

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

João Victor Matos e Moreira

**EFEITOS DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE EM RATOS
HIPERTENSOS**

Porto Alegre

2022

João Victor Matos e Moreira

EFEITOS DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE EM RATOS

HIPERTENSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira, João Victor Matos e
Efeitos de isquemia cerebral focal permanente em
ratos hipertensos / João Victor Matos e Moreira. --
2022.
42 f.
Orientador: Diogo Onofre Gomes de Souza.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. acidente vascular encefálico. 2. bioquímica. 3.
hipertensão arterial. I. Souza, Diogo Onofre Gomes de,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Às sutis e não sutis causas e condições que, desde a minha infância, conduziram-me a esse caminho (os armários cheios de livros, a introspecção, o gosto pelas ciências, a admiração pelos professores e a ambição de me tornar um).

À todos os colegas e amigos que conheci no Rio Grande do Sul, com quem compartilhei abraços, risadas e muito chimarrão.

Com muito carinho, aos colegas e professores da FURG – São Lourenço do Sul, pelos felizes momentos vividos e pela inspiração, incentivo e apoio para que pudesse realizar a pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e incentivado durante essa trajetória.

Aos colegas e professores do laboratório 28 (Bioquímica – UFRGS), que me acolheram com muito carinho e com quem pude compartilhar momentos preciosos antes da pandemia do COVID-19.

Aos preciosos amigos Felippo Bifi, Fernanda Teixeira e demais colegas do LCMC (IC-FUC) pelos abraços, risadas e almoços.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e à oportunidade de estudar em uma universidade pública de qualidade.

Por último e, certamente mais importante, agradeço à minha orientadora Dra. Francieli Rohden, por me receber em seu grupo, por ter me ensinado e me acompanhado em todas as etapas da realização do presente trabalho e pelo apoio em diversas etapas da minha vida profissional e pessoal em Porto Alegre (até mesmo nas minhas mudanças). Uma pessoa de luz, que merece todo reconhecimento do mundo.

SUMÁRIO

PARTE 1	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Acidente vascular encefálico	10
1.2 Fluxo sanguíneo cerebral.....	11
1.3 Hipertensão arterial e alterações neurovasculares	12
1.4 Modelos animais de acidente vascular encefálico.....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
PARTE 2	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Aspectos éticos	17
3.2 Animais.....	17
3.3 Cirurgia de isquemia focal permanente	18
3.4 Teste do cilindro	19
3.5 Teste de remoção de adesivo	19
3.6 Tarefa do campo aberto	20
3.7 Volume da lesão isquêmica	20
3.8 Análises estatísticas	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Teste do cilindro	22
4.2 Teste de remoção de adesivo	23

4.3 Tarefa do campo aberto	25
4.4 Volume da lesão	27
PARTE 3	29
5. DISCUSSÃO	30
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	35
REFERÊNCIAS	36

PARTE 1

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma enfermidade decorrente da redução ou interrupção do fluxo sanguíneo cerebral, resultando em morte celular e deficits cognitivos e sensoriomotores. É uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo. Após um AVE, é formada uma zona central de dano tecidual irreversível (núcleo isquêmico) e uma região recuperável em volta do núcleo, denominada zona de penumbra. A hipertensão arterial sistêmica (HAS), caracterizada pelo aumento persistente da pressão arterial, é o principal fator de risco para o AVE e afeta negativamente a progressão da doença e a resposta ao tratamento. A HAS provoca uma série de alterações neurovasculares, como espessamento da parede de grandes artérias cerebrais, disfunção da barreira hematoencefálica e alteração de mecanismos de controle do fluxo sanguíneo cerebral. É importante utilizar modelos animais com comorbidades na pesquisa pré-clínica em AVE, de forma a torná-la mais translacional. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de um modelo de AVE isquêmico focal permanente em ratos hipertensos sobre a função sensoriomotora e volume da lesão cerebral isquêmica. A pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Cardiologia, registrada nos protocolos UP 5806/20 e UP 5850/20. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar Kyoto (WKY - controle) machos adultos foram anestesiados e submetidos a isquemia cerebral focal permanente por termocoagulação dos vasos piais. Avaliações comportamentais foram realizadas ao longo de 42 dias para determinar a recuperação sensoriomotora e a memória de habituação. No teste do cilindro, os animais apresentaram assimetria dos membros anteriores e observou-se uma recuperação total da simetria dos ratos normotensos (WKY), mas não houve recuperação nos ratos hipertensos (SHR). No teste de remoção de adesivo, houve recuperação sensoriomotora total nos ratos WKY e parcial nos ratos SHR. Na tarefa do campo aberto, a isquemia cerebral afetou a memória de habituação a curto prazo nos ratos WKY. Não foi observada memória de habituação a curto prazo nos ratos SHR submetidos ou não a isquemia cerebral. Observou-se uma redução do volume cerebral isquêmico nos ratos WKY 7 dias pós-AVE. Com estes resultados, pode-se observar que a HAS prejudica a recuperação sensoriomotora de ratos submetidos à isquemia cerebral. A redução do volume de lesão isquêmica observada nos ratos WKY pode explicar a recuperação sensoriomotora total observada nesses animais. O trabalho reforça a necessidade de se utilizar modelos animais com comorbidades na pesquisa em AVE.

Palavras-chave: acidente vascular encefálico; hipertensão arterial sistêmica; função motora

ABSTRACT

Stroke is a disease characterized by reduction or interruption of cerebral blood flow, leading to cell death and cognitive and sensorimotor deficits. It is a leading cause of death and disability worldwide. After a stroke, a central zone of irreversibly damaged tissue is formed (ischaemic core) and a salvageable surrounding area named ischaemic penumbra. Hypertension is characterized by sustained elevation of blood pressure and is the most prevalent risk factor for stroke and worsens stroke outcome and response to treatment. Hypertension causes neurovascular alterations like stiffening of large cerebral arteries, blood brain barrier dysfunction and alterations of cerebral blood flow regulation mechanisms. It is important to use animal models with comorbidities in stroke research, to make it more translational. Therefore, the study aims to evaluate the effects of a model of permanent ischaemic stroke in hypertensive rats on sensorimotor function and cerebral infarct size. The study was approved by IC/FUC's Ethical Committee on Animal Use (UP 5806/20 and 5850/20). Adult male spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar Kyoto (WKY) rats were anesthetized and submitted to focal ischaemia by thermocoagulation of pial vessels. Behavioral assessments were performed over 42 days to evaluate sensorimotor recovery and habituation memory. In the cylinder task, there was a total recovery of symmetry of WKY rats, but there was no recovery in SHR rats. In adhesive removal task, there was a total sensorimotor recovery for WKY rats and partial recovery for SHR rats. Stroke impaired short-term habituation memory in open field task in WKY rats. The short-term habituation memory wasn't observed in SHR rats. There was a bigger cerebral infarct size in SHR rats compared to WKY at 7 days after stroke. These results show how hypertension impairs sensorimotor recovery in rats submitted to cerebral ischaemia. Cerebral infarct size reduction observed in WKY might explain the total sensorimotor recovery of this strain. The study reinforces the need of using animal models with comorbidities in stroke research.

Key words: stroke; hypertension; motor function

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVE – acidente vascular encefálico

AVEi – acidente vascular encefálico isquêmico

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

HAS – hipertensão arterial sistêmica

PA – pressão arterial

SHR – rato espontaneamente hipertenso

SHRSP – *stroke-prone spontaneously hypertensive rat*

TC – teste do cilindro

TRA – teste de remoção do adesivo

WKY – Wistar Kyoto

1. INTRODUÇÃO

1.1 Acidente vascular encefálico

O acidente vascular encefálico (AVE) é a segunda maior causa de morte no Brasil e no mundo, além de ser uma grande causa de incapacidade em pacientes (BRASIL, 2017; KATAN; LUFT, 2018). A incidência do AVE aumenta com a idade e estima-se que cerca de 1 em cada 4 pessoas sofrerá um AVE durante sua vida (CAMPBELL *et al.*, 2018; FEIGIN *et al.*, 2022).

