



Universidade Estadual de Maringá  
Departamento de Farmácia e Farmacologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**EFEITOS NEUROHISTOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS APÓS  
HIOPERFUSÃO CEREBRAL CRÔNICA NO RATO: INFLUÊNCIA DA IDADE E  
DO CONJUNTO DE VASOS OCLUIDOS**

CARLA APARECIDA DE BARROS

Maringá  
2008



Universidade Estadual de Maringá  
Departamento de Farmácia e Farmacologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

CARLA APARECIDA DE BARROS

**EFEITOS NEUROHISTOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS APÓS  
HIOPERFUSÃO CEREBRAL CRÔNICA NO RATO: INFLUÊNCIA DA IDADE E  
DO CONJUNTO DE VASOS OCLUIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
*Strictu sensu* em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Estadual de Maringá como requisito  
parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Milani

Maringá  
2008

Dedico este trabalho

À minha família, por estar sempre ao meu lado, incentivando-me a prosseguir e alcançar meus objetivos, ofertando carinho e amor durante toda a caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, inicial e principalmente a Deus, por estar vivo em minha vida e Se fazer presente em cada detalhe dela.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Humberto Milani que me confiou este trabalho e fez-me despertar à responsabilidade e ao senso crítico, sempre respaldada pelo conhecimento e incentivada pelo espírito da pesquisa.

À aluna e amiga Roberta Ayumi, eterna gratidão pela dedicação e grande contribuição para que este trabalho pudesse ser concluído.

A todos os técnicos, Marcos, Solidalva, Carlos, Maria Euride, Maria dos Anjos, Ana Paula, José e Ricardo, que ao longo dessa jornada nunca me desampararam, oferecendo toda dedicação e experiência.

A todos os professores, funcionários e alunos pela amizade conquistada.

A todos os colegas de trabalho, pelo companheirismo.

A todos, sincera gratidão.

## RESUMO

**Fundamentação:** O presente estudo é uma continuidade de trabalhos anteriores do nosso laboratório com vistas ao desenvolvimento de um modelo animal de hipoperfusão cerebral crônica e progressiva (HCCP) mediante a oclusão gradual e permanente dos 4 principais vasos que irrigam o cérebro, ou sejam, artérias vertebrais e artérias carótidas (modelo 4-VO). O desenvolvimento de modelos animais que reproduzam uma condição de insuficiência vascular-cerebral é essencial para o estudo da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas associadas a um estado de hipoperfusão cerebral crônica, bem como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Nesse contexto, o uso de animais idosos torna o modelo mais clinicamente relevante.

**Objetivo:** Avaliar os possíveis efeitos neurohistológicos e comportamentais (cognitivos) em função do tipo de vasos ocluídos e da idade do animal. Além disso, quantificar a densidade do número de células piramidais com núcleos e nucléolos distintos das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo e os efeitos dos diferentes tipos de oclusões sobre a integridade estrutural da retina tendo em vista a importância da acuidade visual para o comportamento de aprendizagem e memória.

**Materiais e método:** Ratos jovens (3 a 5 meses de idade), adultos (12 a 14 meses de idade) ou idosos (18 a 20 meses de idade) foram submetidos à oclusão permanente e gradual de dois conjuntos de vasos, ou sejam: Artérias vertebrais (AV) + artérias carótidas comuns (ACC), conforme a seqüência AV → ACC → ACC (modelo 4-VO/ACC) ou, artérias vertebrais (AV) + artérias carótidas internas (ACI), conforme a seqüência AV → ACI → ACI (modelo 4-VO/ACI). O intervalo de tempo entre os estágios de oclusão foi de 1 semana. Os grupos controles ('sham') passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém, sem oclusões de vasos. Passados 40 a 45 dias após o último estágio de oclusão (4-VO), a performance de aprendizagem e memória espacial dos diferentes grupos experimentais foi avaliada no teste do labirinto radial aversivo (LRA), recentemente desenvolvido em nosso próprio laboratório. Após três dias de adaptação ao ambiente de teste, os animais foram expostos ao LRA diariamente, durante 15 dias consecutivos (5 dias/semana), sendo uma 'Sessão' por dia, com três tentativas/sessão. Cada tentativa teve uma duração máxima de 4 minutos. O desempenho de aprendizagem e memória foi medido por três parâmetros: (i) 'latência' para encontrar o esconderijo durante cada sessão de teste, (ii) 'número de erros de memória de referência', e (iii) 'número de erros de memória operacional'. Ao final do teste comportamental, o cérebro e os olhos de cada animal foram extraídos após perfusão intracardíaca com solução fixadora, e

processado para análise histológica do hipocampo e retina, respectivamente. No hipocampo, a densidade de neurônios piramidais foi medida nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4. Na retina, a integridade histomorfológica das diversas camadas de células foi avaliada qualitativamente.

**Resultados:** O grupo de ratos jovens, submetido ao procedimento 4-VO/ACC apresentou um desempenho de aprendizagem e memória prejudicado quando comparado com o seu grupo sham. Tal efeito foi estatisticamente significativo para os parâmetros ‘número de erros de referência’ e ‘número de erros operacionais’ ( $P < 0,0001 - 0,05$ ). Uma redução significativa na densidade de neurônios piramidais foi observada em todas as regiões analisadas do hipocampo ( $P < 0,01$ ). O procedimento 4-VO/ACC também resultou em profundas alterações na estrutura morfológica da retina (análise qualitativa). Em contraste, o procedimento 4-VO/ACI quando realizado em ratos jovens ou adultos, não causou nenhum déficit comportamental ( $P > 0,05$  para todos os parâmetros), não provocou neurodegeneração hipocampal ( $P > 0,05$  para todas as regiões analisadas), bem como não se evidenciou alterações estruturais da retina, pelo menos nos moldes daquelas observadas no grupo 4-VO/ACC. Já no grupo de animais idosos, o procedimento 4-VO/ACI resultou em prejuízo da capacidade de aprendizagem e memória, principalmente sobre o parâmetro ‘latência’. O número de erros cometidos também foi maior após 4-VO/ACI, porém, sem alcançar significância estatística. Entretanto, somente o grupo sham se beneficiou das várias sessões de treinamento (ANOVA, efeito global das Sessões:  $P < 0,0001 - 0,05$ ), indicando que, no grupo idoso operado, a dificuldade inicial do teste não foi superada ao longo das várias sessões de teste. No grupo idoso, apenas três animais apresentaram uma redução no número de neurônios piramidais do hipocampo após 4-VO/ACI, porém, na média, não foram diferentes do grupo sham ( $P > 0,05$ ). Similarmente, não se constatou alterações na estrutura da retina.

**Conclusão:** Os resultados do presente estudo indicam que, se por um lado, o procedimento 4-VO/ACC causa profundo déficit comportamental e lesão neuronal no hipocampo, por outro, também leva a uma lesão retiniana, com conseqüente disfunção visual. Este efeito limita, portanto, a utilidade do modelo 4-VO/ACC para se estudar as inter-relações entre hipoperfusão cerebral crônica, distúrbios cognitivos, e alterações neuropatológicas e/ou neuroquímicas centrais. Em contraste, o modelo 4-VO/ACI em ratos jovens ou adultos, não causa lesões da retina, porém, não foi suficiente para provocar alterações cognitivas e/ou neuropatológicas, sendo, portanto, igualmente limitado. Diversamente, o modelo 4-VO/ACI mostrou que pode ser eficaz para provocar alterações neuropatológicas e comportamentais no rato idoso, sem a influência de lesões do sistema visual. Outras variáveis como a cronicidade de 4-VO/ACI e a redução do intervalo de tempo entre os estágios de oclusão devem ser

determinantes para a validação do modelo 4-VO/ACI de hipoperfusão cerebral crônica e progressiva, com vistas ao estudo do potencial terapêutico de drogas. Tais estudos já se encontram em andamento.

**Palavras-chave:** aprendizagem e memória; danos neuronais; hipocampo; hipoperfusão cerebral crônica e progressiva; lesão de retina; modelo 4-VO permanente.

## ABSTRACT

Continuing with the view to the development of a permanent, 3-stage, 4-vessel occlusion (4-VO) model of chronic and progressive cerebral hypoperfusion in rats, here we evaluated how the set of vessels that are occluded and the age of animal affect (i) the ability for spatial learning, (ii) the hippocampal cell density and (iii) the morphological integrity of retina. Bilateral occlusion of the vertebral arteries (VA) was combined with stepwise ligation of the common carotid arteries (CCA) (4-VO/CCA model) or internal carotid arteries (ICA) (VO/ICA model), with 1-week inter-stage interval. The effects of 4-VO/CCA were evaluated in young rats, while the effects of 4-VO/ICA were assessed in young, adult or old rats. Forty days after completion of the 4-VO stage, or sham-operation, the rats were tested in the aversive radial maze for 15 consecutive days, after which the brain and eyes were examined for ischemic damage. Compared to sham, the 4-VO/CCA young rats exhibited cognitive impairment ( $P < 0.0001 - 0.05$ ), hippocampal damage ( $P < 0.01$ ), and retinal degeneration ( $P < 0.05$ ). Compared to control, the 4-VO/CCA group did not benefit from the effect of training sessions ( $P > 0.05$ ). In contrast, neither learning deficit nor hippocampal, or retinal damage were observed in both young and adult rats subjected to the 4-VO/ICA procedure. In old rats, chronic 4-VO/ICA caused a mild learning deficit, expressed significantly for the parameter 'latency' ( $P < 0.05$ ). A highly significant effect of training was observed for the old, sham-operated rats ( $P < 0.0001 - 0.001$ ), but not for the old 4-VO/ICA rats ( $P > 0.05$ ). In average, hippocampal cell density was not changed after 4-VO/ICA in old rats, but when analysed individually, 3 of 10 subjects exhibited reduced pyramidal cells in all hippocampal sectors. The morphology of retina appeared unaffected. These data suggest that the 4-VO/ICA model of chronic cerebral hypoperfusion is a more suitable paradigm given the apparent functional preservation of the visual system, which integrity is important when spatial behavior is to be measured. Moreover, the age at which 4-VO/ICA is imposed represent an important factor for determining the behavioral and neuropathological changes.

**Key words:** Chronic cerebral hypoperfusion, hippocampus, learning and memory, neuronal damage, retinal degeneration, stepwise 3-stage 4-VO.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Anatomia do Círculo de Willis no humano (A) e no rato (B). ACA-artéria cerebral anterior, ACOA-artéria comunicante anterior, ACM-artéria cerebral média, ICA-artéria carótida interna, ACP-artéria cerebral posterior, ACOP-artéria comunicante posterior, ACS-artéria, cerebelar superior, AB-artéria basilar, ACAP-artéria cerebelar antero-posterior, AV-artéria vertebral, AEP-artéria espinhal posterior. .... 18
- Figura 2** Desenho esquemático mostrando a localização das artérias carótida comum e interna e os respectivos locais de oclusão nos modelos 4-VO/ACC (A) e 4-VO/ACI (B). .... 23
- Figura 3** Representação do labirinto radial aversivo, em sua versão de confinamento. A versão confinada consiste na colocação de portas de entrada de cada braço, as quais podem ser fechadas ou abertas pelo experimentador. Este procedimento evita que comportamentos, tais como entradas em braços consecutivas adjacentes sejam utilizadas pelo animal. .... 25
- Figura 4** Efeito do procedimento 4-VO/ACC sobre a aquisição medida no LRA. O painel superior mostra a performance de aquisição medida diariamente ao longo de 15 dias, porém, plotada em blocos de 3 dias. O desempenho comportamental é expresso pelos parâmetros ‘latência’, ‘número de erros de referência’ e ‘número de erros operacionais’. A ‘latência total’ e o ‘número total de erros’ (somatória dos 15 dias de teste) são mostrados na parte inferior da figura. A deficiência de aprendizagem causada pelo 4-VO/ACC é expressa por todos os parâmetros medidos diariamente ou cumulativamente ( $p^* < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,0001$  vs “sham”). Um efeito significativo do treino ocorreu sobre o grupo “sham” somente ( $p < 0,0001$ ). .... 31
- Figura 5** Performance de aprendizagem após 4-VO/ACI em ratos jovens ou adultos (12 meses). O desempenho de aprendizagem é expresso em termos de ‘latência’ e ‘número de erros’ medidos diariamente e plotados em blocos de três dias (painéis superiores) ou cumulativamente pela soma dos 15 dias de treino (painéis inferiores). Nenhum sinal de deficiência cognitiva pode ser observado após 4-VO/ACI, em comparação com o grupo “sham” ( $p > 0,05$ , sham vs operados). O efeito do treino foi semelhante para ambos os grupos ( $p < 0,0001$ ). .... 33
- Figura 6** Performance de aprendizagem após 4-VO/ACI em ratos idosos (18 meses). O desempenho de aprendizagem é expresso em termos de ‘latência’ e ‘número de erros’ medidos diariamente (painéis superiores) ou cumulativamente (painéis inferiores). A ‘latência’ foi significativamente maior no grupo 4-VO/ACI (painel superior esquerdo:  $P < 0,05$  vs “sham”). O ‘número de erros’ medido diariamente (painel superior) ou cumulativamente (painel inferior) também foi maior após 4-VO/ACI, porém, o efeito global ‘entre-grupos’ não alcançou significância

estatística. Um efeito significativo do treinamento ocorreu sobre o grupo “sham” ( $p < 0.0001 - 0.01$ ), porém, não sobre o grupo 4-VO/ACI, ( $p > 0,05$ ), indicando um déficit de aprendizagem neste último. .... 35

**Figura 7** Efeitos dos procedimentos 4-VO/ACC (painel B) ou 4-VO/ACI (painel C = ratos jovens; painel D = ratos idosos, ICA = ACI) sobre a densidade de neurônios piramidais nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo (painel B - D). O painel A mostra um corte coronal e unilateral do hipocampo (coordenada estereotáxica: -3,80 mm, aumento 50X), indicando os pontos aproximados (círculos) onde a contagem de células piramidais foi realizada em cada uma das respectivas regiões. \* $P < 0,01$  vs “sham”. ....37

**Figura 8** Fotomicrografias representativas de seções coronais de várias regiões do hipocampo de ratos representados na Fig. 7. As setas indicam neurônios piramidais considerados morfometricamente íntegros. Coloração: hematoxilina/eosina; aumento 40X. Barra de calibração: 50  $\mu$ m.....38

