



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Influência da Hemodiluição Normovolêmica sobre a Neuroproteção de ratos submetidos à Lesão Isquêmica Focal do Sistema Nervoso Central

Leonardo Desessards Olijnyk

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Stefani

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina Ciências Cirúrgicas

Influência da Hemodiluição Normovolêmica sobre a Neuroproteção de ratos submetidos à Lesão Isquêmica Focal do Sistema Nervoso Central

Leonardo Desessards Olijnyk

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Stefani

Porto Alegre, 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Olijnyk, Leonardo Desessards
Influência da Hemodiluição Normovolêmica sobre a
Neuroproteção de ratos submetidos à Lesão Isquêmica
Focal do Sistema Nervoso Central / Leonardo Desessards
Olijnyk. -- 2019.
72 f.
Orientador: Marco Antonio Stefani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Acidente Vascular Cerebral Agudo. 2.
Neuroproteção. 3. Oclusão cerebrovascular. 4.
Hemodiluição. 5. Isquemia focal. I. Stefani, Marco
Antonio, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

A imagem abaixo é uma foto tirada de uma das salas do laboratório de anatomia da UFRGS, também conhecida como “sala do Toninho”...



...Dedico esta dissertação aos meus pais,
que me ensinaram a usar a cabeça...

AGRADECIMENTOS

Minha noiva, Melina Petry de Oliveira Souza, tem me acompanhado na trabalhosa jornada de formação profissional e acadêmica. Dizer que eu não teria conseguido realizar todos objetivos até o momento sem ela, pode parecer apenas belas palavras, mas não são. Obrigado por tudo.

Nos dois últimos anos contei com os ensinamentos e ajuda do Professor Marcos Antônio Stefani. Além das orientações técnicas e práticas no decorrer do projeto, em especial uma coisa me chamou atenção: apesar de muitas vezes eu não conseguir dedicar todo tempo que gostaria ou deveria ao projeto (em virtude da pesada rotina de conciliar residência médica com mestrado), ele sempre manteve a calma e seguiu me incentivando e orientando com maestria. Esta virtude não está nos livros. Concluo que ser professor deve ser algo que lhe causa muito prazer. Espero seguir correspondendo a confiança depositada.

Agradeço ao Professor Carlos Eduardo da Silva e ao Professor Paulo Eduardo Peixoto de Freitas, que me ensinaram desde como pegar um bisturi a operar um aneurisma cerebral. Neurocirurgiões sabem a grandiosa dimensão disso.

Minha gratidão a Antonio Generoso Severino. Aprendi com ele muito do que se pode aprender num laboratório experimental, e também assimilei o que podemos aprender com pessoas boas e trabalhadoras.

Finalmente, vou registrar em palavras meu obrigado a um valoroso amigo que ganhei no desenvolvimento do projeto. Michel Rasche Brandão trouxe ao laboratório a genuína chama da humildade e curiosidade. Mal sabe ele o quão incentivador para mim foi este espírito.

RESUMO

Introdução: a isquemia cerebral (IC) é um complexo processo patológico que envolve uma série de mecanismo desde obstrução de fluxo sanguíneo e cessão de aporte de oxigênio e nutrientes, até os diversos mecanismos de dano e morte celular. Apesar dos avanços na sua compreensão e terapêutica nas últimas décadas, muito se tem para descobrir sobre sua fisiopatologia e abordagem ideal. Por outro lado, o acidente vascular cerebral isquêmico, doença que mais representa a IC, é uma das maiores causas de mortalidade no mundo. Desta forma, este trabalho pretende estudar o efeito neuroprotetor da hemodiluição normovolêmica sobre a neuroproteção de ratos submetidos à lesão isquêmica focal do sistema nervoso central. Terapêutica amplamente acessível na prática clínica e que pode ser aplicada em concomitância com outros métodos modernos de tratamento da IC.

Objetivo: avaliar o efeito histológico da hemodiluição normovolêmica (HNV) sobre a neuroproteção de ratos submetidos à lesão isquêmica focal do sistema nervoso central e posterior reperfusão cerebral. **Materiais e métodos:** foram utilizados 36 ratos machos Wistar (18 no grupo controle e 18 no grupo intervenção), pesando 280-330 g. IC focal é induzida por oclusão da artéria cerebral média esquerda por 1 h. Após este tempo, é desfeita a oclusão em novo tempo anestésico, reestabelecendo o fluxo cerebral normal. Nesta etapa, o grupo intervenção passa por imediata hemodiluição de 10% considerando a volemia basal do animal. Após 48 horas, os animais são sacrificados. É feito cortes coronais no encéfalo e corados com solução de cloreto de trifeniltetrazólio para estudo e comparação de área isquêmica. **Resultados:** foram avaliados os cortes coronais do cérebro de 9 animais do grupo controle e 10 animais do grupo intervenção. Os resultados mostram que o grupo controle apresentou uma área infartada média de $48,75 \pm 7,78\%$ do hemisfério com lesão e o grupo intervenção apresentou área de lesão: $25,8 \pm 14,48\%$ (Tabela 01). A diferença foi significativamente menor para $p < 0,05$. **Discussão e Conclusão:** a lesão isquêmica cerebral envolve complexos mecanismos de dano celular. Entre os fatores importantes em sua compreensão está a perfusão tecidual. Considerando isso, HNV apresenta substrato teórico e experimental na neuroproteção após esta lesão. Por outro lado, em vista da evolução das terapias de reperfusão arterial, será cada vez mais comum o tratamento de pacientes pós revascularização e terapêuticas auxiliares podem assumir papel consistente neste cenário. A hemodiluição pode trazer benefício clínico na IC focal e mais estudos experimentais e clínicos devem ser desenvolvidos.

Palavras-chave: Acidente Vascular Cerebral Agudo. Neuroproteção. Rato. Oclusão cerebrovascular. Hemodiluição. Isquemia focal.

ABSTRACT

Introduction: cerebral ischemia (HF) is a complex pathological process that involves a series of mechanisms ranging from blood flow obstruction and cession of oxygen and nutrients, to the various mechanisms of cell damage and death. Despite advances in understanding and therapy in recent decades, much remains to be discovered about its pathophysiology and ideal approach. On the other hand, ischemic stroke, the disease that most represents HF, is one of the largest causes of mortality in the world. Thus, this study aims to study the neuroprotective effect of normovolemic hemodilution on the neuroprotection of rats submitted to focal ischemic injury of the central nervous system. This therapy is widely accessible in clinical practice and can be applied concomitantly with other modern methods of treatment of HF. **Objective:** to evaluate the histological effect of normovolemic hemodilution (HNV) on the neuroprotection of rats submitted to focal ischemic central nervous system injury and subsequent cerebral reperfusion. **Materials and methods:** 36 male Wistar rats were used (18 in the control group and 18 in the intervention group), weighing 280-330 g. Focal HF is induced by occlusion of the left middle cerebral artery for 1 h. After this time, the occlusion is undone in a new anesthetic time, re-establishing the normal cerebral flow. At this stage, the intervention group goes through immediate hemodilution of 10% considering the basal volemia of the animal. After 48 hours, the animals are sacrificed. Coronal cuts are made in the brain and stained with triphenyltetrazolium chloride solution to study and compare the ischemic area. **Results:** Coronal sections of the brain of 9 animals in the control group and 10 animals in the intervention group were evaluated. The results show that the control group presented a mean infarcted area of $48.75 \pm 7.78\%$ of the hemisphere with injury and the intervention group presented an area of injury: $25.8 \pm 14.48\%$ (Table 01). The difference was significantly smaller for $p < 0.05$. **Discussion and Conclusion:** cerebral ischemic injury involves complex mechanisms of cellular damage. Among the important factors in its understanding is tissue perfusion. Considering this, HNV presents theoretical and experimental substrate in neuroprotection after this lesion. On the other hand, in view of the evolution of arterial reperfusion therapies, it will be increasingly common the treatment of patients after revascularization and auxiliary therapies may assume a consistent role in this scenario. Hemodilution may bring clinical benefit in focal HF and more experimental and clinical studies should be developed.

Keywords: Acute Stroke. Neuroprotection. Rat. Cerebrovascular Occlusion. Hemodilution. Focal Ischemia

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.1 Epidemiologia e impacto do Acidente Vascular Cerebral (AVC).....	12
1.2 Acidente vascular cerebral isquêmico(AVCi) e sua fisiopatologia.....	13
1.3 Tratamento do AVCi agudo e seus avanços.....	18
1.4 O papel da hemodiluição na isquemia cerebral focal.....	20
1.5 Modelo de isquemia cerebral focal em ratos.....	23
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo primário.....	32
4.1 Objetivo secundário.....	32
5 RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	38
ARTIGO EM INGLÊS.....	44
ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	599
CONCLUSÃO.....	765

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Artéria Carótida
ACM	Artéria Cerebral Média
AP	Área de Penumbra
AVC	Acidente Vascular Cerebral
AVCi	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
FSC	Fluxo Sanguíneo Cerebral
HNV	Hemodiluição Normovolêmica
IC	Isquemia Cerebral
MERCI	Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia
PAM	Pressão Arterial Média
PIC	Pressão Intracraniana
PPC	Pressão de Perfusão
RL	Radicais Livres
SF	Soro Fisiológico:
TTC	Trifeniltetrazólio
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equação para fluxo sanguíneo cerebral.....	15
Figura 2 – Efeito da restrição sanguínea no dano neuronal.....	16
Figura 3 – Gráfico de efeito de isquemia neuronal.....	17
Figura 4 – Cortes encefálicos de ratos Wistar.....	27
Figura 5 – Cortes encefálicos pós-corante.....	28
Figura 6 – Representação de oclusão de artéria cerebral média.....	28
Figura 7 – Imagens trans-operatória.....	29
Figura 8 – Imagens trans-operatória.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das amostras	34
Tabela 2 – Resultados das amostras	34

INTRODUÇÃO

Uma ampla variedade de mecanismos está envolvida na lesão cerebral isquêmica. Recentes estudos mostram que a lesão de neurônios após a isquemia-reperfusão pode ocorrer através da depleção de substratos energéticos celulares, liberação de aminoácidos excitatórios, aumento do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial, culminando na ativação de um estágio apoptótico (LIPTON, 1999; WHITE et al., 2000). Após o dano cerebral isquêmico, ambos, apoptose e degeneração neuronal foram observados em várias regiões cerebrais, incluindo o neocórtex, estriado, hipotálamo e o tálamo (GARCIA et al., 1993). A sequência temporal dos eventos apoptóticos tem sido caracterizada como iniciando 6 horas após a lesão e permanecendo evidente após 24 e 48 horas (RUPALLA et al., 1998).

Neste sentido, torna-se importante testar novas abordagens terapêuticas em um modelo experimental que simule o trauma isquêmico, com alta prevalência na sociedade brasileira (MINELLI; FEN; MINELLI, 2007; CASTRO et al., 2009; LOTUFO, 2005; BRASIL, 2012). Desta forma, através deste trabalho pretende-se estudar o efeito neuroprotetor da hemodiluição normovolêmica sobre a neuroproteção de ratos submetidos à lesão isquêmica focal do sistema nervoso central.

Os dados e publicações a respeito do efeito deste assunto são escassos. Nas buscas realizadas em base de dados, utilizando termos como neuroproteção ou isquemia cerebral, associado a hemodiluição, são encontrados poucas citações objetivas e raros estudos experimentais.

No entanto, a expectativa acerca da hemodiluição em pacientes com tendência a dano isquêmico agudo não é recente. A terapia dos “3 Hs” (hemodiluição, hipertensão e hipervolemia) é historicamente usada para prevenção de vasoespasmos em pacientes com hemorragia subaracnóide (LEE; LUKOVITS; FRIEDMAN, 2006). Em emergências médicas, a instituição de volume isotônico na abordagem inicial de suspeitos de acidente isquêmicos também já foi proposta (GROTA et al., 1985).

Segundo dados do Ministério da Saúde, o acidente isquêmico cerebral (AVC) é a principal causa morte em nosso país⁸. Sua apresentação clínica varia num amplo espectro de sintomas brandos como parestesias e episódios confusionais, até quadro catastróficos como coma. O trabalho de prevenção desta patologia, que

envolve a abordagem de fatores risco como hipertensão arterial sistêmica, diabetes, obesidade, tabagismo e dislipidemia (CASTRO et al., 2009), tem relevância clínica bem estabelecida. Por outro lado, o tratamento do quadro agudo recém consolidou os primeiros passos com a terapia de trombólise farmacológica endovenosa e, ainda mais modernamente, trombólise mecânica em procedimentos radio-intervencionistas (ANDERSON et al., 2016). Entretanto, estes recursos nem sempre estão disponíveis nas emergências médicas, principalmente as fora de grandes centros urbanos. Neste cenário, a infusão de soro fisiológico (SF) é comumente estabelecida em atendimentos de pronto-socorro para pacientes com diagnóstico ou suspeita de AVC, seu real efeito ainda necessita ser estimado, assim como dose, tempo de infusão, posologia, relação com análises laboratoriais (tais como hematócritos e natremia) e possíveis efeitos adversos.

Este trabalho ocorrerá no âmbito experimental com um modelo já consolidado de oclusão temporária da artéria cerebral média em roedores (ULUÇ et al., 2011; BEDERSON, 1986). Considerando o dano isquêmico inicial do procedimento, os autores propõem um protocolo de hemodiluição conceitualmente factível no ambiente de atendimentos hospitalares. Os resultados serão gerados por informações quantitativas da área isquêmica encefálica nos animais submetidos ao experimento. Discussão dos dados e possíveis aplicações clínicas são, então, feitas pelos autores.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Epidemiologia e impacto do Acidente Vascular Cerebral (AVC)

Segundos dados divulgados pelo Ministério da Saúde do Brasil, o AVC é principal causa de óbito na população adulta do país, além de ser responsável por 10% das internações hospitalares (MINELLI; FEN; MINELLI, 2007; CASTRO et al., 2009; LOTUFO, 2005; BRASIL, 2012). Após o evento inicial, um a cada 10 pacientes diagnosticados do AVC vem a falecer em trinta dias e este número pode chegar a 50% no primeiro ano (BRASIL, 2012).

De acordo com publicações internacionais, em 2015, o acidente vascular cerebral causou 11,8% das mortes no mundo (BENJAMIN et al., 2018). Esta estatística se manterá estável, com projeção de que em 2030, seja responsável por 12,2% dos óbitos globais, permanecendo a segunda causa de morte no mundo (atrás apenas de doenças cardíacas) (WHO, 2013).

Além das altas incidências, as doenças vasculares também estão relacionadas a altas taxas de morbidade e incapacidade funcional. Nos Estados Unidos, gastos com pacientes que sobreviveram a acidentes vasculares cerebrais chegam perto de 20 bilhões de dólares ao ano. Além da perda anual de produtividade de 15,5 bilhões, considerando óbitos e afastamento da atividade laboral (FANG et al., 2012). Dados brasileiros indicam que até 70% da população economicamente ativa que sofre AVC não retorna plenamente ao trabalho e cerca de 30% irá necessitar de auxílio para deambular (BRASIL, 2012).

Desta forma, é evidente o impacto que esta doença causa na sociedade brasileira, assim como sua importância no dia-a-dia dos médicos e demais profissionais de saúde. Com o envelhecimento da população, esta doença se torna cada vez mais incidente e as taxas de mortalidade no Brasil apresentam crescimento mais exuberante que em países desenvolvidos, principalmente nas grandes cidades (LOTUFO, 2005). Importantes avanços foram desenvolvidos nas últimas décadas para manejo das doenças cerebrovasculares, acompanhando sua melhor compreensão. Apesar disso, os cuidados e terapêuticas para interromper ou mesmo recuperar danos causados pelas lesões no tecido nervoso permanecem limitados, como mostram os dados citados neste item.

1.2 Acidente vascular cerebral isquêmico(AVCi) e sua fisiopatologia

O acidente vascular cerebral é classicamente dividido em dois tipos: isquêmico e hemorrágico. O primeiro representa cerca de 85% dos casos (MINELLI; FEN; MINELLI, 2007). Entre os diversos fatores de riscos, podemos citar a hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus*, obesidade, dislipidemia, tabagismo, etilismo, sedentarismo e distúrbios cardíacos como fibrilação atrial. Entre os fatores não-modificáveis estão a idade, sexo, raça e histórico familiar, sendo que o gênero masculino e a raça negra apresentam maior propensão (CASTRO et al., 2009).

O AVC hemorrágico acontece quando há extravasamento de sangue no parênquima cerebral em decorrência do rompimento de um vaso ou malformação vascular. Já o AVCi ocorre em consequência da oclusão luminal de uma artéria do tecido nervoso, desencadeando um processo isquêmico no tecido a jusante.

A isquemia pode iniciar por diferentes mecanismos, a saber: aterosclerose, fenômenos cardio-embólicos, vasculites, dissecação arterial, vasoespasmo, estados pró-trombóticos, hipoperfusão por choque sistêmico entre outros. Êmbolos e placas arteroscleróticas são as duas causas mais comuns. A primeira representa 15 a 20% dos AVCi e além da fibrilação atrial, é ocasionado por próteses valvares, doenças reumatológicas cardíacas, aneurisma ventricular e forâmen oval patente (SACCO et al., 1989). A doença arterosclerótica também responde por grande parcela dos infartos cerebrais (SOLER; RUIZ, 2010). Placas de ateromas podem se desenvolver e ocasionar oclusão em grandes vasos nutridores do tecido nervoso, como artérias carótidas e vertebrais, ou em pequenos vasos intracranianos. Agregação plaquetária, dano endotelial, deposição de lipídios e formação de fibrina são mecanismo envolvidos na evolução da arterosclerose.