O AVE pode ser do tipo isquêmico, que representa cerca de 71% do total, ou do tipo hemorrágico (CAMPBELL *et al.*, 2018). O AVE hemorrágico ocorre quando há ruptura de vasos sanguíneos, causando danos ao tecido cerebral devido ao extravasamento de componentes sanguíneos e formação de hematoma (SHI *et al.*, 2019). Já o AVE isquêmico (AVEi) resulta de uma redução abrupta do fluxo sanguíneo cerebral, que provoca morte celular (MESCHIA; BROTT, 2018; SHI *et al.*, 2019).

A maioria dos casos de AVEi tem origem tromboembólica, quando um êmbolo, geralmente proveniente de placas de ateroma ou fibrilação atrial, oclui vasos e interrompe o fluxo sanguíneo em uma determinada região cerebral (CAMPBELL *et al.*, 2018). Após o AVEi, é formada uma zona central de dano (infarto), onde há morte celular e a recuperação tecidual é irreversível (núcleo da isquemia). Em volta do núcleo, há uma região recuperável denominada zona de penumbra, que progressivamente se converte em tecido com dano irreversível, aumentando o núcleo isquêmico. A zona de penumbra contribui para déficits clínicos, mas uma rápida reperfusão pode recuperar sua função normal (CAMPBELL *et al.*, 2018; MESCHIA; BROTT, 2018).

1.2 Fluxo sanguíneo cerebral

O cérebro é um órgão que depende de um aporte adequado e contínuo de oxigênio e glicose (fonte energética essencial) pela circulação sanguínea, visto que tem glicogênio insuficiente e possui alta demanda energética (IADECOLA, 2004).

Alterações no fluxo sanguíneo cerebral podem prejudicar a função das células nervosas e causar danos cerebrais. Sendo assim, para garantir o suprimento de nutrientes de acordo com as demandas de energia celular, existem mecanismos de controle do fluxo sanguíneo cerebral, como a autorregulação da pressão arterial (PA) e hiperemia funcional (FARACO; IADECOLA, 2013; IADECOLA, 2004).

Existem artérias intracranianas (artérias da pia) na superfície do cérebro que se ramificam e penetram o cérebro, se tornando arteríolas parenquimais rodeadas por astrócitos (CIPOLLA, 2009; IADECOLA, 2004). Os vasos são constituídos por células endoteliais, células musculares lisas e pericítos. As células endoteliais são interconectadas através de junções apertadas, constituindo a barreira hematoencefálica. Elas também liberam substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, que estimulam o músculo liso a contrair ou relaxar, alterando assim o diâmetro vascular (FARACO; IADECOLA, 2013; IADECOLA, 2004).

O sistema vascular no cérebro possui um mecanismo de autorregulação da PA frente às flutuações da pressão que ocorrem durante as atividades do dia-a-dia. Essa regulação permite a manutenção de um fluxo sanguíneo cerebral estável, quando a PA média se encontra entre 60-150 mmHg. Dentro dessa faixa, o músculo liso vascular contrai ou relaxa para aumentar ou diminuir a pressão, mantendo um fluxo relativamente constante. Acima ou abaixo desse limite, a autoregulação fica prejudicada e há risco de dano cerebral (CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018; FARACO; IADECOLA, 2013).

Outro mecanismo homeostático importante na regulação do fluxo sanguíneo cerebral é a hiperemia funcional. A atividade neural estimula a liberação de substâncias vasoativas que possibilitam um aumento do fluxo sanguíneo na região. Dessa forma, o aporte de nutrientes e a remoção de metabólitos é pareado com a atividade cerebral (FARACO; IADECOLA, 2013; IADECOLA, 2004).

1.3 Hipertensão arterial e alterações neurovasculares

Hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição multifatorial caracterizada pelo aumento persistente da PA. Usualmente assintomática, representa principal fator de risco para todos os tipos de AVE, cuja incidência aumenta proporcionalmente com o aumento da PA sistólica e diastólica (BARROSO *et al.*, 2021; CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018).

O estresse mecânico causado sobre a parede arterial, devido à elevação persistente da pressão sanguínea, resulta em um remodelamento da estrutura neurovascular e do fluxo sanguíneo cerebral. Dessa forma, a HAS pode agravar o desfecho de um AVE (CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018; FARACO; IADECOLA, 2013).

As alterações observadas nos vasos incluem hipertrofia ou reorganização de células musculares lisas, bem como a deposição de proteínas da matriz extracelular na parede do vaso, como colágeno e fibronectina, e degradação de fibras de elastina, levando a um enrijecimento da parede de grandes artérias. Dessa forma, o remodelamento reduz o diâmetro do lúmen dos vasos e aumenta a resistência vascular, podendo resultar em hipoperfusão no cérebro e comprometimento hemodinâmico (CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018; FARACO; IADECOLA, 2013).

Em pacientes hipertensos, o mecanismo de autorregulação da PA (que mantém a PA constante frente a variações dentro de uma faixa específica de PA média), sofre uma elevação dos limites superior e inferior (CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018). A HAS também afeta a hiperemia funcional e a função endotelial. O aumento do fluxo sanguíneo cerebral induzido pela atividade cerebral é atenuado em pacientes hipertensos. Dessa forma, observa-se que a HAS afeta vários mecanismos de controle cerebrovascular, podendo contribuir para disfunções e dano cerebral (FARACO; IADECOLA, 2013).

1.4 Modelos animais de acidente vascular encefálico

Visto que o AVE é uma das principais causas de morte no mundo, é de suma importância estudar seus mecanismos fisiopatológicos para desenvolvimento de novas e melhores estratégias preventivas e terapêuticas (KUMAR *et al.*, 2016) Todavia, muitos tratamentos para AVE isquêmico testados em modelos pré-clínicos não obtiveram sucesso na pesquisa clínica (MCCANN; LAWRENCE, 2020).

Sabe-se que a idade e algumas comorbidades, como a HAS, são importantes fatores de risco para o AVE e pioram a progressão da doença e a resposta ao tratamento. Entretanto, a maioria dos estudos pré-clínicos em AVE é realizada em animais jovens e saudáveis. Sendo assim, é importante levar em consideração a idade e comorbidades na pesquisa pré-clínica de forma a tornar a pesquisa mais translacional (MCCANN; LAWRENCE, 2020).

Atualmente, existem diversos modelos animais nos quais se pode simular um AVE e possibilitam o estudo das alterações patológicas decorrentes da isquemia cerebral, como o modelo de oclusão intraluminal da artéria cerebral média, modelos de craniectomia,

fototrombose, termocoagulação, dentre outros (FLURI; SCHUHMANN; KLEINSCHNITZ, 2015; SILVA, 2018).

O AVE isquêmico por termocoagulação é um modelo de isquemia cerebral focal permanente, com boa reprodutibilidade e baixa mortalidade. Nesse modelo, os vasos da pia são termocoagulados com uma solda quente em uma região específica do córtex cerebral, após craniectomia (SILVA, 2018).

