



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

PEDRO GABRIEL DE ARAÚJO CORDEIRO

PADRONIZAÇÃO ELETROCORTICOGRÁFICA DAS FREQUÊNCIAS
RELACIONADAS ÀS FORÇAS THETA E GAMMA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUÊMIA CEREBRAL EM RATOS

BELÉM - PARÁ
2017

PEDRO GABRIEL DE ARAÚJO CORDEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Moisés Hamoy

BELÉM - PARÁ
2017

PEDRO GABRIEL DE ARAÚJO CORDEIRO

**PADRONIZAÇÃO ELETROCORTICOGRÁFICA DAS FREQUÊNCIAS
RELACIONADAS ÀS FORÇAS THETA E GAMMA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUÊMIA CEREBRAL EM RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moises Hamoy

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Vanessa Joia de Mello

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Msc. Rômulo Augusto Feio Farias

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

BELÉM-PARÁ

2017

“Pode se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”

J. K. Rowling

Dedico esse trabalho e todos os outros que virão à minha avó Tereza (in memoriam), à minha Mãe Socorro Aragão que é meu alicerce e que nunca deixou de acreditar em mim, ao meu Pai Reinaldo e aos meus irmãos Laura e Lucas.

AGRADECIMENTOS

A DEUS primeiramente, já que é graças a ele que eu consegui chegar até aqui. Sou muito grato por todas as bênçãos que ele tem me proporcionado e sigo em frente renovando minha fé cada vez mais.

À minha mãe, Maria do Socorro Aragão de Araújo, meu maior bem nessa vida, que sempre se esforçou ao máximo para me fazer o homem que sou hoje e é graças a ela também que chego ao final de mais uma etapa.

À minha Avó Maria Tereza Aragão (in memoriam) que, apesar do pouco tempo juntos, me mostrou o amor mais verdadeiro.

Ao meu Pai Reinaldo Costa Cordeiro, meu primeiro amigo e exemplo de caráter.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram em mim e que de uma forma ou de outra contribuíram para chegar onde cheguei.

Ao meu orientador Professor Doutor Moisés Hamoy, que me proporcionou oportunidades únicas me acolhendo em seu laboratório e me repassando um pouco do seu conhecimento científico. Muito obrigado Professor, o senhor foi fundamental na construção do meu profissionalismo me ensinando que mesmo nas horas mais adversas, se nos esforçarmos podemos encontrar uma alternativa. *“A necessidade é a mãe da criatividade”*.

A toda família do Laboratório de Farmacologia de Toxicologia de Produtos Naturais (LFTPN), em especial: à Professora Dr^a Vanessa Joia de Mello que durante todos esses anos também contribuiu de forma significativa na construção do meu futuro, muito obrigado Professora pelo carinho, à Silvana Lopes e Laiane Nascimento que foram companheiras de bancada compartilhando desde os momentos mais tristes aos mais alegres, muito obrigado Senhoras. Por último não posso deixar de agradecer a todos aqueles que compartilharam o seu conhecimento comigo me ensinando e orientando nas atividades do laboratório, muito obrigado a todos.

Aos amigos mais que especiais, Paula, Marcela, Bárbara, Dairla, Antônio, Leonardo, Lucas, Larissa e Rebeca por todos os momentos vividos juntos desde o ensino fundamental.

À Universidade Federal do Pará que me proporcionou momentos únicos, desde a aprovação até os laços de amizade construídos aqui dentro.

À Lariza, Natalia, Isis e Felipe as maiores amigas que construí na faculdade e que sem dúvidas seguirão comigo para a vida toda.

A todos os meus amigos que não foram citados aqui, mas, que sem os quais é impossível seguir em frente, vocês são parte fundamental da minha história.

A todos os Professores presentes na minha vida escolar/acadêmica, muito obrigado por cada palavra, cada incentivo, cada ensinamento passado foi um tijolo na construção do meu saber.

A todos os animais utilizados em pesquisa que contribuem com o que há de mais precioso para o enriquecimento e aprimoramento da ciência no mundo. Muito obrigado.

Por fim, a cada pessoa que contribuiu para a realização desse sonho.

RESUMO

As enfermidades relacionadas com o sistema circulatório representam na atualidade uma parte significativa das estatísticas de causa de morte, todos os dias 15 milhões de pessoas são acometidas por Acidente Vascular Encefálico (AVE). A busca por modelos experimentais de acidente vascular encefálico é de extrema necessidade para melhor compreender e estudar o AVE e seus possíveis tratamentos. Para a realização do estudo foram utilizados 06 Ratos Wistar adultos provenientes do Bioterio central da UFPA e com parecer favorável da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais e Experimentação da UFPA (CEPAE) sob registro BIO0112-14. Após ambientação os animais foram anestesiados e submetido a cirurgia estereotóxica para implante dos eletrodos nas coordenadas estereotóxicas de Bregma 0,96 mm, latero-lateral ± 2 mm, dorso-ventral -2 mm em área do córtex motor do rato. Sete dias após a cirurgia os animais foram anestesiados, posteriormente foi realizada uma incisão na região cervical ventral, para promover o acesso às artéria carótidas comum e a traquéia, em seguida os animais foram entubados e mantidos em respiração artificial. O primeiro estágio de registros (Basal - 30 minutos), depois as artérias carótidas comuns foram isoladas e ocluídas por pressão para indução do quadro isquêmico, foi realizado o segundo estágio de registros (Isquemia - 30 minutos), depois o rato foi reperfundido, e realizado o último estágio de registro (Reperusão - 30 minutos). Os registros eletroencefalográficos revelaram que durante o período isquêmico ocorrem modificações nos padrões de traçado e nas amplitudes dos registros. Os resultados demonstram que durante o período de isquemia e reperfusão ocorre uma redução de amplitude nas forças de maiores frequências. Podendo essas forças caracterizar o modelo animal para isquemia cerebral e serem utilizadas como possíveis marcadores para condições patológicas relacionadas à hipóxia cerebral, bem como para avaliação de tratamentos a serem utilizados na fase aguda do processo.

