com consideráveis diferenças. Hoje existem fios pré-fabricados em vários tamanhos para adequar-se a diferentes aplicações, o que pode contribuir para melhorar a reprodutibilidade dos infartos (PERCIE du SERT *et al.*, 2017).

Em nosso estudo observamos que ratos submetidos isquemia cerebral focal contínua por oclusão da ACM com fio intraluminal foi mais efetiva que a isquemia com períodos de reperfusão intermitente (áreas isquêmicas -10,49% vs. 21,47% e volumes isquêmicos 744,15 vs. 1408,24). A diferença observada em relação aos dados de David, Prado e Dietrich (1996) podem ser parcialmente explicados pelo fato de termos utilizado ratos Wistar da raça Hannover (BARDUTZKY *et al.*, 2005). Foram utilizados animais do sexo masculino, já que as fêmeas apresentam neuroproteção por fator hormonal o que poderia confundir nossa análise (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007).

As altas mortalidades operatórias observadas (25.9% no grupo GC e 45% no grupo GI), comparadas à mortalidade zero no grupo *sham* do nosso estudo, são observadas com frequência num grupo de animais submetidos à isquemia, principalmente em modelos de isquemia transitória por oclusão da ACM em relação a oclusões permanentes porque as oclusões transitórias podem causar lesão endotelial e a reperfusão secundária pode adicionar variabilidade (PERCIE du SERT *et al.*, 2017).

A oclusão da ACM com reperfusão intermitente é um procedimento tecnicamente mais complexo que a focal contínua com reperfusão apenas no final da isquemia e demandou um tempo de manuseio cirúrgico do animal maior que na isquemia contínua. A duração do procedimento e sua maior complexidade foi o primeiro fator a ser considerado na avaliação destes resultados. Além disso, a ACEE foi ligada definitivamente no início do procedimento, o fio intraluminal foi removido várias vezes até a ACEE para reperfusão. A ligadura da ACEE pode ter causado dificuldade de mastigação e de ingestão de líquidos, o que acarreta perda peso que, nas primeiras 72 horas da oclusão, está correlacionada ao tamanho do infarto (DIRNAGL, 2010). A maior manipulação do endotélio vascular pelo fio pode ter causado lesão endotelial com a formação de microtrombos e/ou microembolização no território da

ACM. Estes fatores poderiam ter sido minorados deixando-se o fio intraluminal na ACI, o que não interfere com os resultados da isquemia da ACM. Todos estes fatores podem justificar parcialmente a maior ocorrência de isquemia na oclusão com reperfusão intermitente.

Na isquemia focal existe uma área de penumbra entre a área necrosada, onde já houve morte neuronal, e a área de tecido cerebral normal (ASTRUP; SIESJO; SYMON, 1981). Na região de penumbra, ocorrem os fenômenos de morte celular programada ou apoptose (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2007, Picone, 2007). Teoricamente, as células em apoptose podem recuperar-se se a isquemia for revertida. A reversibilidade da isquemia depende da intensidade e da duração do processo isquêmico (SPETZLER; HADLEY, 1989). Porém, com a persistência da isquemia, as células em apoptose evoluem para morte e a disfunção neurológica também se instala, tornando o dano neuronal irreversível e sem reparo (SPETZLER; HADLEY, 1989). Desta forma, o foco das intervenções terapêuticas está direcionado para a área de penumbra isquêmica, com aplicação de medidas que possam reduzir o tamanho do infarto cerebral (SPETZLER; HADLEY, 1989).

A análise por imunofluorescência (TUNEL) é uma técnica utilizada para detectar proteínas específicas em uma amostra de tecido ou células. É um método sensível e específico que pode ser usado para identificar marcadores de morte celular (apoptose), doença, avaliar a resposta imune de um indivíduo a uma infecção ou para investigar a expressão de proteínas em diferentes tecidos ou células. O procedimento consiste em fixar e preparar as amostras de tecido ou células, seguido da aplicação de anticorpos marcados com uma molécula fluorescente. Os anticorpos se ligam às proteínas alvo nas amostras, permitindo que elas sejam visualizadas sob um microscópio de fluorescência. A intensidade da fluorescência pode ser medida para quantificar a expressão da proteína alvo nas amostras.

Após a morte celular onde existe uma fragmentação do DNA, uma das fitas do DNA é rompida e libera nucleotídeos são marcados pelo TUNEL. A presença de células apoptóticas nas áreas de isquemia cerebral em ratos foi demonstrada em estudos anteriores pela marcação destas células pela técnica imunohistoquímica de TUNEL (PICONE, 2007).

Em nosso estudo fizemos também a avaliação da isquemia pela presença de células em apoptose nas áreas de isquemia utilizando esta técnica. Os neurônios íntegros não apresentam marcação e os neurônios degenerados são marcados em vermelho pelo TUNEL. As porcentagens de células em apoptose observadas nas áreas isquêmicas foram maiores nos animais do grupo GI que nos animais GC e do grupo *sham* (75,20% vs. 51,24% vs. 9,4% respectivamente). Estes resultados foram concordantes com a observação das áreas isquêmicas.

A interpretação dos nossos resultados deve ser efetuada com cautela porque o estudo foi efetuado em ratos Wistar Hannover, raça esta que é mais resistente aos processos isquêmicos cerebrais. O método utilizado para oclusão temporária intermitente com períodos de reperfusão envolve problemas técnicos maiores que o processo de oclusão contínua e a própria reperfusão pode ser a causa de piora do insulto isquêmico.