A isquemia cerebral (IC) ocorre quando o fluxo sanguíneo diminui a ponto de não sustentar o metabolismo do tecido nervoso. Durante o processo, alterações celulares são desencadeadas em cascata e o desfecho final é a morte neuronal, que macroscopicamente é expressa pelo infarto cerebral. A IC pode ser analisada em dois grupos: global e focal (SIESJO, 1992a, 1992b; SIESJO; SIESJO, 1996).

Isquemia global ocorre quando o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) diminui em todo cérebro, como em uma parada cardíaca. O dano e morte celular pode variar dependendo da região analisada, o que significa que determinadas áreas encefálicas são mais resistentes ao sofrimento isquêmico que outras (CERVOS-

NAVARRO, DIEMER, 1991). Por exemplo, estudos experimentais em roedores mostraram que neurônios do hipocampo são mais resistentes nessa espécie (CERVOS-NAVARRO, DIEMER, 1991; PULSINELLI; BRIERLEY; PLUM, 1982). No entanto, essa diferença não passa de minutos. Por fim, o prognóstico em uma IC global tende a ser mais sombrio se medidas clínicas não forem instituídas rapidamente. Em uma parada cardíaca o tempo médio de retomada de fluxo cerebral para uma adequada recuperação neurológica é de 12 minutos (SAFAR; STEZOSKI; NEMOTO, 1976).

Já IC focal decorre da oclusão de uma artéria ou supressão sanguínea em uma área específica do encefálica. Independente do mecanismo pela qual a artéria foi lesada ou ocluída, o insulto isquêmico tende a evoluir de maneira centrífuga no território vascular. As zonas mais periféricas recebem aporte de artérias colaterais, enquanto a parte mais central é mais dependente do vaso nutridor. Estas áreas periféricas, comumente são definidas como áreas de penumbra (AP) (PULSINELLI, 1992), na qual há sofrimento isquêmico, mas terapias de reperfusão podem levar a recuperação das células (DONNAN et al., 2008). AP tem representação radiológicas em exames tomográficos e principalmente em ressonância magnética. A otimização em recuperação tem sido foco nos tratamentos modernamente desenvolvidos.

Esse conhecimento de que o infarto tecidual não é um evento uniforme ou dicotômico, e durante seu processo há janelas de reversibilidade foi se consolidando nas últimas décadas (DONNAN, 2007). A evolução do conhecimento acerca do FSC e evolução nas técnicas de sua aferição foram passo crucial para isso. Symon, Pasztor e Branston (1974) publicaram na década de 70 um estudo experimental com observações que foram um marco para a compreensão da IC focal. No trabalho um modelo de oclusão de artéria cerebral média mostrou três zonas distintamente afetadas na isquemia cerebral. Uma primeira, mais periférica, afetada discretamente pela diminuição do FSC; uma segunda zona, com aporte sanguíneo intermediário, que apresentava traçado isoelétrico em estudo eletroencefalográfico; e uma zona central na qual o insulto isquêmico gerado pela redução marcante de suprimento arterial desencadeava, além da alteração no eletroencefalograma, sinais de dano quase imediato na membrana celular e distúrbios na concentração de potássio extracelular. Igualmente importante, o autor demonstrou que a elevação da pressão sanguínea causou aumento do FSC na zona intermediária, resultando em

recuperação neuronal e conseqüente diminuição da área infartada. Desde então o conceito de área de penumbra recebe atenção intensa do meio científico.

Conhecimento acerca do fluxo sanguíneo cerebral é fundamental para compreensão dos mecanismos envolvidos na isquemia cerebral (JONES, 1981). Seus níveis sofrem variações relacionadas com a pressão sanguínea, resistência vascular e pressão intracraniana. O FSC é expresso pela função de pressão de perfusão cerebral (PPC) pela resistência vascular cerebral (RVC). Já a PPC é calculada pelo resultado da Pressão Arterial Média (PAM) subtraída da Pressão Intracraniana (PIC) (CIPOLLA, 2009) (figura 1). Em circunstâncias que o FSC global tem relevância marcante no desfecho clínico, como atendimento a traumatizados, a PAM e PIC são frequentemente aferidas intrinsecamente e se tornam alvo direto das terapias clínicas e cirúrgicas (CHESNUT et al., 2012; SMITH, 2008). Por outro lado, a resistência vascular também é objeto de atenção especial e sofre alterações acompanhando parâmetros fisiológicos como troca de gases na ventilação, níveis ácido-base e temperatura sistêmica, além ser influenciada por limitantes ao adequado retorno venoso. Estes tópicos não serão amplamente debatidos neste trabalho devido a sua imensa abrangência de informações e necessidade de foco nos eventos desencadeados pela isquemia focal e suas conseqüências histológicas e celulares.

Figura 1 – Equação para fluxo sanguíneo cerebral

$$\text{FSC} = \frac{\text{PPC}}{\text{RVC}}$$

$$\text{PPC} = \text{PAM} - \text{PIC}$$

Fórmulas que demonstram a relação entre fluxo sanguíneo cerebral (FSC), pressão de perfusão (PPF), pressão arterial média (PAM) e pressão intracraniana (PIC).
Fonte: Cipolla (2009).

Atualmente conceito de área de penumbra é aceito como o território periférico de uma IC que ainda pode ser recuperado quando aplicadas terapias de reperfusão (WHITE, 2000; SIESJO, 1992a, PULSINELLI, 1992; DONNAN et al., 2008; DONNAN, 2007), seja mecânica ou farmacológica. A AP é dinâmica no processo isquêmico. Durante os primeiros minutos de um AVCi focal, virtualmente toda área acometida é de penumbra. Com a evolução da lesão, a penumbra diminui centrifugamente e são variáveis da possível recuperação o fluxo sanguíneo e o

tempo decorrido. A figura 2 mostra a relação e progressão de um infarto cerebral considerando estas duas variáveis. As etapas de sofrimento neuronal com a progressiva diminuição de fluxo sanguíneo também é melhor conhecida e são esquematizadas na figura 2. Tais dados foram consolidados, principalmente, a partir com estudos em primatas, nos quais AVCi eram ocasionados no território da artéria cerebral média (ACM) (JONES, 1981).

Ainda sobre AP algumas observações feitas com base em estudos com culturas de células merecem ser citados. Ao contrário da impressão inicial de que a reperfusão sanguínea sempre levaria a um benefício e recuperação celular, foi identificado que neurônios em sofrimento podem inexoravelmente evoluir para morte celular mesmo com a correção do aporte de oxigênio e nutrientes. Ainda, evidências mostram que a revascularização, a depender de sua intensidade e estágio da isquemia em que é realizada, pode causar um efeito deletério (SMITH, 2004; SCHALLER; GRAF, 2004). Ou seja, circunstancialmente, reperfusão de tecido isquêmico é pode ser mais lesivo que a evolução do insulto inicial. Por último, a evolução dos mecanismos de dano celular parecem não ser idênticas quando comparada as células que sofreram impacto mais agudo, no centro do território, com aquelas de sofrimento mais prolongado, na periferia (LIPTON, 1999).

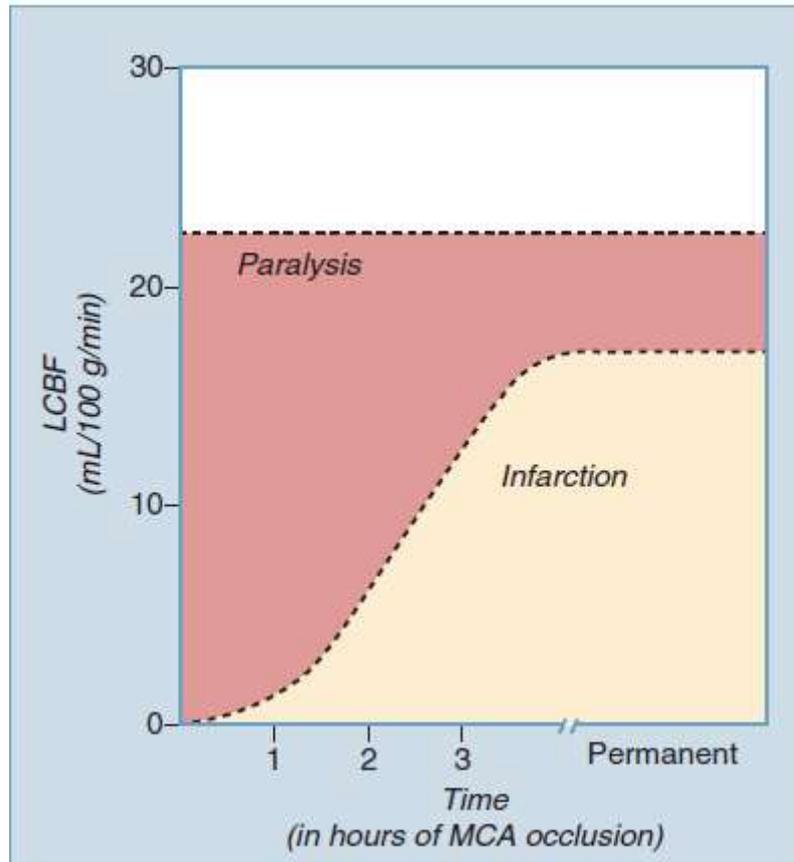
Figura 2 – Efeito da restrição sanguínea no dano neuronal

Ischemic Threshold	Rate of CBF (mL/100 g/min)	Neurological Manifestation
Normal	50-60	No deficit
First	25-30	Mild to moderate deficit from electrical impairment
Second	16-20	Severe deficit from electrical failure
Third	10-12	Profound deficit from pump failure and cytotoxic edema
Fourth	<10	Impending death from gross metabolic failure

O dano celular tem relação direta com o FSC. Quanto mais crítico é a restrição, mais importante é a lesão devido a isquemia.

Fonte: Winn (2016).

Figura 3 – Gráfico de efeito de isquemia neuronal



Estudos experimentais em primatas mostraram que a função neuronal se torna nula quando o fluxo sanguíneo diminui abaixo de 23ml/100g/min. Lesão irreversível passa a correr em reduções mais graves e a injúria se acentua quanto mais prolongado é o tempo isquêmico.
 Fonte: Winn (2016).

Muito ainda se tem para esclarecer a respeito de toda fisiopatologia da IC. No entanto, os experimentos das últimas décadas revelaram que a lesão isquêmica é resultado de um complexo processo de cascatas bioquímicas, que podem evoluir durante horas, até dias (SIESJO, 1992a, 1992b, SIESJO; SIESJO, 1996; WAHLGREN; AHMED, 2004; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Entre os diversos fatores que envolvem os mecanismos de lesão neuronal, três parecem desempenhar os efeitos principais: excitotoxicidade e desequilíbrio iônico, estresse oxidativo por radicais livres e a programação da apoptose celular.

No momento em que a oclusão arterial priva neurônios de oxigênio e glicose, a falta de ATP afeta os gradientes iônicos mantidos pela membrana celular e leva a uma importante despolarização local. Tal evento desencadeia descarga de glutamato, aminoácido que em excesso gera um acúmulo de cálcio no meio intracelular. O cálcio tem papel de destaque na homeostase celular e sua forma

iônica (Ca^{+2}) é mantida em muito maior concentração no meio extracelular à custa de ATP e canais sódio-dependentes (FASOLATO; INNOCENTI; POZZAN, 1994; ABRAMOV; SCORZIELLO; DUCHEN, 2007). A desregulação e grande quantidade cálcio no interior da célula ativa enzimas que degradam proteínas e lipídios, gerando radicais livres (RL) e óxido nítrico. Falhas nos mecanismos mitocondriais também estão presentes nas disfunções celulares e geram mais RL (ABRAMOV; SCORZIELLO; DUCHEN, 2007; MATSUO et al., 1995; FISKUM; MURPHY; BEAL, 1999). Por fim, começam a ocorrer danos ao DNA e rotas de apoptose são ativadas.

Ainda, diferentemente da morte celular programada (apoptose), insultos extremos geram necrose celular. Histologicamente, a necrose causa alterações como edema celular e vacúolos citoplasmáticos, culminando com lise da membrana e liberação de debris celulares que ocasionam dano a células vizinhas e resposta inflamatória (eventos que são mínimos na apoptose) (HENGARTNER, 2000; KARCH; MOKENTIN, 2015).

Entretanto, a luz do conhecimento atual, necrose e apoptose não são eventos dicotômicos e opostamente divididos entre morte programada e não-programada. Pelo contrário, os conceitos primários parecem ser pontos extremos de um espectro no qual podem ser encontrados diversos cenários morfológicos simultâneos ou em combinação na morte celular. Esse aspecto pode ter correlação com as diferentes evoluções celulares no infarto cerebral citado previamente, a depender da intensidade e cronologia da isquemia neuronal (RAMI; KOGEL, 2008; HENGARTNER, 2000; KARCH; MOKENTIN, 2015; BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006).

1.3 Tratamento do AVCi agudo e seus avanços

Além de ser uma doença amplamente incidente na população, o AVCi também apresenta uma grande variedade de apresentações clínicas. Suas manifestações podem variar de um quadro confusional transitório ou discreta parestesia no braço, a uma severa hemiplegia com afasia ou mesmo quadro de coma. Os principais fatores responsáveis por estes achados são topografia e dimensão da lesão. Isquemias lacunares no polo frontal podem passar despercebidas em uma pessoa idosa. Já êmbolos na ACM ou infartos no tronco

cerebral são situações críticas e de prognóstico sombrio caso a interrupção do fluxo cerebral não seja tratada (BRASIL, 2012; ANDERSON, 2016; BENJAMIN et al., 2018; DONNAN, 2008).

Por outro lado, as características epidemiológicas e apresentações agudas da doença deixam claro que todo centro de saúde que recebe emergências médicas deve estar preparado para atender pacientes com AVCi. Profissionais vigilantes quanto a diagnóstico e conduta, disponibilidade de terapias e exames complementares e agilidade no processo de atendimento são alguns dos fatores envolvidos para o melhor tratamento do AVCi. Atendimento pré-hospitalar eficiente, rapidez na aplicação de exames de imagem, manejo interdisciplinar e centros de referência vocacionados para casos mais complexos também são pontos cruciais para o fluxo otimizado dos pacientes (ANDERSON et al., 2016; DONNAN, 2008).

Nesse contexto, avanços importantes foram realizados nas últimas décadas. Guidelines notoriamente passaram a enfatizar a preocupação com o rápido manejo dos pacientes com AVCi, representando a ideia de que “tempo é cérebro” (HACKE et al., 2008). Em média, cada minuto de evolução em um infarto cerebral representa a perda de 1,9 milhões de neurônios e 14 bilhões de sinapses.

Em 1995 foi divulgado o primeiro ensaio clínico randomizado com resultados positivos no uso de Alteplase endovenoso para o tratamento do AVCi agudo (HACKE et al., 1995). Nos anos seguintes, novos estudos reforçaram o benefício da droga trombolítica, estandardizando critérios e avaliações, consolidando e até estendendo a janela de tempo para aplicação (inicialmente seu uso era restrito até 3 horas do início do quadro, quando então trabalhos mostraram benefício para janelas de 4,5 horas e, posteriormente, até 6 horas), correlacionando seu uso aos achados em exames de imagem e, por fim, deixando cada vez mais claro a importância de centros de referência treinados para executar os protocolos de reperfusão (THE NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE RT-PA STROKE STUDY GROUP, 1995; HACKE et al., 2008; WARDLAW; KOUMELLIS; LIU, 2013; LEVY et al., 2009; BERKHEMER et al., 2015).

Concomitante a difusão de Alteplase na terapia do AVCi agudo, outro método promissor foi ganhando corpo nas últimas décadas. A técnica endovascular para tratamento de doenças intracranianas teve evolução exponencial e hoje ostenta crescente entusiasmo na intervenção da IC. Após alguns trabalhos não-

sistematizados, nos anos 90s os ensaios clínicos PROACT I e II mostraram evidente benefício na recanalização de ACM quando utilizados aplicação direta intra-arterial de trombolítico na oclusão do vaso (FURLAN et al., 1999; DEL ZOPPO et al., 1998). Apesar do aumento da taxa de complicações hemorrágicas, o a recuperação do grupo tratado era significativamente melhor.

O entusiasmo com o método cresceu na década seguinte, e técnicas avançadas para retirada mecânica de êmbolos se desenvolveram. Em 2004 foi aprovado nos Estados Unidos o uso do MERCI (Mechanical Embolus Removal in Cerebral Ischemia) (SMITH et al., 2005, 2008). Tal recurso endovascular poderia ser usado em até 8 horas do início de um quadro isquêmico; no entanto, o benefício em comparação a terapia trombolítica de Alteplase não era claro. Nos últimos 10 anos, a criação de dispositivos endovasculares, como *stents*, foram testadas e comparadas com a já estabelecida terapia trombolítica, firmando resultados cada vez mais encorajadores. Com o avanço dos testes, atualmente a comunidade científica aguarda resultados relativos ao uso de técnicas de reperfusão com expansão da janela de tratamento, incluindo pacientes com sintomas estabelecidos até 24 horas (CAMPBELL et al., 2015; SAVER et al., 2015; JOVIN, et al., 2015; GOYAL et al., 2015; CAMPBELL et al., 2015; BERKHEMER et al., 2015).

