

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Neurociências

EDUARDO HENRIQUE FERREIRA

**ANÁLISE DOS PADRÕES VENTILATÓRIOS EM RATOS PÓS-ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO**

**BELO HORIZONTE
2022**

Eduardo Henrique Ferreira

**ANÁLISE DOS PADRÕES VENTILATÓRIOS EM RATOS PÓS-ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO**

Dissertação desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo
Massensini

Coorientador: Prof^a. Dr. Glauber S. F. da
Silva

BELO HORIZONTE
2022

043

Ferreira, Eduardo Henrique.

Análise dos padrões ventilatórios em ratos pós-acidente vascular encefálico isquêmico [manuscrito] / Eduardo Henrique Ferreira. – 2022.

82 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini. Coorientador: Profa. Dr. Glauber S. F. da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Acidente Vascular Cerebral. 3. Isquemia. 4. Mecânica Respiratória. I. Massensini, André Ricardo. II. Silva, Glauber dos Santos Ferreira da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO

EDUARDO HENRIQUE FERREIRA

Realizou-se, no dia 14 de outubro de 2022, às 14:00 horas, na Sala de Seminários - ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 245ª defesa de dissertação, intitulada *ANÁLISE DOS PADRÕES VENTILATÓRIOS EM RATOS PÓS-ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO*, apresentada por EDUARDO HENRIQUE FERREIRA, número de registro 2019717764, graduado no curso de FISIOTERAPIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. André Ricardo Massensini - Orientador (UFMG), Profa. Glauber dos Santos Ferreira da Silva (UFMG), Profa. Andrea Siqueira Haibara (UFMG), Profa. Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação: Aprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 14 de outubro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof. André Ricardo Massensini (Doutor)

Prof. Glauber dos Santos Ferreira da Silva (Doutor)

Profa. Andrea Siqueira Haibara (Doutora)

Profa. Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Andre Ricardo Massensini, Professor do Magistério Superior**, em 14/10/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Siqueira Haibara, Professora do Magistério Superior**, em 14/10/2022, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Miranda Kangussu Gomes Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 15/10/2022, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 15/10/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1833273** e o código CRC **0D2AE4C0**.

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Neurociências e no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes agências de fomento:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Aos meus pais Adilson e Marlene, que sempre me incentivaram a buscar a minha
melhor versão;
Ao meu irmão Douglas, por ter me ajudado a construir o mundo da forma que eu
conheço.

AGRADECIMENTOS

A minha história no mestrado iniciou-se na *I Jornada da Especialização em Neurociências e suas Fronteiras* no ano de 2016, na qual, tive a oportunidade de assistir a uma palestra do professor André intitulada: “*Sinais de vida e morte em um cérebro isquêmico*”.

Depois dessa palestra tive a plena certeza de que era este o caminho que eu queria me aventurar pelos próximos anos. Para concretizar este momento, após a palestra do professor André, fui até ele e pedi para tirar uma foto (tenho até hoje como lembrança). Gosto de olhar para essa foto, pois ela me lembra de como eu era e em quem me tornei durante este percurso!

Foram momentos de alegrias, desafios, tristezas e várias outras sensações que me fizeram ser quem eu sou hoje. Posso dizer que sou um ser humano melhor, mais atencioso, pragmático e questionador. Mais ansioso? Com certeza! Mas quem disse que o mestrado é um “passeio no parque”? O mestrado é uma viagem ao desconhecido! Esteja preparado para se aventurar nas mais inesperadas aventuras! Só não se esqueça de subir a bordo com pessoas que irão te proporcionar segurança, consciência e apoio durante o caminho!

Obrigado André, por me confiar acesso à tripulação do NNC Enterprise 2019!

Durante esta viagem, tive a oportunidade de conhecer o copiloto Glauber. Fico muito feliz de tê-lo encontrado! Glauber me mostrou que é possível navegar por áreas desconhecidas e inóspitas! Eles sempre foram pacientes com as minhas limitações e proporcionam as ferramentas para que eu pudesse solucionar os meus problemas.

Obrigado por tudo, André e Glauber!

Apertem os cintos, pois vamos dar uma volta na lua...

Tempo...

O mais precioso tesouro que possuímos! Nada como o tempo para conhecermos pessoas!

Sou grato por ter tido a oportunidade de viajar com os comandantes Grace, Márcio e Eduardo! Pessoas fantásticas e com um conhecimento além do espaço sideral!

Com eles pude aprender que todo corpo continua em seu estado de repouso ou de movimento uniforme em uma linha reta, a menos que seja forçado a mudar

aquele estado por forças aplicadas sobre ele. Com este ensinamento, decidi me impulsionar diariamente à frente, para conquistar o meu grande objetivo de me tornar um Mestre em Neurociências, sempre cuidando para que forças externas não pudessem me tirar da trajetória!

Tive grande ajuda durante este percurso para me manter em equilíbrio, principalmente dos membros da equipe *Strokes*, sendo eles, Aline, Beatriz, Lorena, Gisele, Marco Túllio, Ariadne, Camilla e Lucas. Eles foram a minha força motriz para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigado por sempre me impulsionar a ser melhor e por me desafiar sempre que necessário!

Também levo com muito carinho no coração todos os demais tripulantes do NNC Enterprise, que de alguma forma estiveram ao meu lado nesta viagem! Tenham a certeza de que vocês tornaram as coisas mais fáceis!

