

COMPARAÇÃO BILATERAL DA QUANTIFICAÇÃO NEURONAL DO CÓRTEX PARIETAL E RETROSPLENIAL DE RATOS DE MEIA IDADE SUBMETIDOS À HIPOPERFUSÃO CEREBRAL CRÔNICA

ACCO, Anauê¹
PEREIRA, Francine Martins²

RESUMO

Lesões cerebrais, principalmente nas regiões envolvidas em aspectos cognitivos e comportamentais, são observadas no modelo experimental de doenças neurodegenerativas associadas a hipoperfusão cerebral crônica (modelo 4VO-ACI). Tanto o córtex quanto o hipocampo – regiões envolvidas neste processo – recebem pouca vascularização, refletindo em perda neuronal e consequentemente em amnésia retrógrada. No entanto, não há relatos de que esta lesão ocorra igualmente em ambos os hemisférios. Objetiva-se assim verificar se a neurodegeneração encontrada ocorre de forma igualitária no córtex parietal e retrosplenial entre os hemisférios cerebrais de animais submetidos a este modelo. Para tanto, ratos Wistar de meia idade foram submetidos ao modelo 4-VO/ACI com intervalo entre as oclusões de 4 dias e cronicidade das mesmas de 30 dias. Após este período, lâminas histológicas da região hipocampal foram confeccionadas e a contagem dos neurônios intactos realizada. Verifica-se que a neurodegeneração foi homogênea quando comparado intra-grupo, fato este que direciona ao mecanismo de homogeneidade da lesão.

PALAVRAS-CHAVE: modelo 4-VO/ACI, cortex parietal, cortex retrosplenial.

BILATERAL COMPARISON OF MEASUREMENT OF NEURONAL PARIETAL AND RETROSPLENIAL CORTEX OF RATS AGED UNDERGOING CHRONIC CEREBRAL HYPOPERFUSION

ABSTRACT

Brain lesions, especially in regions involved in cognitive and behavioral aspects are observed in the experimental model of neurodegenerative diseases associated with chronic cerebral hypoperfusion (4VO - ACI model). Both the cortex and the hippocampus - regions involved in this process - receive little vascularization, reflecting neuronal emperda and consequently in retrograde amnesia. However, there are no reports that this injury occurs equally in both hemispheres. The objective is to check that neurodegeneration is found equally in perietalretrosplenial cortex and between the cerebral hemispheres of animals subjected to this model. For this purpose, Wistar rats were subjected to middle age 4-VO/ACI model with occlusion in the range of 4 days and chronicity of the same 30 days. After this period, histological slides were prepared from the hippocampal region and the count of intact neurons held. It appears that neurodegeneration was homogeneous when compared intra-group, a fact that drives the homogeneity of the injury mechanism.

KEYWORDS: 4-VO/ACI model, parietal cortex, retrosplenialcortex

1 INTRODUÇÃO

O termo demência refere-se a uma disfunção cerebral (cortical e subcortical) crônica e progressiva que resulta num complexo declínio cognitivo (RITCHIE E LOVESTORE, 2002; Vicente, 2008). Via de regra, os quadros de demência estão associados à idade avançada, sendo sua prevalência dobrada a cada 5 anos a partir dos 65 anos de idade, afetando aproximadamente 40% dos idosos entre 90 e 95 anos (HANSSON ET AL., 2006; VICENT, 2008).

A diminuição do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) ocorre no envelhecimento normal, podendo esta levar a um declínio das funções cognitivas, porém, sem caracterizar um estado de demência. O conceito de hipoperfusão cerebral infere que a quantidade de sangue que supre o cérebro é reduzida a um ponto minimamente crítico, a partir do qual as necessidades metabólicas do tecido cerebral deixam de ser atendidas, quando então se instala uma crise energética em termos do suprimento de glicose e oxigênio (DE LA TORRE, 2000). Uma vez atingido esse limiar de redução do FSC em algumas regiões do cérebro (ex., hipocampo e córtex entorinal), particularmente no idoso, surgem os primeiros sinais de disfunções cognitivas, caracterizados principalmente por amnésia (DE LA TORRE, 2009).