Contudo, mesmo com a crescente importância dada ao rápido manejo do AVCi, consolidação dos protocolos e maior disponibilidade nos centros médicos das terapias citadas, a parcela de pacientes elegíveis para receber tratamento de recanalização arterial é pequena. Nos Estados Unidos, essa taxa não passa de 17% (PAPANAGIOTOU; NTAIOS, 2018). No Brasil, as informações a respeito são limitadas, mas mesmo com recentes esforços para desenvolver centros de referência para AVC, o sistema de saúde carece de melhor estruturação e eficiência.

1.4 O papel da hemodiluição na isquemia cerebral focal

Considerando a disparidade entre a volumosa incidência de AVCs e a escassa oportunidade de executar os mais avançados tratamentos para esta doença em nosso meio, princípios mais acessíveis que as terapias de revascularização seguem com papel relevante e merecem ser desenvolvidas.

As primeiras condutas em paciente com suspeita de AVC são relativas a garantia das funções vitais e estabilização de qualquer alteração sistêmica com

distúrbio evidente que ofereça risco iminente a saúde. Isto é especialmente importante nos casos mais graves e seu fluxo deve iniciar desde o atendimento pré-hospitalar (BRASIL, 2012; ANDERSON et al., 2016). Após instalação no ambiente de emergência, esforços são direcionados para confirmação do diagnóstico. A função dos exames de imagem encefálica são insubstituíveis nesse ponto (DONNAN et al., 2008). Finalmente, a instituição de terapias diretas visando a IC aguda podem ser realizadas. É nesse estágio as limitações ficam explícitas. Como citado previamente, raros são os pacientes em condições operacionais e cronológicas de seguir para intervenção de reperfusão vascular.

Nesse contexto, a hemodiluição pode apresentar função relevante no tratamento do AVCi. Seu subsídio teórico é otimização reológica do fluxo sanguíneo, levando a melhor perfusão tecidual (TU et al., 1988a, 1988b; HEROS; KAROSUE, 1988). Sua execução é possível em qualquer centro de atendimento médico, desde o grande centro hospitalar até a pequena emergência no interior. Além de ser uma medida tecnicamente simples, apresenta raras contraindicações ou malefícios (KAPP et al., 1988; COLE et al., 1992; ORTON et al., 1997) (como todo tratamento, não é isento de riscos e podemos citar comorbidades cardíacas, aumento de edema cerebral, e distúrbios eletrolíticos como elementos que merecem atenção). Também é notório que sua administração não exclui qualquer tratamento de revascularização e pode ser executada antes, no transcorrer ou após estes. Ademais, a hemodiluição é uma terapia de baixo custo, um dos fortes entraves no nosso meio.

Apesar do valor da hemodiluição ter sido testado em estudos clínicos e experimentais nas últimas décadas, seu exato papel no tratamento da IC ainda não está estabelecido. Sua ação estaria ligada ao conceito de AP, já referido. Como, comprovadamente, sutis melhoras da perfusão tecidual poderiam salvar neurônios e estabelecer melhor recuperação clínica, o efeito da hemodiluição na transmissão de oxigênio e nutrientes e na remoção de metabólitos segue sendo parâmetro de estudo (TU et al., 1988a, 1988b; HEROS; KAROSUE, 1988; KAPP et al., 1988; COLE et al., 1992; ORTON et al., 1997; THE HEMODILUTION IN STROKE STUDY GROUP, 1989; KOLLER et al., 1990; COLE et al., 1993; FISHER; GINSBERG, 2004).

A evidência de que hemodiluição pode melhorar a perfusão cerebral é reforçada pela equação de Hagen-Poiseuille, na qual o fluxo sanguíneo é

inversamente proporcional a sua viscosidade. Tal parâmetro é intimamente relacionado ao hematócrito (Hct) de um indivíduo e evidências mostram que seu papel é ainda mais crucial em ambientes de microcirculação, na qual os gradientes de velocidade de fluxo são menores e aos quais competem grande parte dos territórios de penumbra (FISHER; GINSBERG, 2004).

Neste cenário, ainda são poucas as informações disponíveis até o momento sobre a intensidade adequada de hemodiluição (níveis ótimos de Hct) e sua relação com o transcorrer das horas e dias de lesão isquêmica encefálica. A transmissão de oxigênio em um tecido sadio é finamente ajustada pela auto-regulação cerebral do FSC. No entanto, em áreas sofrendo insulto agudo, esta capacidade se perde (HEROS; KARASUE, 1988). Nesta situação os vasos tendem a desenvolver máxima dilatação e o aumento da capacidade reológica do sangue teve benefício experimentalmente demonstrado (TU et al., 1988a).

Hemodiluição pode ser hipovolêmica, normovolêmica e hipervolêmica. Não há motivos para induzir um estado hipovolêmico em um indivíduo passando por agressão isquêmica. Pelo contrário, qualquer otimização clínica se beneficia de um adequado aporte de volume tanto sistêmico, como isquemia focal. Hipervolemia apresenta a inconveniente risco de edema cerebral em um tecido com regulação de fluxo já prejudicada e conseqüente elevação da pressão intracraniana. Este efeito é deletério para lesão focal e para condição neurológica global. Além disso, pacientes que desenvolvem AVC normalmente apresentam comprometimento vascular sistêmico, o que inclui doenças cardíacas. Uma sobrecarga de volume em pacientes reserva cardiovascular comprometida é extremamente perigoso (TU et al., 1988a; HEROS; KAROSUE, 1988; KAPP et al., 1988). Dessa maneira, HNV apresenta uma margem de segurança compatível com alterações sistêmicas e pode desempenhar o ganho esperado na otimização do fluxo tecidual de sangue.

Alguns trabalhos na literatura já demonstraram benefício da hemodiluição normovolêmica em IC em experimentos laboratoriais e em estudos clínicos (COLE et al., 1992; THE HEMODILUTION IN STROKE STUDY GROUP, 1989; KOLLER et al., 1990; GROTTA et al., 1985). Apesar de todas as considerações que devem ser feitas achados em animais, estes servem de anteparo para dar mais segurança a pesquisas clínicas e podem já prever prejuízos a serem evitados em uma hipótese científica.

As circunstâncias que envolvem um paciente com AVC são inúmeras. Como descrito, um dos fatores a ser considerado atualmente é a utilização de terapias em concomitância no atendimento ao paciente. Como vimos, mesmo em situações que a revascularização possa ser realizada em circunstâncias ótimas, o tecido cerebral sofre dano de sua lesão inicial. Os dados que podem reforçar o benefício da HNV em pacientes após reperfusão são escassos e, assim, modelos experimentais podem dar suporte a novas pesquisas e consolidação de medidas clínicas.

1.5 Modelo de isquemia cerebral focal em ratos

Desenvolvimento e execução de modelos experimentais são de fundamental importância para avaliação para melhor compreensão de patologias humanas. A simulação de eventos biológicos em laboratório permite melhor compreensão de condições anatômicas, fisiológicas, patológicas e farmacológicas (BARRÉ-SINOUSI; MONTAGUTELLI, 2015). No estudo da IC não é diferente.

O uso de ratos em modelos de AVCi possui as vantagens de ter o custo baixo comparado a outros animais, possuir anatomia intracraniana similar à do ser humano e apresentar boa reprodutibilidade. Além disso, na técnica utilizada existe a possibilidade de reperfusão, evento análogo à execução de uma intervenção hospitalar com sucesso e vai ao encontro dos aspectos estudados neste trabalho (BEDERSON et al., 1986; MENZIES; HOFF; BETZ, 1992; BRINT et al., 1988). Também é interessante notar que o procedimento proposto causa oclusão da ACM, situação comum na prática clínica dos AVCi de causa cardio-embólica.

Como em todo experimento laboratorial, a padronização do método é de vital importância. Os cuidados para tanto são enfatizados no item 2. Uluç et al. (2011) apresentaram modelo similar ao usado neste projeto e reforçou que mesmo com a utilização de filamentos produzidos sob medida para oclusão da ACM em ratos, variações da área isquêmica podem ocorrer. Este fenômeno não causa surpresa, visto que variedades anatômicas e fisiológicas ocorrem em todas espécies. No entanto, esforço deve ser feito para estandarização de todos os passos e controle de fatores externos que possam influenciar nos resultados das amostras. Para isso, diversos cuidados são tomados, como reforçado por outros autores: controle da temperatura local e do ambiente cirúrgico, padronização anestésica, antisepsia peri-operatória e de instrumental, analgesia da dor, alocação dos animais em

biotério com cuidados protocolares, dieta padrão para todos animais e cuidado para uso de animais de idade e peso corporal semelhantes.

Independente da técnica cirúrgica, trabalhos experimentais mostraram que a avaliação da isquemia focal 48 horas após oclusão de ACM em roedores é adequado para estudo de área infartada. Mesmo em procedimentos de isquemia-reperusão, a área central isquêmica apresenta dano consistente e estabelecido. A AP tem suas células afetadas proporcionalmente ao tempo isquêmico e intervenções sobre a perfusão cerebral. Neste modelo, tempo isquêmico mais extenso, de 2 a 3 horas, causa lesão de intensidade semelhante nas zonas centrais e periféricas (LIPTON, 1999).

Por fim, são escassas as informações sobre a relação da intensidade da hemodiluição e seu efeito clínico. Ou seja, apesar de embasamento teórico sobre o benefício da HNV e alguns resultados clínicos, pouco se sabe sobre otimização da dose-efeito. Em busca por dados que auxiliem no objetivo do projeto, foi encontrado que a retirada de até 10% da volemia de uma rato pode ser considerada segura. Em contrapartida, em roedores com peso semelhante, a infusão aguda de até 2ml de líquido é prudente (DIEHL et al., 2001; MORTON et al., 2001; NAGASAWA; KOGURE, 1989).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da UFRGS para experimentação animal e com a Lei Federal 11.794/08 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e regula o registro dos centros de experimentação animal.

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando 280-330 g. Após uma semana de adaptação no biotério do departamento de morfologia, todos os ratos são submetidos à técnica cirúrgica isquêmica. A isquemia cerebral focal é induzida por oclusão da artéria cerebral média esquerda por uma hora. Após este tempo, é desfeita a oclusão em novo tempo anestésico, reestabelecendo o fluxo cerebral normal. O processo não traz outro prejuízo circulatório ou sistêmico.

A seguir a descrição passo-a-passo do modelo utilizado, acompanhado de fotos ilustrativas captadas durante a execução do trabalho.

Primeiro tempo anestésico:

- Indução anestésica com isoflurano 5% em sistema fechado, com máquina desenvolvida para anestesia laboratorial e suporte de oxigênio externo.
- Tricotomia cervical anterior.
- Posicionamento do rato em cama aquecida a 35-37 °C, fixação com adesivos e ventilação com capacete adaptado.
- Antissepsia com Clorexidine alcoólico e anestesia local com Lidocaína 2%.
- Incisão paramediana e dissecação de planos subcutâneos sob microscopia. (microscópio Zeiss S88 e magnificação de até 8x)
- Identificação de glândula cervical e tendão de músculo esternocleidomastoideo, que será referência anatômica para encontrar bifurcação da carótida profundamente.
- Dissecação cuidadosa de artéria carótida comum (AC), e parte proximal de artéria carótida interna e externa. Hemostasia local.
- Posicionamento de fio de sutura prolene 5-0 em carótida comum com nó simples sem restringir fluxo do vaso.
- Clipagem distal e proximal de AC com distância mínima de 0,5cm entre os cliques e fio de sutura posicionado neste espaço.

- Produção de pertuíto delicado na AC com agulha.
- Posicionamento intraluminal de filamento nylon 4-0 com ponta encapada de silicone (comercializado por Doccol Corp., Redlands, EUA).
- Fechamento delicado do nó e abertura de clipe distal.
- Progressão superior de filamento até que seja encontrada resistência ou pequena parte do fio reste fora do vaso.
- Verificação de hemostasia e fechamento cutâneo.
- Animal retirado da anestesia.

Após uma hora de recuperação, a contar da progressão do filamento (tempo de isquemia) o animal segue para segunda etapa. Nesse período o pesquisador realiza teste clínico para verificar a isquemia, que é representada clinicamente por hemiparesia direita.

Segundo tempo anestésico:

- Anestesia e posicionamento conforme primeiro procedimento (não é realizado repique de anestesia local).
- Retirada de sutura subcutânea e identificação dos aspectos microcirúrgicos.
- Tração de filamento endovascular até visualização transluminal de silicone distal ao nó.
- Reposicionamento de clipe distal.
- Afrouxamento de nó e retirada de filamento.
- Sutura primária de AC com fio 9 ou 10-0.
- Retirada cuidadosa de clipe distal. Retirada cuidadosa de clipe proximal com atenção a imediato reposicionamento em caso de sangramento de grande fluxo por sutura.
- Em caso de pouco extravasamento, posicionamento de cotonete por 30 a 60 segundos. A hemostasia comumente ocorre com esta manobra conservadora.
- Em caso de extravasamento importante, reposicionamento de clipe proximal e reforço de sutura.
- Verificação de hemostasia.
- Fechamento cutâneo e retirada da anestesia.

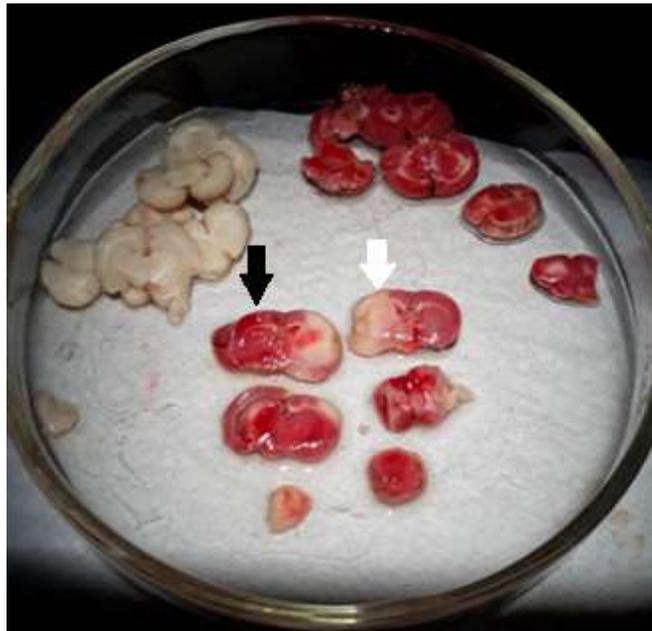
- No grupo intervenção, é neste momento que o pesquisador retira 2ml de sangue do animal e infundi 2ml de SF 0,9% aquecido, efetuando a hemodiluição normovolêmica.

Após os procedimentos os animais são mantidos em biotério climatizado, com água e ração conforme demanda. É utilizado protocolo de Tramadol subcutâneo para alívio da dor. Depois de 2 dias é realizado sacrifício sob anestesia geral e extração do encéfalo para análise.

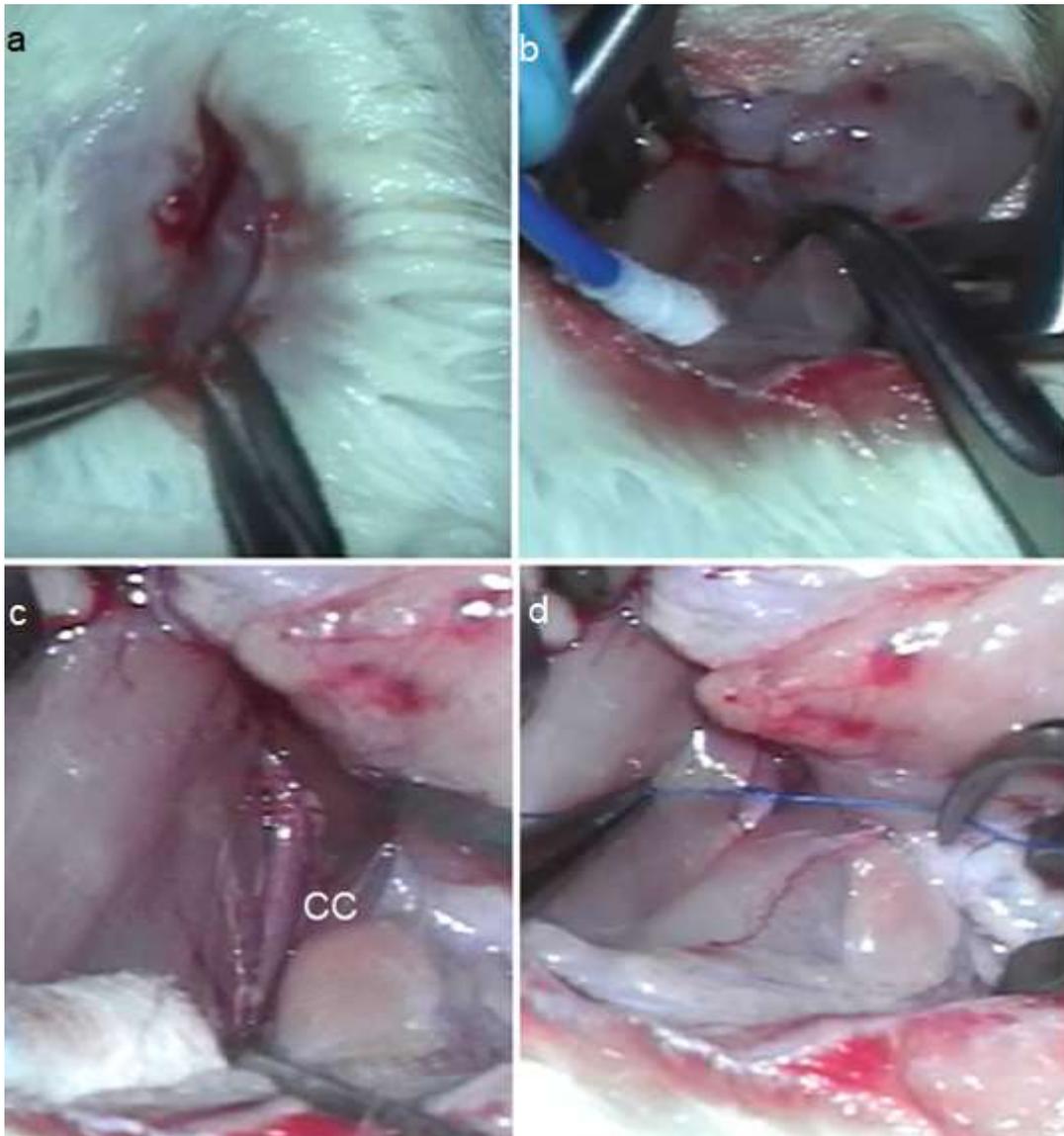
O cérebro é seccionado no sentido coronal e o tecido é imerso em solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, Sigma) a 1%. A área não perfundida representa a isquemia cerebral. As secções são digitalizadas e analisadas em software de análise de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, USA). As áreas hemisféricas e as áreas isquêmicas são delineadas em todos os cortes. O volume da área infartada e os volumes hemisferiais são, então, calculados.