Palavras chave: Isquemia, acidente vascular, eletrocorticograma

ABSTRACT

Every day, 15 million people are affected by stroke, one of the main death causatives associated to circulatory system disorders. The search for experimental models of cerebral vascular accident is of extreme necessity to better understand and to study the AVE and its possible treatments. Six adult Wistar rats from the Central Biotereum of UFPA and with a favorable opinion from the Commission for Ethics in Animal Research and Experimentation of UFPA (CEPAE) were used to carry out the study. After adjustment, the animals were anesthetized and submitted to stereotaxic surgery to implant the electrodes in the stereotactic coordinates of Bregma 0.96 mm, latero-lateral ± 2 mm, dorsal-ventral -2 mm in the area of the mouse motor cortex. Seven days after surgery, the animals were anesthetized and an incision was made in the ventral cervical region to promote access to the common carotid artery and trachea, then the animals were intubated and maintained in artificial respiration. After the first stage of recording (baseline - 30 minutes), the common carotid arteries were isolated and pressure-occluded by ischemic induction, the second stage of recording was performed (Ischemia - 30 minutes), then the mouse was reperfused, and performed the last stage of recording (Reperfusion - 30 minutes). Electroencephalographic records revealed that during the ischemic period changes in the tracing patterns and amplitudes of the registers occurred. The results demonstrate that during the period of ischemia and reperfusion a reduction of amplitude occurs in the forces of higher frequencies. These forces may characterize the animal model for cerebral ischemia and be used as possible markers for pathological conditions related to cerebral hypoxia, as well as for the evaluation of treatments to be used in the acute phase of the process.

Key words: Ischemia, Electrocorticography, Stroke

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 – INTRODUÇÃO	01
1.1- A ESTRUTURA VASCULAR DO SISTEMA NERVOSO.....	02
1.2- FISIOPATOLOGIA DO AVE ISQUÊMICO.....	04
1.2.1 – Processos bioquímicos do AVE isquêmico.....	04
2 – JUSTIFICATIVA	07
3 – OBJETIVOS	08
4 – MATERIAL E MÉTODO.....	09
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
7 – CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS	17

1- INTRODUÇÃO

As enfermidades relacionadas com o sistema circulatório representam na atualidade uma parte significativa das estatísticas de causa de morte. O Acidente Vascular Encefálico (AVE) representa uma das causas de morte mais expressivas do mundo, todos os dias 15 milhões de pessoas são acometidas por AVE totalizando aproximadamente 6 milhões de mortes anualmente (WOODRUFF et al.,2011; MACREZ et al., 2011), cerca de uma em cada seis pessoas vai sofrer pelo menos um acidente vascular durante toda a vida (SESHADRI et al, 2006).

Dados do Sistema de Informações sobre mortalidade da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde revelam, assustadoramente, que, durante o período de 2001 a 2011, a manutenção em mais de 60% dos óbitos informados no Brasil foi devida a três grupos de causas: doenças do aparelho circulatório (com tendência a decréscimo, variando de 31,90% a 30,69%), neoplasias (com tendência de acréscimo, variando de 15,18% a 16,88%) e causas externas (de 14,65% a 13,35%).

Na região Norte as mortes por doenças do aparelho circulatório mostraram proporção estável de 24%. Sendo importante destacar que se trata da principal causa de morte em todas as regiões do país (DATASUS).

Embora se tenha notado um decréscimo nas causas de morte por doenças do aparelho circulatório, ainda é consenso que essas doenças mereçam destaque no cuidado assistencial e na pesquisa, principalmente quando se observa que a população brasileira, segundo o Censo 2010 promovido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), totaliza 190.732.694 pessoas, sendo que 8,3% desta encontra-se na região Norte (o que representa aproximadamente 15.830.813 pessoas). No Pará, tem-se uma população em torno de 7.500.000 pessoas.

Para Garritano e cols (2011), o número de indivíduos com mais de 60 anos de idade vem aumentando acentuadamente nas últimas décadas. Com isso, a tendência ao aparecimento de doenças do aparelho circulatório aumenta, mantendo-se a principal causa de óbitos em ambos os sexos do Brasil.

Os mesmos autores afirmam que dentro do grupo das doenças do aparelho circulatório, o acidente vascular encefálico (AVE) tornou-se uma das principais causas de morte no mundo. Entre os países da América Latina, o Brasil é o que apresenta as maiores taxas de mortalidade por AVE, sendo entre as mulheres a

principal causa de óbitos. Mesmo sendo referida uma redução dos índices de mortalidade nas últimas décadas, os valores continuam muito elevados.

Segundo Kumar e cols (2008), o cérebro precisa de uma oferta constante de glicose e oxigênio pelo sangue. Embora o cérebro responda por apenas 1 a 2% do peso corporal, ele recebe um elevado débito cardíaco em repouso e responde por 20% do consumo total de oxigênio corporal.

Quedas na concentração de glicose e oxigênio no sangue circulante, ou por outro lado, a suspensão do influxo sanguíneo ao encéfalo, não são toleradas além de um período muito curto. A parada da circulação cerebral por mais de sete segundos leva o indivíduo à perda da consciência. Após cerca de cinco minutos começam a aparecer lesões que são irreversíveis (MACHADO, 2009)

O AVE se caracteriza pela instalação de um déficit neurológico focal, não convulsivo e repentino, determinado por uma lesão encefálica, secundária a um mecanismo vascular não traumático. É possível ainda encontrar AVE's secundários à embolia arterial e processos de trombóticos, causando, assim isquemia e/ou hemorragia cerebral (BRAGA,2003).

O AVE é uma condição neuropatológica que, além de ser letal em grande parte dos casos, os sobreviventes acabam desenvolvendo varias sequelas irreversíveis como déficits motores e sensoriais, paralisia parcial e distúrbios de linguagem e compreensão (YANG et al., 2011; JIN et al., 2010).

Segundo o Ministério da Saúde, classifica-se o AVE em dois grupos, que possuem causas e desenvolvimentos distintos, o AVE isquêmico e o AVE hemorrágico. O AVE do tipo Isquêmico se caracteriza pela oclusão ou obstrução súbita de um vaso sanguíneo que faça a irrigação direta do encéfalo, resultando numa baixa imediata dos níveis de oxigênio e glicose para a área afetada (LAKHAN et al., 2009). O AVE do tipo isquêmico ocorre com maior frequência, cerca de 80% dos casos, o restante é de AVE hemorrágico (CHEN et al., 2011 ; FEIGIN et al, 2003).

1.1- A ESTRUTURA VASCULAR DO SISTEMA NERVOSO

A irrigação do encéfalo é proveniente das artérias carótidas esquerda e direita e das artérias vertebrais. Na base do crânio estas artérias formam um polígono anastomótico, o polígono de Willis, de onde saem as principais artérias para a vascularização cerebral (MACHADO A., 2009).