**Figura 9** Fotomicrografias representativas da retina de ratos submetidos aos procedimentos 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI crônicos. Os animais controles (“sham”) mostram a organização das camadas de células ganglionares (CCG = GCL), plexiforme interna (CPI = IPL), nuclear interna (CNI = INL), plexiforme externa (CPE = OPL), nuclear externa (CNE = ONL) e cones e bastonetes (CCB = CBL). Os efeitos de 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI crônicos, em função da idade (margem esquerda) são mostrados por três animais operados (oper) de cada grupo, respectivamente (oper-1, oper-2 e oper-3). Nota-se claramente a desestruturação morfológica da retina nos animais submetidos ao 4-VO/ACC, em contraste aos animais submetidos ao modelo 4-VO/ACI, tanto jovem quanto idoso, cuja estrutura das camadas celulares parecem preservadas. Coloração: hematoxilina/eosina; aumento 20X. .... 39

**Figura 10** Média do número de células na camada celular ganglionar (CCG) em função do conjunto de vasos ocluídos (4-VO/ACC ou 4-VO/ACI) e da idade dos animais. \* $P < 0,05$  vs “sham”. .... 40

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A $\beta$ -4 - proteína beta-amilóide
- AB - artéria basilar
- ACA - artéria cerebral anterior
- ACAP - artéria cerebelar antero-posterior
- ACC - artéria carótida comum
- ACI - artéria carótida interna
- ACM - artéria cerebral média
- ACOA - artéria comunicante anterior
- ACOP - artéria comunicante posterior
- ACP - artéria cerebral posterior
- ACS - artéria cerebelar superior
- AD - Doença de Alzheimer
- AEP - artéria espinhal posterior
- APtP - artéria pterigopalatina
- AV - artéria vertebral
- CA – cornu ammonis
- CCG - camada de células ganglionares
- CNE - camada nuclear externa
- CNI - camada nuclear interna
- CPE - camada plexiforme externa
- CPI - camada plexiforme interna
- COBEA - comitê de ética em experimentação animal
- DOV - Demência de Origem Vascular
- FSC - fluxo sanguíneo cerebral
- HCC - hipoperfusão cerebral crônica
- HCCP - hipoperfusão cerebral crônica e progressiva
- 2-VO - modelo de oclusão de 2 vasos
- 4-VO - modelo de oclusão de 4 vasos
- 4-VO/ACC - modelo de oclusão das artérias vertebrais e artérias carótidas comuns
- 4-VO/ACI - modelo de oclusão das artérias vertebrais e artérias carótidas internas
- LRA - labirinto radial aversivo
- SNC - sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 SUPRIMENTO MACROVASCULAR DO CERÉBRO .....	15
<b>1.1.1 Artérias Carótidas</b> .....	<b>15</b>
1.1.1.1 Artéria Carótida Interna .....	15
1.1.1.2 Artéria Carótida Externa .....	16
1.1.2 Artérias Vertebrais.....	16
1.1.3 Círculo de Willis .....	17
1.2 HIPOPERFUSÃO CEREBRAL CRÔNICA NO RATO.....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 ANIMAIS .....	21
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.3 CIRURGIA.....	22
3.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL .....	24
<b>3.4.1 Aparato de Teste</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4.2 Procedimento do Teste</b> .....	<b>25</b>
3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	27
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	28
3.7 ESTATÍSTICA.....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 MORTALIDADE.....	29
4.2 PERFORMANCE DE APRENDIZAGEM EM FUNÇÃO DO TIPO DE VASO OCLUÍDOS E DA IDADE DO ANIMAL .....	30
<b>4.2.1 Oclusão das Artérias Vertebrais e Artérias Carótidas Comuns em Ratos         Jovens</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.2 Oclusão das Artérias Vertebrais e Artérias Carótidas Internas em Ratos         Jovens e Adultos</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.3 Oclusão das Artérias Vertebrais e Artérias Carótidas Internas em Ratos         Idosos</b> .....	<b>34</b>
4.3 ALTERAÇÕES NEUROHISTOLÓGICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE VASOS OCLUÍDOS E DA IDADE DO ANIMAL .....	36
<b>4.3.1 No Hipocampo</b> .....	<b>36</b>

4.3.2 Na Retina .....	38
5. DISCUSSÃO .....	41
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## 8. INTRODUÇÃO

Evidências clínicas e experimentais apontam para uma provável relação causal entre a redução crônica e progressiva do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e o desenvolvimento de estados crônicos de demência, inclusive aquela do tipo Doença de Alzheimer (DA), sendo o sintoma inicial e predominante, a deficiência de aprendizagem e memória. É possível também, que os marcos histopatológicos observados na DA, tais como acúmulo da proteína beta-amilóide ( $A\beta$ -4) e a diminuição de neurônios colinérgicos, sejam alterações secundárias à deficiência cerebrovascular crônica e progressiva (De la Torre, 1994; De la Torre, 2005; Farkas et al., 2000 a,b,c; Farkas & Luiten, 2001; Iadecola & Gorelick, 2003; Kalaria, 2002; Sarti et al., 2002). Várias morbidades que afetam preponderantemente o indivíduo idoso são reconhecidas como importantes fatores de risco para os estados de demência relacionados ao envelhecimento, e neles incluem: doenças coronarianas graves, infarto do miocárdio, colapso cardiocirculatório, aterosclerose das artérias carótidas internas, inflamação cardiovascular, hipertensão, hipotensão, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, diabetes mellitus e hábitos de vida (tabagismo, alcoolismo e sedentarismo) (De la Torre, 2000; Meyer et al., 2000).

Semelhantemente ao que se observa no humano, vítima de insuficiência cerebrovascular, um estado de hipoperfusão cerebral crônica (HCC) também pode ser induzido experimentalmente em animais de laboratório, inclusive no rato. O uso de modelos animais que reproduzem uma condição de HCC é um requisito essencial para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na fisiopatologia das doenças crônicas neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, bem como para a avaliação do potencial terapêutico de drogas. Nesse contexto, a oclusão permanente das artérias carótidas comuns (Eklöf et al., 1972) em ratos tem sido uma técnica amplamente utilizada para criar uma condição de hipoperfusão cerebral crônica (modelo 2-VO) (para revisão, ver Farkas et al.,

2007). Recentemente, outros modelos têm sido propostos tais como o modelo 3-VO (oclusão das ACC + artéria subclávia) (De la Torre et al., 1992) e o modelo 4-VO (oclusão das ACC + artérias vertebrais) (Plaschke et al., 2005). Contudo, antes de discorrermos mais detalhadamente sobre os modelos animais de hipoperfusão cerebral crônica, achamos pertinente fornecer uma descrição resumida sobre os principais vasos sanguíneos que irrigam o cérebro no homem e no rato.

## **1.1 SUPRIMENTO MACROVASCULAR DO CÉREBRO**

O cérebro é perfundido pelo sangue arterial por dois pares principais de vasos: as artérias carótidas internas e as artérias vertebrais; essas últimas dão forma à única artéria basilar. Os ramos carotídeos e vertebrais originam-se como artérias extracranianas da aorta, passam pelo pescoço e pela base do crânio para chegar à cavidade intracraniana. Dois terços do fluxo sanguíneo cerebral derivam do sistema carotídeo e o restante do vertebral, sendo que, o sistema das carótidas é responsável pela circulação anterior do cérebro enquanto a artéria basilar supre a região cerebral posterior (Farkas & Luiten, 2001; Sacco, 1997).

### **1.1.1 Artérias Carótidas**

A artéria braquiocefálica divide-se em carótida comum direita e subclávia direita. No alto do pescoço, ao nível da base da mandíbula, pela cartilagem tireóide, as duas carótidas comuns bifurcam-se em carótidas externas e internas (Atkins, 2008; Cerci Neto, 2008).

#### **1.1.1.1 Artéria Carótida Interna**

A artéria carótida interna (ACI) não possui ramos no pescoço. Logo após penetrar no crânio, pelo forame *lacerum*, avança pelo interior do seio cavernoso. Dirige-se para frente, mas logo se curva acentuadamente para trás. Este segmento recurvado, de convexidade para

frente, chama-se sifão carotídeo. Os grandes pares de vasos que se originam das carótidas internas (ACI) são as artérias cerebrais anterior (ACA) e a artéria cerebral média (ACM), sendo que esta última carrega 80% do sangue que alcança os hemisférios cerebrais (Farkas & Luiten, 2001), os quais compreendem os lobos frontais, parietais e temporais anteriores (Sacco, 1997). A partir da ACI origina-se a artéria pterigopalatina (APtP), que penetrando na cavidade orbitária, supre o nervo óptico, retina e músculos extra-oculares (Otha et al., 1997; Sacco, 1997). Isto explica porque alguns indivíduos com doenças oclusivas das artérias carótidas desenvolvem perda de acuidade visual (Duggan & Green, 1991). Efeitos semelhantes foram descritos no modelo de oclusão permanente das artérias carótidas comuns (ACC) no rato (modelo 2-VO) (Davidson et al., 2000). Neste modelo, a observação de que somente cerca da metade dos animais desenvolvem atrofia do nervo óptico e/ou retinopatia pode ser atribuído a uma circulação reserva do Polígono de Willis para as (APtP). Entretanto, porque isto ocorreria somente em parte dos indivíduos não é sabido (Davidson et al., 2000).

#### **1.1.1.2 Artéria Carótida Externa**

A artéria carótida externa origina-se da artéria carótida comum e anastomosa-se com ramos da carótida interna (Cerci Neto, 2008).

#### **1.1.2 Artérias Vertebrais**

As artérias vertebrais (AV), direita e esquerda, são artérias encefálicas e medulares, de importância fisiológica considerável no homem, visto que representam a segunda fonte de suprimento sanguíneo cerebral. Originam-se geralmente da artéria subclávia, entram pelos forames da sexta vértebra cervical e sobem pelos forames transversos, passam pelo forame occipital, atravessam a dura-máter e entram na cavidade intracraniana, juntando-se à artéria vertebral contra-lateral, na junção bulbo-pontina, para constituir a artéria basilar, a qual marca

sua terminação (Atkins, 2008; Cerci Neto, 2008; Sacco, 1997). As duas artérias, vertebral e basilar, irrigam a parte postero-inferior do encéfalo, porção superior da medula espinhal, bulbo raquidiano, protuberância anular, cerebelo, pedúnculos cerebrais, tubérculo quadrigêmeo e a parte posterior do cérebro. Apesar do pouco diâmetro da artéria vertebral sua oclusão causa isquemia e conseqüentemente sérias anormalidades ao funcionamento do sistema nervoso central (SNC), como cegueira e paralisia (Stroke Center, 2008).

### **1.1.3 Círculo de Willis**

Na base do cérebro, os dois sistemas vasculares, carotídeo e vertebral, são interconectados pelo Círculo ou Polígono de Willis, um heptágono de artérias que se distribuem a todas as regiões do cérebro, fornecendo atalhos potenciais entre a circulação cerebral lateral e a antero-posterior. Entretanto, sob circunstâncias fisiológicas adequadas, o sangue que flui através das artérias vertebrais não se mistura ao sangue das artérias carótidas internas (Farkas & Luiten, 2001). O Círculo de Willis é formado pelas artérias: 1) comunicante anterior, que se anastomosa às duas artérias cerebrais anteriores; 2) segmento inicial das duas artérias cerebrais anteriores, entre a origem da carótida interna e da comunicante anterior; 3) duas comunicantes posteriores que são responsáveis pela comunicação entre os sistemas carotídeo e vertebral; 4) segmento inicial das duas cerebrais posteriores, entre a bifurcação da basilar e a junção com a comunicante posterior, bilateralmente. Esta rede protege o cérebro, e se uma das artérias principais é ocluída, as artérias menores distais podem receber alternativamente o sangue de outras artérias, a circulação colateral (Cerci Neto, 2008; Sacco, 1997; Stroke Center, 2008).

Uma redistribuição compensatória de sangue no Círculo de Willis ou talvez outros processos que neutralizem o declínio repentino no FSC podem ser esperados (Farkas & Luiten, 2001) quando o lúmen de uma artéria intracraniana é estreitado, devido, por exemplo,

à aterosclerose severa (Farkas & Luiten, 2001) ou quando as artérias carótidas comuns ou as artérias cerebrais médias de animais de laboratório são experimentalmente ocluídas para criar um modelo de isquemia cerebral (Farkas & Luiten, 2001). A Figura 1 demonstra similaridades e as diferenças entre a anatomia do Círculo de Willis visto no homem e no rato.