Alguns pontos merecem destaque nesse processo: os procedimentos foram todos realizados pelo mesmo pesquisador para devida uniformização do experimento. Em uma fase inicial, o método foi testado e praticado em animais visando o aprendizado e padronização da técnica.

Figura 4 – Cortes encefálicos de ratos Wistar



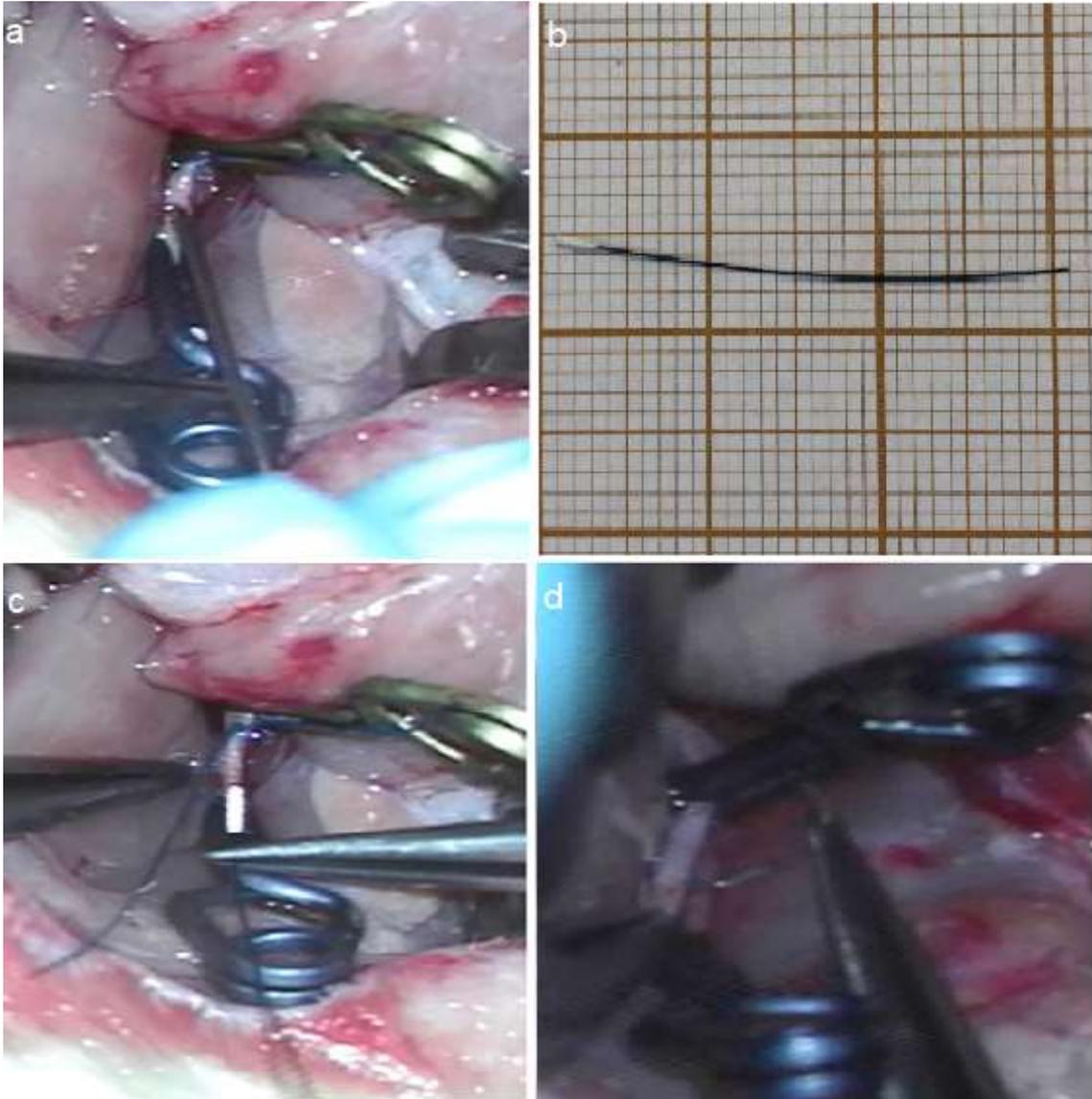
Cortes coronais de peças encefálicas dos roedores. É possível ver cortes não corados e corados com e sem lesão isquêmica. Seta preta: área íntegra. Seta branca: área de infarto

Figura 7 – Imagens trans-operatória

Procedimento de oclusão endovascular da artéria cerebral média: incisão paramediana cervical (a), dissecção e identificação de planos musculares (b), dissecção de artéria carótida comum (c), posicionamento de fio de sutura (d)

CC: carótida comum

Fonte: Autor.

Figura 8 – Imagens trans-operatória

Execução de pertuíto em artéria carótida com agulha (a), filamento endovascular com ponta revestida por silicone (b), posicionamento endovascular de filamento que progredirá até emergência da artéria cerebral média (c), sutura primária de artéria com fio 9 ou 10-0 após retirada de filamento (d)
Fonte: Autor.

3 JUSTIFICATIVA

O Acidente Vascular Cerebral isquêmico é uma doença de ampla incidência em nossa sociedade. Apesar dos avanços terapêuticos das últimas décadas e da melhor compreensão de sua fisiopatologia, ainda há muito para se descobrir. Por outro lado, médicos frequentemente lidam com estes pacientes, seja em lugares que carecem de infraestrutura, seja em hospitais onde há disponível modernos recursos diagnósticos e terapêuticos.

A hemodiluição é uma terapia disponível amplamente no atendimento clínico de pacientes e seu benefício na perfusão cerebral tem base teórica e experimental. Sua aplicação pode ser realizar em tratamentos mais conservadores da isquemia cerebral ou em concomitância com terapias de revascularização imediata. No entanto, é necessário maior aprofundamento de seu estudo para consolidação de protocolos no tratamento do AVCi agudo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo primário

Avaliar o efeito histológico da hemodiluição normovolêmica sobre a neuroproteção de ratos submetidos à lesão isquêmica focal do sistema nervoso central após 48 horas de reperfusão cerebral.

4.1 Objetivo secundário

Avaliar a segurança clínica de um protocolo de 10% hemodiluição normovolêmica em 10% para ratos submetidos à lesão isquêmica focal do sistema nervoso central e reperfundidos em 1 hora.

5 RESULTADOS

Foram avaliados os cortes coronais de 9 animais de grupo controle e 10 animais de grupo intervenção. Os demais não entraram na amostra por um ou mais dos seguintes motivos: não foi visualizado infarto tecidual após coloração (falha na técnica de execução da isquemia); óbito no trans-operatório; óbito no período pós-operatório de 48h; perda sanguínea trans-operatória que ultrapassasse 0,5ml no grupo controle ou 0,5ml além dos 2ml retirados no grupo intervenção; intercorrência que pudesse interferir na circulação global (por exemplo: dois animais tiveram trombose ou lesão de carótida comum).

Após escaneamento dos cortes coronais, as imagens foram submetidas a análise do software ImageJ, sendo identificado os seguintes parâmetros: área não-infartada de hemisfério afetado e área total de hemisfério contralateral. Com base nesses dados, foram calculados a área infartada de hemisfério afetado e proporção de área com infarto, ambos usando como base a área do hemisfério sem lesão.

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que o grupo controle apresentou uma área infartada média de 48,75% do hemisfério com lesão. Já, os cortes do grupo intervenção apresentaram 25,8%. Este dado foi estatisticamente significativo.

Considerando que o procedimento de retirada e infusão do grupo intervenção pudesse afetar de alguma forma anatômica a vascularização do hemisfério, ou mesmo que por ser mais elaborado e haver mais manipulação do local e do animal a isquemia da ACM pelo filamento foi de alguma forma prejudicada, foi retirado os 4 resultados mais extremos de em que houve baixo índice de infarto (animais intervenção 1, 2, 3, e 10) para novo cálculo. Nesse caso o resultado do grupo intervenção foi 35,45% de área de infarto no hemisfério com lesão, o que também gera uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1 – Resultados das amostras

Resultados	
Estatística T	4,336568
Graus de Liberdade	14,01718
P-valor	0,9996592
Média da Amostra 1	48,74
Média da Amostra 2	25,8
Desvio Padrão da Amostra 1	7,78
Desvio Padrão da Amostra 2	14,58
Tamanho da Amostra 1	9
Tamanho da Amostra 2	10
Hipótese Alternativa Menor que	0
Nível de Confiança	95%
Limite Inferior	-Inf
Limite Superior	32,25634

Tabela gerada mostrando P-valor >99% de probabilidade de hipótese nula não ser verdadeira.

Em outras palavras, $p < 0,01$.

Fonte: Autor.

Tabela 2 – Resultados das amostras

Resultados	
Estatística T	2,747837
Graus de Liberdade	8,939604
P-valor	0,988653
Média da Amostra 1	48,74
Média da Amostra 2	35,45
Desvio Padrão da Amostra 1	7,78
Desvio Padrão da Amostra 2	10
Tamanho da Amostra 1	9
Tamanho da Amostra 2	6
Hipótese Alternativa Menor que	0
Nível de Confiança	95%
Limite Inferior	-Inf
Limite Superior	22,16273

Tabela gerada mostrando P-valor >98% de probabilidade de hipótese nula não ser verdadeira.

Em outras palavras, $p < 0,05$.

Fonte: Autor.

DISCUSSÃO

O AVCi é a patologia mais associada a isquemia cerebral focal. Sua incidência é elevada no mundo inteiro e nos Estados Unidos o custo com esses pacientes passa dos 30 bilhões de dólares ao ano (SMITH, 2004). Apesar dos avanços em sua compreensão e tratamento nas últimas décadas, a única droga disponível para casos agudos é o ativador de plasminogênio tissular, Alteplase. As terapias endovasculares também surgiram como alternativa promissora de revascularização e vem se consolidando nos grandes centros (SCHALLER; GRAF, 2004; WAHLGREN; AHMED, 2004).

No entanto, é improvável que um paciente não sofra perda neuronal após instalação de um evento isquêmico. Estudos experimentais mostram que a perda celular inicia poucos minutos após oclusão arterial (WHITE et al., 2000; GARCIA et al., 1993; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999; KRISTIAN; SIESJO, 1998). Esse fato é principalmente verdadeiro para AVCi de causa cardio-embólica, que são responsáveis por cerca de 20% dos casos (FASOLATO; INNOCENTI; POZZAN, 1994). Neles é comum que uma artéria de maior calibre seja afetada, sendo a ACM a mais comum. Como a oclusão ocorre de maneira abrupta, o tecido acometido carece de circulação colateral. Mesmo assim, a IC não evolui de maneira homogênea e o território central, no qual a isquemia é mais crítica (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999), apresenta pior prognóstico quanto a sua recuperação ou reversibilidade do dano em caso de revascularização.

A base teórica de ação da hemodiluição é o aumento da reologia sanguínea, o que melhora a perfusão tecidual (MINELLI; FEN; MINELLI, 2007). A área de penumbra (AP), território no qual a lesão isquêmica ainda pode ser revertida, seria a maior beneficiada pela ação da hemodiluição. Esta hipótese já foi testada com resultados animadores em trabalhos laboratoriais, mas inconsistentes nos estudos clínicos (LEE; LUKOVITS; FRIEDMAN, 2006; ABRAMOV; SCORZIELLO; DUCHEN, 2007; MATSUO et al., 1995).

Em áreas saudáveis do sistema nervoso, a autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) age aumentando ou diminuindo o aporte local de sangue conforme demanda. Entretanto, em áreas com sofrimento isquêmico, os vasos apresentam essa capacidade alterada ou insuficiente (LOTUFO, 2005). A hemodiluição teria função importante no tratamento de fase aguda do AVCi,

otimizando a perfusão da AP (CASTRO et al., 2009; LOTUFO, 2005; BRASIL, 2012; LEE; LUKOVITS; FRIEDMAN, 2006).

Dessa maneira, este estudo visou avaliar qual o papel da hemodiluição em condições análogas a uma terapia de revascularização. O modelo utilizado apresenta conveniente característica de simular uma condição clínica frequente (AVCi por êmbolo cardiogênico) e possibilidade de revascularização evidente, simulando uma terapia de sucesso no tratamento hospitalar da IC focal. Previamente, já havia sido demonstrado que a oclusão da ACM por uma hora com o mesmo filamento deste trabalho gerava uma área de infarto consistente (FISKUM; MURPHY; BEAL, 1999). Por outro lado, os ratos podem sofrer injúria sistêmica com a retirada de sangue e infusão de soluções a depender a velocidade, quantidade e método utilizado. Os valores deste estudo foram escolhidos por se aproximar da dose máxima de infusão endovenosa que os animais poderiam aguentar considerando seu peso, sem prolongar o tempo anestésico (RAMI; KOGEL, 2008; HENGARTNER, 2000; KARCH; MOLKENTIN, 2015). Ou seja, o procedimento realizado se aproxima de uma situação de atendimento de emergência de AVCi, na qual o paciente é candidato a terapia de reperfusão e pode realizar HNV em curto período.

Também determinante no protocolo testado foi opção pela normovolemia. Hemodiluição pode ser hipovolêmica, normovolêmica e hipervolêmica. Não há motivos para induzir um estado hipovolêmico em um indivíduo passando por agressão isquêmica. Pelo contrário, qualquer otimização clínica se beneficia de um adequado aporte de volume tanto para o ponto de vista sistêmico, como para a isquemia focal. Hipervolemia apresenta a inconveniente risco de edema cerebral em um tecido com regulação de fluxo já prejudicada e consequente elevação da pressão intracraniana. Este efeito é deletério para lesão focal e para condição neurológica global. Além disso, pacientes que desenvolvem AVC normalmente apresentam comprometimento vascular sistêmico, o que inclui doenças cardíacas. Uma sobrecarga de volume em pacientes com reserva cardiovascular comprometida é perigoso (LOTUFO, 2005; WAHLGREN; AHMED, 2004). Dessa maneira, HNV apresenta uma margem de segurança compatível com estabilidade sistêmica e pode desempenhar o ganho esperado na otimização do FSC.

Outro fator a ser considerado, é a tendência de expansão da janela de execução para revascularização. Quando a Alteplase teve seu uso aprovado pela FDA, sua indicação era somente para aqueles casos com início de sintomas registrados no máximo 3 horas antes. Evidências mais atuais já indicam benefício do uso pode chegar a 4 horas e meia (WHO, 2013). Na mesma direção, as técnicas endovasculares evoluem para impactar o prognóstico até 6 (SACCO et al., 1989), ou mesmo 12 horas depois do início da IC. Neste sentido, é indispensável considerar que o processo de isquemia, em muitos casos, será tratado com revascularização horas após um dano já estabelecido. Ainda que os mecanismo de morte neuronal não sejam completamente compreendidos, é bem aceito que cascatas enzimáticas que levam a apoptose ou necrose neuronal não possam ser revertidas após certo tempo de privação de oxigênio e nutrientes. O quanto a HNV pode auxiliar nesse processo não é conhecido, mas os dados histológicos deste estudo mostram que esta terapia pode auxiliar na resposta do sistema nervoso a agressão inicial.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, A.Y.; SCORZIELLO, A.; DUCHEN, M.R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. **J Neurosci.**, v. 27, p. 1129-1138, 2007.
- ANDERSON, D. et al. Health Care Guideline: Diagnosis and Initial Treatment of Ischemic Stroke, 11th ed. Dec. 2016.
- BARRÉ-SINOUSSE, F.; MONTAGUTELLI, X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future science OA**, v. 1, n. 4, FSO63, Nov. 2015. doi:10.4155/fso.15.63
- BEDERSON, J.B. et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n. 3, p. 472-476, May/Jun. 1986.
- BENJAMIN, E.J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67-e492, 2018. doi: 10.1161/CIR.0000000000000558
- BERKHEMER, O.A. et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 372, p. 11-20, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 664, de 12 de abril de 2012**. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Trombólise no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/PRT0664_12_04_2012.html. Acesso em: 15 mar. 2019.
- BREDESEN, D.E.; RAO, R.V.; MEHLEN, P. Cell death in the nervous system. **Nature**, v. 443, p. 796-802, 2006.
- BRINT, S. et al. Focal Brain Ischemia in the Rat: Methods for Reproducible Neocortical Infarction Using Tandem Occlusion of the Distal Middle Cerebral and Ipsilateral Common Carotid Arteries. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 8, n. 4, p. 474-485, 1988.
- CAMPBELL, B.C.V. et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. **N Engl J Med**, v. 372, p. 1009-1018, 2015.
- CASTRO, J.A.B. et al. Estudo dos principais fatores de risco para acidente vascular encefálico. **Rev Bras Clin Med**, v. 7, p. 171-173, 2009. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2009/v7n3/a171-173.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- CERVOS-NAVARRO, J.; DIEMER, N.H. Selective vulnerability in brain hypoxia. **Crit Rev Neurobiol.**, v. 6, p. 149-182, 1991.
- CHESNUT, R.M. et al. A Trial of Intracranial-Pressure Monitoring in Traumatic Brain Injury. **N Engl J Med**, v. 367, p. 2471-2481, 2012.