Hora de retornar para a Terra...

É sempre bom ter pessoas que nos fazem manter o pé no chão, ou seja, na Terra! Tive o enorme prazer de conhecer os tripulantes Flávio e Leonardo, pessoas ímpares e com um senso de realidade invejável! Sempre durante as nossas conversas, eles me mostravam o melhor caminho a seguir, devido a grande experiência que eles possuem neste vasto universo. Obrigado pelo direcionamento nos momentos nos quais estava sem acesso ao computador de bordo.

Há sempre tempo para novas aventuras...

Após retornar à Terra, tive o prazer de encontrar pessoas excepcionais na base experimental do controle neural da ventilação. Inicialmente, foi como navegar com uma venda nos olhos ou no meio da nuvem de Oort. Sorte a minha ter pessoas com um vasto conhecimento nesta área de estudo. Agradeço em especial à Paloma, Vitória, Beatriz e Hanna, pelos momentos que passamos juntos, até nos finais de semana, fazendo novos experimentos. Tenham a certeza de que ficou mais fácil respirar com vocês!

Agradeço também aos professores Ann e Daniel Zocal pelos ensinamentos e discussões durante este processo. Foram momentos de grande aprendizado! Não posso me esquecer dos alunos deles que sempre trouxeram luz às nossas discussões! Foi um prazer caminhar com vocês!

Os levo no coração! *You'll be in my heart...Always!*

Saber colaborar é sinônimo de humildade e gentileza!

Como é bom ter pessoas ao nosso redor com disposição em ajudar! Sou muito grato por cada colaborador que encontrei nesta caminhada!

Para começar os agradecimentos, citarei o professor Dawit e o aluno Pedro pela contribuição nos testes de força que realizamos. Levarei sempre no coração as nossas conversas e cafés compartilhados antes dos experimentos. E não posso me esquecer de citar que o Pedro é o *Lufano* mais *Lufano* que eu conheci! Obrigado pela disponibilidade (mesmo aos domingos de manhã) e por ser sempre paciente e educado!

Nesta caminhada também tive a ajuda do professor Victor e do aluno João Vitor. Agradeço por me mostrarem um universo até então desconhecido. Ver além do que se vê...ver o que está oculto. Sem vocês eu não teria tido a oportunidade de enriquecer ainda mais o meu trabalho e de colocar a última peça do quebra-cabeça no lugar.

Agradeço também ao professor Lucas Kangussu por me mostrar um caminho alternativo para a realização da isquemia. Obrigado pelos *papers* enviados e pela aula maravilhosa sobre vascularização do SNC! Nunca será esquecida!

Nunca se esqueça das suas origens! É sempre bom voltar para casa!

"Home is where the heart is" ...

A única certeza que temos, é que o nosso lar é onde o nosso coração está! É sempre bom voltar para casa e reencontrar o nosso porto seguro!

Após uma longa jornada explorando o desconhecido, volto para os meus! Aqueles que sempre posso contar e que estão sempre presentes quando eu mais preciso! Pessoas que sempre apoiaram as minhas escolhas e que me impulsionaram a ir cada vez mais longe!

FAMÍLIA, sinônimo de paz, aconchego e amor!

Agradeço, em especial, ao meu pai Adilson, minha mãe Marlene e ao meu irmão Douglas. Pessoas que estiveram sempre presentes em TODAS as etapas da minha vida! Sem vocês eu não teria me tornado quem eu sou hoje e nem estaria onde estou! Obrigado por tanto!

Agradeço também aos demais familiares pelo apoio, conversas descontraídas e orações!

Quem tem um amigo tem um tesouro!

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida! Pessoas que compartilharam momentos inesquecíveis e que estarão sempre no meu coração!

Poderia citar alguns nomes, mas amigo que é amigo sabe! Obrigado por estar sempre presente, nos momentos felizes e tristes! Obrigado por ser porto seguro, caminho no deserto e luz na escuridão!

Amo vocês, mais que chocolate!

E a aventura continua...

Assim termino esta etapa: com um sorriso no rosto, com um olho tremendo, uma lágrima pingando e com a saudade crescendo!

Você deixará saudades, UFMG! Achou que iria me derrubar? Conseguiu! HAHAHAHA Brincadeira!

Olha quem virou mestre, UFMG! Acho que o jogo virou!

RESUMO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é considerado a principal causa de incapacidade na população adulta brasileira, gerando grandes prejuízos funcionais nos seus portadores, sendo estes, motores, cognitivos e sensoriais. Muito se sabe sobre estas alterações citadas anteriormente, no entanto, pesquisas devem ser realizadas para entender o impacto do AVE na ventilação. Por este motivo, avaliamos o impacto do AVE no controle neural da ventilação de ratos por meio da pletismografia de corpo inteiro, utilizando os estímulos de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, equilibrada com nitrogênio (N₂) de balanço) e hipóxia (10% O₂ e N₂ 90%). Nossos dados sugerem que a cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns (BCAo), considerada como um modelo de isquemia global, causou uma atenuação da resposta ventilatória dos animais nos estímulos de hipercapnia e hipóxia, sendo que na hipercapnia os animais isquemia apresentaram diferenças significativas na frequência respiratória (FR), na ventilação (VE) e no consumo de O₂ (VO₂). No estímulo de hipóxia, eles apresentaram diferenças significativas na FR e na VE. Realizamos também a quantificação das apneias, no entanto não houve diferença significativa no grupo isquemia.