A artéria carótida interna é ramo da artéria carótida comum, penetra na cavidade craniana pelo canal carotídeo do osso temporal, atravessa o seio cavernoso. A seguir perfura a dura-mater e a aracnoide, divide-se em dois ramos terminais: a artéria carótida interna dá os seguintes ramos mais importantes: artéria oftálmica; artéria comunicante posterior; e artéria coriáideia anterior (MACHADO A., 2009).

As artérias vertebrais direita e esquerda destacam-se das artérias subclávias, direita e esquerda correspondentes, ao nível do sulco bulbo-pontino, fundem-se para constituir um tronco único, a artéria basilar. A artéria basilar bifurca-se para formar as artérias cerebrais posteriores direita e esquerda (Fig.1).

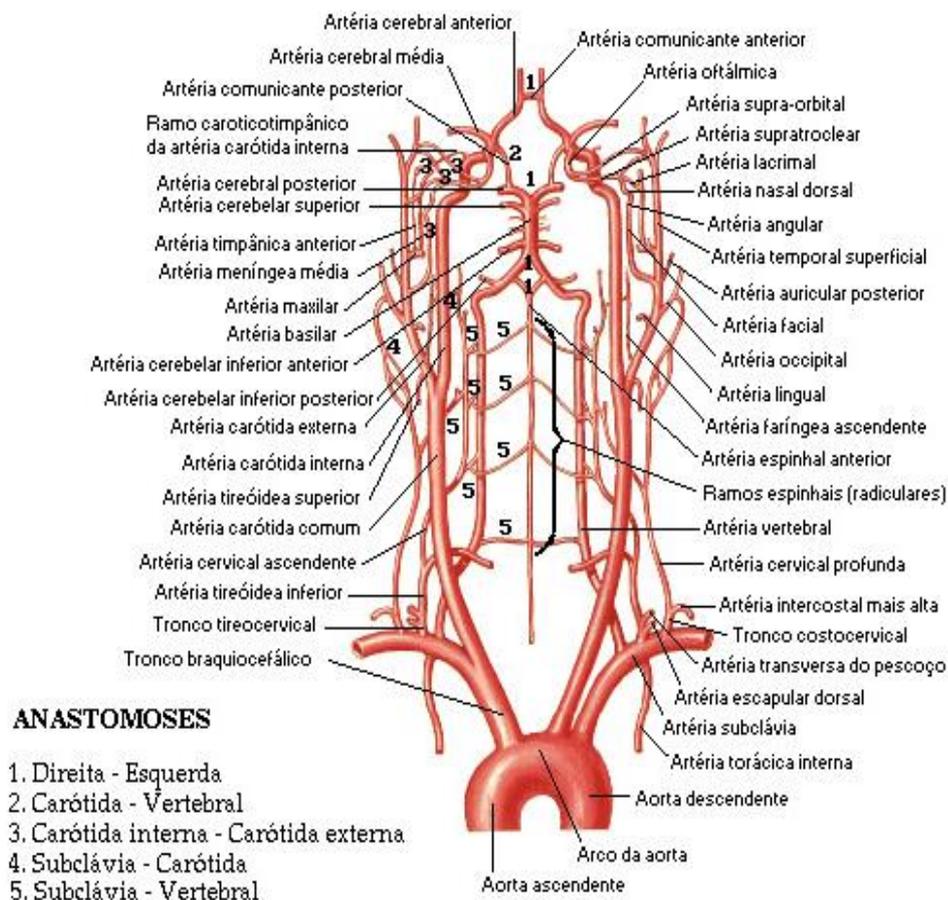


Fig 1. Imagem da circulação encefálica extraída do Atlas de Anatomia Humana. Fonte: NETTER, Frank H.. Atlas de Anatomia Humana. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

1.2- FISIOPATOLOGIA DO AVE ISQUÊMICO

O acidente vascular encefálico do tipo isquêmico envolve uma série complexa e rápida de eventos, que incluem alterações a nível intravascular, endotelial, neuronal e inflamatórias que podem evoluir para a morte celular (ADAMS et al, 2001).

Os mecanismos fisiopatológicos para o desenvolvimento do AVE do tipo isquêmico podem envolver: trombose local (por mudança de fluxo ou na viscosidade sanguínea) ou embolia. Com a obstrução do vaso sanguíneo há perda da suplementação de glicose e de oxigênio o que leva a alterações no metabolismo celular que resultam no colapso de produção de energia e desintegração das membranas celulares. Os mecanismos de oclusão vascular podem ser classificados em: 1) infarto aterosclerótico de grandes artérias, a qual pode ser intra ou extracraniana; 2) embolia de origem cardíaca; 3) doença de pequenas artérias; 4) outras (dissecções, estados pró-trombóticos, abuso de drogas, infecção etc.); 5) causa indeterminada (JOAQUIM et al, 2010).

1.2.1 – Processos bioquímicos do AVE isquêmico

A isquemia, ou diminuição do fluxo sanguíneo para um tecido, é a causa mais comum de lesão celular em medicina clínica. Ao contrário da hipóxia, na qual a produção de energia pela glicólise anaeróbica continua (embora com menor eficiência do que as vias oxidativas), a isquemia também compromete a distribuição de substratos para a glicólise. Em consequência, a geração de energia anaeróbica também cessa nos tecidos isquêmicos, depois que os substratos são exauridos ou quando a glicólise é inibida pela acumulação de metabólitos que normalmente poderiam ser removidos pelo fluxo sanguíneo. Sendo assim, a isquemia lesa os tecidos com mais rapidez que a hipóxia (KUMAR, 2003).

A alteração bioquímica fundamental nas células em hipóxia e que ocasiona lesão celular é a redução da geração de ATP intracelular, como consequência do suprimento reduzido de oxigênio (KUMAR, 2003).

Os mecanismos biológicos que ligam uma determinada lesão com as manifestações celulares e tissulares resultantes são complexos, interconectados e intimamente intercombinados com muitas vias metabólicas intracelulares. Há certa

dificuldade elencar alterações moleculares específicas causadas por uma determinada lesão (KUMAR, 2003).

Em lesões celulares, vários princípios gerais são relevantes: a resposta celular ao estímulo nocivo depende do tipo de lesão, sua durabilidade e sua gravidade; as consequências de um estímulo nocivo dependem do tipo, status, adaptabilidade e do fenótipo genético da célula lesada; a lesão celular resulta de alterações bioquímicas e funcionais em um ou mais dos vários componentes celulares essenciais (KUMAR, 2003).

Um estímulo nocivo tem como importantes alvos: (1) mitocôndrias, os sítios de geração de ATP; (2) membranas celulares, das quais dependem as homeostases iônica e osmótica da célula e de suas organelas; (3) síntese proteica; (4) citoesqueleto; e (5) o aparelho genético da célula (KUMAR, 2003).