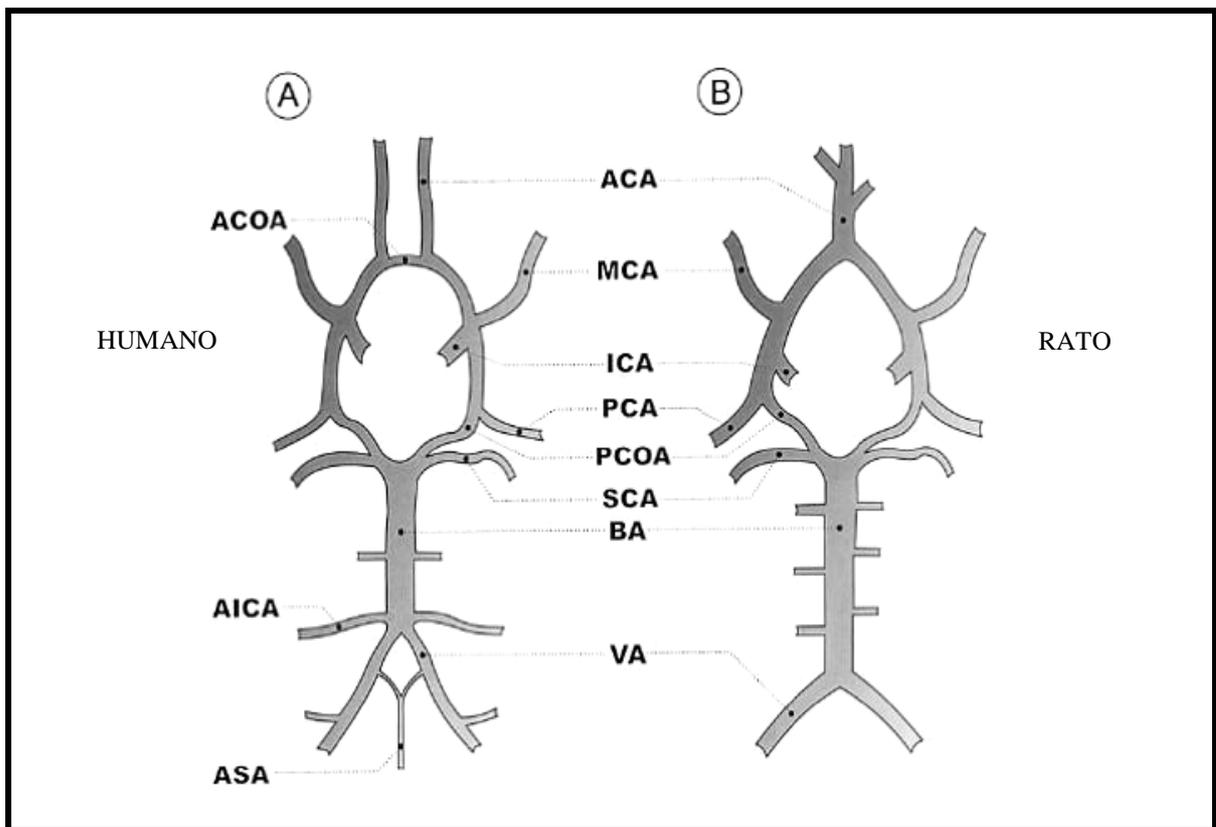


Figura 1 – Anatomia do Círculo de Willis no humano (A) e no rato (B). ACA-artéria cerebral anterior, ACOA-artéria comunicante anterior, ACM-artéria cerebral média, ACI-artéria carótida interna, ACP-artéria cerebral posterior, ACOP-artéria comunicante posterior, ACS-artéria cerebelar superior, AB-artéria basilar, ACAP-artéria cerebelar antero-posterior, AV-artéria vertebral, AEP-artéria espinhal posterior (reproduzido de Farkas & Luiten, 2001).

## 1.2 HIPOPERFUSÃO CEREBRAL CRÔNICA NO RATO

A oclusão crônica e simultânea das artérias carótidas comuns (ACC, modelo 2-VO) em ratos reduz 25 a 50% do fluxo sanguíneo cortical e hipocampal (Eklöf et al., 1972), resultando em mudanças neurofisiológicas cerebrais, alterações do endotélio microvascular, neurodegeneração no hipocampo, bem como disfunções de aprendizagem e memória (Davidson et al, 2000; Ohta et al., 1997; Sarti et al., 2002). O modelo 2-VO permanente tem

sido amplamente usado para se estudar alguns aspectos de doenças crônicas neurodegenerativas que afetam o humano, incluindo aquelas que resultam primordialmente em deficiências cognitivas, tal como a doença de Alzheimer (Farkas & Luitten, 2001; Farkas et al., 2007). Entretanto, o uso do modelo 2-VO crônico para se estudar alterações comportamentais (aprendizagem e memória), sofre de uma limitação importante. A oclusão permanente das artérias carótidas comuns (ACC) interrompe o fluxo sanguíneo para as estruturas oculares, a quais são primordialmente supridas pela (APtP), a qual deriva do ramo interno da artéria carótida (Davidson et al., 2000; Osborne et al., 2004). Disso resulta degeneração do nervo óptico e retinopatia em pelo menos 50% dos animais (Davidson et al., 2000). Tais alterações no sistema visual do rato sujeito ao procedimento 2-VO são remanescentes das alterações observadas no homem vítima de doenças oclusivas da (ACC) ou da artéria carótida interna (ACI) as quais resultam na síndrome isquêmica ocular. Esta síndrome tem como principais manifestações clínicas perda da acuidade visual, inflamações da conjuntiva, córnea e úvea anterior, neovascularização da íris, miose, catarata, glaucoma, retinopatias, amaurose fugaz, perdas de células ganglionares e lesão do nervo óptico (Farkas et al., 2007; Lavinsky et al., 2006; Osborne et al., 2004).

A degeneração do sistema visual após oclusão permanente das (ACC) no rato limita o uso deste modelo quando o objetivo do estudo é avaliar a capacidade de aprendizagem e memória de tarefas espaciais, tal como os testes de labirinto. O desempenho dessas tarefas pelo rato depende da integridade do sistema visual, pois o teste requer a presença de pistas visuais extra-labirinto distribuídas aleatoriamente no ambiente (Farkas & Luiten, 2001). Por causa disso, Ohta e cols. (1997) aperfeiçoaram o modelo 2-VO mediante a oclusão seletiva dos ramos internos das artérias carótidas (modelo 2-VO/ACI), preservando assim o fluxo sanguíneo através da (APtP). Entretanto, nenhum grau de neurodegeneração hipocampal foi observado, pelo menos até 3 meses após 2-VO/ACI (Ohta et al., 1997), devido provavelmente

a existência de uma vasta circulação cerebral colateral (Eklöf et al., 1972), bem como pela extraordinária capacidade do rato jovem para auto-regulação do fluxo sanguíneo cerebral (Farkas & Luiten, 2001).

Visando obter um modelo de hipoperfusão cerebral capaz de produzir um padrão consistente de neurodegeneração, porém, que preservasse a integridade das estruturas visuais, nosso laboratório vem trabalhando no desenvolvimento de um modelo de oclusão gradual, em 3 estágios, das artérias vertebrais (AV) e artérias carótidas (modelo 4-VO crônico e progressivo) (Neto et al., 2005). Ratos submetidos ao procedimento 4-VO com oclusão das artérias carótidas comuns (ACC, modelo 4-VO/ACC), por um período de 30 dias, apresentaram neurodegeneração hipocampal e deficiência de aprendizagem no teste do labirinto radial. Em contraste, a oclusão das artérias vertebrais e artérias carótidas internas (modelo 4-VO/ACI) resultou também em lesão hipocampal (em menor grau), porém, a capacidade de aprendizagem não foi afetada, mesmo após 60 dias de hipoperfusão. Esses dados sugerem que o déficit comportamental observado no grupo submetido ao procedimento 4-VO/ACC deve ser conseqüente à disfunção visual, enquanto no grupo com 4-VO/ACI as estruturas visuais tenham permanecido intactas, o que está de acordo com a literatura (Ohta et al., 1997).

Entretanto, o modelo 4-VO/ACI usado no rato jovem parece não ser eficaz para produzir alterações neuropatológicas e comportamentais, pelo menos nas condições experimentais usadas até o presente. Além do tipo de vasos ocluídos (AV + ACC ou AV + ACI), outras variáveis como a idade dos animais, devem exercer influências importantes no sentido de determinar as seqüelas resultantes de uma intervenção tal como o procedimento 4-VO/ACI. Por exemplo, é sabido que a capacidade do cérebro para compensar uma deficiência de fluxo sanguíneo cerebral pode estar reduzida no indivíduo idoso (De la Torre et al., 1992, He et al., 1997). Portanto, nossa proposta é a de dar continuidade nas investigações com vistas

ao desenvolvimento de um modelo animal de hipoperfusão cerebral crônica capaz de produzir seqüelas neuropatológicas e comportamentais, porém, isento de alterações visuais.

## **2.0 OBJETIVOS**

São dois os objetivos do presente estudo: comparar os efeitos causados pelos procedimentos 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI sobre a capacidade de aprendizagem e memória, densidade neuronal nas várias regiões do hipocampo, e sobre a integridade histomorfológica da retina em ratos jovens. Esse experimento visa não só confirmar resultados anteriores do nosso laboratório (Neto et al., 2005), mas também fornecer para uma análise neurohistológica mais detalhada das células CA (*cornu ammonis*) do hipocampo (CA1, CA2, CA3 e CA4), além de se investigar se os procedimentos 4-VO/ACC e 4-VO/ACI afetam a integridade histomorfológica da retina. O segundo objetivo é o de verificar se os resultados observados após 4-VO/ACI em ratos jovens, isto é, ausência de lesão hipocampal e ausência de déficit cognitivo, poderiam ser diferentes em animais idosos submetidos a esse modelo de hipoperfusão. Isto se justifica com base nas evidências de uma redução na capacidade do cérebro idoso para auto-regulação do fluxo sanguíneo cerebral (De la Torre et al., 1992; He et al., 1997), ou seja, a questão é saber se, no rato idoso, o modelo 4-VO/ACI de hipoperfusão cerebral crônica poderia ser efetivo no sentido de produzir neurodegeneração hipocampal e déficit cognitivo.

## **3.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 ANIMAIS**

Foram usados 50 ratos Wistar, machos, jovens (3 meses), adultos (12 meses) e idosos (18 meses), pesando 270-280 g, 350-400 g e 500-600 g, respectivamente. Os animais foram alojados em caixas de plástico (39x33x16 cm) em grupo de três ou quatro, à temperatura

controlada ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). O ciclo de luz (claro/escuro) foi controlado automaticamente e mantido em 12h, sendo as luzes acessas às 07h00min. A renovação do ar atmosférico permaneceu constante através de um exaustor e a alimentação e água ofertados *ad libitum*. Todos os animais usados eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e os procedimentos experimentais respeitaram aos princípios éticos da Faculdade Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais utilizados foram divididos em 4 grupos, conforme o tipo de vasos ocluídos (AV + ACC ou AV + ACI) e a idade do animal (3, 12 ou 18 meses). O quadro abaixo esquematiza o protocolo experimental.

Grupo	Idade (mês)	Vaso ocluído (1ª. etapa)	Intervalo (dias)	Vaso ocluído (2ª. etapa)	Intervalo (dias)	Vaso ocluído (3ª. etapa)
1	3	AV bilateral	7	ACC direita	7	ACC esquerda
2	3	AV bilateral	7	ACI direita	7	ACI esquerda
3	12	AV bilateral	7	ACI direita	7	ACI esquerda
4	18	AV bilateral	7	ACI direita	7	ACI esquerda

### 3.3 CIRURGIA

Os animais foram submetidos à oclusão permanente das (AV) e (ACC) ou (ACI), sendo anestesiados por via intramuscular pela associação de Quetamina (15mg/kg) e Xilazina (1,0mg/kg). A Figura 2 mostra um desenho esquemático da localização anatômica dos pontos de oclusão da artéria carótida nos modelos 4-VO/ACC e 4-VO/ACI em 2 estágios.

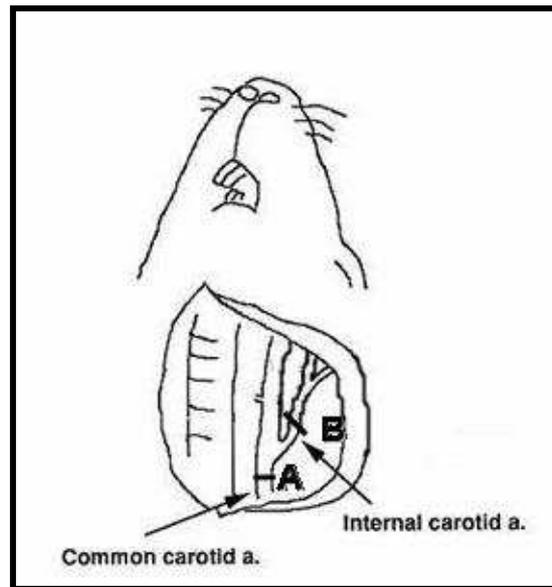


Figura 2 - Desenho esquemático mostrando a localização das artérias carótida comum e interna e os respectivos locais de oclusão nos modelos 4-VO/ACC (A) e 4-VO/ACI (B), (modificado de Ohta et al., 1997).

Após fixação auricular do animal na base de um aparelho estereotáxico, uma incisão longitudinal medindo 3 cm, foi realizada na porção cervical para expor o forame alar, localizado na primeira vértebra cervical. Os músculos adjacentes foram dissecados e a ponta do eletrodo foi introduzida no forame e girada delicadamente até que a presença de hemorragia comprovasse o rompimento das AV bilateralmente, a qual foi prontamente controlada com o auxílio de um eletrocauterizador. Nessas condições, considerou-se permanentemente ocluídas as artérias vertebrais (AV). A incisão foi suturada com fio de algodão e o animal devolvido ao biotério setorial. Passados sete dias da primeira etapa cirúrgica (estágio 2-VO), os animais foram novamente anestesiados e submetidos à oclusão permanente das artérias carótidas comum (ACC) ou interna (ACI) direita, mediante um incisão longitudinal (3 cm) na porção ventral do pescoço, conforme as técnicas de rotina do laboratório. A incisão cervical foi suturada e o animal conduzido ao biotério setorial. Novamente, sete dias mais tarde, procedeu-se a oclusão permanente das ACC e ou ACI esquerda, completando assim as seqüências AV→ACC→ACC (modelo 4-VO/ACC) ou

AV→ACI→ACI (modelo 4-VO/ACI). Os animais dos grupos controles (“sham”) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém, sem oclusões.

### 3.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

#### 3.4.1 Aparato de teste

O labirinto radial aversivo (LRA) é composto por 8 braços radiais (55cm X 15cm) que se projetam a partir de uma plataforma poligonal central com dezesseis lados (71 cm lado-a-lado). Na extremidade de cada braço, uma abertura (9cm de diâmetro) fornece o acesso à caixa de madeira escura (23 X 11 X 9,5 cm), a qual pode ser introduzida e removida como gaveta posicionada logo abaixo das aberturas, servindo como um refúgio (*goal box* ou zona de recompensa) para o rato, em relação à superfície iluminada, aversiva do labirinto. Dos 8 braços, somente um contém o refúgio verdadeiro, nas braços restantes, as caixas não possuem fundo. Nas bordas dos braços erguem-se paredes de acrílico transparente (2,5 cm de altura) para impedir que o animal caia. A área central é separada internamente dos braços por portas-guilhotina, também de acrílico transparente (19 cm de altura). O labirinto eleva-se 90 cm acima do solo, podendo girar livremente em torno do seu eixo central. A partir de uma antecâmara, um sistema de cordas e roldanas conecta individualmente cada porta-guilhotina, permitindo que o experimentador controle o confinamento do animal na arena central, antes de liberá-lo para explorar os braços. Diversas pistas extra-labirinto (tais como objetos tridimensionais) ficam disponíveis na sala de teste. Um pequeno ventilador gera um constante ruído de fundo durante todo o experimento, amenizando assim a interferência de barulhos bruscos e imprevisíveis. Duas lâmpadas de 200W e 40W ficam fixas no teto, 180 cm acima do labirinto. A câmera de vídeo é posicionada a 220 cm de distância e 130 cm acima do labirinto. Para a análise descritiva dos dados, os 8 braços foram numerados de acordo com a

posição em relação às pistas extra-labirinto, de tal forma que a seqüência e a freqüência das visitas a cada diferente posição podem ser registradas.