Para avaliar possíveis alterações funcionais, motoras, e comportamentais, realizamos o score neurológico, *grip test* e a tarefa de reconhecimento de objetos respectivamente. O grupo isquemia não apresentou diferenças significativas nestes parâmetros, indicando que o modelo de isquemia utilizado pode ter sido leve/moderado para estes animais.

Por último, foi realizada a marcação de morte celular com o Fluoro-Jade no tronco encefálico e no estriado. Vimos que este modelo de isquemia não causou morte celular nas áreas responsáveis pela quimiorrecepção central, sendo as áreas investigadas: o Núcleo do Trato Solitário (NTS), Raphe Obscurus (RO), Raphe Magnus (RM) e região rostral ventrolateral do bulbo, no entanto, o insulto isquêmico pode ter causado danos na circuitaria destes neurônios, uma vez que os dados obtidos mostraram alterações em algumas variáveis respiratórias, tais como na frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e na ventilação (VE). Mais estudos devem ser realizados para esclarecer o motivo pelo qual estas alterações ocorreram, a fim de contribuir para um maior entendimento sobre o impacto de uma lesão central no controle neural da ventilação.

Palavras-chave: Neurociências, acidente vascular cerebral, isquemia, mecânica respiratória

ABSTRACT

The stroke is considered the main cause of disability in the Brazilian adult population, causing great functional losses in its carriers, which are motor, cognitive and sensory. Much is known about these changes mentioned above, however, research should be carried out to understand the impact of stroke on ventilation. For this reason, we evaluated the impact of stroke on neural control of breathing in rats through whole-body plethysmography, using the stimuli of hypercapnia (7% CO₂, 21% O₂, balanced with nitrogen (N₂)) and hypoxia (10% O₂ and N₂ 90%). Our data suggest that bilateral common carotid occlusion surgery (BCAo), considered as a model of global ischemia, caused an attenuation of the animals' ventilatory response to hypercapnia and hypoxia stimuli, and in hypercapnia the ischemia animals showed significant differences in the respiratory rate (RR), ventilation (VE) and O₂ consumption (VO₂). In the hypoxia stimulus, they showed significant differences in RR and VE. We also performed the quantification of apneas, however there was no significant difference in the ischemia group.

To evaluate possible functional, motor, and behavioural changes, we performed the neurological score, grip test and the object recognition task, respectively. The ischemia group showed no significant differences in these parameters, indicating that the ischemia model used may have been mild/moderate for these animals.

Finally, cell death labeling was performed with Fluoro-Jade in the brainstem and striatum. We saw that this model of ischemia did not cause cell death in the areas responsible for central chemoreception, and the areas investigated were: the Nucleus of the Solitary Tract (NTS), Raphe Obscurus (RO), Raphe Magnus (RM) and rostral ventrolateral region of the medulla, however, the ischemic insult may have caused damage to the circuitry of these neurons, since the data obtained showed changes in some respiratory variables, such as respiratory rate (RR) and ventilation (VE). More studies should be carried out to clarify the reason why these changes occurred, in order to contribute to a better understanding of the impact of a central lesion on the neural control of ventilation.