Desde que se estabeleceu uma provável relação entre a HCC e déficits cognitivos, modelos animais foram desenvolvidos na tentativa de se investigar alguns aspectos daquele fenômeno. O desenvolvimento de modelos animais para doenças neurodegenerativas associadas à insuficiência vascular cerebral crônica é uma questão importante e clinicamente relevante, uma vez que a HCC é uma consequência final (“end point”) em diversas doenças cardiovasculares e metabólicas, incluindo parada cardíaca, doença coronariana, infarto do miocárdio, aterosclerose das ACI, hipertensão, diabetes, entre outras (ROHERET ET AL. 2003).

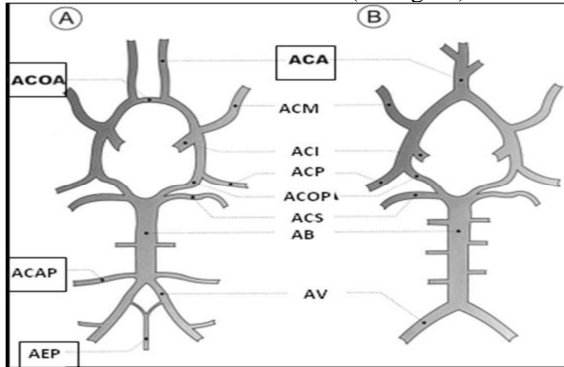
A reprodução de condições que se assemelhem à HCC no ser humano foi alcançada mediante a oclusão permanente das ACC em ratos, o que representa, provavelmente, o primeiro modelo relatado na literatura, e classicamente referido como modelo 2-VO (EKLÖF E SIESJÖ, 1972). Este modelo tem sido muito utilizado para se estudar as alterações neuropatológicas, bioquímicas e comportamentais provocadas pela HCC e suas semelhanças com o que se observa na clínica (DE JONG ET AL., 1999; FARKAS E LUITEN, 2001; FARKAS ET AL., 2007). A despeito das diferenças interespecies, a utilidade dos modelos animais para se estudar a fisiopatologia da doença

¹Acadêmica de Medicina. Faculdade Assis Gurgacz. anaue_nene@hotmail.com

²Bióloga. Mestre em Fisiologia e Doutora em Ciências Farmacêuticas. Faculdade Assis Gurgacz. francine@fag.edu.br

cerebral isquêmica é real, pelo menos em parte, dada a similaridade da topografia vascular cerebral observada entre o homem e o rato. A Figura 1 denota essa similaridade.

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. As principais diferenças entre o homem e o rato encontram-se evidenciadas (retângulo). Modificado a partir de Farkas e Luiten (2001).



Com base nessas limitações dos modelos 2-VO/ACC, 2-VO/ACI e 4-VO/ACC em virtude de lesões oculares (o que impossibilita testes de memória) e não reprodutibilidade de resultados e inspirado nos trabalhos de Plaschke e cols., foi proposta a possibilidade de desenvolver um modelo de HCC que fosse capaz de provocar tanto alterações neuropatológicas quanto deficiências cognitivas, porém, sem a influência de alterações visuais. Desses estudos nasceu o modelo 4-VO/ACI permanente de três estágios, e referido como modelo 4-VO/ACI (NETO ET AL., 2005; BARROS ET AL., 2009). Pereira et al. (2012) produziu neste modelo, através de intervalo entre as oclusões (IEO) de 4 dias e cronicidade de 30 dias e a utilização de ratos de meia idade, neurodegeneração cortical e hipocampal e déficit cognitivo (aprendizagem e memória) consistentes para o sucesso do modelo; ambos, neurodegeneração e deficiência cognitiva serão os principais parâmetros a serem usados para se medir os efeitos cerebroprotetores de drogas, uma vez que (FERREIRA ET AL., 2011).