## ***6. CONCLUSÕES***

---



## 6 CONCLUSÕES

Em nosso estudo em ratos, observamos que a isquemia focal intermitente causou mais lesão cerebral quando comparada à isquemia focal contínua e em relação ao grupo controle, contrariando a crença comum de que a clipagem temporária de vasos em cirurgia de aneurismas é benéfica. Entretanto, devido às características do animal e a fatores técnicos do método utilizado, estes resultados devem ser interpretados com cautela ao se fazer a transposição destes resultados para a prática clínica.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

AKYÜZ, M.; ÇETIN, A.; BOZTUG, N.; KAZAN, S.; TUNCER, R. Effects of the temporary clipping in aneurysm surgery on the remnant. **Acta Neurochir.**, Wien, v. 144, n. 2, p. 129-136, Feb. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1007/s007010200015>.

ALMEIDA, A.; ALLEM, K. L.; BATES, T. E.; CLARK, J. B. Effect of reperfusion following cerebral ischemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 1689-1703, Oct. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041698.x>.

ARAKI, T.; KATO, H.; KOGURE, K. Neuronal damage and calcium accumulation following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil. **Brain. Res.**, Amsterdam, v. 528, n. 1, p. 114-122, Sep. 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90202-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90202-M).

ARAKI, Y.; ANDOH, H.; YAMADA, M.; NAKATANI, K.; ANDOH, T.; SAKAI, N. Permissible arterial occlusion time in aneurysm surgery: postoperative hyperperfusion caused by temporary clipping. **Neurol. Med. Chir.**, Tokyo, v. 39, n. 13, p. 901-907, Dec. 1999. DOI: <https://doi.org/10.2176/nmc.39.901>.

ARONOWSKI, J.; STRONG, R.; GROTTA, J. C. Reperfusion injury demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 17, n. 10, p. 1048-1056, Oct. 1997. DOI: <https://doi.org/10.1097/00004647-199710000-00006>.

ASTRUP, J.; SIESJO, B. K.; SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. **Stroke**, Dallas, v. 12, n. 6, p. 723-725, Dec. 1981. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.12.6.723>.

ATTANASIO, A.; SCHIFFER, D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 176, n. 1, p. 27-35, May. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.1711760106>.

BARDUTZKY, J.; SHEN, Q.; HENNINGER, N.; BOULEY, J.; DUONG, T. Q.; FISHER, M. Differences in ischemic lesion evolution in different rat strains using diffusion and perfusion imaging. **Stroke**, Dallas, v. 36, n. 9, p. 2000-2005, Sep. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000177486.85508.4d>.

BARTUS, R. T.; BAKER, K. L.; HEISER, A. D.; SAWYER, S. D.; DEAN, R. L.; ELLIOTT, P. J.; STRAUB, J. A. Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 14, n. 4, p. 537-544, Jul. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1994.67>.

BATJER, H. H.; FRANKFURT, A. I.; PURDY, P. D.; Smith, S. S.; Samson, D. S. Use of etomidate, temporary arterial occlusion, and intraoperative angiography in surgical treatment of large and giant cerebral aneurysms. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 68, n. 2, p. 234-240, Feb. 1988. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1988.68.2.0234>.

BEDERSON, J. B.; PITTS, L. H.; GERMANO, S. M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARKOWSKI, H. M. Evaluation of 2,3,5-tripheniltetrazolium chloride as a stain detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**, Dallas, v. 17, n. 6, p. 1304-1308, Nov./Dec. 1986. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.17.6.1304>.

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- BOYKO, M.; ZLOTNIK, A.; GRUENBAUM, B. F.; GRUENBAUM, S. E.; OHAYON, S.; GOLDSMITH, T.; KOTZ, R.; LEIBOWITZ, A.; SHEINER, E.; SHAPIRA, Y.; TEICHBERG, V. I. An experimental model of focal ischemia using an internal carotid artery approach. **J. Neurosci. Methods**, Amsterdam, v. 193, n. 2, p. 246-253, Nov. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.08.026>.
- BRATINA, R. N.; GRENBERG, R. N.; PASTEUR, W.; GROTTA, J. C. Cuenta emergency department management of stroke in Houston, Texas. **Stroke**, Dallas, v. 26, n. 3, p. 409-414, Mar. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.26.3.409>.
- BROUGHTON, B. R. S.; REUTENS, D. C.; SOBEY, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke**, Dallas, v. 40, n. 5, p. e331-e339, May. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531632>.
- BUCHAN, A. M. Do NMDA antagonists prevent neuronal injury? No. **Arch. Neurol.**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 420-421, Apr. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1001/archneur.1992.00530280114032>.
- CARLOTTI JR, C. G.; COLLI, B. O.; KAZUO, J.Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 59, n. 2-B, p.365-371, Jun. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2001000300011>.
- CARVALHO, C. A. M.; TIRAPELLI, D. P. C.; RODRIGUES, A. R.; LIZARTE NETO, F. S.; NOVAIS, P. C.; SILVA, J. P.; CARLOTTI JÚNIOR, C. G.; COLLI, B. O.; TIRAPELLI, L. F. Morphological and immunohistochemical analysis of apoptosis in the cerebellum of rats subjected to focal cerebral ischemia with or without alcoholism model. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 31, n. 9, p. 629-637, Sep. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-865020160090000009>
- CHAVES, M. L. F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Rev. Bras. Hipertens.**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 4, p. 372-382, Out.-Dec. 2000. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/7-4/012.pdf>. Acesso em: 22 Dec. 2021.
- CHEN, S. T.; HSU, C. Y.; HOGAN, E. L.; MARICQ, H.; BALENTINE, J. D. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. **Stroke**, Dallas, v. 17, n. 4, p. 738-743, Jul-Aug. 1986. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.17.4.738>.
- CHURCH, J.; ZEMAN, S.; LODGE, D. The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 69, n. 5, p. 702-709, Nov. 1988. DOI: <https://doi.org/10.1097/0000542-198811000-00011>.
- COLLI, B. O.; SILVA, M. N.; CARLOTTI Jr, C. G. **Isquemia cerebral experimental**. In: SILVA JR, O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER Jr, A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. Editora Robe, São Paulo, 1998, cap. 65, 643-62.
- COLLI, B. O.; TIRAPELLI, D. P. C.; CARLOTTI Jr, C. G.; LOPES, L. D.; TIRAPELLI, L. F. Biochemical evaluation of focal non-reperfusion cerebral ischemia by middle cerebral artery occlusion in rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 66, n. 3B, p. 725-730, Sep. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2008000500023>.
- CONWAY, E. M.; ZWERTS, F.; EYMEN, V. V.; DEVRIESE, A.; NAGAI, N.; LUO, W.; COLLEN, D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain molecular mechanisms of hipoxia-induced upregulation. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 163, n. 3, p. 935-946, Sep. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63453-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63453-0).
- CÓRDOVA, J. S. Z.; DEMICHELIS, M. E.; VALERIA, F.; GARAVAGLIA, G.; CHADDAD, F.; RANGEL, C. C.; ORDÓÑEZ-GRANJA, J.; CAMPERO, A.; MARÍN, G.; BALDONCINI, M.