CIPOLLA, M.J. **The Cerebral Circulation**. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2009. Chapter 5, Control of Cerebral Blood Flow.

COLE, D.J. et al. Focal Cerebral Ischemia in Rats: Effect of Hemodilution with 0:0: Cross-Linked Hemoglobin on CBF. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 12, p. 971-976, 1992.

_____. Focal Cerebral Ischemia in Rats: Effect of Hypervolemic Hemodilution with Diaspirin Cross-linked Hemoglobin Versus Albumin on Brain Injury and Edema. **Anesthesiology**, v. 78, n. 2, p. 335-342, 1993.

DEL ZOPPO G.J. et al. PROACT: A phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. **Stroke**, v. 29, p. 4-11, 1998.

DIEHL, K. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **J. Appl. Toxicol.**, v. 21, p. 15-23, 2001.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 391-397, 1999.

DONNAN, G.A. **The Ischemic Penumbra: Pathophysiology, Imaging and Therapy**. New York: Informa Healthcare, 2007. p. 321-328.

_____. et al. Stroke. **Lancet**, v. 371, p. 1612-1223, 2008.

FANG, J. et al. Prevalence of Stroke - United States, 2006–2010. **Stroke**, v. 61, n. 20 p. 379-382, May 2012.

FASOLATO, C.; INNOCENTI, B.; POZZAN, T. Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? **Trends Pharmacol Sci.**, v. 15, p. 77-83, 1994.

FISHER, M.; GINSBERG, M. Current Concepts of the Ischemic Penumbra: Introduction. **Stroke**, v. 35, p. 2657-2658, 2004.

FISKUM, G.; MURPHY, A.N.; BEAL, M.F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 19, p. 351-369, 1999.

FURLAN, A. et al. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 282, p. 2003-2011, 1999.

GARCIA, J. H. et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 623-635, 1993.

GOYAL, M. et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 372, p. 1019-1030, 2015.

GROTTA, J.C. et al. Baseline hemodynamic state and response to hemodilution in patients with acute cerebral ischemia. **Stroke**, v. 16, n. 5, p. 790-795, Sep./Oct. 1985.

HACKE, W. et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). **JAMA**, v. 274, p. 1017-1025, 1995.

HACKE, W. et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 359, p. 1317-1329, 2008.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HEROS, R.C.; KAROSUE, K. Hemodilution for cerebral ischemia. **Curr Concepts Cerebrovasc Dis Stroke**, v. 23, p. 31-36, 1988.

JONES, T.H. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. **J Neurosurg.**, v. 54, n. 6, p. 773-782, 1981.

JOVIN, T.G. et al. REVASCAT Trial Investigators. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 372, p. 2296-2306, 2015.

KAPP, J.P. et al. Isovolemic Hemodilution in Stroke. **Surg Neurol**, v. 29, p. 191-193, 1988.

KARCH, J.; MOLKENTIN, J.D. Regulated necrotic cell death: the passive aggressive side of Bax and Bak. **Circ Res.**, v. 116, p. 1800-1809, 2015.

KOLLER, M. et al. Adjusted Hypervolemic Hemodilution in Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 21, p. 1429-1434, 1990.

KRISTIAN, T.; SIESJO, B.K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, v. 29, p.705-718, 1998.

LEE, K.H.; LUKOVITS, T.; FRIEDMAN, J.A. "Triple-H" Therapy for Cerebral Vasospasm Following Subarachnoid Hemorrhage. **Neurocrit. Care**, v. 4, p. 68-76, 2006.

LEVY D.E. et al. Ancrod in acute ischemic stroke: results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the Ancrod Stroke Program. **Stroke**, v. 40, p. 3796-3803, 2009.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol. Rev.**, n. 79, p. 1431-1568, 1999.

LOTUFO, P.A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 1, p. 3-4, 2005.

MATSUO, Y. et al. Role of neutrophils in radical production during ischemia and reperfusion of the rat brain: effect of neutrophil depletion on extracellular ascorbyl radical formation. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 15, p. 941-947, 1995.

MENZIES, S.A.; HOFF, J.T.; BETZ, A.L. Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: A Neurological and Pathological Evaluation of a Reproducible Model. **Neurosurgery**, v. 31, n. 1, p. 100-107, Jul. 1992.

MINELLI, C.; FEN, L.F.; MINELLI, D.P.C. Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matao, Brazil: a population-based prospective study. **Stroke**, v. 38, p. 2906-2911, 2007.

MORTON, D.B. et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVA/AVMA/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. **Laboratory Animals**, v. 35, n. 1, p. 1-41, Jan. 2001.

NAGASAWA, H.; KOGURE, K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 20, n. 8, p. 1037-1043, Aug. 1989.

ORTON, D.N. et al. Histologic Lesions Associated with Intravenous Infusions of Large Volumes of Isotonic Saline Solution in Rats for 30 Days. **Toxicol Pathol.**, v. 25, n. 4, p. 390-394, 1997.

PAPANAGIOTOU, P.; NTAIOS, G. Endovascular Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke Panagiotis. **Circ Cardiovasc Interv.**, v. 11, 2018.

PULSINELLI, W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. **Lancet**, v. 339, p. 533-536, 1992.

_____; BRIERLEY, J.B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann Neurol**, v. 11, p. 491-498, 1982.

RAMI, A.; KOGEL, D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: two sides of the same coin? **Autophagy**, v. 4, p. 422-426, 2008.

RUPALLA, K. et al. Time-course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. **Acta Neuropathol.**, v. 96, p. 172-178, 1998.

SACCO, R.L. et al. Infarcts of Undetermined Cause: The NINCDS Stroke Data Bank. **Ann Neurol**, v. 25, n. 4, p. 382-390, Apr. 1989.

SAFAR, P.; STEZOSKI, W.; NEMOTO, E.M. Amelioration of brain damage after 12 minutes' cardiac arrest in dogs. **Arch Neurol**, v. 33, p. 91-95, 1976.

SAVER, A. et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. **NEJM**, v. 372, p. 2285-2295, 2015.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 24, p. 351-371, 2004.

SIESJO, B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. **J Neurosurg.**, v. 77, p. 337-354, 1992a.

_____. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. **J Neurosurg.**, v. 77, p. 169-184, 1992b.

_____.; SIESJO, P. Mechanisms of secondary brain injury. **Eur J Anaesthesiol.**, v. 13, p. 247-268, 1996.

SMITH, M. Monitoring Intracranial Pressure in Traumatic Brain. **Injury Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 1, p. 240-248, Jan. 2008.

SMITH, W.S. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. **J Vasc Interv Radiol.**, v. 15, p.S3-S12, 2004.

_____. et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. **Stroke J Cereb Circ**, v. 36, p. 1432-1438, 2005.

_____. et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. **Stroke J Cereb Circ**, v. 39, p. 1205-1212, 2008.

SOLER, E.P.; RUIZ, V.C. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: similarities and differences. **Curr Cardiol Rev.**, v. 6, n. 3, p. 138-149, Aug 2010. doi: 10.2174/157340310791658785.

SYMON, L.; PASZTOR, E.; BRANSTON, N.M. The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. **Stroke**, v. 5, p. 355-364, 1974.

THE HEMODILUTION IN STROKE STUDY GROUP. Hypervolemic hemodilution treatment of acute stroke. Results of a randomized multicenter trial using pentastarch. **Stroke**, v. 20, n. 3, p. 317-323, Mar 1989.

THE NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE RT-PA STROKE STUDY GROUP. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 333, p. 1581-1588, 1995.

TODD, M.M.; WEEKS, J.B.; WARNER, D.S. Cerebral blood flow, blood volume, and brain tissue hematocrit during isovolemic hemodilution with hetastarch in rats. **Am J Physiol**, v. 263, n. 1 Pt 2, p. H75-82, Jul. 1992.

TU, Y.K. et al. Isovolemic hemodilution in experimental focal cerebral ischemia. Part 1: Effects on hemodynamics, hemorheology, and intracranial pressure. **J Neurosurg**, v. 69, p. 72-81, 1988a.

_____. Isovolemic hemodilution in experimental focal cerebral ischemia. Part 2: Effects on regional cerebral blood flow and size of infarction. **J Neurosurg**, v. 69, p. 82-91, 1988b.

ULUÇ, K. et al. Focal Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. **J. Vis. Exp.**, v. 48, e1978, 2011. doi:10.3791/1978.

WAHLGREN, N.G.; AHMED, N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies - the need for new approaches. **Cerebrovasc Dis.**, v. 17, suppl 1, p. 153-166, 2004.

WARDLAW, J.M.; KOUMELLIS, P.; LIU, M. Thrombolysis (different doses, routes of administration and agents) for acute ischaemic stroke. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, p. CD000514, 2013.

WHITE, B.C. et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J. Neurol. Sci.**, v. 179, 1-33, 2000.

WINN, H.R. **Youmans and Winn Neurological Surgery**. 7th ed. New York: Elsevier, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Health statistics and information systems**: Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. Geneva; 2013. Disponível em: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections2015_2030/en/ Acesso em: 22 nov. 2016.

ARTIGO EM INGLÊS**NORMOVOLÉMIC HEMODILUTION DECREASE ISCHEMIC AREA IN
ENDOVASCULAR OCCLUSION/REPERFUSION MODEL OF MIDDLE CEREBRAL
ARTERY**

Authors: Leonardo Desessards Olijnyk¹, Antônio Generoso Severino¹, Michel Rasche Brandão¹, Tais Malysz Sarzenski¹, Marco Antônio Stefani¹

¹ Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS, Institute of Basic Health Sciences, Department of Morphological Sciences - Porto Alegre - RS - Brasil

Correspondence:

Leonardo Desessards Olijnyk –Alfredo Schuett Street, 880, Três Figueiras – Porto Alegre, RS - Brazil
- ZipCode 91 330 - 120 – Tel.: +55-51-98407 9395
Email: leonardo.olijnyk@gmail.com

Abstract: Introduction: cerebral ischemia (HF) is a complex pathological process that involves several tissue alterations and mechanisms of cell damage. Despite advances in understanding and therapy in recent decades, much remains to be discovered about its pathophysiology and ideal approach. Normovolemic hemodilution may have a neuroprotective effect on the focal ischemic injury of the central nervous system. This therapy is widely accessible in clinical practice and can be applied concomitantly with other modern methods of treatment of HF. **Objective:** to evaluate the histological effect of normovolemic hemodilution on the neuroprotection of rats submitted to focal ischemic central nervous system injury after 48 hours of cerebral reperfusion. **Materials and methods:** We used 36 male Wistar rats (18 in the control group and 18 in the intervention group), weighing 280-330 g. Focal HF is induced by occlusion of the left middle cerebral artery for 1 h. After this time, the occlusion is undone in a new anesthetic time, re-establishing the normal cerebral flow. After this step, in the intervention group, the immediate hemodilution of

10% is performed considering the basal blood volume of the animal. After 48 hours, the animals are sacrificed, coronal cuts are made in the brain and stained with triphenyltetrazolium chloride solution to study and compare the ischemic area.

Results: The mean infarcted area of the control group was $48.75 \pm 7.78\%$ of the injured hemisphere. The intervention group presented a smaller area of lesion: $25.8 \pm 14.48 \%$. The difference was statistically significant ($p < 0.05$). **Discussion and**

Conclusion: in experimental studies prior to normovolemic hemodilution, optimistic results were found in the approach to cerebral ischemia. These results were not consistent in clinical trials. With the advent of reperfusion therapies, the treatment of stroke rose to the next level. In this scenario, it is important to study resources that can increasingly improve neuroprotective approaches. Hemodilution may bring benefits to patients with cerebral ischemia and its effects deserve further studies for clinical practice.

Keywords: Acute Stroke. Neuroprotection. Rat. Cerebrovascular Occlusion.

Hemodilution. Focal Ischemia

Introduction

The effects of hemodilution in cerebral ischemia (CI) have been studied for decades¹⁻¹¹. Considering focal ischemic injury, patients presenting ischemic stroke were the main targets for research. Publications of experimental and clinical studies about hemodilution treating CI experienced an optimistic initial period, but in the '90s the scientific community moved its attention to revascularization therapies that were emerging¹²⁻²⁵. However, even with the establishment of intravenous alteplase protocols and, later endovascular techniques, few patients are eligible for this treatment at the emergency room²⁶⁻²⁷.

On the other hand, hemodilution has demonstrated to improve perfusion and decrease the area of cerebral infarction in experimental studies⁶⁻⁸. Its benefit in vascular perfusion is due to rheological mechanisms and activity in the penumbra area (PA) of the ischemic lesion⁵. Even with a greater understanding of the mechanisms of neuronal damage and death, several aspects still need elucidation. Cerebral ischemia causes damages to nervous tissue that persists after local revascularization. It is probably related to impaired vascular autoregulation of blood⁷.

At a cellular level, several biochemical and enzymatic processes persist after initial ischemia. The sequence of apoptotic events starts 6 hours after the first injury and remain pronounced for up to 24 to 48 hours^{1-3,28}. The role of these aspects in the ischemia/reperfusion process is not clear yet. Considering this, it is important to test new therapeutic approaches in an experimental model that simulates ischemic injury and the following revascularization.

Thus, this study intends to investigate the neuroprotective effect of normovolemic hemodilution (NH) on the neuroprotection of rats after revascularization of focal ischemic lesion of the central nervous system. NH therapy is widely available in clinical practice and can be applied in combination with other resources in the treatment of CI.

Materials and Methods

Animals and ethical considerations

This project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS). All procedures were performed in accordance with UFRGS guidelines for animal experimentation and with

Federal Law 11.794/08, which establishes the procedures for the scientific use of animals and regulates the registration of animal experimentation centers.

We used 36 male Wistar rats (18 in the control group and 18 in the NH group), weighing 280-330g obtained from the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of UFRGS. The animals were maintained in the Bioterium Sector of the Department of Morphological Sciences with feed and water "ad libitum" in a 12 h light/dark cycle.

Experiment

The animals of both groups were submitted to focal cerebral ischemia by occlusion of the left middle cerebral artery. Anesthetic induction was performed with Isoflurane and local anesthesia with xylocaine 1%. The rats were placed in dorsal decubitus position, in a heated bed at 34-35°C, using a helmet for oxygen support, local trichotomy and antisepsis with alcoholic chlorhexidine.

The procedure initiates with a left paramedian incision, exposure and microsurgical dissection of the left common carotid artery (CCA) and its proximal bifurcation. Then, it is positioned with proximal and distal clamping on the artery and placed an intraluminal 4-0 nylon filament with an encapsulated silicone tip (marketed by Docol Corp., Redlands, CA, USA). The filament is advanced to the left middle cerebral artery and its position is maintained fixed with 5-0 prolene thread (Figure 1). After that, the rat is withdrawn from the anesthesia.

After one hour (ischemia duration) the second surgical time begins in the same protocol care. Under microscopic magnification, the filament is removed and the arteriotomy is repaired with 9 or 10-0 thread. Care is taken to maintain the patency of the CCA.

At this moment, in the intervention group, 2 ml of blood is collected from the animal and 2 ml of heated SF 0.9% is infused, performing normovolemic hemodilution. Both actions are performed gently, for approximately 3 to 4 minutes.

After the procedures and anesthetic recovery, the animals return to the bioterium. Subcutaneous Tramadol protocol is used for pain relief. After 2 days sacrifice proceeded under anesthesia and careful extraction of the encephalon is performed.

Evaluation of the ischemic area

The brain is sectioned along coronal lines and the tissue is embedded in a 1% solution of triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) (Figure 2). The sections are scanned and analyzed in image analysis software (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, USA) (Figure 3).

The volume of the infarcted area and the percentage weight of the brain of the different groups are analyzed through one-way ANOVA ($p < 0.05$). The following analyses are made using the SPSS 12.0 program.

Results

Coronal sections of 9 animals of the control group and 10 animals of the intervention group were evaluated. The others animals were not included in the sample for one or more of the following reasons: no tissue infarction was visualized after staining (failure in the ischemia execution technique); death in the trans-operative period; death in the 48-hour postoperative period; trans-operative blood loss exceeding 0.5 mL in the control group or 0.5 mL in addition to the 2 mL collected

in the intervention group; intercurrent that could interfere in global circulation (for example thrombosis or CCA injury).