A natureza progressiva de 4-VO/ACI (isto é, AV→ACI→ACI) pode exercer um efeito de pré-condicionamento isquêmico, de modo que uma fase anterior de oclusão pode minimizar ou mesmo neutralizar os efeitos da próxima fase, e assim por diante. Se este raciocínio for correto, o pré-condicionamento poderia fornecer ao cérebro mecanismos que permitam uma auto-regulação mais eficiente do FSC ou ativar processos de neuroproteção celular, impedindo assim, o desenvolvimento de sequelas estruturais (neurodegeneração) e funcionais (amnésia). Tem sido observado também que o efeito neuroprotetor e de plasticidade oferecido pelo pré-condicionamento isquêmico parece ser anulado pelo envelhecimento (HE ET AL., 1997).

Quando verifica-se a neurodegeneração gerada pelo modelo 4-VO/ACI no córtex parietal e retrosplenial, questiona-se se a mesma ocorre dentro de uma homogeneidade nos hemisférios corticais, o que leva ao objetivo deste, comparando-se entre os hemisférios nas regiões supracitadas, a existência de tal diferença.

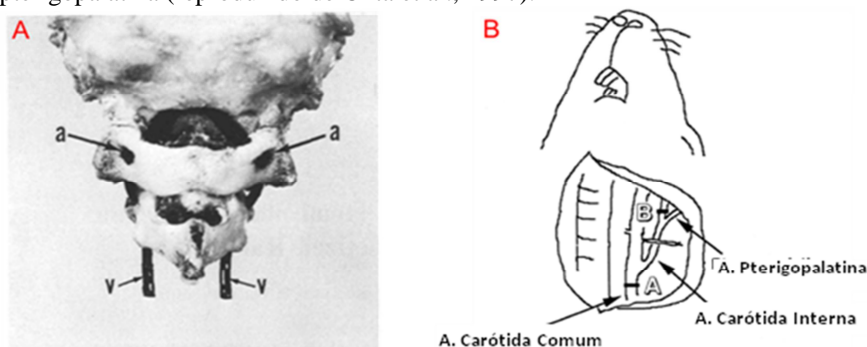
2 METODOLOGIA

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM (protocolo nº 042/2007), foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar machos entre 12 a 15 meses de idade, sendo 10 deles designados ao grupo controle (operados, mas sem nenhuma oclusão de vasos). Os demais foram submetidos ao procedimento 4-VO/ACI (grupo 4-VO/ACI, ver item 2.3 para procedimento cirúrgico). Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UEM e alojados em Biotério Setorial da FAG. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendem às 07:00), exaustor para renovação do ar e com ingestão de ração e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à oclusão permanente das AVs e ACIs, sendo anestesiados pela associação de Quetamina (15mg/kg) e Xilazina (1,0mg/kg), administrados por via intramuscular. Após fixação auricular do animal na base de um aparelho estereotático, uma incisão longitudinal medindo 3 cm foi realizada na porção cervical dorsal para expor o forame alar, localizado na primeira vértebra cervical. Os músculos adjacentes foram dissecados e a ponta de um eletrocautério foi introduzida no forame alar e girada delicadamente até que a presença de hemorragia comprovasse o rompimento das AV bilateralmente, a qual foi prontamente estancada mediante a aplicação de uma corrente elétrica (3 mA).

Nessas condições, as AVs foram consideradas permanentemente ocluídas. A incisão foi suturada com fio de algodão e o animal devolvido ao biotério setorial. Passados 4 da primeira etapa cirúrgica (estágio 2-VO), os animais distribuídos nos seus respectivos grupos experimentais foram novamente anestesiados e submetidos à oclusão permanente da 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, após 4 dias a ACI esquerda foi ocluída, completando, assim, a sequência AV → ACI → ACI (modelo 4-VO/ACI de 3 estágios). Os animais dos grupos controles (“sham”) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém, sem oclusões. As localizações dos pontos de oclusão estão representadas na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática dos locais cirúrgicos para a oclusão permanente dos 4 vasos. Em A, visão dorsal do rato demonstrado os forames alares (a) por onde passam as artérias vertebrais (v) (Reproduzido de Pulsinelli & Brierly, 1979). Em B, desenho mostrando a posição relativa das artérias carótida comum, carótida interna e pterigopalatina (reproduzido de Ohta et al., 1997).