Histological changes of vascular clipping in Wistar rats. **Surg. Neurol. Int.**, Mumbai, v. 2, n. 13, p. 561. Dec. 2022. DOI: [https://doi.org/10.25259/SNI\\_1022\\_2022](https://doi.org/10.25259/SNI_1022_2022).

CROMPTON, M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. **J. Physiol.**, Paris, v. 529, n. 1, p. 11-21, Nov. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00011.x>.

DAVID, C. A.; PRADO, R.; DIETRICH, W. D. Cerebral protection by intermittent reperfusion during temporary focal ischemia in the rat. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 85, n. 5, p. 923-928, Nov. 1996. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1996.85.5.0923>.

De La TORRE, E.; MESCHAN, I. Intracranial and extracranial circulation in the dog: anatomic and angiographic studies. **Am. J. Anat.**, Philadelphia, v. 105, n. 3, p. 343-381, Nov. 1959. DOI: <https://doi.org/10.1002/aja.1001050303>.

DEZENA, R. A.; COLLI, B. O.; CARLOTTI Jr, C. G.; TIRAPELLI, L. F. Pre, intra and post-ischemic hypothermic neuroprotection in temporary focal cerebral ischemia in rats: morphometric analysis. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 70, n. 8, p. 609-616, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2012000800010>.

DIAS, L. A. A.; COLLI, B. O.; NETTO, J. C.; LACHAT, J. J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 1047-1054, Dec. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2000000600012>.

DIDENKO, V. V.; NGO, H.; MINCHEW, C. L.; BOUDREAUX, D. J.; WIDMAYER, M. A.; BASKIN, D. S. Caspase-3-dependent and -independent apoptosis in focal brain ischemia. **Mol. Med.**, New York, v. 8, n. 7, p. 347-352, Jul. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393932/>. Acesso em: Dec. 2021.

DIRNAGL, U. **Complexities, confounders, and challenges in experimental stroke research: a checklist for researchers and reviewers.** In: DIRNAGL U (ed.) Rodent models of stroke. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, pp.263–277.

DRAKE, C. G. Giant intracranial aneurysms: experience with surgical treatment of 174 patients. **Clin. Neurosurg.**, Baltimore, v. 26, p. 12-95, Jan. 1979. DOI: [https://doi.org/10.1093/neurosurgery/26.cn\\_suppl\\_1.12](https://doi.org/10.1093/neurosurgery/26.cn_suppl_1.12).

DU, C.; HU, R.; CSERNANSKY, C. A.; HSU, C. Y.; CHOI, D. W. Very delayed infarction after focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 16, n. 2, p. 195-201, Mar. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1097/00004647-199603000-00003>.

DUARTE, S. G.; CAMPOS, A. D.; COLLI, B. O. Functional evaluation of temporary focal cerebral ischemia: experimental model. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 61, n. 3B, p. 751-756, Sep. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2003000500009>.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Ischemic stroke in mice and rats. **Methods. Mol. Biol.**, Totowa, v. 573, p. 95-114, Jul. 2009. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-247-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-247-6_6).

DUTTA, G.; JAGETIA, A.; SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D.; SINGH, H.; CHAWLA, R.; AGARWAL, A.; IQBAL, M.; TANDON, M. Intra-operative cerebral blood flow assessment by indocyanine green video-angiography after temporary arterial occlusion in aneurysm surgery and its clinical implications: a prospective study. **J. Cerebrovasc. Endovasc. Neurosurg.**, Seould, v. 23, n. 3, p. 210-220, Sep. 2021. DOI: <https://doi.org/10.7461/jcen.2021.E2020.10.003>.