The results are presented in Table 1. The mean infarcted area of the control group was $48.75 \pm 7.78\%$ on the injured hemisphere. The mean infarcted area of the intervention group presented a smaller lesion extension: $25.8 \pm 14.48\%$. This difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Discussion

Ischemic stroke is the pathology most commonly related to focal brain ischemia and the second leading cause of death in the world. In the United States, the cost of these patients exceeds 30 billion dollars per year²⁹. Despite advances in understanding and treatment in recent decades, the only drug available for revascularization therapy is the tissue plasminogen activator, Alteplase. Endovascular interventions have also emerged as a promising alternative to acute cases and have been consolidated in reference centers³⁰⁻³¹.

Experimental studies on focal CI have revealed that cell death starts a few minutes after arterial occlusion^{2-3,32-33}. In addition, acute insults can trigger processes that culminate in cell irreversible damage hours or days after the event²⁸. Thus, it is unlikely that a patient does not suffer neuronal loss after the onset of ischemic injury. This fact is mainly true for cardio-embolic stroke, which is responsible for nearly 20% of ischemic strokes³⁴. In these cases, larger caliber arteries are commonly affected, especially the MCA. As occlusion occurs abruptly, the compromised tissue has no collateral circulation. However, focal CI does not progress homogeneously and the central territory, where ischemia is critical³², presents a worse prognosis regarding

recovery or reversibility of cellular damage, even in case of successful revascularization.

An ischemic territory where the vascular restriction is not so severe, but still at harmful levels, is found downstream of the arterial occlusion, in a centrifugal zone. Called the "penumbra area" (PA), the cells of this tissue would benefit immediately in a perfusion restoration. In the experimental model by occlusion of the MCA, blood in the PA reduces to less than 40% of normal flow, while in the central ischemic zone the flow is less than 15%²⁸. If the obstruction is maintained, both areas evolve to infarction. On the other hand, hemodilution therapy increases blood rheology, which theoretically improves neurovascular perfusion⁵. It's proven that the ischemic cellular lesion can still be reverted in PA, what could explain the benefit of hemodilution. This hypothesis has already been tested with encouraging results in laboratory studies, but inconsistent in clinical studies. Most of these studies were executed when revascularization therapies were not available^{9,35-36}.

Also relevant is to consider that healthy nervous tissue is capable of self-regulation of cerebral blood flow (CBF). It acts increasing or decreasing the local blood supply considering the demand. However, in areas with neurovascular impairment, endothelial dysfunction leads to loss of this capacity⁷, compromising this compensatory mechanism. Recent evidence shows that in the penumbra area the blood flow reduces during the evolution of ischemic lesion. Therefore, hemodilution would act in improving the perfusion of an area where the modulation capacity has been exhausted and there is no more appropriate reaction to the ischemia and reperfusion process. In the clinical setting, it has the potential to help patients presenting stroke⁶⁻⁹.

Therefore, this study aimed to evaluate the role of hemodilution in analogous conditions to a new perspective seen in clinical practice: use of revascularization therapies in acute stroke. The model used presents a convenient feature mimicking a frequent pathological condition (ischemia by embolus in MCA). Previously, it had been demonstrated that the occlusion of the MCA for one hour with the same filament of this study generates a consistent infarction area³⁷.

There is no clear evidence on the degree of optimal hemodilution for nervous perfusion. So, the dilution rates of this study were chosen considering the maximum dose of intravenous infusion that the animals could stand regarding their weight, with no extension of the anesthetic time³⁸⁻³⁹. The rats may suffer a systemic injury with the removal of blood and infusion of solutions depending on the speed, quantity and method used. Nevertheless, this experimental ischemic model could be performed in order to resemble a situation of emergency care in stroke, in which the patient is a candidate for reperfusion therapy and can perform NH in an immediate protocol.

Normovolemia was also a determining issue in the protocol tested. Hemodilution can be hypovolemic, normovolemic or hypervolemic. There is no reason to induce a hypovolemic condition in an individual suffering ischemic damage. Any adequate clinical treatment leads to volume recover. It contributes both to the systemic balance and for the focal ischemia approach. On the other hand, hypervolemia presents the inconvenient risk of cerebral edema in tissue where flow regulation is already impaired and consequent increase in intracranial pressure. This effect is deleterious for focal lesion and for a global neurological condition. In addition, patients who develop a stroke usually have a systemic vascular impairment, which includes heart disease. Volume overload in patients with an impaired cardiovascular reserve can be dangerous^{7,31}. Thus, NH courses with a safety

evolution to systemic stabilization and can perform the expected benefit of CBF improvement after hemodilution.

Another point to be considered is the current tendency to expand the window for brain revascularization. When Alteplase was approved by the FDA, its indication was only for cases with onset of symptoms registered in the previous 3 hours. Recent evidence indicates the benefit of application up to 4.5 hours¹⁵. In the same direction, endovascular techniques are expanding the positive impact in prognosis up to 6¹⁶, or even 12 hours after the CI onset. In this sense, it is essential to consider that the ischemic process, in many cases, will be treated with revascularization therapy hours after established damage. Although the neuronal death mechanism is not fully understood, it is well accepted that enzymatic cascades that lead to apoptosis or neuronal necrosis cannot be reversed after a certain point of oxygen and nutrient deprivation. It is possible to observe cell death in the central ischemic zone twenty minutes after arterial occlusion onset, even with intervention. After 2 to 3 hours, the infarction territory evolves into a penumbra area³³. The potential role of NH in this process is not known, but the histological data of this study show that this therapy can assist in the better response of the nervous system to acute injury.

Prospective studies have not confirmed the beneficial effect of hemodilution on acute stroke^{41,42}. According to systematic reviews, there is no reason to indicate this therapy, although there is also no prejudice with its use⁴³. However, such evidence is based on studies performed during the 1980s and 1990s. The effect of NH on post-reperfusion brains is not well established. New data are available on ischemic processes and the CSF auto-regulatory mechanism. Theoretically, hemodilution improves cerebral perfusion with no impairment to the oxygen supply. Considering persistent ischemic insult, the penumbra area, the zone where perfusion is on

borderline, would be the main target of this therapy. Now, in revascularized patients, the nervous tissue at critical levels has the blood flow restored. The relationship of this event with the regulatory endothelial flow mechanisms, its real potential to interrupt cellular apoptosis, the effect of reperfusion in damaged tissue (in patients with revascularization several hours after the onset of symptoms) and the impact of different degrees of hemodilution are not well established.

Conclusion

The aspects involving the management of a patient with CI are numerous. As described, one of the issues to be studied is the potential benefit of using concomitant therapies for stroke. Even in situations which revascularization can be performed in optimal circumstances, brain tissue suffers damage from its initial injury. Data about the benefit of NH in patients with ischemic and reperfusion injury are rare. Thus, further experimental models can support and consolidation the implement of clinical protocols. It is also important to remember that hemodilution is a low-cost therapy and widely accessible to the health centers.

References

1. White BC, Sullivan JM, Gracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 2000;179:1–33.
2. Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* 1993;142:623-35.
3. Rupalla K, Allegrini P, Sauer D, Weissner C. Time-course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol.* 1998;96:172-8.
4. Grotta JC, Pettigrew C, Allen S, Tonnesen A, Yatsu FM, Gray J, et al. Baseline Hemodynamic State and Response to Hemodilution in Patients with Acute Cerebral Ischemia. *Stroke.* 1985 Sep-Oct;16(5):790-5.

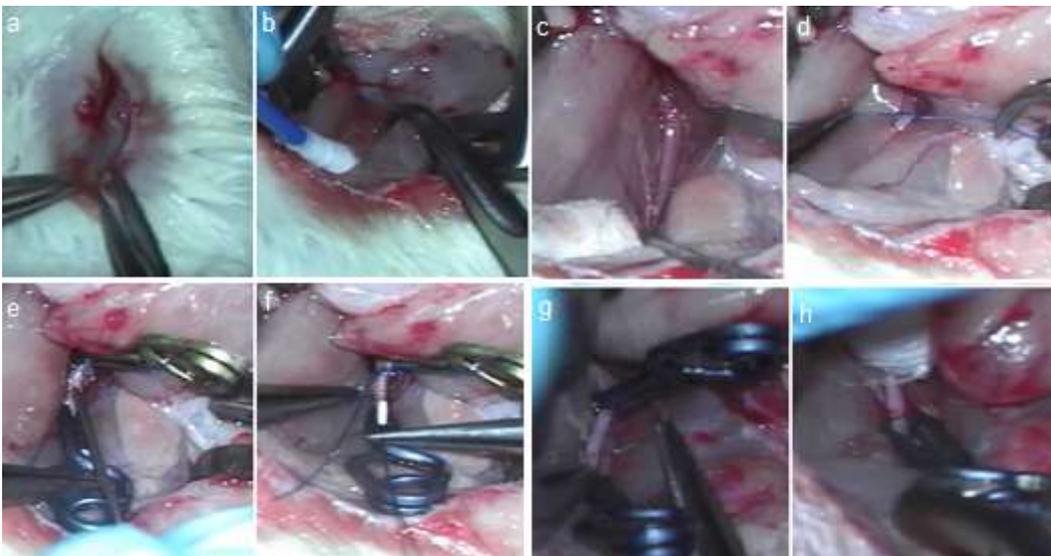
5. Tu YK, Heros RC, Candia G, Hyodo A, Lagree K, Callahan R, et al. Isovolemic hemodilution in experimental focal cerebral ischemia. Part 1: Effects on hemodynamics, hemorheology, and intracranial pressure. *J Neurosurg.* 1988;69:72-81.
6. Tu YK, Heros RC, Karacostas D, Liszczak T, Hyodo A, Candia G, et al: Isovolemic hemodilution in experimental focal cerebral ischemia. Part2: Effects on regional cerebral blood flow and size of infarction. *J Neurosurg.* 1988;69:82-91.
7. Heros RC, Karosue K. Hemodilution for cerebral ischemia. *Curr Concepts Cerebrovasc Dis Stroke.* 1988;23:31-36.
8. Kapp JP, Smith RR, Peeler DF, Morrow S, Smith ES. Isovolemic Hemodilution in Stroke. *Surg Neurol.* 1988;29:191-3
9. The Hemodilution in Stroke Study Group. Hypervolemic hemodilution treatment of acute stroke. Results of a randomized multicenter trial using pentastarch. *Stroke.* 1989 Mar;20(3):317-23.
10. Koller M, Haenny P, Hess K, Weniger D, Zangger P. Adjusted Hypervolemic Hemodilution in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 1990;21:1429-34.
11. Todd MM, Weeks JB, Warner DS. Cerebral blood flow, blood volume, and brain tissue hematocrit during isovolemic hemodilution with hetastarch in rats. *Am J Physiol.* 1992 Jul;263(1 Pt 2):H75-82.
12. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA.* 1995 Oct 4;274(13):1017-25.
13. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581-88.
14. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008 Sep 25;359(13):1317-29. doi: 10.1056/NEJMoa0804656.
15. Wardlaw JM, Koumellis P, Liu M. Thrombolysis (different doses, routes of administration and agents) for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(5):CD000514.
16. Levy DE, del Zoppo GJ, Demaerschalk BM, Demchuk AM, Diener HC, Howard G, et al. Ancrod in acute ischemic stroke: results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the Ancrod Stroke Program. *Stroke.* 2009 Dec;40(12):3796-803. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.565119.
17. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015 Jan 1;372(1):11-20. doi: 10.1056/NEJMoa1411587.
18. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, et al. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999 Dec 1;282(21):2003-11.
19. del Zoppo GJ, Higashida RT, Furlan AJ, Pessin MS, Rowley HA, Gent M. PROACT: A phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. *Stroke.* 1998 Jan;29(1):4-11.
20. Smith WS, Sung G, Saver J, Budzik R, Duckwiler G, Liebeskind DS, et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke.* 2008 Apr;39(4):1205-12. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.497115.

21. Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke*. 2005 Jul;36(7):1432-8.
22. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 2015 Mar 12;372(11):1009-18. doi: 10.1056/NEJMoa1414792.
23. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jun 11;372(24):2285-95. doi: 10.1056/NEJMoa1415061.
24. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jun 11;372(24):2296-306. doi: 10.1056/NEJMoa1503780.
25. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015 Mar 12;372(11):1019-30. doi: 10.1056/NEJMoa1414905.
26. Papanagiotou, P, Ntaios G. Endovascular Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke Panagiotis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2018;11.
27. Vanacker P, Lambrou D, Eskandari A, Mosimann PJ, Maghraoui A, Michel P. Eligibility and predictors for acute revascularization procedures in a stroke center. *Stroke*. 2016;47:1844-9.
28. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*. 1999;79:1431-568.
29. Fang J, Shaw KM, George MG. Prevalence of Stroke - United States, 2006–2010. *Stroke*. 2012 May;61(20):379-82.
30. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke*. *Lancet*. 2008;371:1612-23.
31. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018 Mar;49(3):e46-e110. doi: 10.1161/STR.000000000000158.
32. Symon L, Pasztor E, Branston NM. The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke*. 1974;5:355-364.
33. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, Fitzgibbon SJ, Degirolami U, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkey. *J Neurosurg*. 1981 Jun;54(6):773-82.
34. Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Curr Cardiol Rev*. 2010 Aug;6(3):138-49. doi: 10.2174/157340310791658785.
35. Fisher M, Ginsberg M. Current Concepts of the Ischemic Penumbra: Introduction *Stroke*. 2004;35:2657-58.
36. Donnan GA. *The Ischemic Penumbra: Pathophysiology, Imaging and Therapy*. New York: Informa Healthcare; 2007:321-8.
37. Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E, Başkaya MK. Focal Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. *J. Vis. Exp*. 2011;(48), e1978.
38. Diehl K, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol*. 2001;21:15-23.

39. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim.* 2001 Jan;35(1):1-41
40. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 1989 Aug 20(8); 1037 – 1043
41. Scandinavian Stroke Study Group: Multicenter trial of hemodilution in acute ischemic stroke. Results of subgroup analyses. *Stroke* 19: 464 – 471, 1988
42. Italian Acute Stroke Study Group: Haemodilution in acute stroke: results of the Italian Haemodilution trial. *Lancet* 1:318-321, 1988
43. Chang TS, Jensen MB. Haemodilution for acute ischemic stroke. *Cochrane Database of Systemic Reviews* 2014, Issue 8. Art. No.: CD000103. DOI: 10.1002/14651858.CD000103.pub2.

Appendix – Figures and Table

Figure 1 – Trans-operative images



Endovascular middle cerebral artery occlusion procedure: cervical paramedian incision (a), dissection and identification of muscle planes (b), dissection of the common carotid artery (c), positioning of suture thread (d). Carotid arteriotomy with needle (e), endovascular filament positioning with silicone-coated tip (f), second anesthetic time, primary suture of the artery with 9 or 10-0 thread after filament removal (g), clip removal (h).

Source: Author.

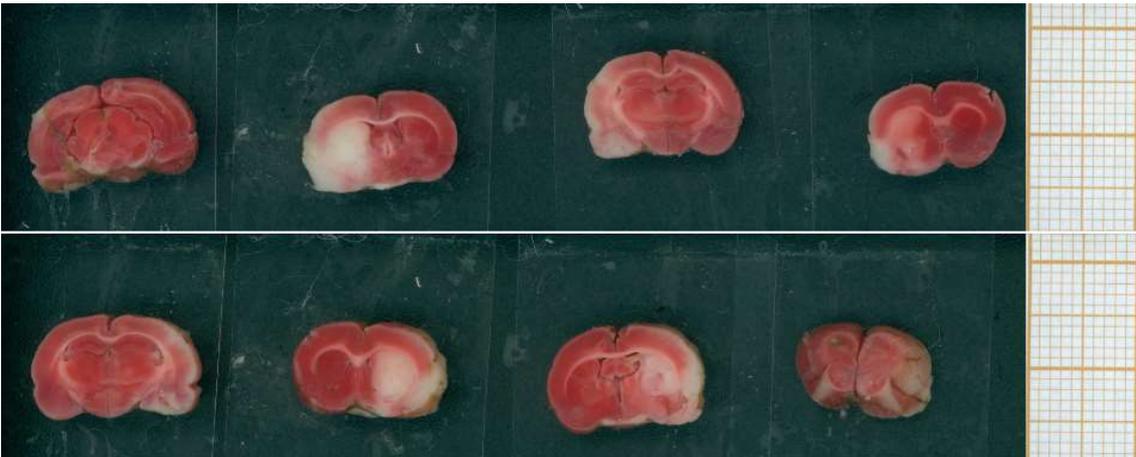
Figure 2 – Encephalic sections of Wistar rats



Coronal sections of rodent's brain. We can observe sections not stained (white), stained (totally red) and stained post-ischemia (partially red).

Source: Author.