A Figura 3 mostra um desenho do labirinto radial aversivo de 8-braços desenvolvido em nosso laboratório (Benetoli et al., 2004; Neto et al., 2005; Paganelli et al., 2004) e utilizado no presente estudo para avaliação dos efeitos cognitivos da hipoperfusão cerebral crônica progressiva.

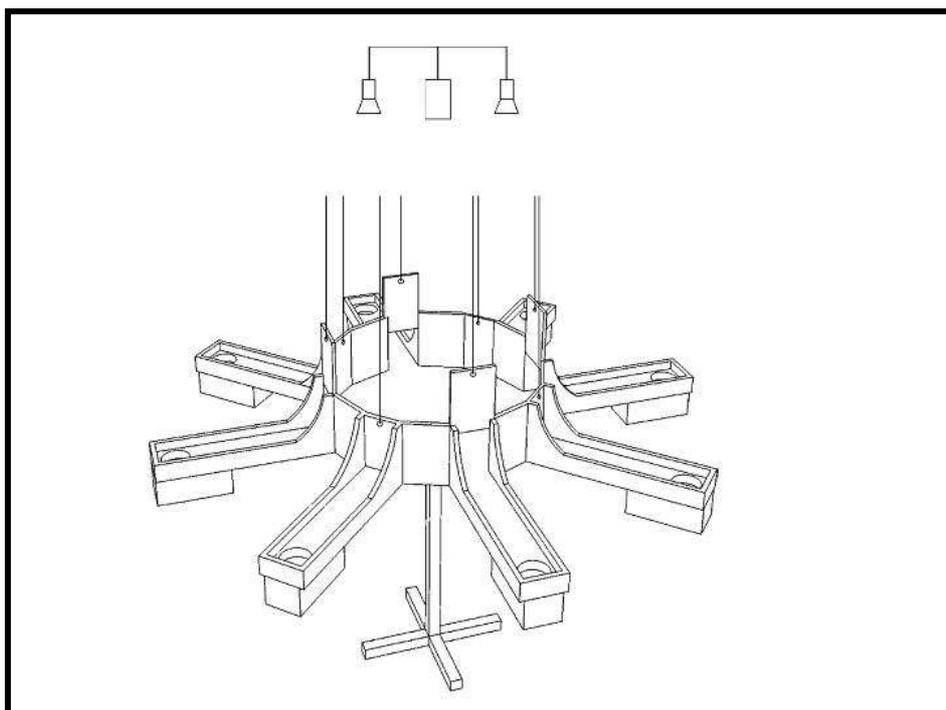


Figura 3 – Representação do labirinto radial aversivo, em sua versão de confinamento. A versão confinada consiste na colocação de portas de entrada de cada braço, as quais podem ser fechadas ou abertas pelo experimentador. Este procedimento evita que comportamentos, tais como entradas em braços consecutivos adjacentes sejam utilizadas pelo animal, (reproduzido de Neto et al., 2005).

### 3.4.2 Procedimento do Teste

Transcorridos 45 dias após o último estágio de oclusão (4-VO), os animais receberam, primeiramente, um período de adaptação ao ambiente de teste. Para tanto, as pistas extra-labirinto foram retiradas do ambiente de teste. O animal foi colocado na arena central por 30 segundos, e então liberado para explorar o interior dos braços. Ao entrar em um determinado braço, o acesso aos demais braços foi fechado. Ao retornar para a arena central, o braço

recentemente visitado foi fechado, ficando o animal confinado por 10 segundos e então novamente liberado para mais uma tentativa para encontrar o esconderijo. Este procedimento foi repetido até que um tempo máximo de 4 minutos tivesse transcorrido. Caso o animal não encontrasse no braço correto, este era conduzido pelo experimentador ao braço correto, sendo colocado no esconderijo, ali permanecendo por 1 minuto. Após este período, o animal era levado ao biotério e o labirinto limpo, retirando-se o excesso de fezes e urina e o esconderijo trocado de braço aleatoriamente. A posição espacial do esconderijo em relação às pistas extra-labirinto foi, contudo, mantida constante. O procedimento de adaptação foi aplicado 1 vez ao dia, durante 3 dias. Concluída a adaptação, o animal foi submetido ao teste de aquisição (aprendizagem da localização espacial do esconderijo) por um período de 15 dias, sendo 3 tentativas/dia, com uma latência máxima de 4 minutos em cada tentativa. Os procedimentos foram os mesmos empregados durante a adaptação, exceto que agora as pistas extra-labirinto estarão dispostas em seus lugares. A performance comportamental foi medida pelo tempo (latência) gasto para encontrar o esconderijo, pelo número de erros de referência e pelo número de erros operacionais. Durante cada tentativa, um erro de referência será contado toda vez que o animal entrar, pela primeira vez, num braço contendo um esconderijo falso. Um erro de memória operacional será registrado toda vez que o rato tornar a entrar em um braço previamente visitado. Por essa definição, o animal utiliza-se da memória de referência para recordar que apenas um, dos oito braços, contém a recompensa, e que a sua relativa localização espacial manteve-se inalterada ao longo de várias sessões de teste, indicando, portanto, uma memória de curto-prazo. Uma visita foi registrada quando o rato alcançar a metade do braço. O animal será considerado fora do braço quando estiver com as quatro patas e mais a cauda sobre a plataforma.

### 3.5 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

Um a três dias após o término do teste comportamental, os animais foram submetidos à anestesia com éter etílico e em seguida, sofreram perfusão transcardiacamente com solução salina (0,9%) e solução de Bouin durante 5 minutos (20 ml/min). Durante o procedimento, as soluções foram mantidas a 1-2°C e a cabeça após decapitada, mantida em banho de gelo (2-4 °C) durante 1 hora.

O cérebro, dividido em 2 partes e os olhos de cada animal foram mantidos em solução fixadora de Bouin, inicialmente por 2 horas ou até a sua desidratação em álcool. Esta conduta foi tomada para diminuir ou evitar qualquer dano tecidual que pudesse interferir nos resultados da análise histológica. As partes seccionadas do cérebro (próximo ao quiasma óptico), foram emblocadas em parafina e 8 a 12 secções coronais semi-seqüenciais, obtidas através de um micrótomo, medindo 7µm de espessura, foram tomadas em um nível esterotático correspondente a 3,80 mm posterior ao bregma, e coradas por hematoxilina/eosina. Três cortes foram escolhidos para representar quantitativamente os neurônios piramidais aparentemente normais das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 dos hipocampos bilaterais.

Para o processamento adequado da retina, os olhos foram extraídos e junto, tomou-se grande quantidade de tecido periocular que imediatamente, foram imersos em solução fixadora. Após 2 horas, o globo ocular e o tecido periocular foram retirados, expondo-se o olho íntegro. A imersão do material em solução fixadora facilitou a enucleação do olho, evitando a manipulação desastrosa da retina. O material anatômico foi desidratado e emblocado em parafina, seguindo o mesmo protocolo histológico do cérebro. Dez a doze cortes coronais semi-seqüenciais de cada olho dos animais, obtidos por micrótomo e medindo 7 µm de espessura foram tomados e corados em hematoxilina/eosina. Seis cortes,

representando os olhos direito e esquerdo de cada animal foram selecionados para posterior análise qualitativa das camadas da retina.

### 3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em relação ao cérebro, uma análise quantitativa do número de células piramidais do hipocampo dos dois hemisférios foi realizada. A densidade celular foi expressa através da contagem de 3 cortes coronais (objetiva 40X, Olympus) semi-seqüenciais de cada indivíduo, considerando-se as células piramidais com núcleos e nucléolos íntegros e distintos das regiões CA1, CA2, CA3 e CA4. Uma média do número de células visualizadas em 6 campos microscópicos (objetiva 40X) de cada região do hipocampo foi feita, sendo a mensuração total da densidade celular representada por 4 médias referentes as regiões CA1, CA2, CA3 e CA4.

Usando um microscópio Olympus (BX41), acoplado à uma câmera fotográfica de alta performance, Olympus (QColor3), foram capturadas 12 imagens (objetiva 20X) e *software*, Q Capture, da região entre o disco óptico e o centro da retina em seis cortes coronais das retinas bilaterais de cada animal. Utilizando-se essas imagens, a integridade morfológica da retina foi avaliada com base nos seguintes parâmetros: (i) média do número de células na camada ganglionar (CCG) contadas em milímetro linear, e (ii) desestruturação, redução ou ausência das camadas plexiforme externa (CPE), nuclear interna (CNI), plexiforme interna (CPI) e nuclear externa (CNE). Através de uma análise comparativa e qualitativa entre as retinas do grupo operado e grupo controle, considerou-se lesionado todas as retinas que apresentaram, pelo menos, uma deformidade segundo os parâmetros considerados.

### **3.7 ESTATÍSTICA**

A análise de variância (ANOVA) de duas vias para amostras repetidas foi usada para a comparação da performance comportamental observada nos animais controle (“sham”) e aqueles submetidos ao 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI, sendo os tratamentos (“sham”, 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI) o fator ‘entre grupos’, e os ‘dias de treinamento’ (blocos de 3 dias) o fator ‘dentro do grupo’. Em caso de um efeito global ‘entre grupo’ estatisticamente diferente, o Teste t de Student foi usado para se distinguirem os pontos (dias) nos quais os grupos “sham” e operado foram diferentes entre si. Para análise dos parâmetros ‘latência total’ e ‘número total de erros’ empregou-se também o Teste t de Student. O Teste U de Mann-Whitney foi usado para se comparar os efeitos das diferentes condições de 4-VO sobre a densidade neuronal nas várias regiões do hipocampo. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

## **4.0 RESULTADOS**

### **4.1 MORTALIDADE**

Dos 16 animais pertencentes ao grupo 4-VO/ACC, 2 indivíduos (12,5%) morreram logo após a primeira etapa das oclusões (artérias vertebrais). Dois ratos (12,5%) morreram durante a primeira semana após o estágio 3-VO (oclusão da artéria carótida comum direita), e 6 animais (37,5%) morreram em diferentes tempos após completar o estágio 4-VO, totalizando ao final (62,5%) de mortalidade. No grupo 4-VO/ACI (12 meses de idade), de 10 animais operados, 6 indivíduos (60%) morreram após o estágio 4-VO. Entre os ratos jovens submetidos a 4-VO/ACI não houve morte. O grupo de animais idosos submetidos a 4-VO/ACI era inicialmente de 20 animais, porém durante os 45 dias de intervalo até o início dos testes de comportamento, 8 animais morreram, calculando-se uma taxa de mortalidade de 40%.

## 4.2 PERFORMANCE DE APRENDIZAGEM EM FUNÇÃO DO TIPO DE VASOS OCLUÍDOS E DA IDADE DO ANIMAL

### 4.2.1 *Oclusão das artérias vertebrais e artérias carótidas comuns em ratos jovens.*

Neste experimento, ratos jovens foram submetidos à oclusão permanente dos 4 vasos conforme a seqüência AV → ACC → ACC, sendo de 1 semana o intervalo entre um estágio e outro de oclusão. A performance de aprendizagem e memória medida no LRA começou a ser avaliada 45 dias após o último estágio de oclusão, isto é, 4-VO/ACC. Os dados de ‘latência’, ‘número de erros de referência’ e ‘número de erros operacionais’ observados ao longo de 15 dias de treinamento foram agrupados em blocos, sendo que cada bloco compreende a média de 3 dias consecutivos (5 blocos, 3dias/bloco). A figura 4 mostra a performance de aquisição (aprendizagem) medida pelos parâmetros de ‘latência’ e ‘número de erros’ cometidos pelos grupos controle (“sham”) e 4-VO/ACC. No painel superior, a performance de aquisição está representada ao longo do vários blocos de treinamento. A ANOVA para amostras repetidas revela um efeito de grupo significativo para os parâmetros ‘número de erros de referência’ ( $F_{1, 44} = 5,81$ ;  $p = 0,012$ ) e ‘número de erros operacionais’ ( $F_{1, 44} = 9,08$ ;  $p < 0,0001$ ). O tempo gasto para encontrar o esconderijo (‘latência’) também foi maior para o grupo 4-VO/ACC, porém, esse efeito não alcançou significância estatística ( $F_{1, 44} = 4,43$ ;  $p = 0,07$ ). O treinamento exerceu um efeito global significativo sobre todos os parâmetros ( $F_{4, 44} = 5,61$  a  $9,65$ ;  $p < 0,0001 - 0,01$ ). Porém, se uma ANOVA é aplicada aos dados de cada grupo individualmente, verifica-se um efeito do treino somente para o grupo “sham” ( $F_{4, 29} = 9,90$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando que os animais com 4-VO/ACC, mas não os “sham”, foram prejudicados nos testes de aprendizagem. Resultados semelhantes são observados quando os parâmetros comportamentais são medidos cumulativamente ao longo dos 15 dias de teste (painel inferior). Refletindo os dados da análise diária, diferenças significativas entre grupo “sham” e grupo operado foram observadas para os parâmetros ‘número total de erros de

referência' ( $t = 3,04$ ;  $p = 0,011$ ) e 'número total de erros operacionais' ( $t = 2,44$ ;  $p = 0,033$ ), ficando o parâmetro 'latência' no nível marginal da significância estatística ( $t = 2,11$ ;  $p = 0,058$ ).