- ENGEL-NITZ, N. M.; SANDER, S.; HARLEY, C.; REY, G. G.; SHAH, H. Costs and outcomes of noncardioembolic ischemic stroke in a managed care population. **Vasc. Health Risk Manag.**, Auckland, v. 6, p. 905-913, Oct. 2010. DOI: <https://doi.org/10.2147/VHRM.S10851>.
- ESTUS, S.; ZAKS, W. J.; FREEMAN, R. S.; GRUDA, M.; BRAVO, R.; JOHNSON Jr, E. M. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 127, n. (6 Pt 1), p. 1717-1727, Dec. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.127.6.1717>.
- FLECKNELL, P. A. Anaesthesia of animals for biomedical research. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v. 71, n. 6, p. 885-865, Dec. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1093/bja/71.6.885>.
- FOLBERGROVÁ, J.; KIYOTA, Y.; PAHLMARK, K.; MEMEZAWA, H.; SMITH, M. L.; SIESJÖ, B.K. Does ischemia with reperfusion lead to oxidative damage to proteins in the brain? **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 13, n. 1, p. 145-152, Jan. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.17>.
- GINSBERG, M. D.; BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**, Dallas, v. 20, n. 12, p. 1627-1642, Dec. 1989. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.20.12.1627>.
- GOLDMAN, M. S.; ANDERSON, R. E.; MEYER, F. B. Effects of intermittent reperfusion during temporal focal ischemia. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 911-916, Dec. 1992. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1992.77.6.0911>.
- GRAHAM, S. H.; CHEN, J.; SHARP, FR; SIMON, R. P. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 13, n. 1, p. 88-97, Jan. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.11>.
- GUÉGAN, C.; ONTÉNIENTE, B.; MAKIURA, Y.; MERAD-BOUDIA, M.; CEBALLOS-PICOT, I.; SOLA, B. Reduction of cortical infarction and impairment of apoptosis in NGF-transgenic mice subjected to permanent focal ischemia. **Brain. Res. Mol. Brain. Res.**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 133-140, Mar. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00372-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00372-0).
- HA, S. K.; LIM, D. J.; SEOK, B. G.; KIM, S. H.; PARK, J. Y.; CHUNG, Y. G. Risk of stroke with temporary arterial occlusion in patients undergoing craniotomy for cerebral aneurysm. **J. Korean Neurosurg. Soc.**, Seoul, v. 46, n. 1, p. 31-37, Jul. 2009. DOI: <https://doi.org/10.3340/jkns.2009.46.1.31>.
- HACHIMI-IDRISSI, S.; VAN HEMELRIJCK, A.; MICHOTTE, A.; SMOLDERS, I.; SARRE, S.; EBINGER, G.; HUYGHENS, L.; MICHOTTE, Y. Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats. **Brain. Res.**, Amsterdam, v. 1019, n. 1-2, p. 217-225, Sep. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.013>.
- HARA, H.; ONODERA, H.; NAGASAWA, H.; KOGURE, K. Effect of nimodipine on ischemia-induced brain edema and mortality in a novel transient middle cerebral artery occlusion model. **Jpn. J. Pharmacol.**, Tokyo, v. 53, n. 2. P. 247-253. Jun. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1254/jjp.53.247>.
- HEISS, W. D.; HAYAKAWA, T.; WALTZ, A. G. Cortical neuronal function during ischemia. Effects of occlusion of one middle cerebral artery on single unit activity in cats. **Arch. Neurol.**, Chicago, v. 33, n. 12, p. 813-820, Dec. 1976. DOI: <https://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500120017003>.
- HEROS, R. C.; NELSON, P. B.; OJEMANN, R. G.; CROWELL, R. M.; DEBRUN, G. Large and giant paraclinoid aneurysms: surgical techniques, complications, and results. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 12, n. 2, p. 153-163, Feb. 1983. DOI: <https://doi.org/10.1227/00006123-198302000-00004>.

HINDMAN, B. J.; BAYMAN, E. O.; PFISTERER, W. K.; TORNER, J. C.; TODD, M. M.; IHAST Investigators. No association between intraoperative hypothermia or supplemental protective drug and neurologic outcomes in patients undergoing temporary clipping during cerebral aneurysm surgery: findings from the intraoperative hypothermia for aneurysm surgery trial. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 112, n. 1, p. 86-101, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1097/aln.0b013e3181c5e28f>.

HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; McDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell Death. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 361, n. 16, p. 1570-1583, Oct. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmra0901217>.

HU, B.; WIELOCH, T. Persistent translocation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II to synaptic junction in the vulnerable hippocampal CA1 region following transient ischaemia. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 277-284, Jan. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64010277.x>.

INOUE, T.; KATO, H.; ARAKI, T.; KOGURE, K. Emphasized selective vulnerability after repeated nonlethal cerebral ischemic insults in rats. **Stroke**, Dallas, v. 23, n. 5, p. 739-745, May. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.23.5.739>.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE)**. [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), 2019.

ISAYAMA, K.; PITTS, L. H.; NISHIMURA, M. C. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining to delineate rat brain infarcts. **Stroke**, Dallas, v. 22, n. 11, p. 1394-1398, Nov. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.22.11.1394>.

JABRE, A.; SYMON, L. Temporary vascular occlusion during aneurysm surgery. **Surg. Neurol.**, v. 27, n. 1, p. 47-63, Jan. 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0090-3019\(87\)90107-8](https://doi.org/10.1016/0090-3019(87)90107-8).

JOSHI, C. N.; JAIN, S. K.; MURTHY, P. S. R. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. **Brain. Res. Protoc.**, v. 13, n. 1, p. 11-17, Apr. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2003.12.001>.

KALOGERIS T, BAINES CP, KRENZ M, KORTHUIS RJ. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*. 2016 Dec 6;7(1):113-170. doi: 10.1002/cphy.c160006. PMID: 28135002; PMCID: PMC5648017.

KATO, H.; KOGURE, K. Neuronal damage following non-lethal but repeated cerebral ischemia in the gerbil. **Acta Neuropathol.**, v. 79, n. 5, p. 494-500, Feb. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00296108>.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n. 3, p. 239-257, Aug. 1972. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.