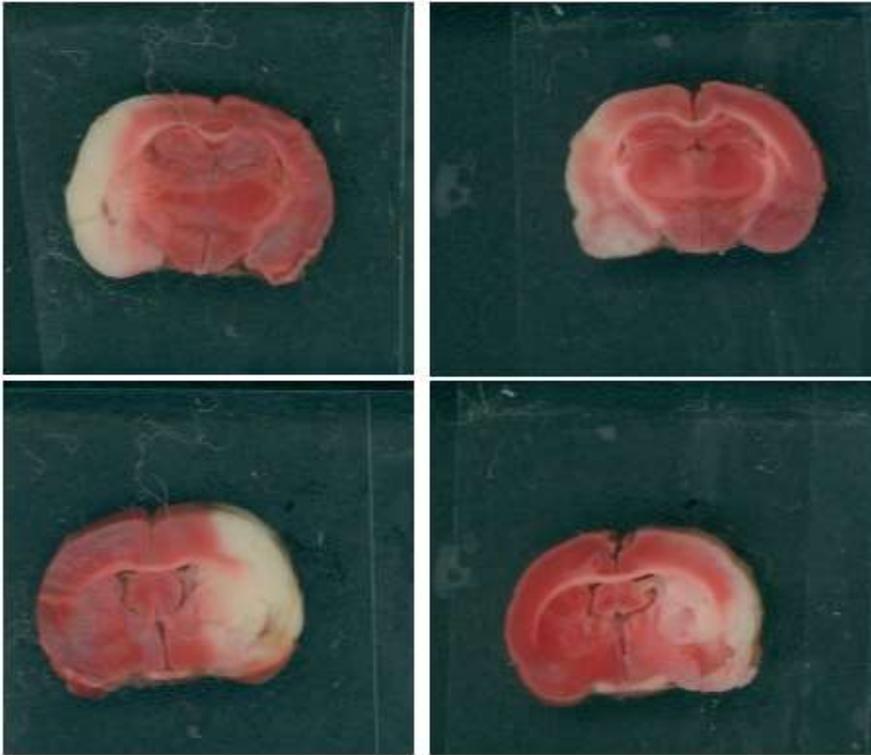
Figure 3 – Post-dye encephalic sections



Coronal brain sections scanned after the use of TTC. The white area corresponds to part of the tissue that suffered infarction. On the right, a millimeter ruler.

Source: Author.

Figure 4 – Post-dye encephalic sections



On the left, expected ischemia post-procedure. On the right, milder ischemia post-procedure and normovolemic hemodilution.

Source: Author.

Table 1 - Results

Resultados	
Estatística T	4,336568
Graus de Liberdade	14,01718
P-valor	0,9996592
Média da Amostra 1	48,74
Média da Amostra 2	25,8
Desvio Padrão da Amostra 1	7,78
Desvio Padrão da Amostra 2	14,58
Tamanho da Amostra 1	9
Tamanho da Amostra 2	10
Hipótese Alternativa Menor que	0
Nível de Confiança	95%
Limite Inferior	-Inf
Limite Superior	32,25634

The mean infarcted area of the control group was $48.75 \pm 7.78\%$ on the injured hemisphere. The mean infarcted area of the intervention group presented a smaller lesion extension: $25.8 \pm 14.48\%$. The difference was statistically significant ($p < 0.05$).

ARTIGO EM PORTUGUÊS

HEMODILUIÇÃO NORMOVOLÊMICA REDUZ ÁREA ISQUÊMICA EM MODELO DE OCLUSÃO/REPERFUSÃO ENDOVASCULAR DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA

Autores: Leonardo Desessards Olijnyk¹, Antônio Generoso Severino¹, Michel Rasche Brandão¹, Tais Malysz Sarzenski¹, Marco Antônio Stefani¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Ciências Morfológicas - Porto Alegre - RS - Brasil

***Correspondências:**

Leonardo Desessards Olijnyk – Rua Alfredo Schuett, 880, Bairro Três Figueiras – Porto Alegre, RS - Brasil - CEP 91 330 - 120 – Telefone.: +55-51-98407 9395
Email: leonardo.olijnyk@gmail.com

Resumo: Introdução: isquemia cerebral(IC) é um complexo processo patológico que envolve diversas alterações teciduais e mecanismos de dano celular. Apesar dos avanços na sua compreensão e terapêutica nas últimas décadas, muito se tem para descobrir sobre sua fisiopatologia e abordagem ideal. A hemodiluição normovolêmica pode apresentar efeito neuroprotetor sobre lesão isquêmica focal do sistema nervoso central. Terapêutica amplamente acessível na prática clínica e que pode ser aplicada em concomitância com outros métodos modernos de tratamento da IC. **Objetivo:** avaliar o efeito histológico da hemodiluição normovolêmica sobre a neuroproteção de ratos submetidos à lesão isquêmica focal do sistema nervoso central após 48 horas de reperfusão cerebral. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 36 ratos machos Wistar (18 no grupo controle e 18 no grupo intervenção), pesando 280-330 g. IC focal é induzida por oclusão da artéria cerebral média esquerda por 1 h. Após este tempo, é desfeita a oclusão em novo tempo anestésico, re-estabelecendo o fluxo cerebral normal. Após esta etapa, no grupo intervenção é

realizada a imediata hemodiluição de 10% considerando a volemia basal do animal. Após 48 horas, os animais são sacrificados, é feito cortes coronais no encéfalo e corados com solução de cloreto de trifeniltetrazólio para estudo e comparação de área isquêmica. **Resultados:** área infartada média do grupo controle foi de $48,75 \pm 7,78\%$ do hemisfério lesionado. O grupo intervenção apresentou uma área menor de lesão: $25,8 \pm 14,48 \%$. A diferença foi estaticamente significativa ($p < 0,05$).

Discussão e Conclusão: em estudos experimentais prévios a hemodiluição normovolêmica havia apresentado resultados otimistas na abordagem da isquemia cerebral. Tais resultados não foram consistentes em teste clínicos. Com advento das terapias de reperfusão o tratamento do AVCi subiu de patamar. Neste cenário é importante estudar recursos que possam melhorar cada vez mais as abordagens neuroprotetoras. A hemodiluição pode trazer benefício para os pacientes com isquemia cerebral e seus efeitos merecem mais estudos para prática clínica.

Palavras-chave: Acidente Vascular Cerebral Agudo. Neuroproteção. Rato. Oclusão cerebrovascular. Hemodiluição. Isquemia focal.

Introdução

Os efeitos da hemodiluição na isquemia cerebral(IC) tem sido estudados há décadas¹⁻¹¹. Nos casos de lesão isquêmica focal, os pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico(AVCi) foram os principais alvos de pesquisas. Além disso, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para melhor compreensão dos complexos mecanismos envolvendo IC. Após um período inicial de otimismo e publicações de estudos experimentais e clínicos sobre hemodiluição no tratamento da IC, o meio científico passou a dar maior atenção as terapias de

revascularização que surgiram nos anos 90¹²⁻²⁵. No entanto, mesmo com a instituição de protocolos de alteplase endovenosa e, posteriormente, de técnicas endovasculares, poucos são os pacientes elegíveis para estes recursos na chegada aos centros hospitalares^{26,27}.

Por outro lado, a hemodiluição comprovadamente apresentou melhora da perfusão e diminuição da área de infarto cerebral em trabalhos experimentais⁶⁻⁸. Seu benefício na perfusão vascular tem relação com otimização reológica e efeitos na área de penumbra(AP) da lesão isquêmica⁵. Mesmo com a maior compreensão dos mecanismos de dano e morte neuronal, vários aspectos ainda necessitam elucidação. Hoje se reconhece que a IC causa alterações teciduais que persistem mesmo após revascularização local. A capacidade de autorregulação de fluxo sanguíneo nos vasos também sofre prejuízo⁷, o que limita mecanismos compensatórios.

A nível celular, diversos processos bioquímicos e enzimáticos se desencadeiam após a isquemia. A sequência temporal dos eventos apoptóticos tem sido caracterizada como iniciando 6 horas após a lesão e permanecendo evidente por até 24 a 48 horas^{1-3,28}. A evolução desses aspectos no cenário de isquemia/reperfusão ainda não está clara. Neste sentido, torna-se importante testar novas abordagens terapêuticas em um modelo experimental que simule a injúria isquêmica e sua revascularização.

Desta forma, este trabalho pretende estudar o efeito neuroprotetor da hemodiluição normovolêmica(HNV) sobre a neuroproteção de ratos após revascularização de lesão isquêmica focal do sistema nervoso central. HNV é uma terapêutica amplamente acessível na prática clínica e que pode ser aplicada em concomitância com outros recursos no tratamento da IC.

Materiais e Métodos

Animais e considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da UFRGS para experimentação animal e com a Lei Federal 11.794/08 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e regula o registro dos centros de experimentação animal.

Foram utilizados 36 ratos machos Wistar (18 no grupo controle e 18 no grupo de HNV), pesando 280-330g obtidos junto ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas com ração e água “ad libitum” permanecendo em ciclo de 12 h claro/escuro.

Experimento

Os animais dos grupos controle e HNV foram submetidos a isquemia cerebral focal induzida por oclusão da artéria cerebral média esquerda. A indução anestésica foi realizada com Isoflurano e anestesia local com xilocaína 1%. Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, em leito aquecido entre 34-35°C, utilizado capacete para suporte de oxigênio, tricotomia local e antissepsia com clorexidine alcoólico.

O procedimento inicia com incisão paramediana esquerda, exposição e dissecação microcirúrgica da artéria carótida comum(AC) esquerda e parte proximal de sua bifurcação. Segue clipagem proximal e distal da artéria e posicionamento

intraluminal de filamento nylon 4-0 com ponta encapada de silicone (comercializado por Docol Corp., Redlands, CA, USA). O filamento é progredido até artéria cerebral média esquerda e sua posição é mantida fixa com fio prolene 5-0 (Fig 01). Então, o rato é retirado da anestesia.

Após uma hora (tempo de isquemia) o segundo tempo cirúrgico começa seguindo os mesmos cuidados protocolares. Sob magnificação microscópica o filamento é tracionado e depois de sua retirada a arteriotomia é corrigida com fio 9 ou 10-0. Cuidado é tomado para manter a perviedade da AC.

Neste momento, no grupo intervenção, é retirado 2ml de sangue do animal e infundi 2ml de SF 0,9% aquecido, efetuando a hemodiluição normovolêmica. Ambas ações são realizadas lentamente, durante cerca de 3 a 4 minutos.

Após os procedimentos e recuperação anestésica, os animais retornam para o biotério. É utilizado protocolo de Tramadol subcutâneo para alívio da dor. Depois de 2 dias é realizado sacrifício com anestesia e extração cuidadosa do encéfalo.

Avaliação da área isquêmica

O cérebro é seccionado no sentido coronal e o tecido é imerso em solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC, Sigma) a 1% (Fig 02). As seções são digitalizadas e analisadas em software de análise de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, USA)(Fig 03).

O volume da área infartada e o peso percentual do cérebro dos diferentes grupos serão analisados através da ANOVA one-way ($p < 0,05$). Dados serão expressos em médias \pm SEM. As análises serão feitas através do programa SPSS 12.0.

Resultados

Foram avaliados os cortes coronais de 9 animais do grupo controle e 10 animais do grupo intervenção. Os demais não entraram na amostra por um ou mais dos seguintes motivos: não foi visualizado infarto tecidual após coloração (falha na técnica de execução da isquemia); óbito no trans-operatório; óbito no período pós-operatório de 48h; perda sanguínea trans-operatória que ultrapassasse 0,5ml no grupo controle ou 0,5ml além dos 2ml retirados no grupo intervenção; intercorrência que pudesse interferir na circulação global (por exemplo: trombose ou lesão da AC).

Os resultados apresentados na tabela 01 mostram que o grupo controle apresentou uma área infartada média de $48,75 \pm 7,78\%$ do hemisfério com lesão. Já, os cortes do grupo intervenção apresentaram uma área menor de lesão: $25,8 \pm 14,48\%$ (Tabela 01). A diferença foi estaticamente significativa ($p < 0,05$)

Discussão

O AVCi é a patologia mais associada a isquemia cerebral focal e a segunda maior causa de morte no mundo. Nos Estados Unidos o custo com esses pacientes passa dos 30 bilhões de dólares ao ano²⁹. Apesar dos avanços em sua compreensão e tratamento nas últimas décadas, a única droga disponível para tratamento de revascularização é o ativador de plasminogênio tissular, Alteplase. As terapias endovasculares também surgiram como alternativa promissora nos casos agudos e vem se consolidando nos grandes centros^{30,31}.

Estudos experimentais sobre IC focal mostraram que a perda celular inicia poucos minutos após oclusão arterial^{2,3,32,35}. Além disso, insultos agudos podem

desencadear processos que culminam com morte de células horas ou dias após o evento³¹. Então, é improvável que um paciente não sofra perda neuronal após instalação de uma injúria isquêmica. Esse fato é principalmente verdadeiro para AVCi de causa cardio-embólica, que são responsáveis por cerca de 20% dos casos³⁴. Neles é comum que uma artéria de maior calibre seja afetada, sendo a ACM a mais frequente. Como a oclusão ocorre de maneira abrupta, o tecido acometido carece da circulação colateral vista em oclusões progressivas. Contudo, a IC focal não evolui de maneira homogênea e o território central, no qual a isquemia é mais crítica³², apresenta pior prognóstico quanto a sua recuperação ou reversibilidade do dano celular, mesmo em caso de revascularização.

Uma zona com menor taxa de restrição vascular na isquemia, mas ainda em níveis lesivos, se encontra a jusante da oclusão arterial, de maneira centrífuga. Chamada de “área de penumbra”(AP), as células desta área teriam benefício imediato em uma restauração da perfusão. No modelo experimental por oclusão de ACM, o fluxo sanguíneo na AP reduz para menos de 40% do normal, enquanto que na zona isquêmica central o fluxo é menor que 15%. Mantida a obstrução, ambas áreas evoluem para infarto. Por outro lado, a base teórica de ação da hemodiluição é o aumento da reologia sanguínea, o que melhora a perfusão tecidual⁵. A AP, território no qual a lesão isquêmica celular comprovadamente ainda pode ser revertida, seria a maior beneficiada pela ação da hemodiluição. Esta hipótese já foi testada com resultados animadores em trabalhos laboratoriais, mas inconsistentes em estudos clínicos realizados em época pré-terapias de revascularização^{9,35,36}.

Também relevante para este conceito é que em áreas saudáveis do sistema nervoso, a autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral(FSC) age aumentando ou diminuindo o aporte local de sangue conforme demanda. Entretanto, em áreas com

sofrimento neurovascular, a disfunção endotelial leva a perda dessa capacidade⁷, prejudicando este mecanismo compensatório. Há evidências que na área de penumbra o fluxo sanguíneo reduz com a evolução do tempo isquêmico. Por tanto, a hemodiluição teria papel auxiliando a perfusão de uma área que esgotou sua capacidade de modulação para uma resposta adequada ao processo de isquemia e reperfusão, ou no cenário clínico, para o tratamento de pacientes com AVCi⁶⁻⁹.

Dessa maneira, este estudo visou avaliar qual o potencial da hemodiluição em condições análogas a um novo cenário visto na prática clínica: uso de terapias de revascularização no AVCi agudo. O modelo utilizado apresenta conveniente característica de simular uma condição fisiopatológica frequente (isquemia por êmbolos em ACM) e possibilidade de revascularização evidente, simulando uma abordagem de sucesso no uso de Alteplase ou técnica endovascular. Previamente, já havia sido demonstrado que a oclusão da ACM por uma hora com o mesmo filamento deste trabalho gera uma área de infarto consistente³⁷.

Sem evidências claras sobre o grau de hemodiluição ótimo para perfusão nervosa, os valores deste estudo foram escolhidos por se aproximar da dose máxima de infusão endovenosa que os animais poderiam aguentar considerando seu peso, sem prolongar o tempo anestésico³⁸⁻⁴⁰. Os ratos podem sofrer injúria sistêmica com a retirada de sangue e infusão de soluções a depender da velocidade, da quantidade e do método utilizado. Não obstante, o modelo de procedimento experimental teve atenção para ser realizado de forma a se semelhar a uma situação de atendimento de emergência em AVCi, na qual o paciente é candidato a terapia de reperfusão e pode realizar HNV em curto período.

Também determinante no protocolo testado foi opção pela normovolemia. Hemodiluição pode ser hipovolêmica, normovolêmica ou hipervolêmica. Não há

motivos para induzir um estado hipovolêmico em um indivíduo passando por agressão isquêmica. Pelo contrário, qualquer otimização clínica se beneficia de um adequado aporte de volume tanto para o ponto de vista sistêmico, como para a isquemia focal. Já a hipervolemia apresenta o inconveniente risco de edema cerebral em um tecido com regulação de fluxo já prejudicada e consequente elevação da pressão intracraniana. Este efeito é deletério para lesão focal e para condição neurológica global. Além disso, pacientes que desenvolvem AVC normalmente apresentam comprometimento vascular sistêmico, o que inclui doenças cardíacas. Uma sobrecarga de volume em pacientes com reserva cardiovascular comprometida é perigoso^{7,31}. Dessa maneira, HNV apresenta uma margem de segurança compatível com estabilidade sistêmica e pode desempenhar o ganho esperado na otimização do FSC.