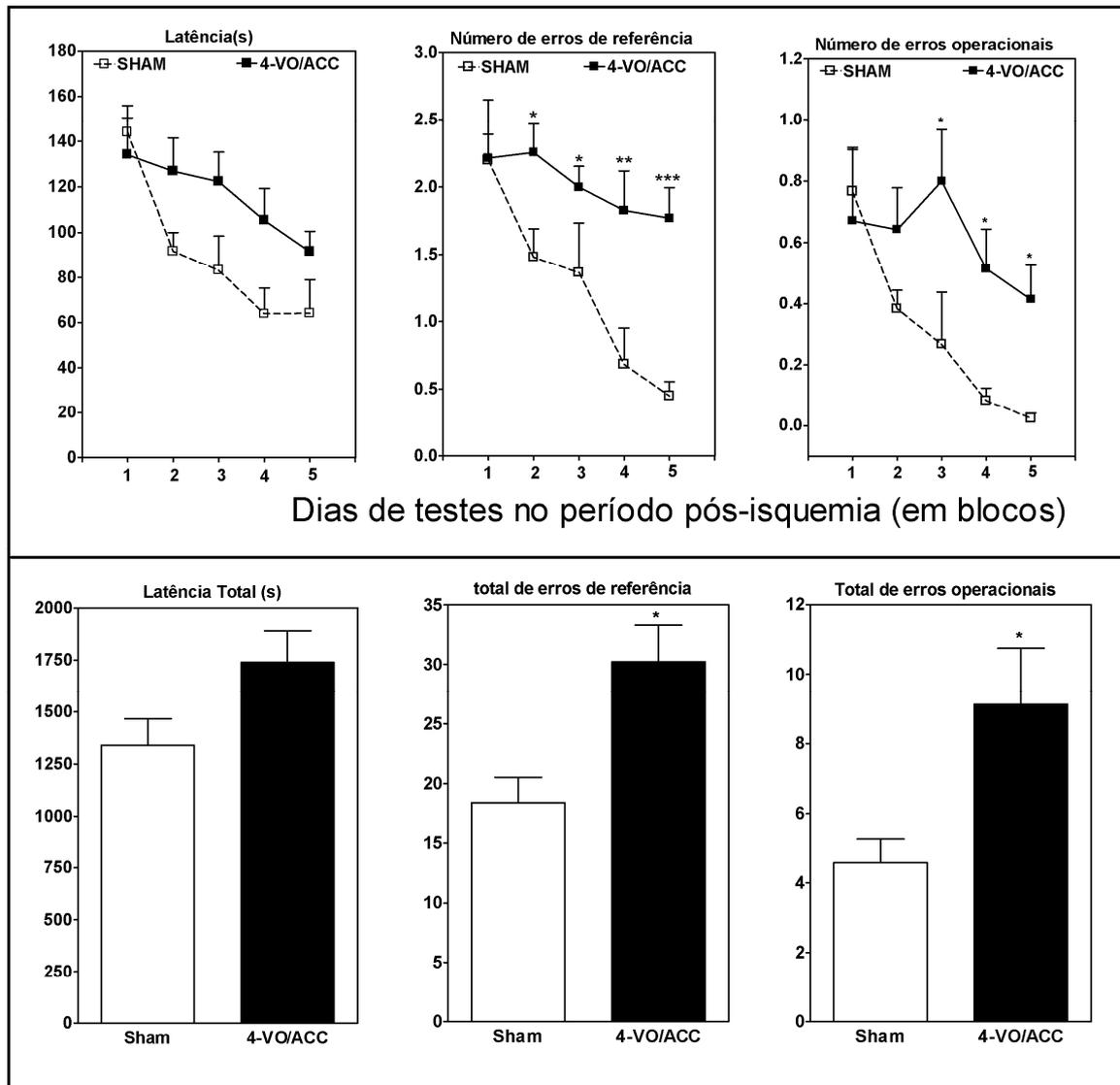


Figura 4 - Efeito do procedimento 4-VO/ACC em ratos jovens sobre a aquisição medida no LRA. O painel superior mostra a performance de aquisição medida diariamente ao longo de 15 dias, porém, plotada em blocos de 3 dias. O desempenho comportamental é expresso pelos parâmetros 'latência', 'número de erros de referência' e 'número de erros operacionais'. A 'latência total' e o 'número total de erros' (somatória dos 15 dias de teste) são mostrados na parte inferior da figura. A deficiência de aprendizagem causada pelo 4-VO/ACC é expressa por todos os parâmetros medidos diariamente ou cumulativamente ( $p^* < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,0001$  vs "sham"). Um efeito significativo do treino ocorreu sobre o grupo "sham" somente ( $p < 0,0001$ ). Os valores representam a média  $\pm$  EPM do grupo. "Sham",  $n = 6$ ; 4-VO/ACC,  $n = 7$ .

#### **4.2.2 Oclusão das artérias vertebrais e artérias carótidas internas em ratos jovens e adultos.**

Os efeitos de 4-VO/ACI crônico sobre a performance de aprendizagem medida em ratos jovens (3 meses) ou adultos (12 meses) não foram diferentes entre si. Portanto, os resultados comportamentais desses animais foram agrupados e ilustrados na figura 5. Os animais operados foram submetidos à mesma seqüência de oclusões descritas para o modelo 4-VO/ACC, agora porém, as oclusões ocorreram nas artérias vertebrais e artérias carótidas internas (seqüência AV→ACI→ACI). Tanto a análise dos dados medidos diariamente quanto cumulativamente, revelam que o procedimento 4-VO/ACI não causou nenhum prejuízo de aprendizagem e memória (painéis superiores:  $F_{1,76} = 0,02$  a  $0,17$ ;  $p > 0,05$ ; painéis inferiores:  $t = 0,24$  a  $0,45$ ;  $p > 0,05$ ). Porém, o efeito global do treino foi altamente significativo ( $F_{4,76} = 8,92$  a  $47,82$ ;  $p < 0,0001$ ) e ambos os grupos, controle e 4-VO/ACI, apresentaram desempenho semelhante podendo ser comprovado quando uma análise de variância é aplicada para cada grupo individualmente (grupo “sham”:  $F_{4,49} = 5,22$  a  $22,28$ ;  $p < 0,0001$  a  $0,01$ ; grupo 4-VO/ACI:  $F_{4,54} = 4,00$  a  $27,31$ ;  $p < 0,0001$  a  $0,01$ ).

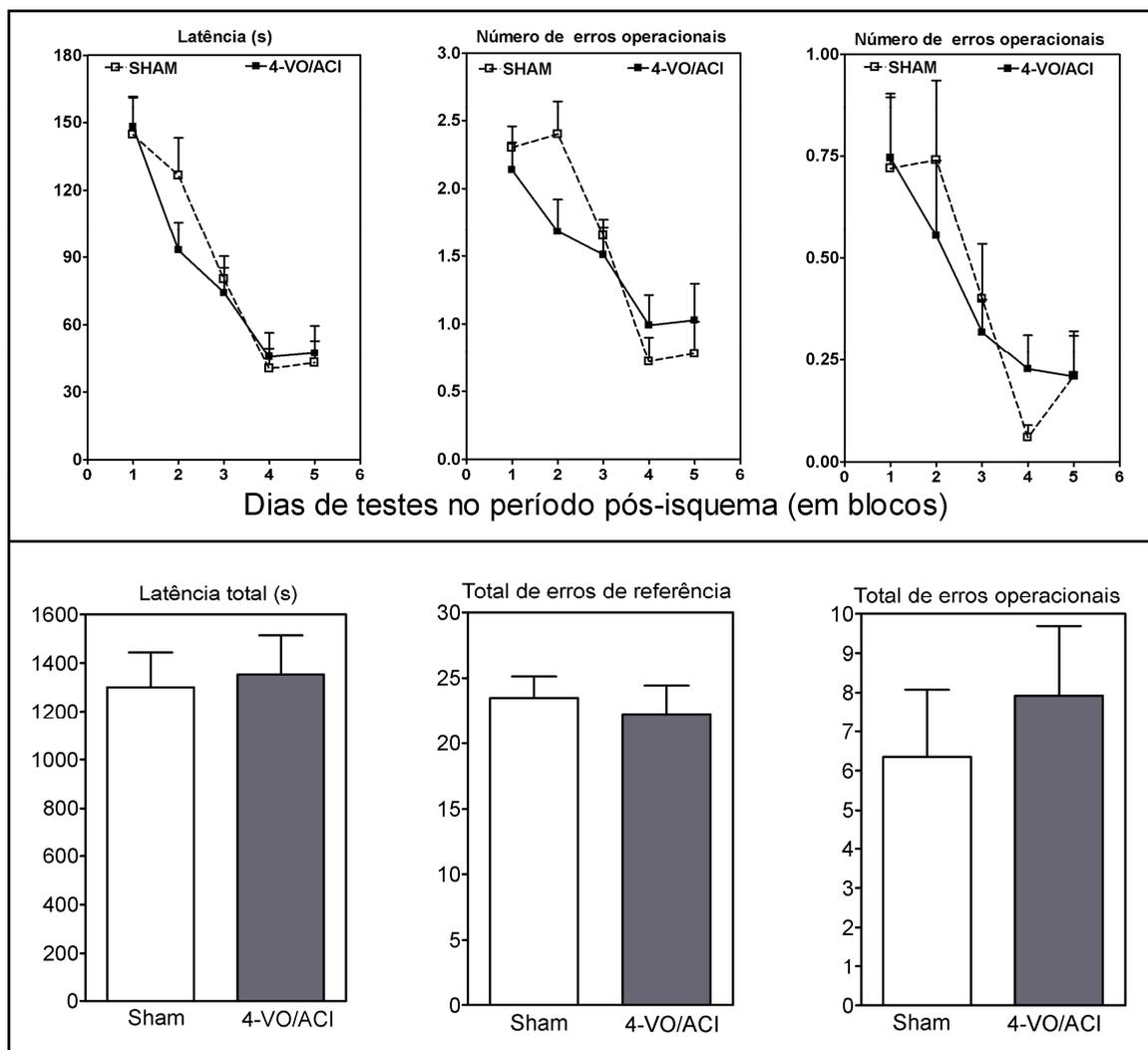


Figura 5- Performance de aprendizagem após 4-VO/ACI em ratos jovens (3 meses) e adultos (12 meses). O desempenho de aprendizagem é expresso em termos de ‘latência’ e ‘número de erros’ medidos diariamente e plotados em blocos de três dias (painéis superiores) ou cumulativamente pela soma dos 15 dias de treino (painéis inferiores). Nenhum sinal de deficiência cognitiva pode ser observado após 4-VO/ACI, em comparação com o grupo “sham” ( $p > 0,05$ ; “sham” vs operados). O efeito do treino foi semelhante para ambos os grupos ( $p < 0,0001$ ). Os valores são a média  $\pm$  EPM do grupo. Grupo “sham” (jovem,  $n = 6$ ; adulto,  $n = 4$ ), Grupo 4-VO/ICA (jovem,  $n = 7$ ; adulto,  $n = 4$ ).

### **4.2.3 Oclusão das artérias vertebrais e artérias carótidas internas em ratos idosos.**

A figura 6 mostra o desempenho de aprendizagem em ratos idosos submetidos ao procedimento 4-VO/ACI. Neste grupo etário, a oclusão crônica e progressiva dos 4 vasos conforme a seqüência AV→ACI→ACI aumentou significativamente o tempo gasto ('latência') para aprender a localização do esconderijo no LRA (painel superior esquerdo:  $F_{1,56} = 11,51$ ;  $p = 0,004$ ; painel inferior esquerdo:  $t = 3,39$ ;  $p = 0,011$ ). O desempenho cognitivo medido pelos parâmetros 'número de erros de referência' e 'número de erros operacionais' não foi estatisticamente diferente entre os grupos "sham" e 4-VO/ACI (painéis superiores, 'erro de referência':  $F_{1,56} = 3,51$ ;  $p = 0,082$ ; 'erro operacional:  $F_{1,56} = 1,17$ ;  $p > 0,05$ ; painéis inferiores, 'erro de referência':  $t = 1,82$ ;  $p = 0,09$  'erro operacional:  $t = 1,06$ ;  $p > 0,05$ ). Um efeito global do treino foi revelado pela ANOVA de duas vias para todos os parâmetros ( $F_{4, 56} = 3,10$  a  $15,67$ ;  $p < 0,0001 - 0,05$ ). Porém, quando a ANOVA de uma via para uma amostra é repetida e usada para cada grupo individualmente, verifica-se que o grupo sham aprendeu a tarefa ao longo do treino ( $F_{4, 29} = 6,91$  a  $17,41$ ;  $p < 0,0001$  a  $0,01$ ); o mesmo não ocorreu para o grupo 4-VO/ACI idoso ( $F_{4, 49} = 0,53$  a  $2,88$ ;  $p = 0,051$  a  $0,53$ ), indicando que os ratos idosos com 4-VO/ACI foram prejudicados na aquisição da tarefa medida no LRA.