Com a diminuição do aporte de oxigênio, a produção de ATP via fosforilação oxidativa do difosfato de adenosina durante a redução do oxigênio no sistema de transporte de elétrons, na estrutura mitocondrial, tende a se tornar escassa. O cérebro por apresentar capacidade limitada para a glicólise sofre muito rapidamente os efeitos bioquímicos desse déficit.

A depleção de ATP em 5% a 10% dos níveis normais tem amplos efeitos em muitos sistemas celulares críticos (KUMAR, 2003).

Com a depleção de ATP observam-se fenômenos como redução da atividade da bomba de sódio e conseqüente efluxo de potássio; aumento compensatório na glicólise anaeróbica, reduzindo o pH intracelular e promovendo ativação de diversas enzimas celulares; falência da bomba de cálcio, ocasionando influxo de cálcio, aumentando um número significativo de enzimas com efeito celular prejudicial (incluindo fosfolipases, proteases, endonucleases, trifosfatases de adenosina), o cálcio intracelular induz o processo apoptótico, pela ativação direta das caspases e pelo aumento da permeabilidade mitocondrial (KUMAR, 2003).

Ainda pode ser observado na depleção prolongada ou crescente de ATP o rompimento estrutural do aparelho de síntese proteica, pelo desprendimento de ribossomos do Reticulo endoplasmático granular (REG) e dissociação de polissomos em monossomos. Os danos à mitocôndria incluem a formação de um canal de alta condutância na membrana desta organela (poro de transição de permeabilidade mitocondrial), causando a perda de potencial de membrana e alteração do pH,

resultando em falha na fosforilação oxidativa e depressão progressiva de ATP, culminando na necrose da célula (KUMAR, 2003).

A permeabilidade aumentada da membrana mitocondrial favorece o extravasamento do citocromo c, que no citosol configura-se em um importante sinalizador de morte celular. Uma grave consequência do processo isquêmico envolve o acúmulo de espécies reativas do oxigênio, fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Com a degradação de diversas proteínas – inclusive as de degradação de radicais livres – há uma desenfreada destruição de diversas estruturas celulares, a exemplo da peroxidação lipídica das membranas; ligação cruzada de proteínas; e fragmentação do DNA (KUMAR, 2003).

Em suma, as diversas alterações bioquímicas levam a diminuição da síntese de fosfolípidos, ao aumento da degradação dos fosfolípidos, alteração do citoesqueleto, formação de produtos de degradação de lípidos. Desta forma os principais sítios de membrana danificados por lesões celulares são: membranas mitocondriais, membrana plasmática e membranas lisossômicas. Na isquemia, se o oxigênio for restaurado todas as alterações são reversíveis. No entanto, se a isquemia persistir, sobrevém uma lesão irreversível e necrose (KUMAR, 2003).

Durante a reperfusão podem acontecer lesões significativas, uma vez que há o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio – com diminuto nível de proteínas de degradação – e a atuação de processo inflamatório associado de possibilita maior reperfusão no local, favorecendo esse evento nocivo (KUMAR, 2003).

2- JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento desse estudo tem como objetivo a formulação de um modelo experimental que mimetize um quadro de Acidente Vascular Encefálico em ratos, que pode levar a obtenção de respostas importantes sobre tal doença, possibilitando maior compreensão dos mecanismos da mesma.

Devido ser um problema que está amplamente distribuído na sociedade atual acometendo milhares de pessoas todos os anos, sem distinção, ou seja, todas as camadas da sociedade estão propensas a serem acometidas, se faz necessário o advento de modelos experimentais que contribuam para um enriquecimento científico a cerca dessa doença.

A coleta de dados sobre os déficits neurológicos causados por um AVE pode ser uma ferramenta para a descoberta de métodos eficazes no controle dos danos, e para isso, a identificação das forças Theta e Gamma no eletrocorticograma em condições de isquemia cerebral pode servir como biomarcador da lesão tecidual, permitindo teste de drogas que melhorem essas condições deletérias no cérebro isquêmico.

3 – OBJETIVOS

3.1 – GERAL

Construir um modelo experimental de acidente vascular encefálico em ratos e avaliar as forças Theta e Gamma como possíveis biomarcadores da lesão.

3.2 – ESPECÍFICOS

- Realizar registros eletrocorticográficos de animais em isquemia cerebral por obstrução das artérias carótidas comuns.
- Avaliar os períodos anterior à oclusão, durante a oclusão e após a reperfusão do animal.
- Avaliar as amplitudes na força Theta (4-10 Hz) e Gamma (20 a 50 Hz) e caracteriza-las como possíveis biomarcadores de disfunção cerebral isquêmica.

4- MATERIAL E MÉTODO

4.1- ANIMAIS:

Para a realização do estudo, foram utilizados 06 ratos Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará e mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, sendo cuidados segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA), sob condições de acesso livre à água e alimentação, com a manutenção da temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e do ciclo claro-escuro de 12 horas, de 06:00 às 18:00h. Todos os procedimentos da pesquisa foram submetidos à aprovação previa do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais e Experimentação da UFPA (CEPAE) sob registro BIO0112-14 .

4.2-SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS:

O anestésico cloridrato de Quetamina foi obtido do laboratório Köing (Santana de Parnaíba, SP, Brasil). O cloridrato de Xilazina foi obtido do laboratório Vallée (Montes Claros, MG, Brasil). O anestésico local Cloridrato De Lidocaína foi obtido pelo laboratório Hipolabor (Sabará, MG, Brasil).

4.3- IMPLANTE DE ELETRODOS:

Primeiramente para possibilitar a obtenção dos registros eletrocorticográficos (EEG) os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para o implante e fixação de eletrodos de aço inoxidável de 1 mm. Os animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina (5 mg/kg) e Quetamina (50mg/kg) por via intraperitoneal (IP), logo após os animais não apresentarem mais reflexo interdigital e a necessidade de suplementação anestésica elucidada, foram tomadas as medidas de assepsia adequadas incluindo a tricotomia da região do crânio. Após as medidas iniciais os animais foram fixados no aparelho estereotáxico.

Posteriormente foi feita uma aplicação de Cloridrato de Lidocaína na região seguido de uma incisão longitudinal na pele para a exposição da superfície óssea do

crânio do animal. Posteriormente o eletrodo foi posicionado no crânio do animal nas coordenadas estereotáxicas de Bregma 0,96 mm, latero-lateral \pm 2 mm, dorso-ventral -2 mm em área do córtex motor do rato (Paxinos & Watson, 2005). Com o auxílio de uma broca odontológica foram perfurados os orifícios correspondentes às coordenadas no crânio.