KETT-WHITE, R.; HUTCHINSON, P. J.; AL-RAWI, P. G.; CZOSNYKA, M.; GUPTA, A. K.; JOHN, D.; PICKARD, J. D.; KIRKPATRICK, P. J. Cerebral oxygen and microdialysis monitoring during aneurysm surgery: effects of blood pressure, cerebrospinal fluid drainage, and temporary clipping on infarction. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 96, n. 6, p. 1013-1019, Jun. 2002. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.2002.96.6.1013>.

KOIZUMI, J.; YOSHIDA, Y.; NAKAZAWA, T.; OONEDA, G. Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. **Jpn J. Stroke.**, Tokyo, v. 8, n. 1, p. 1-8, 1986. DOI: <https://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>.

KRISHT, A. F.; KADRI, P. A. S. Surgical clipping of complex basilar apex aneurysms: a strategy for successful outcome using the pretemporal transzygomatic transcavernous approach. **Neurosurgery**,

Baltimore, v. 56, n. 2 Suppl, pg. 261-273, Apr. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000156785.63530.4e>

KUMAR, S.; SAHANA, D.; MENON, G. Optimal Use of Temporary Clip Application during Aneurysm Surgery - In Search of the Holy Grail. **Asian J Neurosurg.**, Mumbai, v. 16, n. 2, p.237-242, May. 2021. DOI: [https://doi.org/10.4103/ajns.AJNS\\_465\\_20](https://doi.org/10.4103/ajns.AJNS_465_20).

KURE, S.; TOMINAGA, T.; YOSHIMOTO, T.; TADA, K.; NARISAWA, K. Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 179, n. 1, p. 39-45, Aug. 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91330-f](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91330-f).

LEKER, R. R.; SHOHAMI, E. Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. **Brain. Res. Rev.**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 55-73, Jun. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00157-1](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00157-1).

LIN, B.; GLOBUS, M. Y. T.; DIETRICH, W. D.; BUSTO, R.; MARTINEZ, E.; GINSBERG, M. D. Differing neurochemical and morphological sequelae of global ischemia: comparison of single- and multiple-insult paradigms. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 59, n.6, p. 2213-2223, Dec. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10113.x>.

LINNIK, M. D.; ZOBRIST, R. H.; HATFIELD, M. D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. **Stroke.**, Dallas, v. 24, n. 12, p. 2002-2008, Dec. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.24.12.2002>.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R.; CARNETHON, M.; DE SIMONE, G.; FERGUSON, T. B.; FLEGAL, K.; FORD, E.; FURIE, K.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S.; HO, M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LACKLAND, D.; LISABETH, L.; MARELLI, A.; MCDERMOTT, M.; MEIGS, J.; MOZAFFARIAN, D.; NICHOL, G.; O'DONNELL, C.; ROGER, V.; ROSAMOND, W.; SACCO, R.; SORLIE, P.; STAFFORD, R.; STEINBERGER, J.; THOM, T.; WASSERTHIEL-SMOLLER, S.; WONG, N.; WYLIE-ROSETT, J.; HONG, Y.; AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. Heart disease and stroke statistics - 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Subcommittee. **Circulation**, Dallas, v. 119, n. 3, p. 480-486, Jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1161/circulationaha.108.191261>.

MCCOLL, B. W.; CARSWELL, H. V.; MCCULLOCH, J.; HORSBURGH, K. Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 997, n. 1, p. 15-23, Jan. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.028>.

MEHTA, S. L.; MANHAS, N.; RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain. Res. Rev.**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 34-66, Apr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.11.003>.

MIYAZAWA, N.; NUKUI, H.; YAGI, S.; YAMAGATA, Z.; HORIKOSHI, T.; YAGISHITA, T.; SUGITA, M. Statistical Analysis of Factors Affecting the Outcome of Patients with Ruptured Distal Anterior Cerebral Artery Aneurysms. **Acta Neurochi.**, Wien, v. 142, n. 11, p. 1241-1246, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/s007010070020>.

MORLEY, T. P.; BARR, H. W. K. Giant intracranial aneurysms: diagnosis, course, and management. **Clin. Neurosurg.**, Baltimore, v. 16, p. 73-94, 1969. DOI: [https://doi.org/10.1093/neurosurgery/16.cn\\_suppl\\_1.73](https://doi.org/10.1093/neurosurgery/16.cn_suppl_1.73).

MORTON, D. B. The animals (Scientific Procedures) Act 1986 and research into anaesthesia. **Br. J. Anaesth.**, Altrincham, v. 65, n. 3, p. 303-305, Sep. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1093/bja/65.3.303>.