Devido a relevância da HAS na patogênese do AVE, é importante que se leve em conta essa comorbidade na investigação pré-clínica. Um dos modelos animais mais utilizados nesses casos é o rato espontaneamente hipertenso (SHR), um modelo de HAS genética desenvolvida a partir de cruzamento seletivo de ratos Wistar Kyoto (WKY) (ERGUL *et al.*, 2016). Há também a linhagem ratos hipertensos com predisposição genética a isquemia cerebral, denominada *stroke-prone spontaneously hypertensive rat* (SHRSP), derivada do cruzamento de ratos SHR (MCGILL *et al.*, 2005).

Estudos realizados com ratos SHR apontam um remodelamento cerebrovascular com redução do diâmetro do lumem vascular e aumento da rigidez das paredes dos vasos, alteração da autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral, disfunção da barreira hematoencefálica e volume maior de infarto após isquemia (CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018; ERGUL *et al.*, 2016).

Sabe-se que os ratos SHR são os mais utilizados na pesquisa em AVE isquêmico com a comorbidade hipertensão (ERGUL *et al.*, 2016). Entretanto, ainda não foi relatado na literatura científica a indução do AVE em ratos SHR pelo modelo de termocoagulação de vasos piais. Sendo assim, o trabalho visa investigar o desfecho patológico do AVE isquêmico focal permanente num modelo animal que possui a comorbidade hipertensão (SHR), comparado com uma linhagem normotensa (WKY) a partir da avaliação do comprometimento da simetria e a sensibilidade das patas dianteiras, memória de habituação e volume do infarto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar efeitos do AVE isquêmico focal permanente por termocoagulação dos vasos piais sobre a função sensoriomotora, memória de habituação à novidade e volume da lesão cerebral em ratos hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) como controle.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a recuperação funcional de ratos SHR e WKY submetidos à AVE isquêmico focal permanente através da avaliação da simetria e da função sensoriomotora.

Verificar a habituação à novidade a curto e longo prazo de ratos SHR e WKY submetidos à AVE isquêmico focal permanente.

Avaliar o volume da lesão cerebral isquêmica de ratos SHR e WKY submetidos a AVE isquêmico por termocoagulação dos vasos piais.

PARTE 2

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram os cuidados preconizados por diretrizes nacionais de experimentação animal, conforme a lei 11.794 de 08/10/2008, por diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Guia de Cuidado no Uso de Animais de Laboratório do National Institute of Health (publicação nº 80-23, revisado em 1996). A eutanásia dos animais foi realizada conforme Lei 714, de 20/06/2002 que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e outras providências, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Lei 11.794 de 08/10/2008 e das Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA.

A pesquisa foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia, registrada nos protocolos UP 5806/20 e UP 5850/20.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos SHR e WKY de 90-120 dias, com peso entre 200-350g, obtidos do biotério do Centro de Cardiologia Experimental do Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia. Os animais foram mantidos em temperatura de $22\pm 2^{\circ}$ C, luz controlada (ciclo claro-escuro de 12/12 h) e com água e ração

padrão de biotério *ad libitum*. Foram acomodados em até 4 animais por caixa de policarbonato de forradas com maravalha.

Os animais foram selecionados a partir de 2 grupos experimentais principais: (1) hipertensos (SHR) e (2) normotensos (WKY). Cada grupo foi subdividido em: (1) animais submetidos a AVE isquêmico por termocoagulação dos vasos piais (ISQ), (2) animais submetidos a cirurgia de craniectomia mas sem AVE isquêmico por termocoagulação dos vasos piais (*sham*) e (3) controle sem intervenção cirúrgica (*naive*).

3.3 Cirurgia de isquemia focal permanente

A lesão isquêmica foi induzida por termocoagulação dos vasos sanguíneos da pia (DOS SANTOS *et al.*, 2010; HANSEL *et al.*, 2015; MÜLLER *et al.*, 2021; NONOSE *et al.*, 2018; ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018). Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (90 mg/kg, 450 µl/kg i.p.) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, 300 µl/kg i.p.) e colocados em um aparelho estereotáxico. Foi realizada craniectomia, expondo a região do córtex parietal esquerdo (+ 2 a - 6 mm A.P. e - 2 a - 4 mm M.L. a partir do bregma).

Os vasos piais foram termocoagulados pela aproximação uma sonda quente por 2 minutos. Logo após, a pele foi suturada com fio mononylon em pontos isolados simples e os animais foram mantidos em colchão térmico (37° C) até a recuperação da anestesia.

3.4 Teste do cilindro

Para avaliação da simetria das patas dianteiras, foi realizado o teste do cilindro (TC) (ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018). Os animais foram colocados dentro de um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro e 30 cm de altura) e os primeiros 20 toques na parede do cilindro utilizando os membros anteriores foram registrados por um observador. Foram registrados os toques com as patas: ipsilateral (em relação ao lado da lesão cerebral), contralateral ou ambas. No fim de cada tarefa, o aparato foi higienizado com álcool 70%.

A assimetria de cada animal foi calculada usando a fórmula: $\text{assimetria} = (\% \text{ de toques com pata ipsilateral} = \text{toques com pata ipsilateral} / \text{soma total de toques}) - (\% \text{ de toques com pata contralateral} = \text{\% de toques com pata contralateral} / \text{soma total de toques})$. Depois, a assimetria foi convertida em % simetria ($100 - \% \text{ assimetria}$) (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Os animais foram avaliados 1 dia antes da cirurgia e nos dias 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a cirurgia.

3.5 Teste de remoção de adesivo

O teste de remoção de adesivo (TRA) é um dos mais eficientes testes comportamentais para detecção de déficits sensoriomotores. Para realização do teste, um adesivo de papel (13 mm de diâmetro) foi colocado na parte interna de cada uma das patas dianteiras. Os animais então foram colocados em uma caixa experimental acrílica de 30 cm de comprimento x 22 cm de largura x 22 cm de altura por 60 segundos. Cronometrou-se o tempo para a remoção do adesivo de cada pata (latência de remoção). Este ensaio foi realizado 5 vezes, com no mínimo 5 minutos de intervalo entre cada ensaio. Foi realizada a média dos 2 menores tempos de

remoção dentro dos 5 ensaios, para calcular a latência de remoção do adesivo nas patas contralateral e ipsilateral (BOUET; FRERET, 2012). Os animais foram avaliados 1 dia antes da cirurgia e nos dias 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a cirurgia

3.6 Tarefa do campo aberto

Esta tarefa avalia a memória de habituação à novidade. Os animais foram colocados em uma caixa preta não transparente, medindo 50 cm de comprimento x 50 cm de largura x 50 cm de altura, e gravou-se a atividade de locomoção dos animais com uma câmera instalada por cima da caixa por 10 min. A distância percorrida por minuto foi calculada pelo do software ANY-Maze (Stoelting CO., Wood Dale, IL). No final de cada sessão, o aparato foi limpo com álcool a 70%. A avaliação dos animais nesta tarefa foi realizada nos dias 7, 21 e 35 após a cirurgia.

Avaliou-se a habituação à novidade a curto e longo prazo. A habituação a curto prazo foi considerada como a diminuição da locomoção do 1º ao 5º minuto na primeira exposição; a habituação a longo prazo foi considerada como uma diminuição na locomoção no 1º min durante exposições sucessivas (ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018).

3.7 Volume da lesão isquêmica

O volume da lesão isquêmica foi calculado 72h ou 10 dias após a cirurgia. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (90 mg/kg, 450 µl/kg i.p.) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, 300 µl/kg i.p.) e o cérebro foi rapidamente removido do crânio, congelado

e seccionado em plano coronal em fatias de 2 mm de espessura. As fatias foram imersas por 30 min em solução 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 37°C, seguido de fixação em solução PFA 4% por 24 h (ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018)

Após fixação, as fatias foram colocadas em uma base escura e foram fotografadas. As áreas desprovidas de coloração vermelha foram consideradas necrosadas (infartadas). O volume total do cérebro e do infarto foi mensurada através do software ImageJ, a partir da qual calculou-se a porcentagem do volume da lesão (ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018).