Para a fixação do eletrodo foi utilizado um acrílico auto polimerizável de uso odontológico. Para a aquisição dos registros os animais foram mantidos dentro de uma gaiola de Faraday conectados ao sistema de aquisição de dados para a obtenção do registro.

4.4-DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o procedimento para implante dos eletrodos, os animais voltaram para o biotério de experimentação do laboratório para aguardarem o dia do registro. Sete dias após o procedimento os animais seguiram para a realização do registro eletroencefalográfico. Primeiramente os animais foram anestesiados com uma associação de Xilazina (5 mg/kg) e Cetamina (50mg/kg) por via IP, Após a verificação do plano anestésico do animal foi realizada uma incisão na região cervical ventral, para promover o acesso às artéria carótidas comum e à traqueia. Em seguida os animais foram entubados e mantidos em respiração artificial durante o primeiro estágio de registros (Basal - 30 minutos), após a colocação da cânula as artérias carótidas comuns foram isoladas e ocluídas por pressão para indução do quadro isquêmico, foi realizado o segundo estágio de registros imediatamente após a oclusão (Isquemia - 30 minutos), passado esse período o rato foi reperfundido, pela liberação das carótidas, e o terceiro e último estágio de registro realizado (Reperusão - 30 minutos).

4.5- EQUIPAMENTOS

Para os registros eletroencefalográficos os animais foram conectados a um sistema digital de aquisição de dados, composto por um amplificador de alta impedância, um osciloscópio e uma placa digitalizadora de sinais, os registros foram armazenados em disco rígido por meio do Software LabVIEW.

4.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados foram analisados através das médias e desvio padrão, as comparações entre os dados foram feitas usando um software Graphpad Prism® 5.0, através do teste de ANOVA, seguida do teste de Tukey.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os registros eletroencefalográficos revelaram que durante o período isquêmico ocorrem modificações nos padrões de traçado e nas amplitudes dos registros. Os electrocorticogramas demonstraram uma maior irregularidade dos padrões, estando às frequências de baixa intensidade mais presentes de acordo com o espectrograma. Após a retirada da oclusão das carótidas e a consequente reperfusão do animal, foi observado que a amplitude do traçado permanece elevada, se diferenciando pelas frequências abaixo de 10 Hz estarem mais presentes. Na figura 2 é possível avaliar a diferença entre os traçados dos três estágios de registros; Basal; Isquemia e Reperfusão, com seus respectivos espectrogramas.

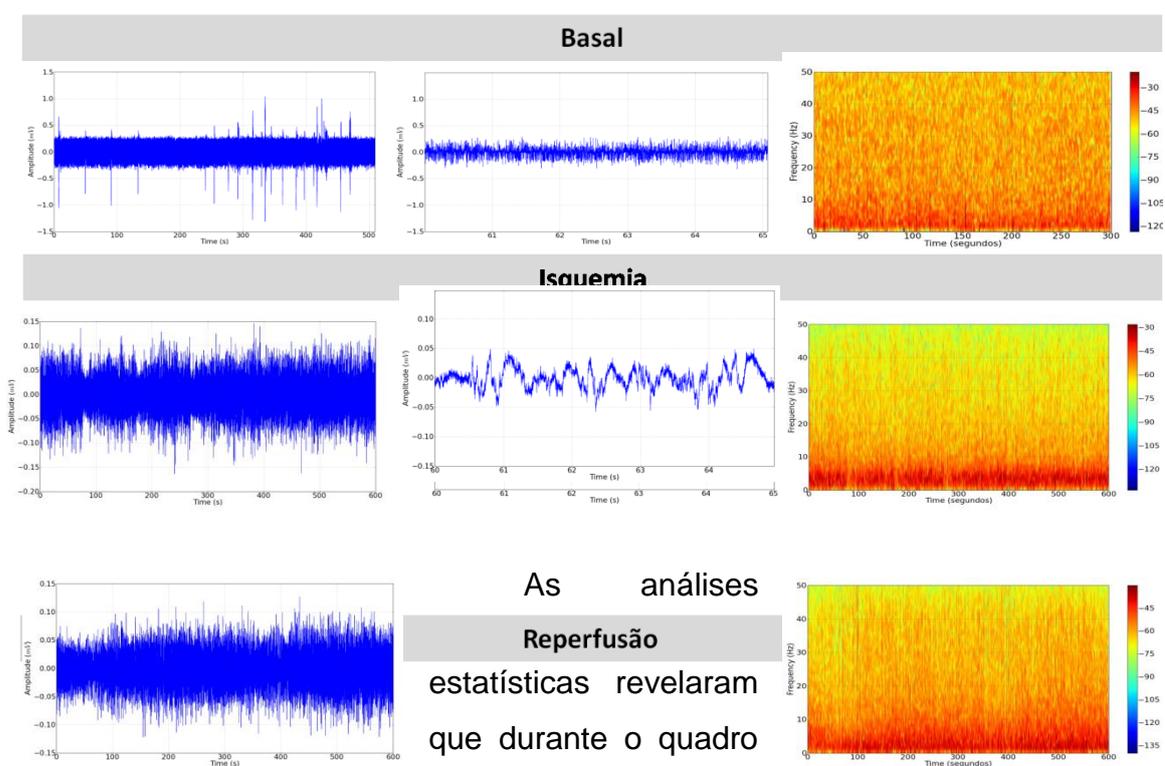


Fig 2- Eletrocorticogramas (ECoG): Registro dos animais com fluxo sanguíneo normal para o cérebro, registro do animal em isquemia cerebral pela oclusão das artérias carótidas, Registro representativo após a reperfusão cerebral.

isquêmico há um aumento das amplitudes nas frequências menores, formando um pico em 3 Hz, característica que se manteve durante o quadro de reperfusão, sendo que no eletrocorticograma do período Basal o pico de frequência ocorre em 10 Hz. Figura 3.