Keywords: Neurosciences, stroke, ischemia, respiratory mechanics

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DURANTE UMA ISQUEMIA CEREBRAL.	21
FIGURA 2: CORRELAÇÃO ENTRE DANOS CEREBRAIS PÓS-AVE COM O TEMPO.	22
FIGURA 3: OS CINCO COMPONENTES PRINCIPAIS QUE COMPÕEM A REDE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO	25
FIGURA 4: LOCALIZAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES CENTRAIS	27
FIGURA 5: LINHA DO TEMPO GERAL	38
FIGURA 6: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA MEDIDA VENTILATÓRIA NO ESTÍMULO DE HIPERCAPNIA	43
FIGURA 7: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA MEDIDA VENTILATÓRIA NO ESTÍMULO DE HIPÓXIA	43
FIGURA 8: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DAS MEDIDAS DE APNEIAS, SUSPIROS E APNEIAS PÓS-SUSPIRO	43
FIGURA 9 – ESCALA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA MODIFICADA (NSS).....	48
FIGURA 10 – TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (RO).	49
FIGURA 11 – GRIP TEST (TESTE MOTOR) DE 02 PATAS.	51
FIGURA 12 – GRIP TEST (TESTE MOTOR) DE 04 PATAS.	52
FIGURA 13 – RESULTADO DAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS À HIPERCAPNIA.	54
FIGURA 14 – RESULTADO DAS VARIÁVEIS RESPIRATÓRIAS APÓS O ESTÍMULO DE HIPÓXIA.	55
FIGURA 15 – QUANTIFICAÇÃO DE APNEIAS (A), APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS) (B) E SUSPIROS (C).....	56
FIGURA 16 – DURAÇÃO DAS APNEIAS E APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS).	57
FIGURA 17 – VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA 24H PÓS-CIRURGIA.	58
FIGURA 18 – VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA 7 DIAS PÓS-CIRURGIA.	59
FIGURA 19 – MARCAÇÃO COM <i>FLUORO-JADE</i> DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO O NTS.....	60
FIGURA 20 – MARCAÇÃO COM <i>FLUORO-JADE</i> DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A RAPHE OBSCURUS.	61
FIGURA 21 – MARCAÇÃO COM <i>FLUORO-JADE</i> DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A RAPHE MAGNUS..	62
FIGURA 22 – MARCAÇÃO COM <i>FLUORO-JADE</i> DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A REGIÃO ROSTRAL VENTROLATERAL DO BULBO.	63
FIGURA 23 – MARCAÇÃO COM <i>FLUORO-JADE</i> DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A REGIÃO DO ESTRIADO.	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: LISTA DE SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC - Artéria carótida comum
AOS – Apneia obstrutiva do sono
AVE - Acidente vascular encefálico
AMPA - Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
BCAo - Oclusão bilateral das artérias carótidas comuns
 Ca^{2+} - Cálcio
 CO_2 - Dióxido de carbono
CPG - Gerador de padrão respiratório central
FR - Frequência respiratória
LC - Locus coeruleus
NMDA – N-metil D-aspartato
NNC - Núcleo de neurociências
NRM - Núcleo magno da rafe
NRO - Núcleo obscuro da rafe
NRP - Núcleo pálido da rafe
NTS - Núcleo do trato solitário
 O_2 - Oxigênio
OX1R – Receptor de orexina do tipo 1
OX2R – Receptor de orexina do tipo 2
 PCO_2 – Pressão parcial de CO_2
pH – Potencial hidrogeniônico
Phox2b – Homeobox 2b do tipo pareado
 PO_2 – Pressão parcial de O_2
preBötC - Complexo pré-Bötzinger
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RTN - Núcleo retrotrapezóide
SNC - Sistema nervoso central
VE - Ventilação
VGlut2 - Transportador vesicular de glutamato 2
VT - Volume corrente
 VO_2 - Consumo de oxigênio
5-HT - Neurônios serotoninérgicos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	19
1.1.1	<i>FISIOPATOLOGIA DO AVE ISQUÊMICO</i>	20
1.2	CONTROLE DA VENTILAÇÃO	23
1.2.1	<i>QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS E CENTRAIS</i>	26
1.3	MODELOS ANIMAIS PARA INDUÇÃO DA ISQUEMIA	28
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	ANIMAIS	37
4.2	GRUPOS ISQUEMIA E SHAM	37
4.3	ESCALA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA MODIFICADA (MNSS)	38
4.4	TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	39
4.5	TESTE DE FORÇA MUSCULAR (GRIP TEST)	40
4.6	CIRURGIA DE OCLUSÃO BILATERAL DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS COMUNS	40
4.7	MEDIDAS VENTILATÓRIAS	41
4.7.1	<i>PLETISMOGRAFIA DE CORPO INTEIRO</i>	41
4.8	SOLUÇÕES	43
4.9	PREPARAÇÃO DO TECIDO CEREBRAL	44
4.9.1	<i>HISTOQUÍMICA – FLUORO-JADE</i>	45
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS	47
5.1	SCORE NEUROLÓGICO	48
5.2	TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	49
5.3	TESTE MOTOR (<i>GRIP TEST</i>)	50
5.4	RESPOSTAS VENTILATÓRIAS À HIPERCAPNIA E À HIPÓXIA 14 DIAS PÓS-CIRURGIA	52
5.5	QUANTIFICAÇÃO DE APNEIAS, APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS) E SUSPIROS	56
5.6	DURAÇÃO DAS APNEIAS E APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS)	57
5.7	VARIABILIDADE RESPIRATÓRIA (FR)	58
5.8	ANÁLISE QUALITATIVA DA MARCAÇÃO DE <i>FLUORO-JADE</i> NO TRONCO ENCEFÁLICO E ESTRIADO	59
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	73
8	REFERÊNCIAS	76

“A imaginação nos levará com frequência a mundos que nunca existiram. Mas sem ela não iríamos a lugar algum”

- Carl Sagan

“Não se conhece completamente uma ciência enquanto não souber da sua história.”

- Auguste Comte

1.1 O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma afecção que possui uma incidência elevada e é responsável pela ocorrência de múltiplas e duradouras incapacidades em adultos (FRENCH et al., 2016). É considerado o segundo maior precursor de mortes no mundo, ocorrendo cerca de 5,7 milhões de casos anuais, o que representa 10% de todos os óbitos (VIRANI et al., 2021). No Brasil, é apontado como o principal causador de incapacidade funcional em adultos (MARTINS et al., 2013).

O AVE provoca a morte de neurônios e, conseqüentemente, a falta de conexão entre eles, o que resulta em uma comunicação indevida do sistema nervoso central com os seus efetores (MOCHIZUKI et al., 2015). Como consequência, o indivíduo pode apresentar alterações sensório-motoras, comportamentais e/ou cognitivas, sendo as alterações sensório-motoras mais prevalentes: a hemiparesia, espasticidade, encurtamento muscular, alterações de equilíbrio e coordenação motora, que podem levar a limitações das atividades diárias, como incapacidade de executar a marcha, alcance e movimentos finos distais dos membros superiores (ALAWIEH; ZHAO; FENG, 2018). Com relação às alterações comportamentais, o paciente pode apresentar sinais de depressão, ansiedade e, em casos mais extremos, agressividade (KIM et al., 2002). Dentre as alterações cognitivas, o paciente pode apresentar dificuldades de memória, déficit de atenção e alterações na linguagem (AL-QAZZAZ et al., 2014).