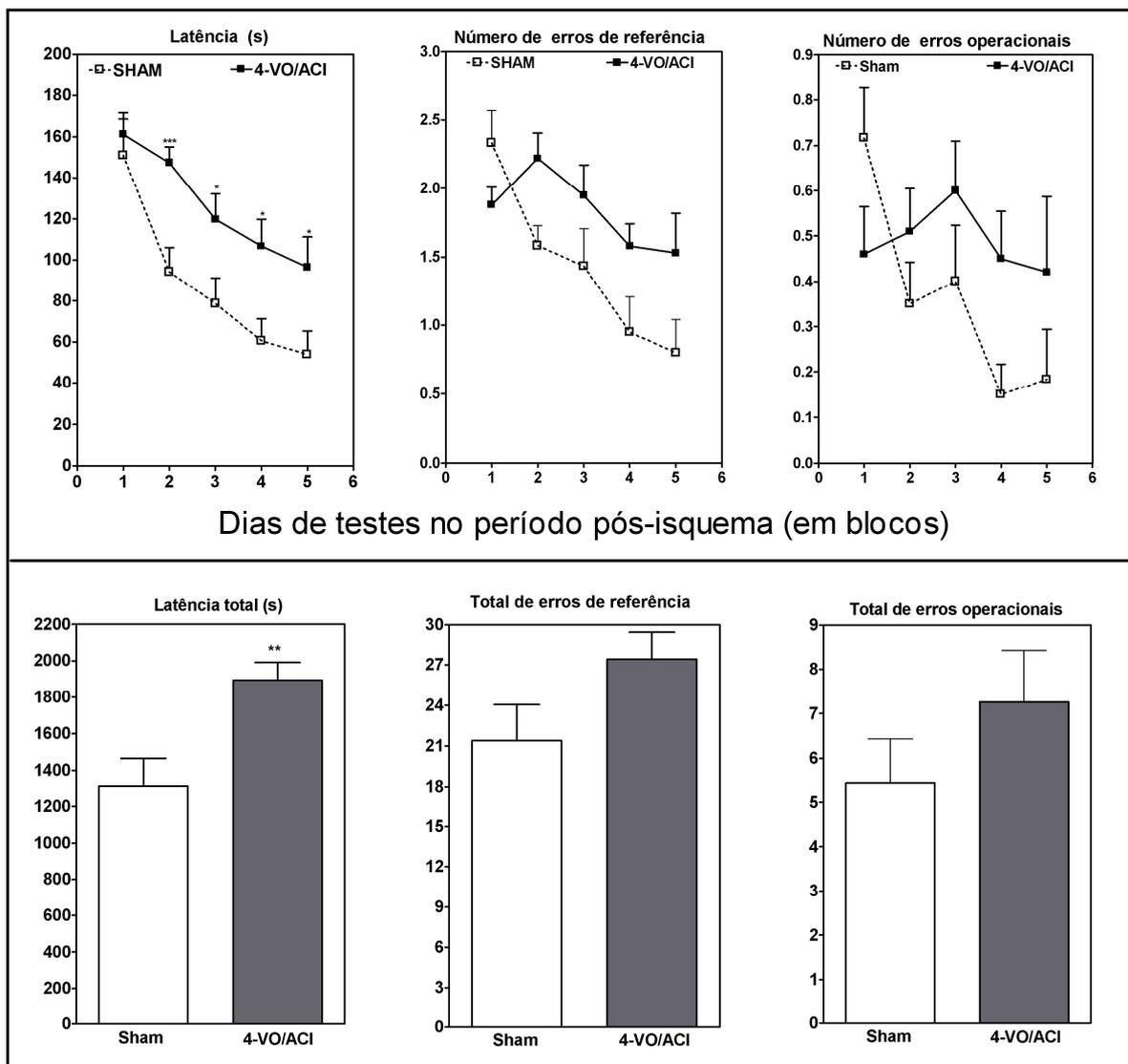


Figura 6 – Performance de aprendizagem após 4-VO/ACI em ratos idosos (18 meses). O desempenho de aprendizagem é expresso em termos de ‘latência’ e ‘número de erros’ medidos diariamente (painéis superiores) ou cumulativamente (painéis inferiores). A ‘latência’ foi significativamente maior no grupo 4-VO/ACI (painel superior esquerdo:  $P < 0,05$  vs “sham”). O ‘número de erros’ medido diariamente (painel superior) ou cumulativamente (painel inferior) também foi maior após 4-VO/ACI, porém, o efeito global ‘entre-grupos’ não alcançou significância estatística. Um efeito significativo do treinamento ocorreu sobre o grupo “sham” ( $p < 0,0001 - 0,01$ ), porém, não sobre o grupo 4-VO/ACI, ( $p > 0,05$ ), indicando um déficit de aprendizagem neste último. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do grupo. Grupo “sham”,  $n=10$ ; Grupo 4-VO/ACI,  $n = 11$ .

### 4.3 ALTERAÇÕES NEUROHISTOLÓGICAS E DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS EM FUNÇÃO DO TIPO DE VASOS OCLUÍDOS E DA IDADE DO ANIMAL

#### 4.3.1 *No hipocampo*

A figura 7 mostra os efeitos dos procedimentos 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI crônicos sobre a densidade de células piramidais nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo. Comparado com o grupo “sham”, o número de células foi significativamente reduzido após 4-VO/ACC (painel B) em todas as regiões hipocâmpais analisadas (CA1: 65,0%,  $p = 0,0043$ ), (CA2: 66,4%,  $p = 0,0022$ ), (CA3: 72,4%,  $p = 0,0022$ ) e (CA4: 64%,  $p = 0,0043$ ). Contrariamente, o procedimento 4-VO/ACI em ratos jovens não causou nenhuma alteração na densidade de células piramidais em qualquer região hipocâmpal (painel C). Os dados histológicos referentes aos animais adultos (12 meses) e submetidos ao procedimento 4-VO/ACI (4 “sham” e 4 operados) não aparecem no gráfico (painel C), pois a análise histológica do cérebro desses animais não pode ser realizada devido a perda do tecido (ressecamento) durante a obtenção dos cortes em micrótomo. Nos ratos idosos (18 a 20 meses), o procedimento 4-VO/ACI também não causou alterações significativas na densidade de células piramidais quando calculado pela média do grupo ( $p > 0,05$  vs grupo “sham”). Contudo, nota-se claramente que em pelo menos 3 animais, o número de células piramidais ficou abaixo do valor mínimo encontrado para o grupo “sham”, indicando que um processo neurodegenerativo poderia estar em curso (painel D). Não foi observada correlação entre o número de células piramidais e o desempenho comportamental nos grupos submetidos ao 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI (Spearman 'R' = 0,029 – 0,26;  $p > 0,05$ ). A Figura 8 mostra fotomicrografias representativas das várias regiões hipocâmpais de ratos submetidos aos procedimentos 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI.

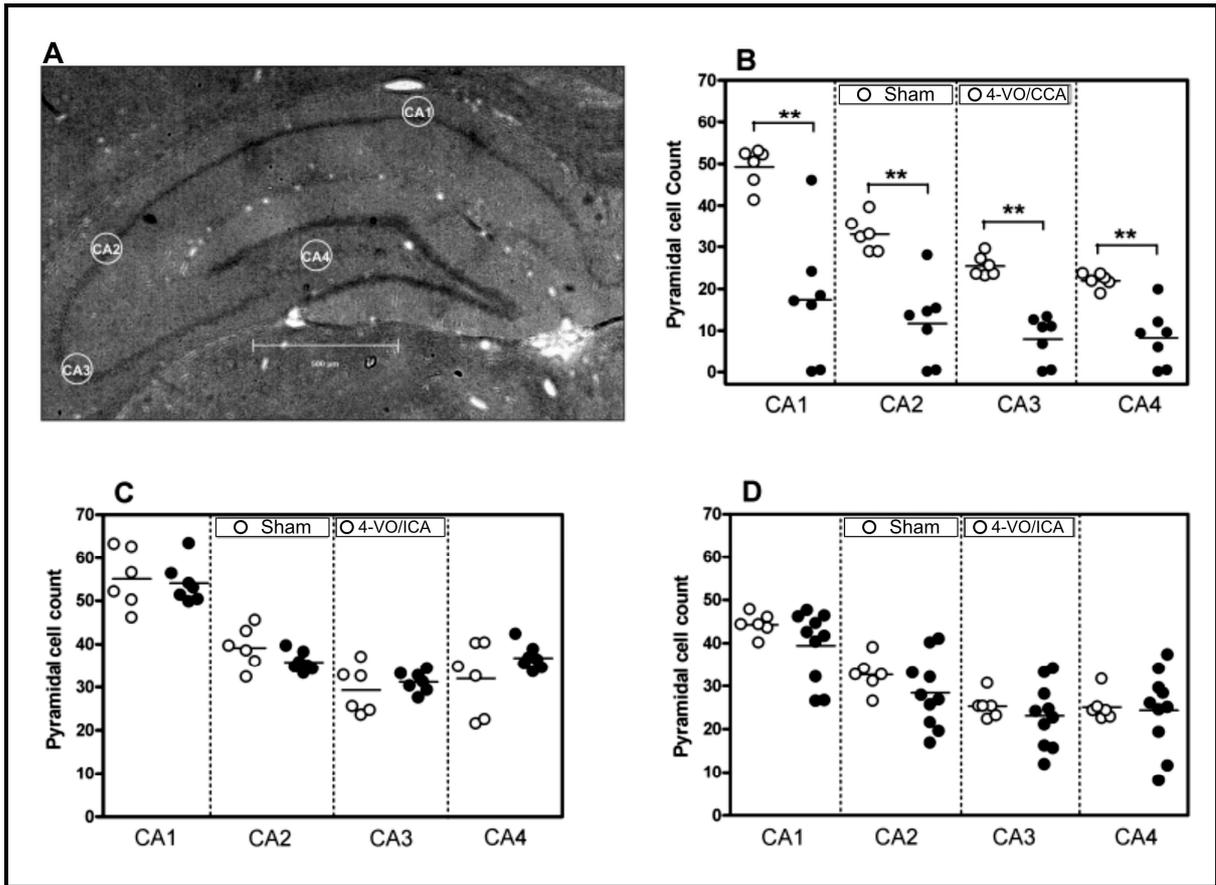


Figura 7- Efeitos dos procedimentos 4-VO/ACC (painel B) ou 4-VO/ACI (painel C = ratos jovens; painel D = ratos idosos, ICA = ACI) sobre a densidade de neurônios piramidais nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo (painel B - D). O painel A mostra um corte coronal e unilateral do hipocampo (coordenada estereotóxica: -3,80 mm, aumento 50X), indicando os pontos aproximados (círculos) onde a contagem de células piramidais foi realizada em cada uma das respectivas regiões. \* $P < 0,01$  vs “sham”.

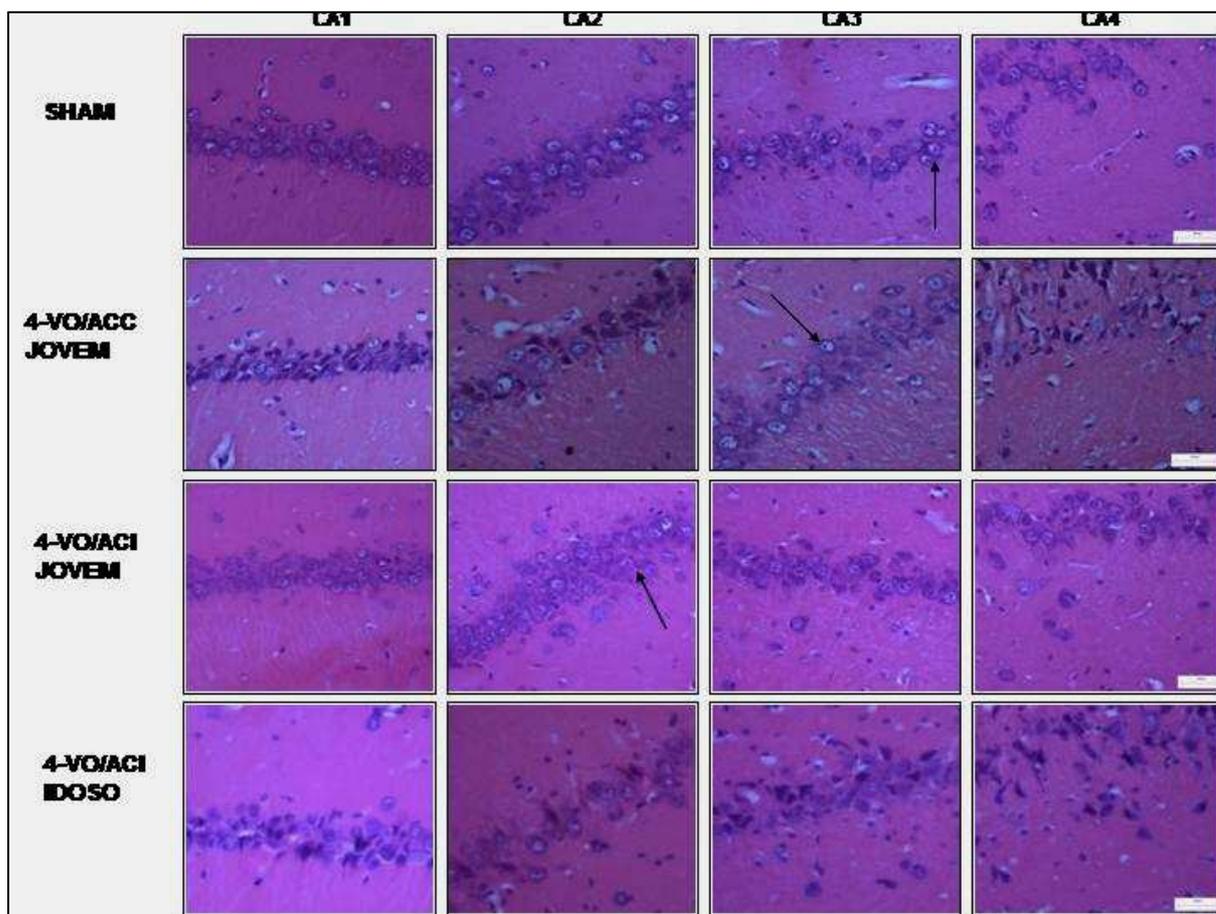


Figura 8- Fotomicrografias representativas de secções coronais de várias regiões do hipocampo de ratos representados na Fig. 7. As setas indicam neurônios piramidais considerados morfometricamente íntegros. Coloração: hematoxilina/eosina; objetiva 40X. Barra de calibração: 50  $\mu$ m.