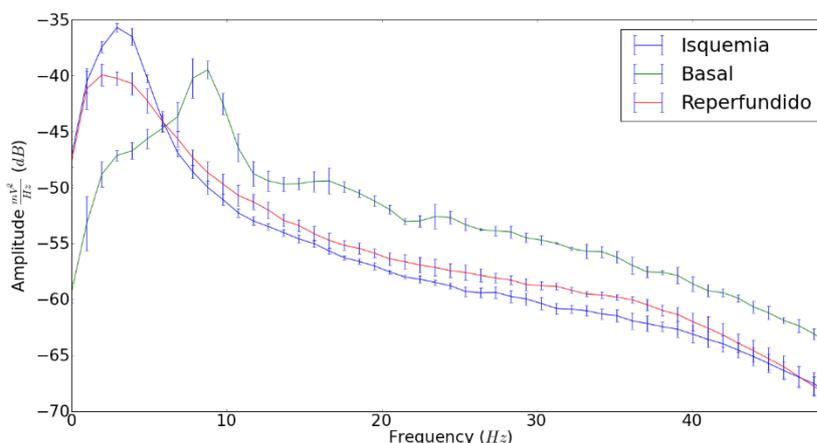


Fig. 03 - Gráfico de distribuição de potência entre as frequências até 50 Hz.

No gráfico representado pela Figura 4 é observado a distribuição linear acumulada das frequências de 0 - 50 Hz, no estado basal foi observado a média de $3,882 \pm 0,4021 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$ que demonstrou ter diferença significativa $P < 0,0001$ tanto para o quadro isquêmico (valor da média de $1,053 \pm 0,09837 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e no período de reperfusão (valor da média de $0,6609 \pm 0,05675 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$).

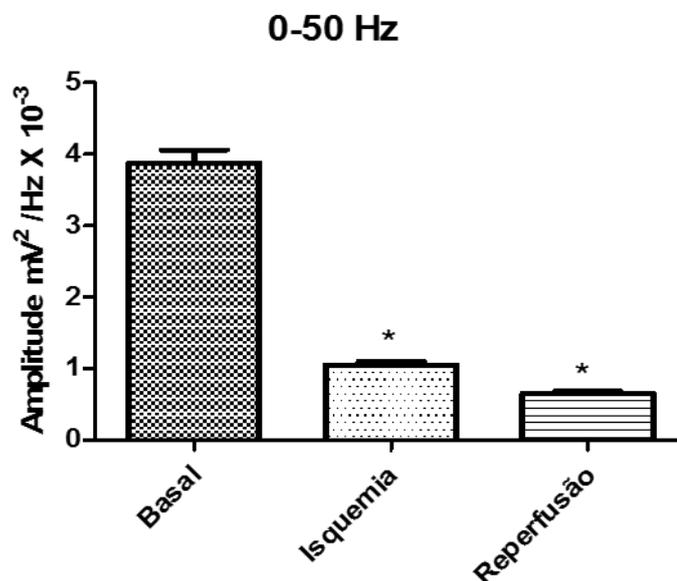
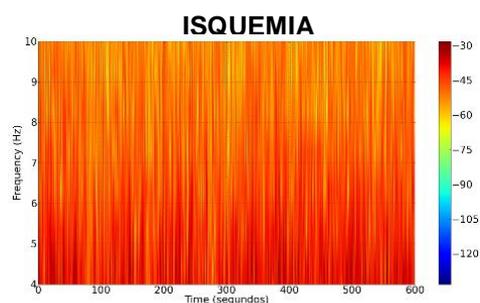
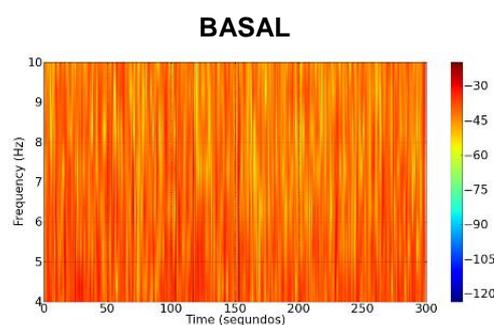
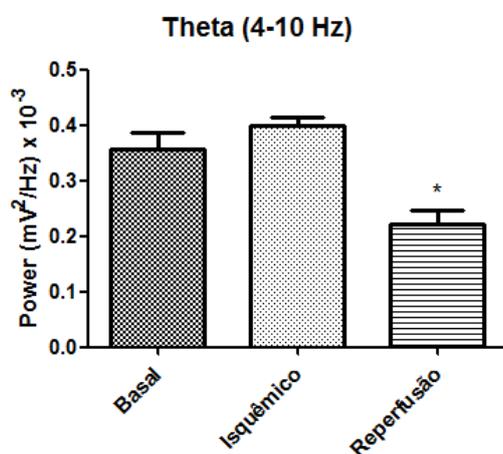


Fig. 04- Gráfico comparando as forças acumuladas nas frequências até 50 Hz de forma linear.

A Figura 05 representa o gráfico exclusivamente da força THETA, que corresponde ao intervalo de frequência de 4 a 10 Hz, a análise comparativa demonstrou que não houve diferença estatística entre a média de força do período Basal ($0,357 \pm 0,06649 \text{ mV}^2/\text{Hz} \times 10^{-3}$) e a média do período de isquemia ($0,3982 \pm$

0,03547 mV²/ Hz x 10⁻³). Entretanto quando comparado o valor da média do período de Reperusão (0,2225 ± 0,053497mV²/ Hz x 10⁻³) com os outros dois períodos, houveram diferenças estatísticas, tanto com o Basal quanto durante a Isquemia (P=0,0006). Essas diferenças estão expressas no espectrograma ao lado da figura. No gráfico representado na figura 06 a força representada é a força GAMMA, intervalo de frequência de 20 a 50 Hz, o estudo comparativo demonstrou que a média de força durante o estado basal (0,08987 ± 0,00622 mV²/ Hz x 10⁻³) apresentou diferença estatisticamente significativa (P<0,0001). Em relação ao período de isquemia (0,0339 ± 0,0161 mV²/ Hz x 10⁻³) e durante o estado de reperusão (0,03652 ± 0,002364mV²/ Hz x 10⁻³). O que valida o apresentado na figura 04, já que a força GAMMA está contida no intervalo de frequência de 20 a 50 Hz.



REPERFUSÃO

Fig. 5- Gráfico que demonstra as amplitudes encontradas em THETA durante o estado basal, isquêmico e reperfundido, associado às respectivas distribuições de energia.