O AVE pode ser causado por fatores modificáveis e não modificáveis (SIEGLER et al., 2013). Fatores modificáveis são aqueles que o indivíduo consegue alterar modificando o seu estilo de vida, sendo alguns deles, o sedentarismo, o fumo, a hipertensão, a obesidade e o diabetes. Já os fatores não modificáveis o indivíduo não consegue alterar, podendo ser herdados geneticamente dos familiares, sendo alguns deles a idade, o gênero, a etnia e a hereditariedade (BOEHME; ESENWA; ELKIND, 2017).

Existem duas formas principais de AVE, sendo elas o isquêmico e o hemorrágico. O AVE isquêmico é o mais comum (87% dos casos) e ocorre devido ao bloqueio do fluxo sanguíneo no vaso devido a um trombo ou coágulo. Já o AVE hemorrágico, menos comum (13% dos casos) porém mais grave, ocorre

principalmente devido à hipertensão e alterações na estrutura da parede dos vasos sanguíneos (GRYSIEWICZ; THOMAS; PANDEY, 2008).

1.1.1 FISIOPATOLOGIA DO AVE ISQUÊMICO

Devido ao AVE isquêmico ser o mais frequente entre os pacientes, nosso estudo teve como foco esse tipo de AVE. Os danos causados pela isquemia resultam de uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos que vão se desenvolvendo ao longo do tempo. Sendo que os mecanismos principais dessa cascata de eventos são a excitotoxicidade glutamatérgica, despolarizações na região próxima à área de isquemia, inflamação e apoptose celular (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

O tecido cerebral tem alta taxa de consumo de oxigênio e glicose, e depende, principalmente, da fosforilação oxidativa para produção de energia. Com a isquemia, a chegada de oxigênio e glicose é prejudicada e dessa forma a produção de energia para manutenção dos gradientes iônicos das células também (MARTIN; LLOYD; COWAN, 1994). Sem os gradientes iônicos, o potencial de membrana é perdido e as células neuronais despolarizam (KATSURA; KRISTIÁN; SIESJÖ, 1994). Conseqüentemente, canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem tornam-se ativados e neurotransmissores excitatórios, como glutamato, são liberados no espaço extracelular. Por sua vez, a ativação dos receptores ionotrópicos (AMPA e NMDA) e os receptores metabotrópicos de glutamato, levam a um aumento ainda maior de Ca^{2+} intracelular (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Esse aumento intracelular do segundo mensageiro, cálcio, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que levam a danos teciduais como, ativação de proteínas proteolíticas que degradam o citoesqueleto celular e a matriz extracelular, e também à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999). Essas moléculas são importantes sinalizadores que desencadeiam processos como inflamação e apoptose (Figura 1).

Todos esses eventos não afetam a região isquêmica de um modo homogêneo. No centro da lesão, onde há redução de até 80% do fluxo sanguíneo (HOSSMANN, 1994), a despolarização acontece minutos após a isquemia e as células morrem rapidamente por lipólise, proteólise, desagregação de microtúbulos seguida de falha bioenergética e alteração drástica da homeostase iônica (DIRNAGL; IADECOLA;

MOSKOWITZ, 1999). Entre o núcleo da lesão e as células saudáveis não afetadas está a região de penumbra, no qual o fluxo sanguíneo é reduzido, mas o metabolismo energético ainda é um pouco preservado (HOSSMANN, 1994).