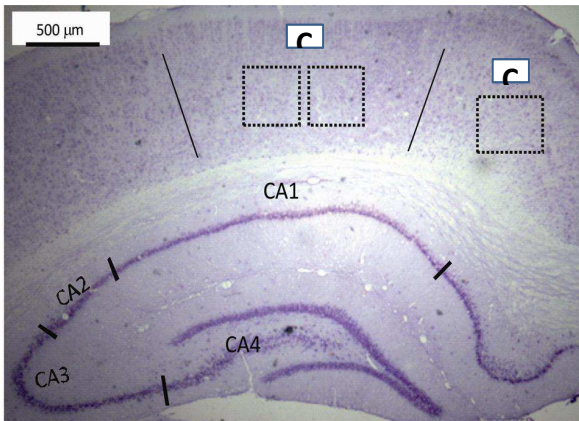
Um dia após o término da cronicidade, os animais foram submetidos à anestesia profunda (Tiopental, 50 mg/kg, i.p.) e em seguida, sofreram perfusão transcárdiacamente com solução salina (0,9%) e solução de Bouin durante 5 minutos (20 ml/min). Durante o procedimento, as soluções foram mantidas a 1-2°C e a cabeça, após decapitada, mantida em banho de gelo (2-4 °C) durante 3 horas para evitar o aparecimento dos chamados “neurônios negros” (“dark neurons”, Cammermeyer, 1961). Os neurônios negros, hiper cromáticos, aparecem mesmo no animal controle quando o cérebro, ainda fresco e metabolicamente viável, sofre algum tipo de trauma mecânico (por ex., elevada pressão de perfusão, traumatismo causado pela espátula no ato da extração, etc.). Também podem aparecer quando a perfusão *in situ* não é adequada e o tecido não perfundido é traumatizado. A presença de neurônios negros gera resultados de neurodegeneração falso-positivos, pois sua morfologia e coloração muito se assemelham a dos neurônios em vias de morte devido, por exemplo, à isquemia.

Após extração, o diencéfalo de cada animal foi dividido em 2 partes e mantido em solução fixadora de Bouin, inicialmente por 2 horas ou até a sua desidratação em álcool. As partes seccionadas do cérebro (próximo ao quiasma óptico) foram emblocadas em parafina para corte em micrótomo rotativo (Olympus, CUT 4055). Para cada cérebro, doze secções coronais (7 µm de espessura) semi-sequenciais (70 µm aparte) foram obtidas em um nível estereotático equivalente a 3,60 - 4,30 mm posterior ao bregma (Paxinos & Watson, 1998). Dispostas em lâminas gelatinizadas, as secções foram processadas para desidratação, diafanização e subsequentemente coradas pelo método de Nissl (cresil violeta). Para a contagem neuronal, utilizou-se o procedimento relatado por Ferreira et al. (2011) como descrito a seguir.

No córtex cerebral, as células piramidais foram contadas em duas regiões: córtex retrosplenial (CR) e córtex parietal (CP), conforme mostrado na Figura 3. Usando uma objetiva de 40x (microscópio binocular, Olympus BX 41), uma área no CR e duas áreas no CP foram digitalizadas (361 x 270 µm²) e capturadas através de uma câmera de alta performance (QColor3, Ontario, Canada) acoplada ao microscópio. Em cada área digitalizada, neurônios piramidais aparentemente normais foram marcados (clicados), conforme critérios descrito acima para o hipocampo, e seu somatório realizado automaticamente. Para cada animal, portanto, o número final de neurônios estimado no CR é dado pela média dos três campos (1 área x 1 hemisfério x 3 cortes). No CP, o número final de neurônios piramidais é dado pela média de 06 mensurações (2 áreas x 1 hemisfério x 3 cortes). A Figura 3 ilustra um corte coronal do cérebro de um animal controle (“sham”) para mostrar a localização das áreas de contagem neuronal no cortex parietal e retrosplenial.