Outro fator a ser considerado, é a tendência de expansão da janela de execução para revascularização. Quando a Alteplase teve seu uso aprovado pela FDA, sua indicação era somente para aqueles casos com início de sintomas registrados no máximo 3 horas antes. Evidências mais atuais já indicam benefício do uso pode chegar a 4 horas e meia¹⁴. Na mesma direção, as técnicas endovasculares evoluem para impactar o prognóstico até 6¹⁶, ou mesmo 12 horas depois do início da IC. Neste sentido, é indispensável considerar que o processo de isquemia, em muitos casos, será tratado com revascularização horas após um dano já estabelecido. Ainda que os mecanismo de morte neuronal não sejam completamente compreendidos, é bem aceito que cascatas enzimáticas que levam a apoptose ou necrose neuronal não possam ser revertidas após certo tempo de privação de oxigênio e nutrientes. Vinte minutos são necessários para observar morte celular na zona central de isquemia mesmo após intervenção. Após 2 a 3

horas, o território de infarto evolui para área de penumbra³³. O quanto a HNV pode auxiliar nesse processo não é conhecido, mas os dados histológicos deste estudo mostram que esta terapia pode auxiliar na resposta do sistema nervoso a agressão inicial.

Estudos prospectivos não confirmaram a hemodiluição como o efeito benéfico no AVCi agudo^{41,42}. De acordo com revisões sistemáticas, não há motivo para indicar esta terapia, apesar de também não constar nenhum prejuízo com seu uso⁴³. No entanto, tais evidências são baseadas em trabalhos realizados principalmente nas décadas de 80 e 90. O efeito da HNV em cérebros pós-reperusão não é bem estabelecido. Novos dados estão disponíveis sobre processos isquêmicos e o mecanismo de auto-regulação do FSC. Teoricamente, a hemodiluição melhora a perfusão cerebral, sem afetar o aporte de oxigênio. No cenário de insulto isquêmico persistente, a área de penumbra, local de perfusão limítrofe, seria o principal alvo dessa terapia. Agora, em pacientes revascularizados, o tecido que estava em níveis críticos, passa a ter demanda de fluxo sanguíneo restabelecida. A relação deste evento com os mecanismos endoteliais regulatório de fluxo, seu real potencial em interromper processos de apoptose celular, o efeito da reperusão sob um tecido com dano estabelecido (em pacientes com revascularização várias horas após início do quadro) e o impacto de diferentes graus hemodiluição não estão determinados.

Conclusão

Os aspectos que envolvem o atendimento de um paciente com IC são inúmeros. Como descrito, um dos fatores a ser estudado é o benefício da utilização de terapias em concomitância para o AVCi. Mesmo em situações que a revascularização possa ser realizada em circunstâncias ótimas, o tecido cerebral sofre dano a partir de sua lesão inicial. Os dados que podem reforçar o benefício da HNV em pacientes após reperfusão são escassos e, assim, modelos experimentais podem dar suporte a novas pesquisas e consolidação de protocolos clínicos. Vale ainda lembrar que a hemodiluição é uma terapia de baixo-custo e amplamente acessível aos centros de atendimento de pacientes com AVCi.

Referências

1. White BC, Sullivan JM, Gracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 2000;179:1–33.
2. Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, et al. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am. J. Pathol.* 1993;142:623-35.
3. Rupalla K, Allegrini P, Sauer D, Weissner C. Time-course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol.* 1998;96:172-8.
4. Grotta JC, Pettigrew C, Allen S, Tonnesen A, Yatsu FM, Gray J, et al. Baseline Hemodynamic State and Response to Hemodilution in Patients with Acute Cerebral Ischemia. *Stroke.* 1985 Sep-Oct;16(5):790-5.
5. Tu YK, Heros RC, Candia G, Hyodo A, Lagree K, Callahan R, et al. Isovolemic hemodilution in experimental focal cerebral ischemia. Part 1: Effects on hemodynamics, hemorheology, and intracranial pressure. *J Neurosurg.* 1988;69:72-81.
6. Tu YK, Heros RC, Karacostas D, Liszczak T, Hyodo A, Candia G, et al: Isovolemic hemodilution in experimental focal cerebral ischemia. Part2: Effects on regional cerebral blood flow and size of infarction. *J Neurosurg.* 1988;69:82-91.
7. Heros RC, Karosue K. Hemodilution for cerebral ischemia. *Curr Concepts Cerebrovasc Dis Stroke.* 1988;23:31-36.
8. Kapp JP, Smith RR, Peeler DF, Morrow S, Smith ES. Isovolemic Hemodilution in Stroke. *Surg Neurol.* 1988;29:191-3

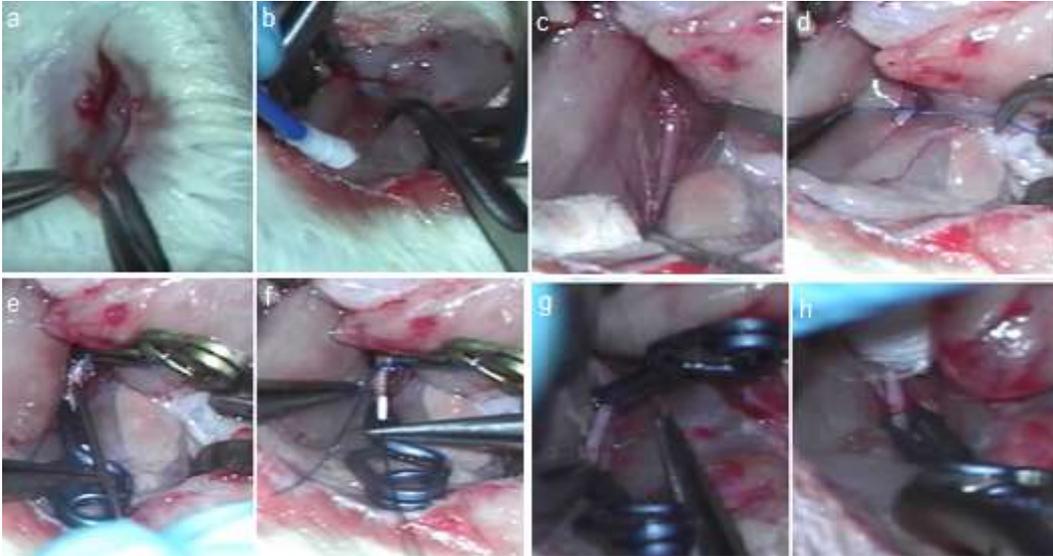
9. The Hemodilution in Stroke Study Group. Hypervolemic hemodilution treatment of acute stroke. Results of a randomized multicenter trial using pentastarch. *Stroke*. 1989 Mar;20(3):317-23.
10. Koller M, Haenny P, Hess K, Weniger D, Zangger P. Adjusted Hypervolemic Hemodilution in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 1990;21:1429-34.
11. Todd MM, Weeks JB, Warner DS. Cerebral blood flow, blood volume, and brain tissue hematocrit during isovolemic hemodilution with hetastarch in rats. *Am J Physiol*. 1992 Jul;263(1 Pt 2):H75-82.
12. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995 Oct 4;274(13):1017-25.
13. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581-88.
14. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008 Sep 25;359(13):1317-29. doi: 10.1056/NEJMoa0804656.
15. Wardlaw JM, Koumellis P, Liu M. Thrombolysis (different doses, routes of administration and agents) for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(5):CD000514.
16. Levy DE, del Zoppo GJ, Demaerschalk BM, Demchuk AM, Diener HC, Howard G, et al. Ancrod in acute ischemic stroke: results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the Ancrod Stroke Program. *Stroke*. 2009 Dec;40(12):3796-803. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.565119.
17. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jan 1;372(1):11-20. doi: 10.1056/NEJMoa1411587.
18. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, et al. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999 Dec 1;282(21):2003-11.
19. del Zoppo GJ, Higashida RT, Furlan AJ, Pessin MS, Rowley HA, Gent M. PROACT: A phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. *Stroke*. 1998 Jan;29(1):4-11.
20. Smith WS, Sung G, Saver J, Budzik R, Duckwiler G, Liebeskind DS, et al. Mechanical thrombectomy for acute ischemic stroke: final results of the Multi MERCI trial. *Stroke*. 2008 Apr;39(4):1205-12. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.497115.
21. Smith WS, Sung G, Starkman S, Saver JL, Kidwell CS, Gobin YP, et al. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke*. 2005 Jul;36(7):1432-8.
22. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 2015 Mar 12;372(11):1009-18. doi: 10.1056/NEJMoa1414792.
23. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, Pereira VM, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jun 11;372(24):2285-95. doi: 10.1056/NEJMoa1415061.

24. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, Rovira A, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015 Jun 11;372(24):2296-306. doi: 10.1056/NEJMoa1503780.
25. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015 Mar 12;372(11):1019-30. doi: 10.1056/NEJMoa1414905.
26. Papanagiotou, P, Ntaios G. Endovascular Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke Panagiotis. *Circ Cardiovasc Interv*. 2018;11.
27. Vanacker P, Lambrou D, Eskandari A, Mosimann PJ, Maghraoui A, Michel P. Eligibility and predictors for acute revascularization procedures in a stroke center. *Stroke*. 2016;47:1844-9.
28. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev*. 1999;79:1431-568.
29. Fang J, Shaw KM, George MG. Prevalence of Stroke - United States, 2006–2010. *Stroke*. 2012 May;61(20):379-82.
30. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. *Stroke*. *Lancet*. 2008;371:1612-23.
31. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018 Mar;49(3):e46-e110. doi: 10.1161/STR.000000000000158.
32. Symon L, Pasztor E, Branston NM. The distribution and density of reduced cerebral blood flow following acute middle cerebral artery occlusion: an experimental study by the technique of hydrogen clearance in baboons. *Stroke*. 1974;5:355-364.
33. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, Fitzgibbon SJ, Degirolami U, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkey. *J Neurosurg*. 1981 Jun;54(6):773-82.
34. Soler EP, Ruiz VC. Epidemiology and Risk Factors of Cerebral Ischemia and Ischemic Heart Diseases: Similarities and Differences. *Curr Cardiol Rev*. 2010 Aug;6(3):138-49. doi: 10.2174/157340310791658785.
35. Fisher M, Ginsberg M. Current Concepts of the Ischemic Penumbra: Introduction *Stroke*. 2004;35:2657-58.
36. Donnan GA. The Ischemic Penumbra: Pathophysiology, Imaging and Therapy. New York: Informa Healthcare; 2007:321-8.
37. Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E, Başkaya MK. Focal Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. *J. Vis. Exp*. 2011;(48), e1978.
38. Diehl K, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol*. 2001;21:15-23.
39. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim*. 2001 Jan;35(1):1-41

40. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 1989 Aug 20(8); 1037 – 1043
41. Scandinavian Stroke Study Group: Multicenter trial of hemodilution in acute ischemic stroke. Results of subgroup analyses. *Stroke* 19: 464 – 471, 1988
42. Italian Acute Stroke Study Group: Haemodilution in acute stroke: results of the Italian Haemodilution trial. *Lancet* 1:318-321, 1988
43. Chang TS, Jensen MB. Haemodilution for acute ischemic stroke. *Cochrane Database of Systemic Reviews* 2014, Issue 8. Art. No.: CD000103. DOI: 10.1002/14651858.CD000103.pub2.

Apêndices – Figuras e Tabelas

Figura 1 – Imagens trans-operatória



Procedimento de oclusão endovascular da artéria cerebral média: incisão paramediana cervical (a), dissecção e identificação de planos musculares (b), dissecção de artéria carótida comum (c), posicionamento de fio de sutura (d). Execução de punção em artéria carótida com agulha (e), posicionamento de filamento endovascular com ponta revestida por silicone (f), em segundo tempo anestésico, sutura primária de artéria com fio 9 ou 10-0 após retirada de filamento (g), retirada de cliques (h)

Fonte: Autor

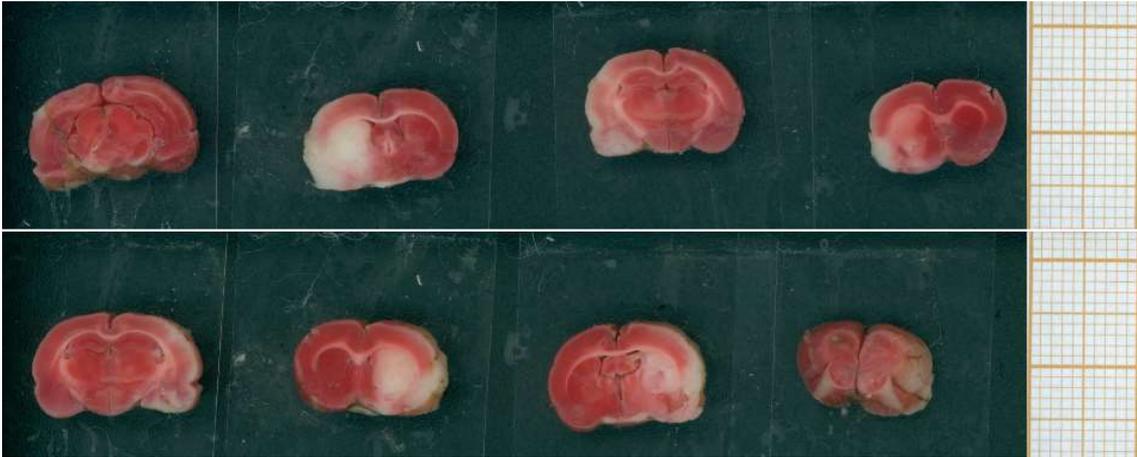
Figura 2 – Cortes encefálicos de ratos Wistar



Cortes coronais de peças encefálicas dos roedores. É possível ver cortes não corados e corados com e sem lesão isquêmica.

Fonte: Autor

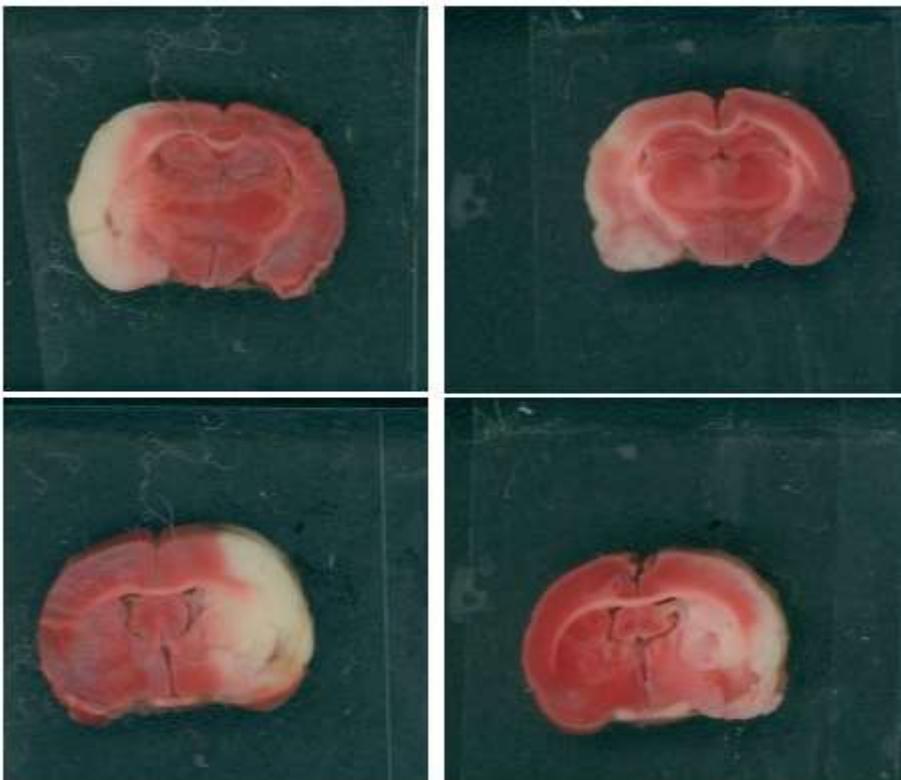
Figura 3 – Cortes encefálicos pós-corante



Cortes encefálicos coronais escaneados após uso de TTC. A área branca representa parte do tecido que sofreu infarto. A direita, uma régua milimetrada.

Fonte: Autor

Figura 4 – Cortes encefálicos pós-corante



À direita, área isquêmica pós procedimento. À esquerda, área isquêmica atenuada pós procedimento e hemodiluição normovolêmica

Fonte: Autor

CONCLUSÃO

Os aspectos que envolvem o atendimento de um com paciente com IC são inúmeras. Como descrito, um dos fatores a ser estudado é o benefício da utilização de terapias em concomitância para o AVCi. Mesmo em situações que a revascularização possa ser realizada em circunstâncias ótimas, o tecido cerebral sofre dano a partir de sua lesão inicial. Os dados que podem reforçar o benefício da HNV em pacientes após reperfusão são escassos e, assim, modelos experimentais podem dar suporte a novas pesquisas e consolidação de protocolos clínicos. Vale ainda lembrar que a hemodiluição é uma terapia de baixo-custo e amplamente acessível aos centros de atendimento de pacientes com AVCi.

Tabela 1

Resultados	
Estatística T	4,336568
Graus de Liberdade	14,01718
P-valor	0,9996592
Média da Amostra 1	48,74
Média da Amostra 2	25,8
Desvio Padrão da Amostra 1	7,78
Desvio Padrão da Amostra 2	14,58
Tamanho da Amostra 1	9
Tamanho da Amostra 2	10
Hipótese Alternativa Menor que	0
Nível de Confiança	95%
Limite Inferior	-Inf
Limite Superior	32,25634

O grupo controle apresentou uma área infartada média de $48,75 \pm 7,78\%$ do hemisfério com lesão. No grupo intervenção a área menor de lesão foi menor: $25,8 \pm 14,48\%$ (Tabela 01). A diferença foi estaticamente significativa ($p < 0,05$)