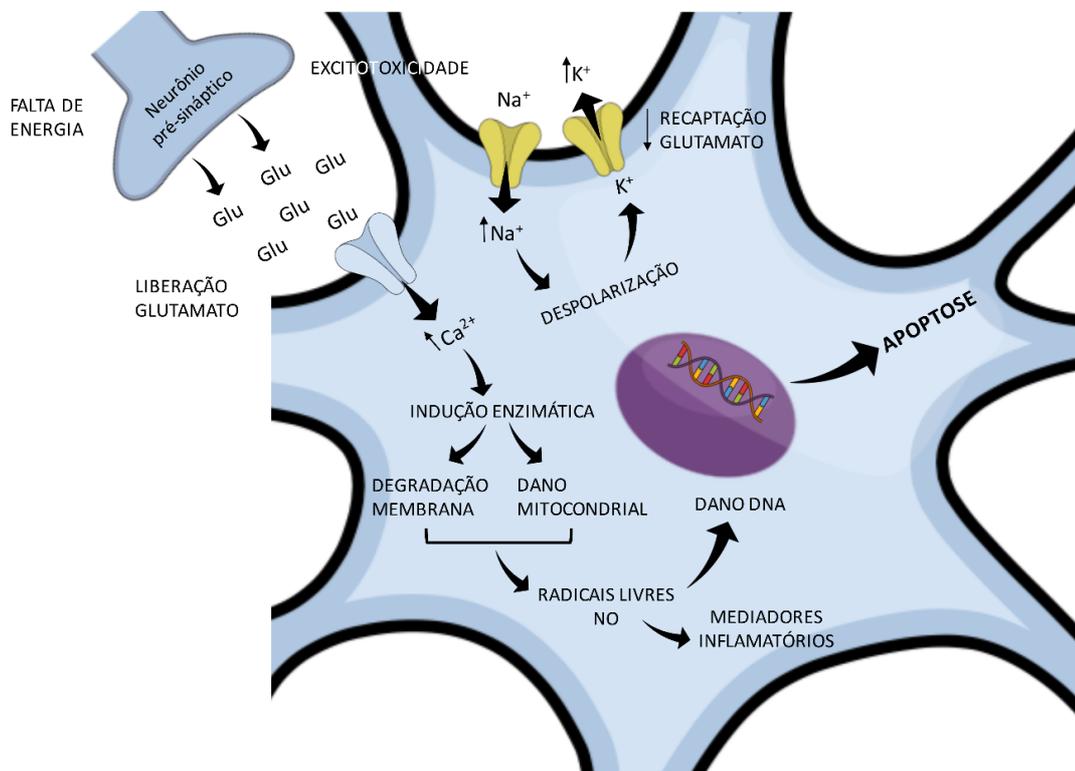


FIGURA 1: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DURANTE UMA ISQUEMIA CEREBRAL.

Após o evento isquêmico, acontece uma falha energética, ocasionando um excesso de entrada de íons Ca^{2+} e Na^+ , causando despolarização celular, com consequente edema. O influxo de Ca^{2+} aumentado estimula a liberação de glutamato, que permanece em excesso da fenda sináptica, causando excitotoxicidade glutamatérgica, gera indução enzimática, degradação da membrana com formação de radicais livres e óxido nítrico, danificando o DNA celular. Com isso, há facilitação da entrada de mediadores inflamatórios, causando ativação microglial e infiltração leucocitária. A entrada de Ca^{2+} citada acima e a formação dos radicais livres também é responsável por danos na mitocôndria ocasionando apoptose. Modificado de (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

A morte celular devido à isquemia pode perdurar por vários dias, apresentando fases distintas. As células presentes na região central da lesão, ou seja, no core, morrem por necrose devido à diminuição do fluxo sanguíneo em até 80%, mas as células mais periféricas que ainda estão vivas compõem a área de penumbra, uma região na qual as células têm o seu metabolismo diminuído como uma forma de proteção, havendo, portanto, a possibilidade de recuperá-las, uma vez que não sofreram a mesma injúria causada no centro da lesão (HOSSMANN, 1994) (Figura 2).

Com o tempo e sem tratamento, a área de penumbra pode progredir para uma área infartada com as mesmas características encontradas no centro da lesão. Portanto, o foco das pesquisas, que procuram drogas capazes de proteger o tecido cerebral contra o AVE, é voltado para a área de penumbra (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Caso o paciente não receba o devido atendimento e a administração de um trombolítico dentro de uma janela de até 3h após o início da isquemia, haverá a evolução da área de penumbra para a morte celular (SCHELLINGER; FIEBACH; HACKE, 2003).

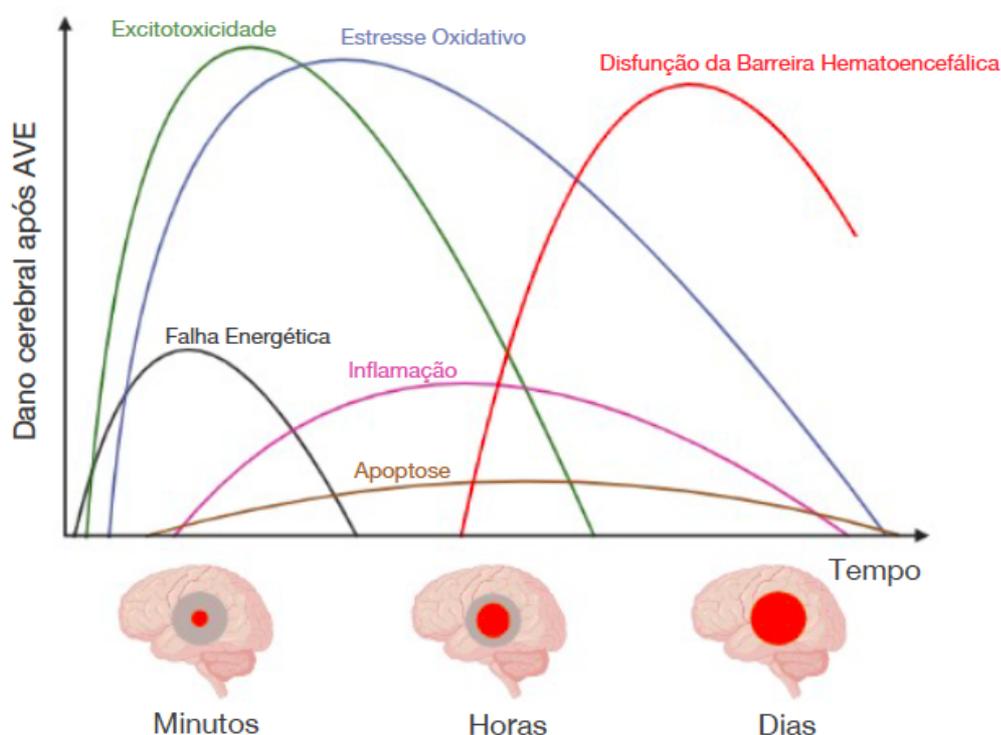


FIGURA 2: CORRELAÇÃO ENTRE DANOS CEREBRAIS PÓS-AVE COM O TEMPO.