Para a quantificação, os valores individuais foram transformados em percentual. Para tanto, o valor médio de cada grupo controle, respectivamente, como que valendo 100%. A identificação dos grupos não foi revelada durante o processo de contagem neuronal.

Figura 3: Microfotografia em pequeno aumento (objetiva 5x) para mostrar o córtex cerebral logo acima, onde o número de neurônios piramidais aparentemente normais foi estimado. Também pode-se observar a região hipocampal e suas subregiões (CA1, CA2, CA3 e CA4) (modif. de Pereira et al., 2012).



Primeiramente, os dados foram examinados quanto aos princípios de distribuição normal (“D’AGOSTINHO E PEARSON OMNIBUS TEST”, ou o TESTE DE SHAPIRO-WILK) e homogeneidade de variância, isto é, homocedasticidade (TESTE DE LAVENE). Se os dados não obedecem aos preceitos de distribuição normal e homocedasticidade, estatísticas não-paramétricas são recomendadas para quantificar os resultados. Com relação aos dados histológicos, nem a distribuição normal nem a homocedasticidade foram encontrados entre os grupos. Neste caso, a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis seguida pelo teste *post-hoc* de Dunn foi utilizada. Em todos os testes estatísticos utilizados, a significância foi estabelecida quando um $p \leq 0,05$ foi alcançado.

3 RESULTADOS

A figura 4 mostra a magnitude de neurodegeneração ao longo dos subcampos do córtex parietal e retrosplenial em virtude do IEO de 4 dias e cronicidade de 30 dias. Verificam-se diferenças significativas nas comparações entre os grupos 4-VO/ACI e sham, mas quando comparam-se intragrupos, ou seja o mesmo grupo com relação aos hemisférios, tal diferença não é verificada. Esta significância comprova-se nos resultados obtidos por Pereira et al (2012), porém indica homogeneidade da lesão ao não se detectar diferenças bilaterais.

Figura 4: Efeito do 4-VO/ACI permanente de 3 estágios sobre o número de neurônios piramidais no córtex parietal e retrosplenial o com IEO de 4 dias e cronicidade de 30 dias. Em cada rato, a média das células hipocampais foi obtida de 3 mensurações (1 hemisfério x 3 secções coronais) e comparadas entre o hemisfério direito e esquerdo. Cada valor individual foi transformado em percentagem em relação ao grupo sham (100%). * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ para CP vs. shans e # $p < 0,05$ para CRP vs. shans.



4 DISCUSSÃO

É importante observar que a lesão (neurodegeneração) cortical ocorre em ratos de meia idade, mas não em ratos jovens, como publicado por Ferreira et al. (2011). Este dano cerebral mais extenso, envolvendo o circuito hipocampo-córtex em ratos de meia-idade pode explicar, pelo menos parcialmente, por que estes ratos, mas não ratos jovens apresentam comprometimento cognitivo após 4-VO/ACI. Uma discussão mais detalhada sobre o papel dos circuitos

hipocampal-córtex, principalmente o papel do córtex pré-frontal na mediação da memória de trabalho também pode ser encontrada no estudo de Ferreira et al. (2011).

O circuito córtex-hipocampo está intimamente correlacionado às memórias de curto e longo prazo (IZQUIERDO ET AL., 1998a), e diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com o hipocampo para regular a aquisição e o armazenamento de nova informação (IZQUIERDO ET AL., 1998b).