3.8 Análises estatísticas

Os efeitos da isquemia no comportamento dos ratos no TC, TRA e tarefa do campo aberto foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. Para comparação do volume da lesão isquêmica dos ratos SHR e WKY ao longo do tempo, também utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. Os dados foram expressos como média \pm EPM para avaliações comportamentais e média \pm DP para volume da lesão. O valor de alfa (nível de significância) foi considerado 0.05. Todas as análises foram realizadas através do software Graph Pad Prism 9.0.

4. RESULTADOS

4.1 Teste do cilindro

Ratos WKY submetidos ao AVEi (ISQ), em comparação com o grupo *naive*, apresentaram redução significativa da simetria no teste do cilindro entre o 3º e o 21º dia pós-isquemia (Figura 1). A partir do 28º dia, houve recuperação espontânea desses animais e não foram mais detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos. Não foi detectada diferença na simetria entre os grupos *naive* e *sham*.

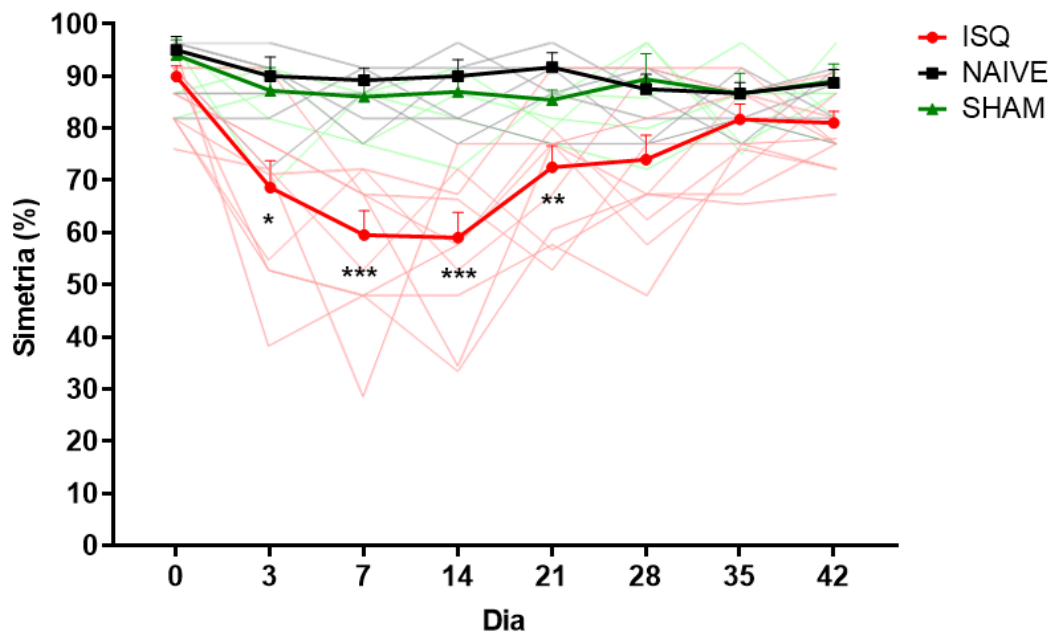


Figura 1. Simetria das patas dianteiras de ratos WKY no teste do cilindro. Dados expressos como média \pm EPM, analisado por ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ISQ comparado com *naive*. ISQ (n=10), *naive* (n=6), *sham* (n=5).

Nos animais SHR submetidos a AVEi, a redução da simetria em relação ao grupo *naive* só foi detectada a partir do 7º dia pós-isquemia e se manteve em declínio até o final do experimento (dia 42) (Figura 2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *naive* e *sham*.

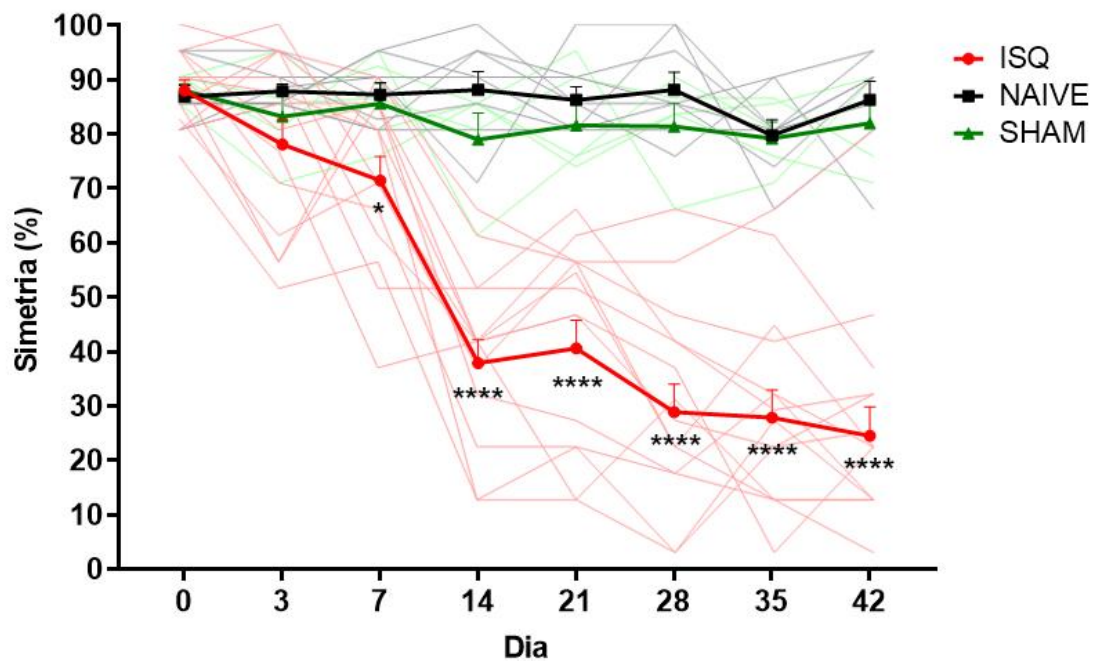


Figura 2. Simetria das patas dianteiras de ratos SHR no teste do cilindro. Dados expressos como média \pm EPM, analisado por ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, ISQ comparado com *naive*. ISQ (n=14), *naive* (n=5), *sham* (n=5).

4.2 Teste de remoção de adesivo

A avaliação dos ratos WKY submetidos a AVEi mostrou que, entre os dias 3 e 28 pós-isquemia, removeram o adesivo da pata contralateral em um tempo significativamente maior em relação ao grupo *naive* (Figura 3A). A partir do dia 35, essa diferença não foi mais

observada. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *sham* e *naive*. Não houve diferença no tempo de remoção do adesivo da pata ipsilateral entre os 3 grupos (Figura 3B).

Ratos SHR submetidos a AVE isquêmico removeram o adesivo da pata contralateral em tempo significativamente maior em relação ao grupo *naive* (Figura 4A) durante todo o tempo do experimento, embora apresentaram um declínio no tempo de remoção a partir do 3º dia pós-isquemia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos *naive* e *sham*. Não houve diferença no tempo de remoção do adesivo da pata ipsilateral entre os 3 grupos (Figura 4B).