Logo após o início da isquemia, acontece uma falha energética, ocasionando excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo. Nos primeiros minutos, há a formação do core e da penumbra, no qual acontece os eventos inflamatórios e a apoptose celular que podem perdurar por horas e até dias. Após algumas horas, a barreira hematoencefálica sofre danos e sua permeabilidade vascular é aumentada, facilitando a entrada de substâncias nocivas ao cérebro. Todos os processos deletérios citados podem perdurar por dias, causando cada vez mais danos e morte celular. Modificada de (BRUCH et al., 2019).

Quando nos deparamos com um paciente pós-isquemia a primeira sequela observada é a hemiparesia contralateral à lesão encefálica, por ser uma alteração física motora e por causar várias alterações funcionais no indivíduo (PAUL et al., 2022). No entanto, não é recorrente a investigação de possíveis alterações na função pulmonar do indivíduo, mesmo sendo comum eles apresentarem maior fadiga ao realizar os exercícios de reabilitação motora (DEME et al., 2022). A respiração depende da força e resistência dos músculos respiratórios, dos volumes e da capacidade pulmonar (MENEZES et al., 2018), no entanto, os indivíduos pós-AVE apresentam déficit na produção de força muscular respiratória, padrão respiratório anormal e volumes pulmonares diminuídos que podem levar à doença respiratória restritiva (LIMA et al., 2014). Assim, a intervenção fisioterapêutica como o treinamento muscular respiratório pode melhorar a força ou produção de força e resistência dos músculos respiratórios, reduzindo assim as complicações respiratórias em indivíduos pós-AVE (MENEZES et al., 2016).

Outra alteração bastante recorrente em pacientes pós-AVE é a apneia, podendo ser classificada como central e obstrutiva. A apneia obstrutiva é a forma mais comum do distúrbio e acontece devido à redução (hipopneia) ou cessação (apneia) do fluxo de ar durante o sono devido ao colapso das vias aéreas superiores. Já a apneia central também é caracterizada pela interrupção da respiração, mas como consequência da perda do *drive* respiratório central, ao invés do colapso físico das vias aéreas superiores (STEVENS et al., 2018). Mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão do impacto do AVE no controle neural da ventilação.

1.2 CONTROLE DA VENTILAÇÃO

Respirar é uma ação motora automática e criticamente necessária para o bom funcionamento corporal. Na inspiração o oxigênio (O_2) necessário para o metabolismo celular é obtido, enquanto na expiração o dióxido de carbono é eliminado (CO_2) auxiliando na manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018). Para que isso aconteça, é necessário um aparato mecânico capaz de gerar uma diferença de pressão entre o meio externo (ar atmosférico) e o meio interno dos pulmões (alvéolos). E para resolver este problema, os pulmões contam com a ajuda de músculos inspiratórios e expiratórios. Os principais músculos inspiratórios são o diafragma e intercostais externos, já a expiração em repouso

ocorre de forma passiva pelo relaxamento dos mesmos músculos citados anteriormente. Em uma expiração ativa, durante a prática de algum exercício físico, por exemplo, os músculos intercostais internos e abdominais são os responsáveis por auxiliar nesta função (LEIRÃO et al., 2018).

Para descrever como o controle neural da ventilação acontece, Del Negro e colaboradores encontraram uma área localizada no bulbo chamada de complexo preBötzing (preBötC), um microcircuito bulbar que faz parte a coluna respiratória ventral, que gera o ritmo respiratório. Esta região é composta por interneurônios ritmogênicos e formadores de padrão excitatórios e inibitórios, que juntos produzem o impulso periódico essencial da inspiração. O preBötC coordena todas as fases do ciclo respiratório, a respiração com comportamentos orofaciais, além de influenciar e ser influenciado por emoções e processos cognitivos (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018).

O complexo foi inicialmente encontrado na região ventrolateral do bulbo, sendo necessário e suficiente para gerar o ritmo relacionado à inspiração em fatias do tronco cerebral de ratos neonatais (SMITH et al., 1991).

A rede respiratória que produz e controla a respiração pode ser dividida nos seguintes componentes principais, sendo eles: o gerador de ritmo e padrão respiratório; os músculos respiratórios (efetores), feedback dos mecano e quimiorreceptores (sensores) e os elementos integrativos, responsáveis por coordenar os movimentos respiratórios com outras funções, sendo algumas delas, a fala, a mastigação, a deglutição, e a locomoção (GREER; FUNK, 2013) (Figura 3). Essa rede neural respiratória é responsiva às modificações da pressão parcial dos gases sanguíneos, sendo detectadas pelos quimiorreceptores centrais e periféricos (NATTIE, 1999).