- NEGOESCU A, LORIMIER P, LABAT-MOLEUR F, DROUET C, ROBERT C, GUILLERMET C, BRAMBILLA C, BRAMBILLA E. In situ apoptotic cell labeling by TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 44, n. 9, p. 959-968, Sep. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1177/44.9.8773561>.
- O'ROURKE, B. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. **J. Physiol.**, Paris, v. 529, n. 1, p. 23-36, Nov. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00023.x>.
- PEERLESS, S. J.; DRAKE, C. G. **Management of aneurysms of the posterior circulation.** In: YOUMANS, J. R. (ed): *Neurological Surgery*, ed 3. Philadelphia: WB Saunders, 1990, pp 1764-1806.
- PERCIE du SERT, N.; ALFIERI, A.; ALLAN, S. M.; CARSWELL, H. V.; DEUCHAR, G. A.; FARR, T. D.; FLECKNELL, P.; GALLAGHER, L.; GIBSON, C. L.; HALEY, M. J.; MACLEOD, M. R.; MCCOLL, B. W.; MCCABE, C.; MORANCHO, A.; MOON, L. D.; O'NEILL, M. J.; PÉREZ, D. E.; PUIG, I.; PLANAS, A.; RAGAN, C. I.; ROSELL, A.; ROY, L. A.; RYDER, K. O.; SIMATS, A.; SENA, E. S.; SUTHERLAND, B. A.; TRICKLEBANK, M. D.; TRUEMAN, R. C.; WHITFIELD, L.; WONG, R.; MACRAE, I. M. The IMPROVE Guidelines (Ischaemia Models: Procedural Refinements Of in Vivo Experiments). *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, New York, v. 37, n. 11, p. 3488-3517, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/0271678X17709185>.
- PICONE Jr, G. **Análise histopatológica e histoquímica da apoptose na isquemia cerebral focal em ratos por coloração luxol fast blue e por TUNEL.** Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.
- POOL, J. L. Aneurysms of the anterior communicating artery. Bifrontal craniotomy, and routine use of temporary clips. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 18, p. 98-112, Jan. 1961. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1961.18.1.0098>.
- PULSINELLI, W. A. Pathophysiology of acute ischemic stroke. **Lancet**, v. 339, n. 8792, p. 533-536, Feb. 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)90347-6](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90347-6).
- RADANOVIC, M.; SCAFF, M. Uso do Doppler transcraniano para monitorização do vasoespasmó cerebral secundário à hemorragia subaracnóide. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 59-64, Jan./Mar. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0104-42302001000100031>.
- ROPPER AH, SAMUELS MA. **Cerebrovascular diseases.** In: Adams and Victor's Principles of Neurology. 9<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill Company. New York, USA. 2009
- ROTHMAN SM, OLNEY JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic ischemic brain damage. **Ann. Neurol.**, Boston, v. 19, n. 2, p. 105-111, Feb. 1986. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.410190202>.
- SAKAKI T, TSUJIMOTO S, SASAOKA Y, TSUNODA S, SHINTOMI, K. The effect of a new calcium antagonist, TA3090 (clentiazem), on experimental transient focal cerebral ischemia in cats. **Stroke**, Dallas, v.24, n. 6, p. 872-879, Jun. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.24.6.872>.
- SAMSON D, BATJER HH, BOWMAN G, MOOTZ, L.; KRIPPNER JR, W. J.; MEYER, Y. J.; ALLEN, B. C. A clinical study of the parameters and effects of temporary arterial occlusion in the management of intracranial aneurysms. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 22-29, Jan. 1994. Disponível em: [https://journals.lww.com/neurosurgery/Fulltext/1994/01000/A\\_Clinical\\_Study\\_of\\_the\\_Parameters\\_and\\_Effects\\_of.5.aspx](https://journals.lww.com/neurosurgery/Fulltext/1994/01000/A_Clinical_Study_of_the_Parameters_and_Effects_of.5.aspx). Acesso em: 20 Ja. 2020.
- SCHIAVONI, V. S.; SILVA, J. P.; LIZARTE NETO, F. S.; ASSIS, M. L. C.; TAZIMA, M. F. G. S.; CARVALHO, C. A. M.; TIRAPELLI, D. P. C.; CARLOTTI Jr, C. G.; COLLI, B. O.; TIRAPELLI, L. F. Morphological and immunohistochemical analysis of proteins CASPASE 3 and XIAP in rats

subjected to cerebral ischemia and chronic alcoholism. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 33, n. 8, p. 652-663, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180080000001>.

SCHICK, U.; DÖHNERT, J.; MEYER, J. J.; VITZTHUM, H. H. Effects of temporary clips on somatosensory evoked potentials in aneurysm surgery. **Neurocritical Care.**, Totowa, v. 2, n. 2, p. 141-149, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1385/ncc:2:2:141>.

SELMAN, W. R.; BHATTI, S. U.; ROSENSTEIN, C. C.; LUST, W. D.; RATCHESON, R. A. Temporary vessel occlusion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Effects of single and multiple episodes on tissue metabolism and volume of infarction. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 80, n. 6, p. 1085-1090, Jun. 1994. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.6.1085>.

SELMAN, W. R.; LUST, W. D.; PUNDIK, S. Metabolic failure leads to the deterioration of the border zone in reversible focal ischemia. **Abstr Soc Neurosci** 18:1579-85, 1992.

SHALAK L, PERLMAN JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. **Early Hum. Dev.**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 125-141, Nov. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.06.003>.

SHIRAIISHI K, SIMON RP: A model of proximal middle cerebral artery occlusion in rat. **J. Neurosci. Methods**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 169-174, Nov. 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(89\)90064-2](https://doi.org/10.1016/0165-0270(89)90064-2).

SILVA, J. P.; LIZARTE NETO, F. S.; CIRINO, M. L. A.; CARVALHO, C. A. M.; CARLOTTI Jr, C. G.; COLLI, B. O.; TIRAPELLI, D. P. C.; TIRAPELLI, L. F. Analysis of Caspase-9 protein and microRNAs miR-21, miR-126 and miR-155 related to the apoptosis mechanism in the cerebellum of rats submitted to focal cerebral ischemia associated with an alcoholism model. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 77, n. 10, p. 689-695, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-282x20190126>.

SILVA, M. N.; COLLI, B. O.; COIMBRA, N. C.; COUTINHO NETO, J. Evaluation of the neuroprotective effect of ketoprofen on rats submitted to permanent focal brain ischemia. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 65, n. 4A, p. 978-984, Dec. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2007000600011>.

SIMÕES, M. L. P. B. **Ética e legislação da pesquisa clínica e experimental. Isquemia cerebral experimental.** In: SILVA Jr, O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER Jr, A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. Editora Robe, São Paulo, 1998, cap. 03, 149-58.