#### 4.3.2 Na retina

A figura 9 mostra os efeitos dos procedimentos 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI crônicos sobre a integridade histomorfológica da retina. Todos os animais submetidos ao procedimento 4-VO/ACC apresentaram profundas alterações na estrutura das camadas celulares da retina, com destaque para a redução (qualitativa) na densidade de células da camada ganglionar (CCG) e redução na espessura ou mesmo desaparecimento das camadas plexiforme externa (CPE), nuclear interna (CNI), plexiforme interna (CPI) e nuclear externa (CNE). Os olhos de 3 animais não puderam ser aproveitados para análise devido dificuldades para se obter os cortes. De modo geral, tais alterações apresentaram-se bilateralmente, porém, não ao longo de

toda a extensão da retina. A lesões são mais freqüentes e intensas na região central da retina. Em contraste, nos animais submetidos à 4-VO/ACI, tanto jovem quanto idoso, não apresentaram nenhuma alteração estrutural que se assemelhasse àquelas observadas no grupo

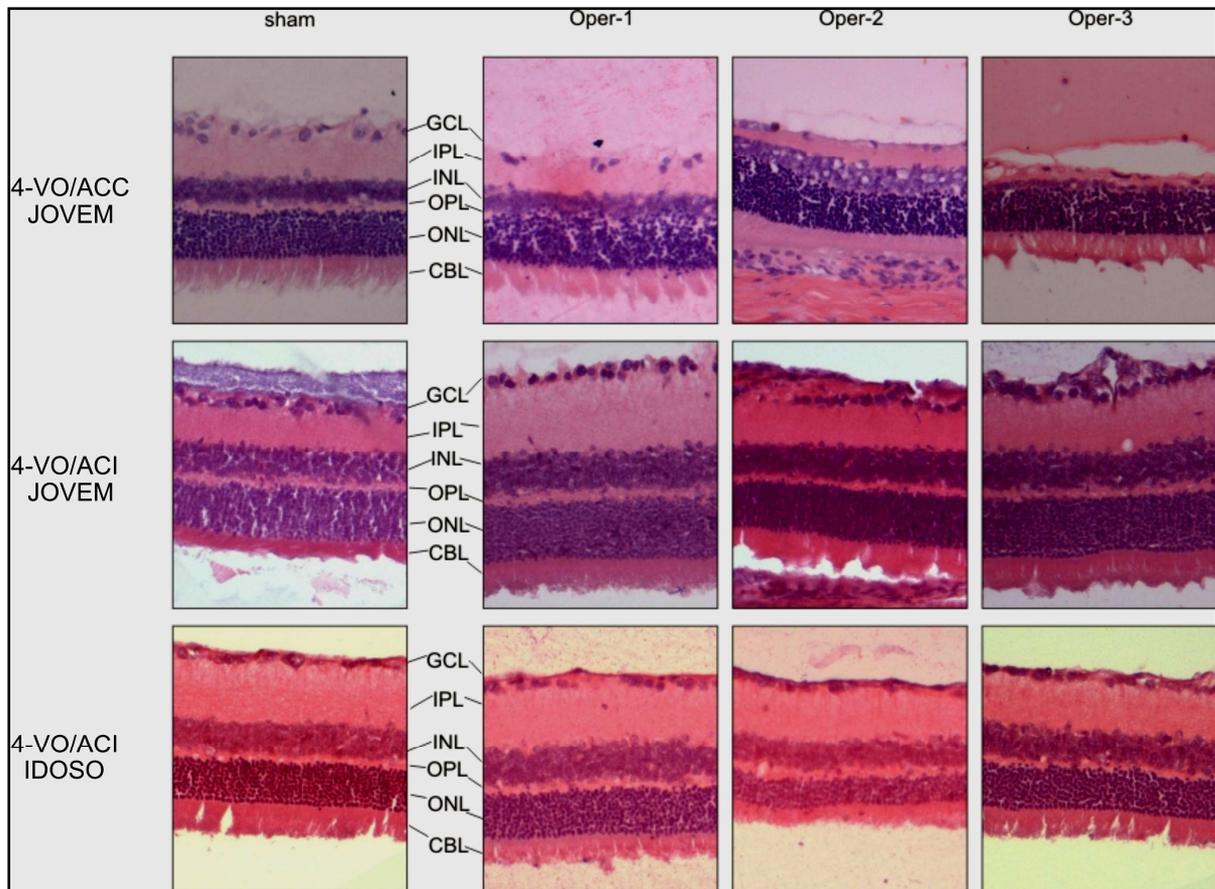


Figura 9- Fotomicrografias representativas da retina de ratos submetidos aos procedimentos 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI crônicos. Os animais “sham” mostram a organização das camadas de células ganglionares (CCG = GCL), plexiforme interna (CPI = IPL), nuclear interna (CNI = INL), plexiforme externa (CPE = OPL), nuclear externa (CNE = ONL) e cones e bastonetes (CCB = CBL). Os efeitos de 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI crônicos, em função da idade (margem esquerda) são mostrados por três animais operados (oper) de cada grupo, respectivamente (oper-1, oper-2 e oper-3). Nota-se claramente a desestruturação morfológica da retina nos animais submetidos ao 4-VO/ACC, em contraste aos animais submetidos ao modelo 4-VO/ACI, tanto jovem quanto idoso, cuja estrutura das camadas celulares parecem preservadas. Coloração: hematoxilina/eosina; objetiva 20X.

A Figura 10 ilustra a média (células/mm) do número de células ganglionares após 4-VO/ACC ou 4-VO/ACI. Uma redução significativa foi observada no grupo 4-VO/ACC ( $p = 0,04$  vs “sham”). Nos grupos submetidos ao procedimento 4-VO/ACI (jovens e idosos), o número de células ganglionares observado não foi diferente daquele encontrado para os respectivos grupos controles ( $p > 0,05$ ). Tal como ocorreu com os cérebros, os olhos dos ratos adultos (12 meses) também não puderam ser aproveitados para análise histológica da retina, em virtude de dificuldades técnicas durante a obtenção dos cortes histológicos.

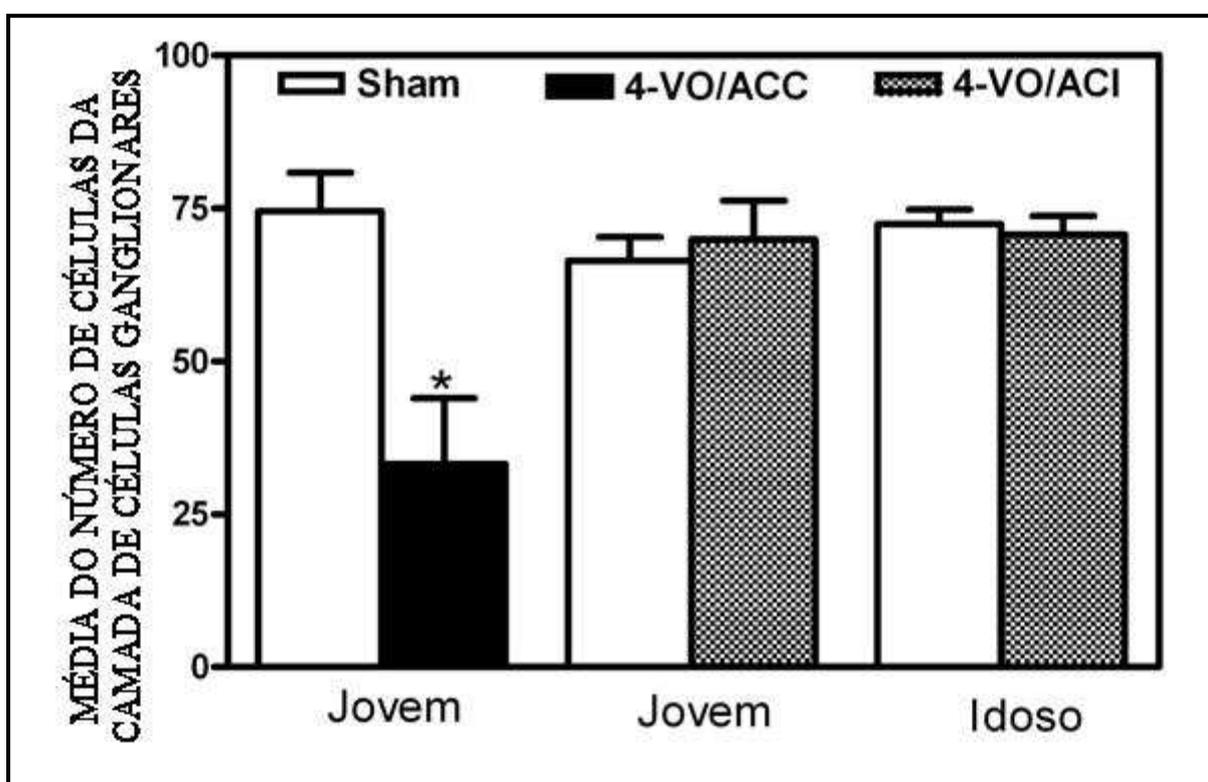


Figura 10 – Média do número de células na camada celular ganglionar (CCG) em função do conjunto de vasos ocluídos (4-VO/ACC ou 4-VO/ACI) e da idade dos animais. \* $P < 0,05$  vs “sham”.

## 5.0 DISCUSSÃO

O presente estudo é uma continuação de trabalhos anteriores do nosso laboratório cujo objetivo central é o desenvolvimento de um modelo animal de hipoperfusão cerebral crônica (HCC) e progressiva mediante a oclusão gradual dos 4-vasos (4-VO), o qual pudesse resultar em alterações cognitivas e neuropatológicas consistentes, sem a interferência de lesões visuais periféricas.

Em um estudo prévio do nosso laboratório (Neto et al., 2005) observamos que o modelo 4-VO/ACC quando imposto a ratos jovens, causa déficits cognitivos e lesão hipocampal, os quais se manifestam dentro de um período de 30 a 50 dias de 4-VO/ACC. Em contraste, nenhuma alteração comportamental ou neurohistológica pode ser encontrada quando o modelo 4-VO/ACI foi usado. Esses resultados foram reproduzidos no presente estudo, indicando claramente que as seqüelas produzidas no modelo 4-VO progressivo de hipoperfusão cerebral crônica (HCC) depende crucialmente do conjunto de vasos ocluídos. Em outras palavras, enquanto o procedimento 4-VO/ACC é capaz de deixar seqüelas funcionais e estruturais, o modelo 4-VO/ACI não. Nossos resultados comportamentais após 4-VO/ACC, concordam com aqueles descritos por (Plaschke et al., 1999) usando outros modelos comportamentais.

A julgar pelo grau de lesão hipocampal e déficit cognitivo observados em nossos estudos, é bem provável que o modelo 4-VO/ACC resulte em um grau de hipoperfusão cerebral mais severo que aquele causado no modelo 4-VO/ACI. Entretanto, a forma como o FSC é alterado ao longo do tempo após a oclusão crônica e progressiva dos 4 vasos, não é sabida (Plaschke et al., 2003). Independente disso, contudo, os dados do presente estudo confirmam nossos resultados anteriores no sentido de que o modelo 4-VO/ACC é capaz de causar seqüelas comportamentais e lesão neuronal consistentes. No que tange ao modelo 4-VO/ACC, entretanto, um dado importante do presente estudo refere-se à ocorrência de severa

degeneração retiniana, uma seqüela que não tem sido considerada nos estudos de Plaschke e colaboradores, embora seja bem documentada no modelo 2-VO (Davidson et al., 2000; Ohta et al., 1997; Osborne et al., 1999; 2004). No presente estudo, todos os animais cujos olhos se mantiveram viáveis para a análise histológica (4 de 7) sofreram profundas alterações na estrutura morfológica da retina. Esse resultado era esperado, pois a ocorrência de retinopatia e atrofia do nervo óptico têm sido consistentemente observadas no modelo 2-VO (Davidson et al., 2000; Ohta et al., 1997; Osborne et al., 1999; 2004). Portanto, é bastante provável que a deficiência de aprendizagem e memória observadas após 4-VO/ACC seja devido, pelo menos em parte, a uma deficiência visual causada pela oclusão dos vasos que irrigam o globo ocular, pois a realização da tarefa no labirinto radial baseia-se na utilização, pelo rato, da disposição espacial de pistas extra-labirinto. Portanto, esta seqüela visual representa uma limitação importante do modelo 4-VO/ACC quando a performance de aprendizagem e a memória espacial fizerem parte do protocolo experimental. De fato, tem sido observado que o desempenho cognitivo de ratos foi prejudicado após 2-VO quando os mesmos foram testados para a aprendizagem de tarefas espaciais no labirinto aquático de Morris, mas não quando testados em modelos de esquiva usando um estímulo sonoro como elemento condicionante (Asakura & Hirate, 1999).

Embora não seja sabido em que extensão o modelo 4-VO/ACC afeta as funções visuais mais que o modelo 2-VO, certamente, a oclusão das (AV) seguida da oclusão das (ACC) devem resultar em uma isquemia ocular completa e, portanto, mais severa (Osborne et al., 2004). Assim, se por um lado o modelo 4-VO/ACC mostra-se eficiente para provocar déficits cognitivos consistentes e duradouros (Neto et al., 2005; Plaschke et al., 1999; dados presentes), bem como neurodegeneração hipocampal (Neto et al., 2005; dados presentes), por outro, o comprometimento das funções visuais dificulta a interpretação dos resultados das

inter-relações entre hipoperfusão cerebral crônica, alterações neuropatológicas e/ou neuroquímicas e disfunções cognitivas.

Diferentemente dos efeitos causados pelo modelo 4-VO/ACC, o procedimento 4-VO/ACI não causou nenhuma alteração comportamental ou neurohistológica em ratos jovens e/ou adultos. Esses resultados confirmam novamente os dados anteriores do nosso laboratório (Neto et al., 2005). O novo dado é que o modelo 4-VO/ACI de hipoperfusão cerebral crônica não afeta a integridade estrutural da retina. Apesar disso, entretanto, não podemos descartar a possibilidade de alterações mais sutis da função visual, talvez em nível eletrofisiológico, sináptico, etc. Também não podemos desprezar a possibilidade de disfunções visuais caso a cronicidade de 4-VO/ACI seja aumentada para além de 30 a 50 dias. De fato, disfunções eletrofisiológicas e degeneração de fotorreceptores foram encontradas após nove meses, mas não após 3 meses de 2-VO (Osborne et al., 1999). Contudo, mesmo considerando a possibilidade de alterações visuais sutis após 4-VO/ACI, a despeito da aparente integridade morfológica da retina, o fato é que a capacidade de aprendizagem e memória não foi alterada no rato jovem. Dada a ausência de lesão hipocampal após 4-VO/ACI em ratos jovens, então a ausência de déficits cognitivos seja mais uma indicação de que as funções visuais não foram afetadas após 4-VO/ACI. Se o modelo 4-VO/ACI não deixa seqüelas visuais, uma questão interessante refere-se ao suprimento sangüíneo para os olhos, já que no presente modelo as artérias carótidas internas (ACI) foram ocluídas em um ponto anterior ao ramo da artéria pterigopalatina, a qual representa a via mais importante de suprimento sangüíneo para o olho do rato. Pelo menos no homem, sabe-se que as artérias facial, maxilar e meníngea média fazem importantes anastomoses com a artéria oftálmica, as quais funcionam como colaterais primárias frente a uma redução do fluxo sangüíneo para o olho. Além disso, as artérias carótidas interna e externa fazem conexão (Liebskind, 2003). Se tal arquitetura vascular colateral poderia estar presente ou ter um equivalente no rato não se sabe. Apesar dos

resultados do presente estudo indicarem a ausência de retinopatia após 4-VO/ACI crônico no rato, não descartamos a necessidade de estudos adicionais, incluindo o uso de parâmetros histoquímicos e/ou eletrofisiológicos, tal como tem sido feito no modelo 2-VO (Osborne et al., 1999).