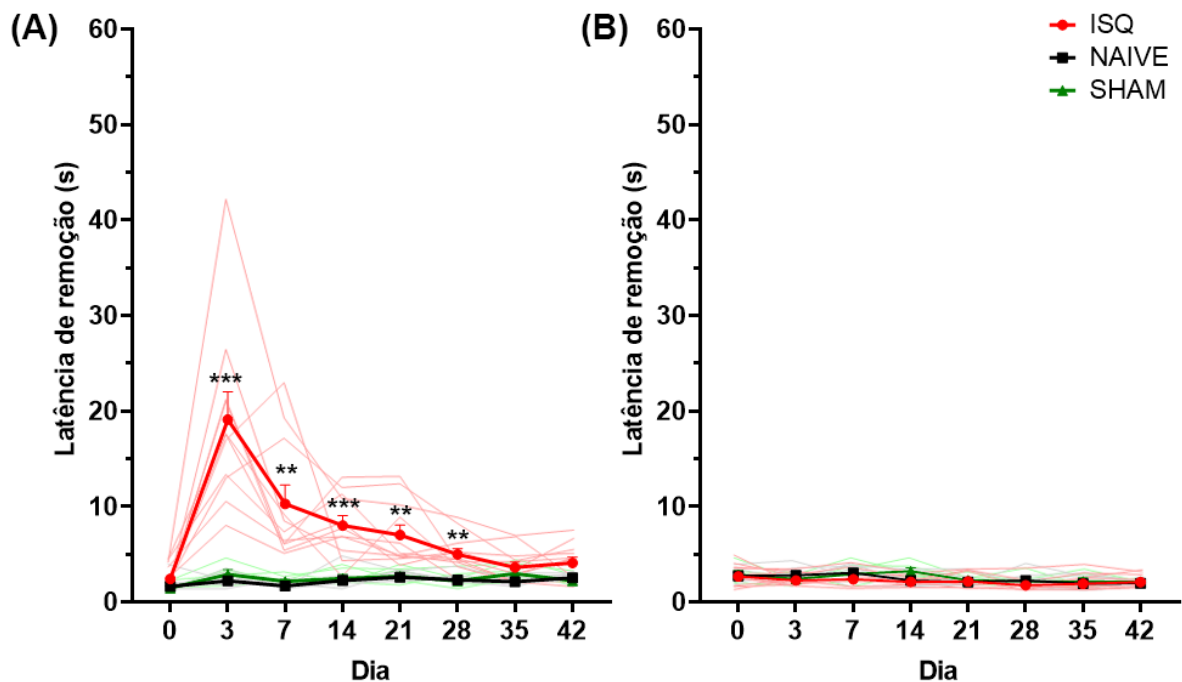


Figura 3. Latência de remoção de adesivo da pata dianteira contralateral (A) e ipsilateral (B) de ratos WKY, avaliada pelo TRA. Dados expressos como média \pm EPM, analisado por ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ISQ comparado com *naive*. ISQ (n=11), *naive* (n=6), *sham* (n=5).

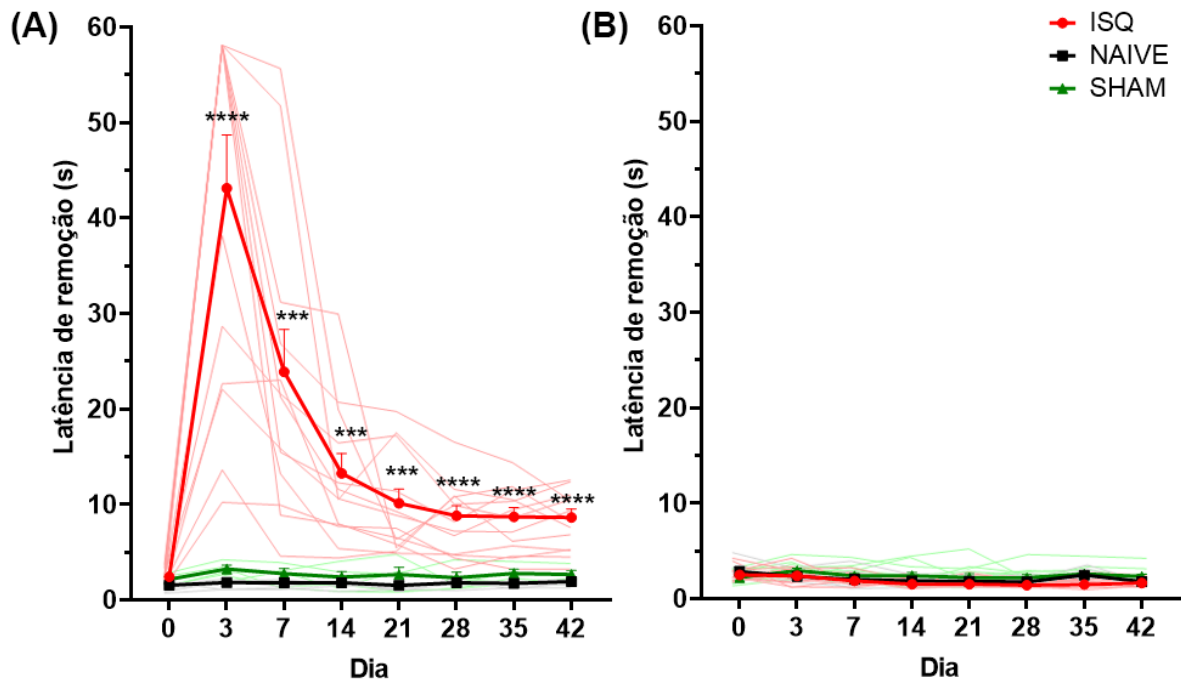


Figura 4. Latência de remoção de adesivo da pata dianteira contralateral (A) e ipsilateral (B) de ratos SHR, avaliada pelo TRA. Dados expressos como média \pm EPM, analisado por ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. ISQ comparado com *naive*. ISQ (n=13), *naive* (n=5), *sham* (n=5).

4.3 Tarefa do campo aberto

Na tarefa do campo aberto, a distância percorrida nas 3 exposições está representada na figura 5 para os grupos WKY *naive* (Figura 5A), WKY ISQ (Figura 5B), SHR *naive* (Figura 5C) e SHR ISQ (Figura 5D). No grupo WKY *naive* (Figura 5A), observou-se um decréscimo estatisticamente significativo entre a distância percorrida no 1º min e no 5º min da primeira exposição, revelando a presença de memória de curto prazo de habituação à novidade. Entretanto, essa diferença não foi observada para o grupo WKY ISQ (Figura 5b), evidenciando que a isquemia afetou a memória de curto prazo de habituação.