SNIDER, B. J.; GOTTRON, F.J.; CHOI, D. W. Apoptosis and necrosis in cerebrovascular disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**; New, York, v. 893, n. 1, p. 243-253, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07829.x>.

SPETZLER R.F.; HADLEY MN. Protection against cerebral ischemia: the role of barbiturates. **Cerebrovasc Brain Metab Rev.** 1(3):212-29, Fall 1989. PMID: 2701376.

STEINBERG, G. K.; PANAHIAN, N.; SUN, G. H, MAIER, C. M.; KUNIS, D. Cerebral damage caused by interrupted, repeated arterial occlusion versus uninterrupted occlusion in a focal ischemic model. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 81, n. 4, p. 554-559, Oct. 1994. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1994.81.4.0554>.

STELLER, H. **Regulation of Apoptosis: Lessons from Drosophila and their Implications for Human Health and Disease**, In: HENGARTNER, M. (ed.), Apoptosis: Fundamentals, Pathways, Clinical Applications and Role in Disease, The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks Ltd, London (online at <http://hstalks.com/bio>), 2007.

SUZUKI, J. M. D., YOSHIMOTO, T.; KAYAMA, T. Surgical treatment of middle cerebral artery aneurysms **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 61, n. 1. P. 17-23, Jul. 1984. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1984.61.1.001>.

SWEENEY, M. I.; YAGER, J. Y.; WIAZ, W.; JUURLINK, B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 1525-1535, Nov. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1139/y95-211>.

TAMURA, A.; GRAHAM, D. I.; MCCULLOCH, J.; TEASDALE, G. M. Focal cerebral ischemia in the rat. I: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 1, n. 1, p. 53-60, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1981.6>.

TAYLOR, C. L.; SELMAN, W. R.; KIEFER, S. P.; RATCHESON, R. A. Temporary vessel occlusion during intracranial aneurysm repair. **Neurosurgery.**, Baltimore, v. 39, n. 5., p. 893-906, Nov. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1097/00006123-199611000-00001>.

TIRAPELLI, D. P. C. **Expressão gênica da apoptose celular na isquemia cerebral focal em ratos e a ação neuroprotetora da hipotermia e do cetoprofeno.** Tese de Doutorado. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

TIRAPELLI, D. P. C.; CARLOTTI Jr, C. G.; LEITE, J. P.; LIZARTE, F. S. N.; TIRAPELLI, L. F.; COLLI, B. O. Analysis of the NMDA in Focal Cerebral Ischemia in Rats. **Int. J. Morphol.**, Temuco, v. 30, n. 3, p. 979-985, 2012. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/8153/f43a4105a720e36aa66d0e17d4ad6f56adc2.pdf> Acesso em: 20 Jan. 2023.

TIRAPELLI, D. P. C.; CARLOTTI Jr, C. G.; LEITE, J. P.; TIRAPELLI, L. F.; COLLI, B. O. Expression of HSP70 in cerebral ischemia and neuroprotetive action of hypothermia and ketoprofen. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 592-596, Aug. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2010000400021>.

TIRAPELLI, L. F. **Análise morfológica, imunohistoquímica e do microRNA-21 relacionada à apoptose celular na isquemia cerebral focal em ratos associada ou não a modelo de alcoolismo.** Tese de Livre-Docência. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

TOMIDA, S.; NOWAK, T. S. JR.; VASS, K.; LOHR, J. M.; KLATZO, I. Experimental model for repetitive ischemic attacks in the gerbil: the cumulative effect of repeated ischemic insults. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 7, n. 6, p. 773-782, Dec. 1987. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1987.133>.

TYMIANSKI, M.; TATOR, C. H. Normal and abnormal calcium homeostasis in neuron: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. **Neurosurgery.**, Baltimore, v. 38, n. 6, p. 1176-1195, Jun. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1097/00006123-199606000-00028>.

UEMURA, T.; KAKIZAWA, S.; YAMASAKI, M.; SAKIMURA, K.; WATANABE, M.; IINO, M.; MISHINA, M. Regulation of long-term depression and climbing fiber territory by glutamate receptor delta2 at parallel fiber synapses through its C-terminal domain in cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 27, n. 44, p. 12096-12108, Oct. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2680-07.2007>.

VIRANI, S. S.; CHAIR, A. A.; APARICIO, H. J.; BENJAMIN, E. J.; BITTENCOURT, M. S.; CALLAWAY, C. W.; CARSON, A. P.; CHAMBERLAIN, A. M.; CHENG, S.; DELLING, F. N.; ELKIND, M. S. V.; EVENSON, K. R.; FERGUSON, J. F.; GUPTA, D. K.; KHAN, S. S.; KISSELA, B. M.; KNUTSON, K.L.; LEE, C. D.; LEWIS, T. T.; LIU, J.; LOOP, M. S.; LUTSEY, P. L.; MA, J.;

MACKEY, J.; MARTIN, S. S.; MATCHAR, D. B.; MUSSOLINO, M. E.; NAVANEETHAN, S. D.; PERAK, A. M.; ROTH, G. A.; SAMAD, Z.; SATOU, G. M.; SCHROEDER, E. B. SHAH, S. H.; SHAY, C. M.; STOKES, A.; VANWAGNER, L. B.; WANG, N. Y.; TSAO, C. W.; ON BEHALF OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION COUNCIL ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update. A report from the American Heart Association. **Circulation**, Dallas, v. 143, n. 8, p. e254–e743, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950>.

WARLOW, C. P. Epidemiology of Stroke. **Lancet**, London, v. 352, n. 3, p. SIII 1-4, Oct. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)90086-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)90086-1).