Se por um lado o modelo 4-VO/ACI de hipoperfusão cerebral crônica não resulta em alterações cognitivas e neurodegeneração quando aplicado a ratos jovens ou adultos, o mesmo não ocorre em animais idosos. Nestes animais, a latência para encontrar o esconderijo no labirinto radial foi significativamente maior que aquela do grupo “sham”. O número de erros também foi maior, porém, sem atingir significância estatística. Apesar disso, a tendência para um déficit cognitivo mais expressivo parece consistente. De fato, se uma ANOVA para amostras repetidas é aplicada para cada grupo separadamente, sendo as ‘sessões’ de treino o único fator da ANOVA, verifica-se que o grupo “sham” apresenta uma boa performance de aprendizagem (efeito principal do treino), o que não ocorre com o grupo 4-VO/ACI. Esse dado indica que o modelo 4-VO/ACI em ratos idosos é capaz de causar deficiência cognitiva, ao contrário do que se observa em ratos jovens ou adultos. Portanto, comparado com os efeitos de 4-VO/ACC em ratos jovens, é possível que os efeitos observados no rato idoso após 40 a 55 dias de 4-VO/ACI representem o início de uma deficiência cognitiva leve, a qual poderia se tornar progressivamente mais severa à medida que a cronicidade de 4-VO/ACI aumenta. Algo semelhante ocorreu com o efeito da 4-VO/ACI sobre o hipocampo de ratos idosos. Embora a densidade de neurônios piramidais calculada pela média do grupo não tenha sido diferente entre os grupos “sham” e operado, alguns animais idosos com 4-VO/ACI apresentaram uma redução do número de células em todas as regiões hipocâmpais analisadas. Isto poderia refletir o início de um processo neurodegenerativo, cuja ocorrência deve estar associada ao grau de hipoperfusão cerebral crônica em cada indivíduo. Mais importante, o déficit cognitivo observado em ratos idosos após 4-VO/ACI ocorreu a despeito da aparente ausência de

retinopatia. Esses dados sugerem, portanto, que o déficit cognitivo causado pelo procedimento 4-VO/ACI em ratos idosos seja devido predominantemente a uma disfunção cerebral associada a hipoperfusão cerebral. É bem provável que tais conseqüências funcionais e estruturais resultantes do modelo 4-VO/ACI em ratos idosos tornem-se mais severas à medida que a cronicidade de 4-VO/ACI aumente ou o intervalo entre as oclusões diminua.

Com base nesses resultados, uma questão a se levantar é por quê o modelo 4-VO/ACI é capaz de causar seqüelas cognitivas e neuropatológicas no rato idoso, mas não no rato jovem, pelo menos durante o período de tempo transcorrido no presente estudo. Tem sido demonstrado que ratos adultos, com 12 meses de idade, são capazes de desenvolver uma pronunciada circulação arterial colateral para compensar a queda de FSC após 4-VO/ACC crônico (Plaschke et al., 2003; 2005). Similarmente, tem sido descrito que ratos jovens submetidos ao procedimento 2-VO por 6 meses, desenvolvem alterações na arquitetura vascular cerebral, as quais incluem arteriogênese, dilatação e tortuosidade da artéria basilar. Tais alterações coincidem com a normalização do FSC ao nível do controle (Choy et al., 2006).

Outro estudo mostra que em ratos jovens submetidos ao modelo 2-VO (oclusão das ACC) há redistribuição do FSC da porção infratentorial para a supratentorial do encéfalo. Entretanto, tal resposta não se desenvolve adequadamente no rato idoso (He et al., 1997). Usando o modelo 3-VO crônico (oclusão da artéria subclávia + carótidas comuns) verificou-se que o FSC se recupera ao nível do controle 9 semanas após 3-VO no rato jovem, mas não no rato idoso (De la Torre et al., 1992). Esses dados indicam que a capacidade do cérebro idoso para a auto-regulação do FSC diminui, tornando o cérebro mais vulnerável aos efeitos de um evento hipóxico/isquêmico. Isto concorda com as observações sobre o desenvolvimento de alterações escleróticas nos vasos cerebrais de ratos idosos, e que tais alterações associadas a idade devem dificultar uma resposta vasodilatatória adequada à redução de perfusão cerebral (He et al, 1997). Além disso, a idade avançada é um importante fator para o desenvolvimento de

uma série de alterações microvascular e metabólicas capazes de determinar o grau de comprometimento da reatividade vascular cerebral frente a uma série de estímulos neuronais, químicos e físicos (Farkas & Luiten, 2001).

## **6.0 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo demonstram que o modelo 4-VO/ACC em ratos jovens causa um importante déficit de aprendizagem e memória de tarefas espaciais medidas no labirinto radial aversivo e redução acentuada do número de células piramidais nas regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 do hipocampo. Entretanto, o modelo 4-VO/ACC resulta também em profundas alterações estruturais da retina, o que certamente, deve provocar deficiência visual importante ou mesmo cegueira. Este efeito torna o modelo 4-VO/ACC limitado para se estudar as inter-relações entre hipoperfusão cerebral crônica, distúrbios cognitivos, e alterações neuropatológicas e/ou neuroquímicas centrais. Em contraste, o modelo 4-VO/ACI não foi eficaz na produção de seqüelas cognitivas e/ou neurohistológicas quando aplicado em ratos jovens ou adultos. Diferente do modelo 4-VO/ACC, o modelo 4-VO/ACI não causou alterações morfológicas da retina. Por outro lado, quando aplicada a ratos idosos, o modelo 4-VO/ACI mostrou-se capaz de provocar alterações neuropatológicas e comportamentais, sem a influência de lesões do sistema visual. Em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que o modelo 4-VO/ACI em ratos idosos pode ser um modelo adequado para se estudar os aspectos neurodegenerativos relacionados a hipoperfusão cerebral crônica. Outras variáveis como a cronicidade de 4-VO/ACI e a redução do intervalo de tempo entre os estágios de oclusão devem ser determinantes para a validação do modelo 4-VO/ACI de hipoperfusão cerebral crônica e progressiva com vistas ao estudo do potencial terapêutico de drogas.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAKURA, W.; HIRATE, K. Permanent bilateral common carotid arterial ligation impairs visual but not auditory conditioned avoidance behavior in rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, v.21, p.85, 1999.

ATKINS, D. L. Cerebral blood flow. Chicago. Disponível em:  
<[http://sky.bsd.uchicago.edu/lcy\\_ref/synap/brainblood](http://sky.bsd.uchicago.edu/lcy_ref/synap/brainblood)>. Acesso em: 05 de Abril de 2008.

BENETOLI, A.; PAGANELLI, R. A.; LIMA, K. C. M.; GIORDANI, F.; CESTARI JUNIOR, L. A.; MILANI, H. Effects of tracolimus (FK506) on ischemia-induced brain damage and memory dysfunction in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.77, p.607-615, 2004.

CERCINETO, A. Acidente Vascular Cerebral. Disponível em:  
<<http://www.medstudents.com.br>>. Acesso em: 03 abril, 2008.

CHOY, M. K.; GANESAN, V.; THOMAS, D. L.; THORNTON, J. S.; PROCTOR, E.; KING, M. D.; VAN DER WEERD, L.; GADIAN, D. G.; LYTHGOE, M. F. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, v.26, p.1066-1075, 2006.

DAVIDSON, C. M.; PAPPAS, B. A.; STEVENS, W. D.; FORTIN, T.; BENNETT, S. A. L. Chronic cerebral hypoperfusion: loss of papillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration. *Brain Res.*, v.859, p.96-103, 2000.

DE LA TORRE, J. C.; FORTIN, T.; PARK, G. A. S.; BUTLER, K. S.; KOSLOWSKI, P.; PAPPAS, B. A.; SOCARRAZ, H.; SAUNDERS, J. K.; RICHARD, M. T. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. *Brain Res.*, v.582, p.186-195, 1992.

DE LA TORRE, J. C. Impaired brain microcirculation may trigger Alzheimer's disease. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, v.18, p.397-400, 1994.

DE LA TORRE, J. C. Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's Pathogenesis. *Neurobiol. Aging.*, v.21, p.331-342, 2000.

DE LA TORRE. Cerebrovascular gene linked to Alzheimer's disease pathology. *Trends Mol. Med.*, v.11(12), p.534-6, 2005.

DUGGAN, J.; GREEN, W. R. Ophthalmologic manifestations of carotid occlusive disease. *Eye*, v.5, p.226-238, 1991.

EKLÖF, B.; SIESJÖ, B. K. The effect of bilateral carotids occlusion up the blood flow and energy state of rat brain. *Acta Physiol. Scand.*, v.86, p.155-165, 1972.

FARKAS, E.; DE VOS, R. A. I.; JANSSEN STEUR, E. N. H. J.; LUITEN P. G. M. Are Alzheimer's disease, hypertension and cerebrocapillary damage related? *Neurobiol. Aging.*, v. 21, p.235-243, (2000 a).

FARKAS, E.; DE JONG, G. I.; APRÓ, E.; DE VOS, R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; LUITEN, P. G. M. Similar ultrastructural break-down of cerebrocortical capillaries in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and experimental hypertension. What is the functional link? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.903, p.72-82, (2000 b).

FARKAS, E.; DE JONG, G. I.; DE VOS, R. A. I.; JANSEN STEUR, E. N. H.; LUITEN, P.G.M. Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease, Parkinson's disease. *Acta Neurophatol.*, v.100, p.395-402, (2000c).

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. M. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progr. Neurobiol.*, v.64, p.575-611, 2001.

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. M.; BARIC, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.*, v.54, p.162-180, 2007.

HE, Z.; IBAYASHI, S.; SUGIMORI, H.; FUJII, K.; SADOSHIMA, S.; FUJISHIMA, M. Age-related ischemia in the brain following bilateral carotid artery occlusion-collateral blood flow and brain metabolism. *Neurochem. Res.*, v. 22, p.37-42, 1997.

IADECOLA, C.; GORELICK, P. B. Converging pathogenic mechanisms in vascular and neurodegenerative dementia. *Stroke*, v.34, p.335-337, 2003.

KALARIA, R. N. Small vessel disease and Alzheimer's dementia: Pathological considerations. *Cerebrovasc. Dis.*, v.13, p.48-52, 2002.

LAVINSKY, D.; ARTENI, N. S.; ACHAVAL, M.; NETTO, S. A. Chronic bilateral common artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v.244, p.199-204, 2006.

LIEBESKIND, D. S. Collateral circulation. *Stroke*, v.34, p.2279-2284, 2003.

MEYER, J. S.; RAUGH, G.; RAUGH, R. A.; HAQUE, A. Risk factors for cerebral hypoperfusion, mild cognitive impairment, and dementia. *Neurobiol. Aging.*, v.21, p.161-169, 2000.

NETO, C. J. B. F.; PAGANELLI, R. A.; BENETOLI, A.; LIMA, K. C. M.; MILANI, H. Permanent, 3-stage, 4-Vessel Occlusion as a Model of Chronic and Progressive Brain Hypoperfusion in Rats: A Neurohistological and Behavioral Analysis. *Behav. Brain Res.*, v.160, p.116-126, 2005.

OHTA, H.; NISHIKAWA, H.; KIMURA, H.; ANAYAMA, H.; MIYAMOTO, M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neurosci.*, v.79, p.1039-1050, 1997.

OSBORNE, N. N.; SAFA, R.; MARK, S. N. Photoreceptors are preferentially affected in the rat following permanent occlusion of the carotid arteries. *Vision Research.*, v.39, p.3995-4002, 1999.

OSBORNE, N. N.; CASSON, R. J.; WOOD, J. P. M.; CHIDLOW, G.; GRAHAM, M.; MELENA, J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progr. Retinal and Eye Res.*, v.23, p.91–147, 2004.

PAGANELLI, R. A.; BENETOLI, A.; LIMA, K. C. M.; FAVERO FILHO, L. A.; MILANI, H. A novel version of the 8-arm radial maze: effects of cerebral ischemia on learning and memory. *J. Neurosc. Meth.*, v.132, p.9-18, 2004.

PLASCHKE, K.; RANNEMBERG, T.; BAUER, J.; WEIGAND, M.; HOYER, S.; BARDENHEUER, H. J. The effect of stepwise cerebral hypoperfusion on energy metabolism and amyloid precursor protein (APP) in cerebral cortex and hippocampus in the adult rat. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, v.6, p.826, 1997.

PLASCHKE, K.; YUN, S-W.; MARTIN, E.; HOYER, S.; BARDENHEUER, H. J. Interrelation between cerebral energy metabolism and behaviour in a rat model of permanent brain vessel occlusion. *Brain Res.*, v.830, p.320-329, 1999.

PLASCHKE, K.; SOMMER, C.; FAHRNER, A.; AMANN, K.; MARTIN, E.; BARDENHEUER, H. J.; KNAUTH, M. Pronounced arterial collateralization was induced after permanent rat cerebral four-vessel occlusion. Relation to neuropathology and capillary ultrastructure. *J. Neural. Transm.*, v.110, p.719-732, 2003.

PLASCHKE, K. Aspects of ageing in chronic cerebral oligoemia. Mechanisms of degeneration and compensation in rat models. *J. Neural. Transm.*, v.112, p.393–413, 2005.

SACCO, R. L. Patogênese, classificação e epidemiologia das doenças vasculares cerebrais. In: ROWLAND, L. P. *Merrit tratado de neurologia*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.184-195, 1999.

SARTI, C.; PANTONI, L.; BARTOLINI, L.; INZITARI, D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: What can be learned from experimental models. *J. Neurol. Sci.*, v.203-204, p.263-266, 2002.

STROKE CENTER. Acute ischemic stroke: new concepts of care. Disponível em: <[http://www.strokecenter.org/education/ais\\_vessels](http://www.strokecenter.org/education/ais_vessels)>. Acesso em: 05 de abril de 2008.