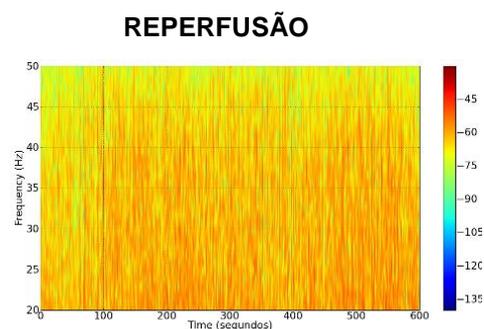
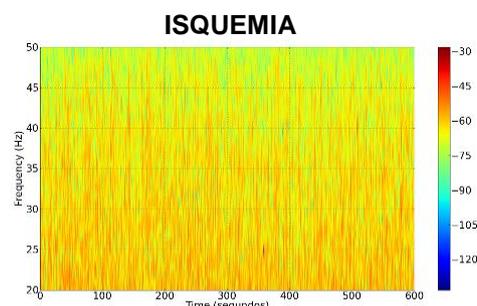
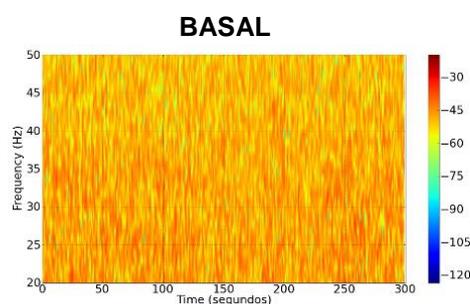
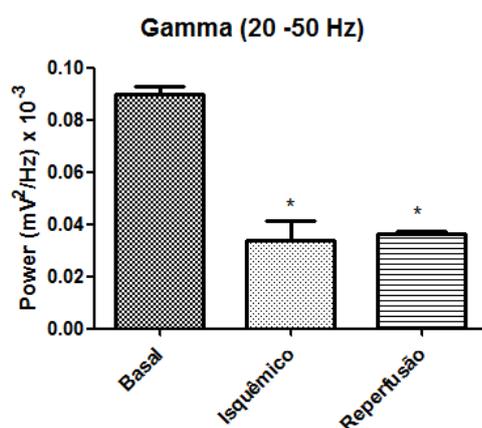
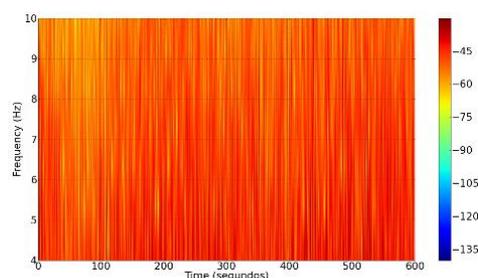


Fig. 06- Gráfico demonstra a diferença na força GAMMA durante os experimentos com os respectivos espectrogramas

Muito se tem estudado acerca do acidente vascular encefálico, desde a década de 80, inúmeros modelos animais vêm sendo testados buscando a elucidação dos processos envolvidos em tal patologia. Os resultados obtidos revelaram a ocorrência de uma queda brusca das amplitudes nas forças de maiores frequências durante o período de isquemia e reperfusão. Trabalhos anteriores, como o de Muniz e col. (2004) demonstraram que em modelo de isquemia por obstrução bilateral das artérias

carótidas comuns há uma queda significativa dos níveis de lactato sanguíneo e ATP no tecido cerebral em contrapartida há aumento exacerbado dos níveis de glicose e piruvato tanto no sangue quanto no tecido cerebral, fato esse que é explicado devido a necessidade que o tecido lesado tem de se suprir a baixa da oferta energética após a oclusão.

O aumento das forças de menores frequências (Theta 04 – 10 Hz) pode estar relacionado a essa tentativa das células se se nutrir no ambiente hostil criado pela obstrução do fluxo sanguíneo, já que segundo Muniz (2004) tanto a glicose, principal fonte energética das células, quanto o piruvato, principal produto da glicólise, estão aumentados no processo isquêmico e na reperfusão.

A comprovação da queda brusca de ATP após 30 minutos de oclusão (MUNIZ et al, 2004), pode ser o fator desencadeador da redução da amplitude nas forças de maiores frequências (Gamma 20 – 50 Hz) evidenciada nos resultados a cima.

De acordo com VALE (2002), após a oclusão bilateral das carótidas há uma redução drástica da amplitude absoluta das forças nas ondas espectrais, o que corrobora em parte com os resultados obtidos já que foi demonstrado que na verdade há uma redução principalmente das forças de maiores frequências (Gamma 20 - 50 Hz)

São poucas as análises eletrofisiológicas em modelos de isquemia cerebral na literatura, fato esse que dificulta a correta discussão dos resultados obtidos, mas revela um singelo ineditismo da pesquisa.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que durante o período de isquemia e reperfusão ocorre uma redução de amplitude nas forças de maiores frequências. Podendo essas forças caracterizar o modelo animal para isquemia cerebral e serem utilizadas como possíveis biomarcadores para condições patológicas relacionadas à hipóxia cerebral, bem como para avaliação de tratamentos a serem utilizados na fase aguda do processo.

Se faz necessário maiores estudos que complementem e corroborem o modelo proposto, como: histologia do tecido cerebral, avaliação de parâmetros fisiológicos para a doença e identificação de marcadores específicos para cada estágio do AVE.

A busca por modelos que, não só, mimetizem o quadro isquêmico que ocorre no ser humano mas adicionem conhecimento acerca da fisiopatologia da doença são primordiais para o desenvolvimento de novos tratamentos e ou métodos diagnósticos.

7- REFERÊNCIAS

ASHTON, D. et al. Dorsal-ventral gradient in vulnerability of CA1 hippocampus to ischemia: a combined histological and electrophysiological study. **Brain research**, v. **487**, n. 2, p. 368-372, 1989.

ALVAREZ, Rafaela Baggi Prieto; PIRES, Eugênia Rodrigues; CARAMÊZ, Rita. Acidente vascular encefálico. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 11, n. 25, p. 88-89, 2014.

BACK, T.; ZHAO, W.; GINSBERG, M. D. Three-dimensional image analysis of brain glucose metabolism-blood flow uncoupling and its electrophysiological correlates in the acute ischemic penumbra following middle cerebral artery occlusion. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. **15**, n. 4, p. 566-577, 1995.

BRAGA, J. L.; ALVARENGA, R. M.; NETO, J. **Acidente Vascular Cerebral. - Rev. Bras Med**, 2003. Disponível em: moreirajr.com.br. [Acesso em 10 de agosto de 2016].

BRAGA, Jorge Luiz; ALVARENGA, REGINA M.P.; NETO, J. B. M. M. Acidente vascular cerebral. **Rev Bras Med**, v. **60**, n. **3**, p. **88-96**, 2003.

BAYNES, J. **Bioquímica Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

CANCELA, D. M. G. O acidente vascular cerebral—classificação, principais consequências e reabilitação. **O portal do Psicólogo**, Portugal, 2008.