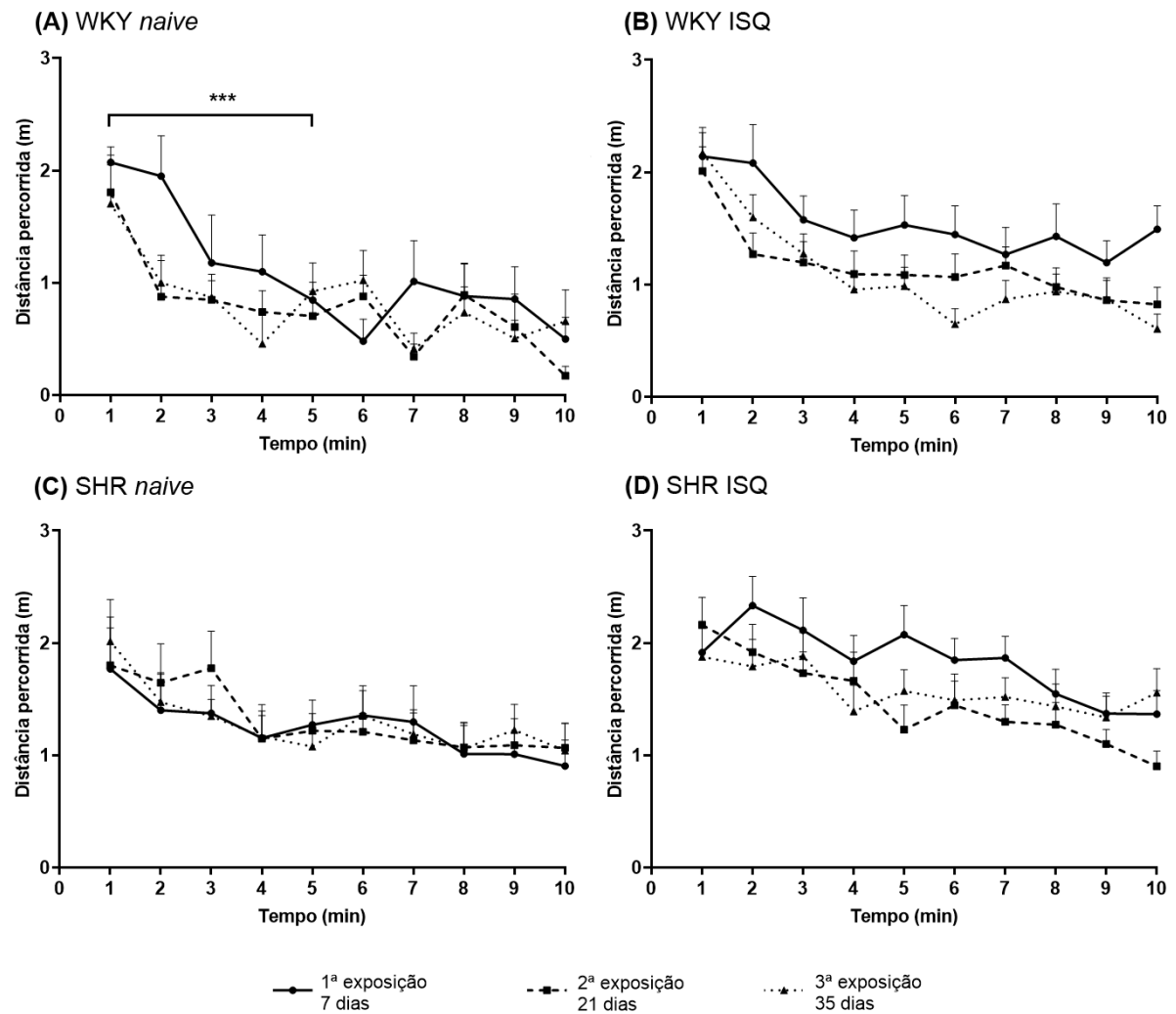


Figura 5. Distância percorrida na tarefa de campo aberto nos dias 7, 21 e 35. Dados expressos como média \pm EPM, analisado por ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. *** $p < 0,001$, 1^o min comparado com 5^o min da primeira exposição de WKY *naive*. WKY *naive* (n=8), WKY ISQ (n=22), SHR *naive* (n=9) e SHR ISQ (n=16).

Não foi observada diferença da distância percorrida do 1^o ao 5^o min para os grupos SHR ISQ (Figura 5D) e SHR *naive* (Figura 5C). Nenhum dos grupos apresentou memória de longa duração de habituação à novidade, visto que não foi observada diferença estatisticamente significativa, em todos os grupos, entre o 1^o min de cada exposição sequencial.

4.4 Volume da lesão

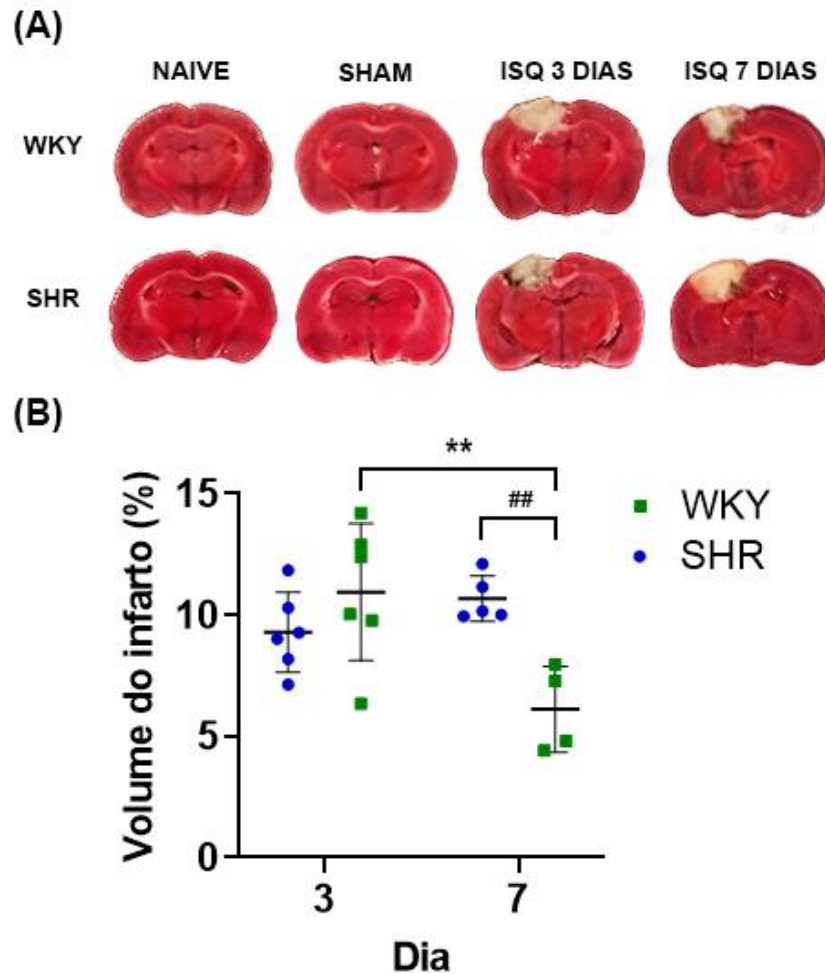


Figura 6. Volume da lesão isquêmica em ratos SHR e WKY no 3º e 7º dia pós-isquemia (fatias coradas com TTC). (A) - imagens representativas de cada grupo. (B) – porcentagem do volume do infarto. Dados expressos como média \pm DP, analisado por ANOVA de duas vias, seguido por comparação múltipla de *Sidak*. ** $p < 0,01$, WKY 3 dias comparado com WKY 7 dias. ## $p < 0,01$, SHR 7 dias comparado com WKY 7 dias. WKY 3 dias (n=6), SHR 3 dias (n=6), WKY 7 dias (n=4), SHR 7 dias (n=5).

Não houve diferença estatisticamente significativa no volume do infarto cerebral, avaliado 3 dias após a isquemia, entre o grupo SHR e WKY (Figura 6B), mas no 7º dia o

volume foi menor no grupo WKY em relação ao SHR. No 7º dia após isquemia, o volume de infarto dos ratos WKY diminuiu em relação ao 3º dia, enquanto nos ratos SHR o volume se manteve igual ao dia 3. Não foram observadas lesões isquêmicas nos cérebros dos ratos WKY e SHR dos grupos *naive* e *sham*.

PARTE 3

5. DISCUSSÃO

Modelos animais de isquemia cerebral são ferramentas essenciais para entendimento da fisiopatologia do AVE e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No presente trabalho, levou-se em consideração a comorbidade tida como principal fator de risco para o AVE, que é a HAS. Pôde-se observar que os ratos hipertensos apresentaram um maior volume de isquemia cerebral e um prejuízo na recuperação da função sensoriomotora pós-isquemia em relação aos ratos normotensos.