WIDMANN, R.; WEBER, C.; BONNEKOH, P.; SCHLENKER, M.; HOSSMANN, K. A. Neuronal damage after repeated 5 minutes of ischemia in the gerbil is preceded by prolonged impairment of protein metabolism. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, New York, v. 12, n. 3, p. 425-433, May. 1992. DOI: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1992.60>.

YUAN, J., YANKNER, B. A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, London, v. 407, n. 6805, p. 802-809, Oct. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35037739>.

ZIVIN, J. A.; CHOI, D. W. Stroke therapy. **Sci. Am.**, New York, v. 265, n. 1, p. 56-63, Jul. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0791-56>.

***ANEXOS***

---

## ANEXOS

### Parâmetros Fisiológicos no colhidos no início e no fim do experimento

#### Grupo Sham. Exames Iniciais.

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Peso	297	278	301	279	293	272	380	297	304	275	273	289	290	295
pH	7,39	7,38	7,41	7,4	7,42	7,36	7,37	7,38	7,4	7,42	7,36	7,42	7,38	7,42
pCO <sub>2</sub>	36	39	92	39	44	39	38	41	39	39	40	41	41	44
pO <sub>2</sub>	94	90	39	89	99	89	90	98	90	100	98	90	90	92
Na	135	138	136	139	136	135	138	136	137	136	139	139	139	139
K	4,7	5,4	5	4,7	4,8	4,6	4,7	4,8	4,7	4,8	4,8	4,7	4,7	4,6
Temperatura	37	36	37	36	36	37	37	37	37	36	36	36	290	37

#### Grupo sham. Exames finais.

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Peso	294	274	298	277	289	270	378	295	300	272	272	288	290	292
pH	7,37	7,36	7,43	7,37	7,41	7,39	7,39	7,42	7,44	7,45	7,36	7,43	7,4	7,42
pCO <sub>2</sub>	38	41	89	42	45	36	37	38	35	36	41	41	41	43
pO <sub>2</sub>	97	93	36	92	96	91	91	99	85	99	97	91	99	91
Na	136	138	137	139	137	135	139	137	136	137	140	140	236	140
K	4,6	5,3	5,4	4,7	4,8	4,8	4,7	4,9	4,7	4,8	4,7	4,7	4,7	4,5
Temperatura	37	37	37	37	36	36	37	36	37	36	37	37	36	37

#### Grupo isquemia contínuo (tetrazólio): Exames iniciais.

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peso	274	299	290	299	283	300	305	300	272	271
pH	7,36	7,34	7,38	7,41	7,4	7,45	7,39	7,38	7,35	7,38
pCO <sub>2</sub>	38	41	45	44	38	40	39	40	92	36
pO <sub>2</sub>	89	89	99	98	98	98	90	90	86	90
Na	139	138	137	138	136	136	140	139	142	140
K	4,7	4,8	4,8	4,6	4,5	4,6	4,9	4,8	4,6	4,6
Temperatura	37	37	36	36	37	37	36	36	36	37



**Grupo isquemia contínua (TUNEL): exames finais.**

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Peso	270	304	307	300	278	286	296	291	298	298	270	273	273	295	296
pH	7,38	7,43	7,42	7,4	7,41	7,42	7,39	7,39	7,39	7,39	7,39	7,37	7,35	7,35	7,39
pCO2	39	35	44	39	39	41	40	41	41	41	36	42	38	41	39
pO2	92	97	91	99	92	91	90	91	88	88	91	89	90	90	90
Na	139	137	139	136	141	140	138	139	140	140	135	139	140	138	140
K	4,8	4,6	4,7	4,6	4,7	4,8	4,6	4,8	4,8	4,8	4,8	4,6	4,7	4,8	4,8
Temperatura	37	36	37	37	37	36	36	37	37	37	36	37	37	37	37

**Grupo isquemia intermitente (TUNEL): exames iniciais.**

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Peso	295	298	274	286	279	306	289	290	272	309	306	308
pH	7,42	7,43	7,38	7,45	7,38	7,38	7,42	7,4	7,39	7,38	7,42	7,41
pCO2	44	43	43	42	41	39	41	41	42	42	36	44
pO2	92	90	88	92	92	89	90	99	42	4,7	97	90
Na	139	135	139	139	140	135	139	236	137	136	137	139
K	4,6	4,8	4,6	4,6	4,6	4,7	4,7	4,6	4,8	4,7	4,7	4,6
Temperatura	37	37	37	37	37	36	36	36	37	37	36	36

**Grupo isquemia intermitente (TUNEL): exames finais.**

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Peso	292	296	273	285	278	303	288	290	270	308	304	307
pH	7,42	7,43	7,38	7,45	7,39	7,38	7,43	7,4	7,39	7,38	7,42	7,44
pCO2	43	43	42	42	41	39	41	42	42	42	35	44
pO2	91	90	89	90	92	89	91	98	42	4,7	97	91
Na	140	135	139	138	141	136	140	237	138	137	137	139
K	4,6	4,8	4,6	4,6	4,6	4,7	4,7	4,7	4,8	4,8	4,6	4,7
Temperatura	37	37	37	37	36	37	37	36	37	36	36	37



## Tempo Cirúrgico Dos Grupos Isquêmicos

### Grupo Isquêmico Contínuo

Animal	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14
Tempo	113	115	117	116	112	110	116	117	115	117	111	114	113	115

Animal	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Média
Tempo	114	111	110	114	115	109	111	114	115	110	113	114,36

### Grupo Isquêmico Intermitente

Animal	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Tempo	175	176	174	173	173	178	170	169	171	172

Animal	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Média
Tempo	174	173	173	175	170	168	175	169	176	172	171	176	173,1