CHAN, Pak H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, n. 6, p. 1124-1129, 1996.

CENSO 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

CHAVES, Márcia LF. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. **Rev Bras Hipertens**, v. 7, n. 4, p. 372-82, 2000.

CHEN, S. T. et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. **Stroke**, v. 17, n. 4, p. 738-743, 1986.

CHEN,J.; ZHANG,C.;JIANG,H.; ZHANG,L.; KATAKOWSKI,A.; LU, M.; CHOPP, M. Atrovastatin induction of VAGF and BDNF promotes brainplasticity after stroke in mice. **Journal of cerebral blood and metabolis**. V. 25, p281-290, 2005.

DEZENA, T. Neuroproteção hipotérmica pré, intra e pós-isquêmica na isquemia cerebral focal temporária em ratos, análise morfométrica. Dissertação de Mestrado Ribeirão Preto: USP, 2011.

DIAS, L. A. A. et al. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. **Arq. neuropsiquiatr**, v. 58, n. 4, p. 1047-54, 2000.

DURUKAN, Aysan; TATLISUMAK, Turgut. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 87, n. 1, p. 179-197, 2007.

EKLÖF, Bo; SIESJÖ, Bo K. The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. **Acta Physiologica**, v. 86, n. 2, p. 155-165, 1972.

GARRITANO C.R., LUZ P.M., PIRES M.L.E., BARBOSA M.T.S. Análise da Tendência da Mortalidade por Acidente Vascular Cerebral no Brasil no Século XXI. **Arq. Bras. Cardiol.**, vol.98, n.6, 2012. SciELO Brasil.

GEOCADIN, R. G. et al. Early electrophysiological and histologic changes after global cerebral ischemia in rats. **Movement disorders**, v. 15, n. S1, p. 14-21, 2000.

HOSSMANN, Konstantin-Alexander. Experimental models for the investigation of brain ischemia. **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 106-120, 1998.

JAUCH, Edward C. et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 44, n. 3, p. 870-947, 2013.

JENSEN, M. S.; LAMBERT, J. D. C.; JOHANSEN, F. F. Electrophysiological recordings from rat hippocampus slices following in vivo brain ischemia. **Brain research**, v. 554, n. 1, p. 166-175, 1991.

JIN, K.; MINAMI, M.; LAN, J. Q.; MAO, X. O.; BATTEUR, S.; SIMON, R. P.; GREEMBERG, D. A. Neurogenesis in dentate subgranular and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**. V.98, p.4710-5, 2001.

JIN, R.; YANG, G.; LI G.; Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J. Leukoc Biol**. v.87, p.779-789, 2010

KOIZUMI, J. et al. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. **Jnp J Stroke**, v. 8, 1986.

KUMAR, V. et al. **Robbins, Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFTER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translation Medicine**. v.7, p.97, 2009.

LEE, E.-Jian et al. Delayed treatment with magnesium: reduction of brain infarction and improvement of electrophysiological recovery following transient focal cerebral ischemia in rats. **Journal of neurosurgery**, v. 102, n. 6, p. 1085-1093, 2005.

LO, E. H. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. S1, p. S396-S405, 2008.

MACHADO A. **Neuroanatomia funcional**. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2009

MACREZ, R.; TOUTIRAIS, O.; MAUFF, L. B.; DEFER, G; DERMAGL, V.; VITRIEN, D. Strokes and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. **Neurology**. v. 10, 2011.

MENDEZ-OTERO, R. et al. Terapia celular no acidente vascular cerebral. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 31, n. 7, p. 99-103, 2009.

MOLINARI, G. F.; LAURENT, J. P. A classification of experimental models of brain ischemia. **Stroke**, v. 7, n. 1, p. 14-17, 1976.

MUNIZ, L. R. F.; FARIA, M. H. G.; VASCONCELOS, P. R. L. Avaliação metabólica das lesões de isquemia e reperfusão cerebrais após oclusão bilateral das artérias carótidas comuns: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras** 2004;19(5). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0102-86502004000500012&script=sci_arttext [acesso em 10 de agosto de 2016].

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

NEUWALD, Rovaldo José et al. Acidente vascular cerebral isquêmico. **Rev. cient. AMECS**, v. 5, n. 2, p. 141-6, 1996.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego. Califórnia. **Ed Elsevier**, 2005

SESHADRI S, Beiser A, Kelly-Hayes M, Kase C S, AuR, Kannel W B, et al. The life time risk of stroke: estimates from the Framingham study. **Stroke** 2006;37:345–50

ROTHMAN, S. M.; OLNEY, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic–ischemic brain damage. **Annals of neurology**, v. 19, n. 2, p. 105-111, 1986.

SMITH, M.-L.; AUER, R. N.; SIESJÖ, B. K. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2–10 min of forebrain ischemia. *Acta neuropathologica*, v. 64, n. 4, p. 319-332, 1984.

TAMURA, A. et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 53-60, 1981.

TARDINI D.M.S., YOSHIDA W.B. Lesões cerebrais decorrentes de isquemia e reperfusão na cirurgia de endarterectomia de carótida. **J Vasc Br** 2003;2(2):119-28. 2003 by Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia vascular [acesso em 08 de janeiro de 2017].

TARDINI, D. M. S. et al. Avaliação de dois modelos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral em ratos com oclusão temporária carotídea associada ou não à oclusão vertebral. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 6, p. 514-17, 2003.

TEIXEIRA, E. et al. Acidente vascular encefálico. **Ares MJJ. Terapia ocupacional na reabilitação física. São Paulo: Roca**, p. 3-16, 2003.

VALE, O. C. Avaliação eletrofisiológica da ação dos antioxidantes glutation e ácido alipóico em um modelo animal de isquemia cerebral. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São

Paulo , v. 60, n. 2B, p. 510, jun. 2002 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2002000300035&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 20 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2002000300035>.

WOODRUFF, T.; THUNDYL, J.; TANG, C. S.; SOBEY, G. C.; TAYLOR, M. S.: Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration** 2011 6:11.

WIEBERS, D. O.; ADAMS, H. P.; WHISNANT, J. P. Animal models of stroke: are they relevant to human disease?. **Stroke**, v. 21, n. 1, p. 1-3, 1990.

YANG, C.; WANG, H.; ZHANG, S.; CHENG, Y.; SUN, J.; Neuroprotective effects of NKN on focal cerebral ischemia in rats. **Turkish Neurosurgery**. V.22, p.1-6, 2011.

ZILLES, Karl. The cortex of the rat: a stereotaxic atlas. **Springer Science & Business Media**, 2012.