Sabe-se que o modelo animal mais utilizado na pesquisa em AVE isquêmico com comorbidade hipertensão (e escolhido para o desenvolvimento do presente trabalho) é o SHR, um modelo genético de HAS obtido a partir do cruzamento seletivo de ratos WKY. Esses animais possuem alterações cerebrovasculares similares às alterações observadas em pessoas com HAS. Ratos WKY são frequentemente utilizados como controle normotenso na pesquisa com SHR (ERGUL *et al.*, 2016; MCGILL *et al.*, 2005).

No presente estudo, a recuperação sensoriomotora dos animais hipertensos e normotensos pós-AVEi foi avaliada através do TC e TRA, que avaliam a simetria e o tempo para sentir e remover adesivos das patas dianteiras, respectivamente (BOUET; FRERET, 2012; ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018). Pôde-se observar no TC que, após indução de AVEi nos ratos SHR, a simetria das patas dianteiras foi prejudicada sem recuperação até o último dia avaliado (42 dias). Já no TRA, houve uma recuperação parcial da função sensoriomotora das patas dianteiras desses ratos ao longo do tempo, mas que permaneceu significativamente prejudicada até o 42º dia. Tais resultados tem um grande contraste em relação aos ratos WKY, que apresentaram uma recuperação total da simetria e função sensoriomotora das patas dianteiras a partir do 28º dia no TC e 35º dia no TRA.

Outros estudos realizados com diferentes modelos de isquemia cerebral também relatam um maior prejuízo na recuperação funcional pós-isquemia em ratos hipertensos em relação a normotensos (MAGUIRE *et al.*, 2004; MCGILL *et al.*, 2005), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Maguire e colaboradores (2004) submeteram ratos WKY, SHR e SHRSP de 16-22 semanas a isquemia cerebral permanente por oclusão da artéria média e avaliaram a recuperação funcional através de um *score* de deficit neurológico nos dias 1, 4, 11, 18 e 28 pós-isquemia. Foi observado que os ratos WKY apresentaram um prejuízo funcional apenas no 1º dia avaliado, se recuperando totalmente nas avaliações seguintes. Os ratos SHR mantiveram um deficit funcional até o 11º dia, se recuperando totalmente nas avaliações subsequentes. Já os ratos SHRSP não apresentaram melhora em nenhum momento avaliado (MAGUIRE *et al.*, 2004).

Em estudo realizado por McGill e colaboradores (2005), ratos SHRSP adultos foram submetidos a isquemia cerebral focal permanente por eletrocoagulação da porção distal da artéria cerebral média, utilizando WKY como controle normotenso. Após avaliações funcionais (*score* neurológico) realizadas ao longo de 28 dias, foi observado que os ratos SHRSP apresentaram apenas uma recuperação parcial até o fim do experimento, enquanto os WKY se recuperaram totalmente (MCGILL *et al.*, 2005).

Estudos utilizando modelo de isquemia cerebral focal permanente por termocoagulação de vasos piais em ratos Wistar mostram uma recuperação parcial da simetria das patas dianteiras avaliado no TC até 42 dias (ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018). Tais dados evidenciam que a resposta funcional motora pós AVEi de ratos Wistar em relação a WKY e SHR é diferente, enfatizando a importância de se realizar estudos com diferentes linhagens e modelos de dano isquêmico cerebral.

No presente trabalho, pôde-se observar que o modelo de isquemia cerebral utilizado afetou a memória de curto prazo de habituação à novidade dos ratos WKY na tarefa do campo

aberto. Já nos ratos SHR, tanto no grupo *naive* quanto no grupo submetido a isquemia cerebral não foi detectada memória de curto prazo de habituação à novidade, sugerindo uma possível influência da HAS na memória desses animais. Sabe-se que a hipertensão arterial é um fator de risco para declínio cognitivo em humanos (QIU; WINBLAD; FRATIGLIONI, 2005). Há estudos que indicam que ratos hipertensos apresentam prejuízo na memória em relação a ratos normotensos (NAKAMURA-PALACIOS *et al.*, 1996; WYSS *et al.*, 2000), o que poderia justificar o prejuízo na memória de habituação de ratos SHR observado no presente estudo.

A memória de longo prazo de habituação à novidade, considerada no presente trabalho como a diminuição na locomoção no 1º min durante exposições sucessivas na tarefa do campo aberto, não foi estatisticamente detectada em nenhum dos grupos testados. Entretanto, observou-se uma tendência no grupo WKY *naive* a apresentar esse tipo de memória, indicando que mais estudos precisam ser realizados para caracterizar e elucidar os mecanismos envolvidos na memória e declínio cognitivo desses animais. Há trabalhos realizados em ratos Wistar onde a memória de habituação foi avaliada de forma semelhante, que indicam que esses animais apresentam memória de longo prazo de habituação á novidade, e que a isquemia cerebral prejudica a memória de longo prazo (ROHDEN *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2018).

Os resultados do presente estudo mostram que não houve diferença significativa no volume da lesão isquêmica no 3º dia pós-isquemia entre WKY e SHR (Figura 6B). Entretanto, observou-se no 7º dia pós-isquemia uma redução desse volume somente nos ratos WKY. Neste dia, o volume da lesão isquêmica foi menor nos ratos WKY em relação aos SHR. Essa redução do volume da lesão nos ratos WKY pode estar envolvida na recuperação sensoriomotora total que esses animais apresentaram nos testes do cilindro e de remoção de adesivo.

Há estudos que apontam um maior volume de isquemia cerebral em ratos hipertensos comparado aos normotensos. Hom e colaboradores (2007) submeteram ratos SHR de 10 e 15 semanas a isquemia cerebral permanente por oclusão da artéria média e observaram que o volume da lesão (mensurado pelo método de coloração com TTC) 4 h pós-isquemia foi consideravelmente maior nos ratos SHR em relação ao controle normotenso (WKY). Maguire e colaboradores (2004) quantificaram, através de técnicas de ressonância magnética, o volume da isquemia cerebral em ratos WKY, SHR e SHRSP submetidos a isquemia permanente por oclusão da artéria média e observaram um menor volume de infarto nos ratos WKY em relação aos ratos hipertensos (SHR e SHRSP) no 1º e 10º dia pós-isquemia.

Alguns trabalhos não observaram diferença no volume da isquemia cerebral entre ratos hipertensos e normotensos. Garcia e colaboradores (2013), compararam os efeitos de um modelo de AVE transitório (oclusão da artéria média por 1 h) entre ratos WKY e SHR de 3 meses de idade, observando que não houve diferença no tamanho da lesão 23h após o insulto isquêmico (pelo método de coloração com TTC). Os autores também relataram que também não houve diferença na redução do fluxo sanguíneo cerebral entre os grupos nesse mesmo período de tempo (GARCIA *et al.*, 2013).

Em um trabalho realizado com ratos WKY e SHR de 12-14 semanas submetidos a isquemia por fototrombose, o volume da lesão isquêmica foi mensurado por ressonância magnética e não foi observada diferença entre os grupos no 1º e 3º dia pós-isquemia (MÖLLER *et al.*, 2015). Em ratos Wistar adultos, o volume da lesão isquêmica de AVE transitório (oclusão da artéria média de 1 h) foi mensurado através de coloração com TTC e observou-se que não houve diferença no volume do infarto entre o 3º e o 7º dia pós-isquemia (SHEN *et al.*, 2010).

O prejuízo na recuperação sensoriomotora pós-isquemia observada nos ratos SHR pode ser explicado pelas alterações neurovasculares que estes animais apresentam por conta

da HAS, como o remodelamento dos vasos sanguíneos cerebrais, disfunção da barreira hematoencefálica e prejuízo da autoregulação do fluxo sanguíneo cerebral e da hiperemia funcional (CALCINAGHI *et al.*, 2013; CIPOLLA; LIEBESKIND; CHAN, 2018; UENO *et al.*, 2004).