Soares (2012) relata que após a lesão isquêmica, pela capacidade limitada do Sistema Nervoso Central (SNC) de se regenerar, os déficits funcionais geralmente são incapacitantes e permanentes. A incapacidade de regeneração decorre, dentre outros fatores, do acúmulo de proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) no local da lesão. No entanto, esta lesão pode ser homogênea ou não nos locais encefálicos abrangidos pela isquemia. Evidências indicam que o ATP e a adenosina desempenham um importante papel em mecanismos de plasticidade sináptica e na formação da memória (IZQUIERDO ET AL., 1998a), indicando que a deficiência no FSC proporcionou sequelas neste aporte de forma homogênea, repercutindo em lesões bilaterais uniformes.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a neurodegeneração ocasionada pelo modelo 4-VO/ACI com intervalo de 4 dias e cronicidade de 30 dias reflete-se em lesão homogênea e uniforme. Novos estudos devem ser seguidos, estudando-se como influências externas podem repercutir em uma possível alteração angiogênica.

REFERÊNCIAS

BARROS, C.A.; EKUNI, R.; MORO, M.A.; PEREIRA, F.M.; PEREIRA, M.A.S.; MILANI, H. The cognitive and histopathological effects of chronic 4-vessels occlusion in rats depend on the set of vessels occluded and the age of the animals. **Behavioural Brain Research**, v.197, p.378-387, 2009.

DE JONG, G.I.; FARKAS, E.; STIENSTRA, C.M.; PLASS, J.R.M.; KEUSER, J.N.; DE LA TORRE, J.C.; LUITEN, G.M. Cerebral Hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. **Neuroscience**, v.91 (1): 203-210, 1999.

DE LA TORRE, J.C. Carotid artery ultrasound and echocardiography testing to lower the prevalence of Alzheimer's disease. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.**, v.18, p. 319-328, 2009.

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.

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.; 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.

FERREIRA, E.D.F.; ROMANINI, C.V.; MORI, M.A.; OLIVEIRA, R.M.W.; MILANI, H. Middle-aged, but not young, rats develop cognitive impairment and cortical neurodegeneration following the four-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion. **Eur J. Neurosci**, v.34, p. 1131-40, 2011.

HANSSON, O.; ZETTERBERG, H.; BUCHHAVE, P.; LONDOS, E.; BLENNOW, K.; MINTHAN, L. Association between CFS biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 228-234, 2006.

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.

- IZQUIERDO, I. Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. *PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 10279-10384, 2008.
- IZQUIERDO, I. ; CAMMAROTA, M. ; da Silva, W.C. ; BEVILAQUA, L.R.M. ; ROSSATO, J. I. ; BONINI, J. S. ; MELLO, P. ; BENETTI, F. ; MEDINA, J.H. . The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 80, p. 115-1267, 2008.
- 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.
- PAXINOS, G.; WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Edn Academic Press**, San Diego, 1998.
- PEREIRA, F.M.; FERREIRA, E.D.F.; OLIVEIRA, R.M.W.; MILANI, H. Time-course of neurodegeneration and memory impairment following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery modelo f chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats. *Behavioural Brain Res.*, v. 229 (2), p. 340-348.
- RITCHIE, K; LOVESTORE, S. The dementias. *The Lancet*, v.30, p.1759-1764, 2002.
- ROHER, A.E.; ESH, C.; KOKJOHN, T.A.; KALBACK, W.; LUEHRS, D.C.; SEWARD, J.D. Circle of Willis atherosclerosis is a risk factor for sporadic Alzheimer's disease. *ArteriosclerThromb Vasc. Biol.*, v. 23, p. 2055-2062, 2003.
- SOARES, Soanne Chyara da Silva. Indução de plasticidade cerebral por remoção da matriz extracelular após lesão isquêmica no córtex sensorio-motor de ratos. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2012. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.
- VICENTE, E. Avaliação dos parâmetros astrogliais e comportamental de ratos submetidos à hipoperfusão cerebral crônica. 2008. 66 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.