Diversos tratamentos para o AVEi vêm sendo estudados, geralmente utilizando-se animais jovens e saudáveis (MCCANN; LAWRENCE, 2020). Um dos tratamentos que se revelam mais promissores é o uso de vesículas extracelulares de células-tronco mesenquimais (LI *et al.*, 2018). Vários estudos já apontam que a administração dessas vesículas pós-AVE em linhagens normotensas de roedores promove uma recuperação funcional desses animais e um efeito neuroprotetor. (LI *et al.*, 2018; ROHDEN *et al.*, 2021). Todavia, é importante investigar se este e outros tratamentos também podem promover uma melhor recuperação pós-AVEi em animais que possuem HAS, já que essa comorbidade pode piorar a progressão da doença e afetar seu tratamento (MCCANN; LAWRENCE, 2020).

Com os resultados do presente estudo, foi possível observar o impacto negativo da HAS na recuperação sensoriomotora pós-AVEi. Não foram encontrados na literatura científica outros estudos que realizaram isquemia cerebral focal permanente pelo modelo de termocoagulação de vasos piais em ratos SHR e WKY ou que avaliaram o desfecho sensoriomotor pós-isquemia nessas linhagens a longo prazo através do teste de cilindro e teste de remoção de adesivo. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de se utilizar modelos com comorbidade para tornar a pesquisa em AVE mais translacional e oferecem a perspectiva de se utilizar esse modelo na investigação pré-clínica de tratamentos para o AVE com comorbidade HAS.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar tratamentos promissores para o AVEi em ratos hipertensos, como por exemplo, vesículas extracelulares derivadas de células tronco mesenquimais.

Avaliar os efeitos do AVEi na memória de ratos hipertensos utilizando outras metodologias, de forma a entender melhor os mecanismos envolvidos na perda de memória de habituação.

Verificar tamanho da lesão isquêmica e fluxo sanguíneo pós-AVEi em ratos hipertensos através de técnicas de ressonância magnética.

REFERÊNCIAS

BARROSO, Weimar Kunz Sebba *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.

BOUET, Valentine; FRERET, Thomas. A master key to assess stroke consequences across species: The Adhesive Removal Test. **Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke**. InTech: Rijeka, Croatia, p. 47-64, 2012.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Principais causas de morte**. Brasília, 2017. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/gbd-brasil/principais-causas/>. Acesso em: 18 jan. 2022.

CALCINAGHI, Novella *et al.* Multimodal imaging in rats reveals impaired neurovascular coupling in sustained hypertension. **Stroke**, v. 44, n. 7, p. 1957-1964, 2013.

CAMPBELL, Bruce. C. *et al.* Ischaemic stroke. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1-22, 2019.

CIPOLLA, Marilyn J. **The Cerebral Circulation**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2009.

CIPOLLA, Marilyn J.; LIEBESKIND, David S.; CHAN, Siu-Lung. The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 38, n. 12, p. 2129-2149, 2018.

DOS SANTOS, Andréia de Vasconcelos *et al.* Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain research**, v. 1306, p. 149-158, 2010.

ERGUL, Adviye *et al.* Impact of comorbidities on acute injury and recovery in preclinical stroke research: focus on hypertension and diabetes. **Translational stroke research**, v. 7, n. 4, p. 248-260, 2016.

FARACO, Giuseppe; IADECOLA, Costantino. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia. **Hypertension**, v. 62, n. 5, p. 810-817, 2013.

FEIGIN, Valery L. *et al.* World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. **International Journal of Stroke**, v. 17, n. 1, p. 18-29, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/17474930211065917>. Acesso em: 18 jan. 2022.

FLURI, Felix; SCHUHMANN, Michael K.; KLEINSCHNITZ, Christoph. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 3445, 2015.

GARCIA, Jorge *et al.* Comparison of infarct volume and behavioral deficit in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rat after transient occlusion of the middle cerebral artery. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2013.

HANSEL, Gisele *et al.* Guanosine protects against cortical focal ischemia. Involvement of inflammatory response. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 3, p. 1791-1803, 2015.

HARPER, Scot L.; BOHLEN, H. Glenn. Microvascular adaptation in the cerebral cortex of adult spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 6, n. 3, p. 408-419, 1984.

HOM, Sharon *et al.* Comparative changes in the blood-brain barrier and cerebral infarction of SHR and WKY rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 5, p. R1881-R1892, 2007.

IADECOLA, Costantino. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 347-360, 2004.

KATAN, Mira; LUFT, Andreas. Global burden of stroke. **Seminars in neurology**, New York, v.18, n. 2, p. 208-211, 2018.

KUMAR, Anil *et al.* A review on animal models of stroke: an update. **Brain research bulletin**, v. 122, p. 35-44, 2016.

LI, Yingchen *et al.* Extracellular vesicles in mesenchymal stromal cells: A novel therapeutic strategy for stroke. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 5, p. 4067-4079, 2018.

MAGUIRE, Sean *et al.* Stroke-prone rats exhibit prolonged behavioral deficits without increased brain injury: an indication of disrupted post-stroke brain recovery of function. **Neuroscience letters**, v. 354, n. 3, p. 229-233, 2004.

MCCANN, Sarah K.; LAWRENCE, Catherine B. Comorbidity and age in the modelling of stroke: are we still failing to consider the characteristics of stroke patients?. **BMJ Open Science**, v. 4, n. 1, p. e100013, 2020.

MCGILL, J. K. *et al.* Impaired functional recovery after stroke in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Stroke**, v. 36, n. 1, p. 135-141, 2005.

MESCHIA, James F.; BROTT, T. Ischaemic stroke. **European journal of neurology**, v. 25, n. 1, p. 35-40, 2018.

MÖLLER, Karoline *et al.* Arterial hypertension aggravates innate immune responses after experimental stroke. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 461, 2015.

MÜLLER, Gabriel C. *et al.* Effects of intranasal guanosine administration on brain function in a rat model of ischemic stroke. **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 2, p. 255-271, 2021.

NONOSE, Yasmine *et al.* Cortical bilateral adaptations in rats submitted to focal cerebral ischemia: emphasis on glial metabolism. **Molecular neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 2025-2041, 2018.

NAKAMURA-PALACIOS, E. M. *et al.* Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural brain research**, v. 74, n. 1-2, p. 217-221, 1996.

QIU, Chengxuan; WINBLAD, Bengt; FRATIGLIONI, Laura. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 8, p. 487-499, 2005.

ROHDEN, Francieli *et al.* Functional Recovery Caused by Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Administered 24 h after Stroke in Rats. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12860, 2021.

SHEN, Chiung-Chyi *et al.* Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke. **Current neurovascular research**, v. 7, n. 1, p. 6-14, 2010.

SHI, Kaibin *et al.* Global brain inflammation in stroke. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 11, p. 1058-1066, 2019.

SILVA, Helio *et al.* Evaluation of temperature induction in focal ischemic thermocoagulation model. **Plos one**, v. 13, n. 7, p. e0200135, 2018.

TEIXEIRA, Luciele Varaschini *et al.* Neuroprotective Effects of Guanosine Administration on In Vivo Cortical Focal Ischemia in Female and Male Wistar Rats. **Neurochemical research**, v. 43, n. 7, p. 1476-1489, 2018.

UENO, Masaki *et al.* Blood-brain barrier is impaired in the hippocampus of young adult spontaneously hypertensive rats. **Acta Neuropathologica**, v. 107, n. 6, p. 532-538, 2004.

WYSS, J. Michael *et al.* Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 5, p. 671-681, 2000.