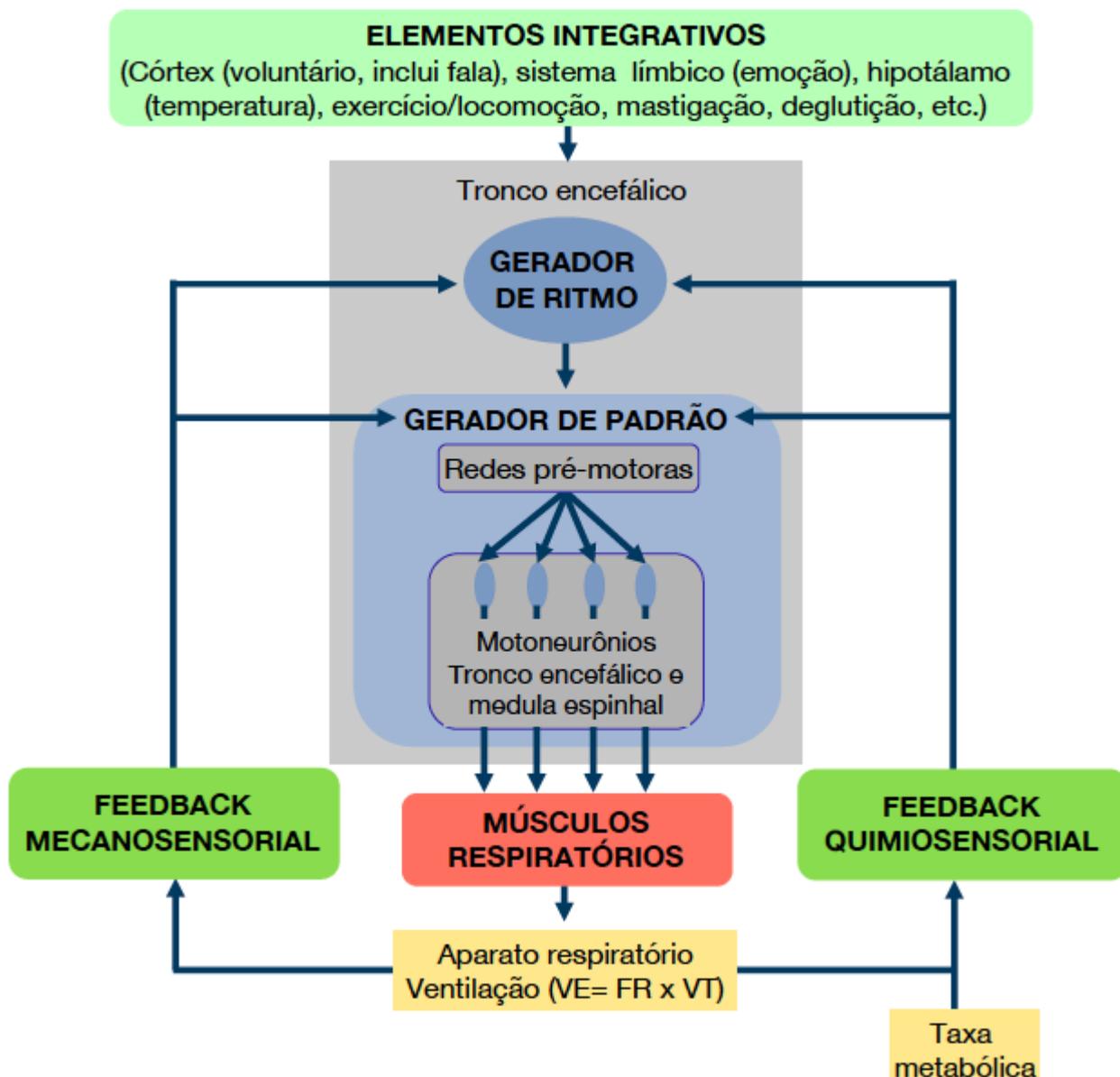


FIGURA 3: OS CINCO COMPONENTES PRINCIPAIS QUE COMPÕEM A REDE DE CONTROLE RESPIRATÓRIO

A rede respiratória pode ser alterada caso ocorra alterações em algum dos cinco componentes que a compõem, sendo eles, (1) uma rede geradora de ritmo; (2) um sistema formador de padrões; (3) os músculos respiratórios; (4) os elementos reguladores mecanossensoriais e quimiossensoriais; e os (5) componentes integrativos. Adaptada do capítulo "Respiration" de (GREER; FUNK, 2013).

Segundo Del Negro e colaboradores, devido a acessibilidade experimental altamente favorável deste complexo, em breve os fundamentos neurais da respiração serão profundamente entendidos (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018).

1.2.1 QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS E CENTRAIS

A respiração possui grande importância, pois as células necessitam do oxigênio (O_2) para realizar a respiração celular e necessitam descartar o excesso de dióxido de carbono (CO_2) para manter o equilíbrio ácido-base do organismo (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018). A maneira pela qual o organismo detecta as diferenças dessas substâncias no sangue, é por meio de sensores sensíveis às alterações de O_2 , CO_2 e pH, que são classificados como quimiorreceptores periféricos e centrais (NATTIE, 1999). Os quimiorreceptores periféricos são encontrados nos corpos carotídeos localizados nas proximidades da bifurcação carotídea e corpúsculos aórticos. Estruturalmente são compostos por aglomerados de células formadas por quimiorreceptores e células de suporte. As terminações nervosas sensoriais do nervo do seio carotídeo penetram nestes aglomerados para fazer sinapse com células quimiorreceptoras.

Os corpos carotídeos desempenham um papel importante no controle da ventilação durante a hipóxia, hipercapnia e acidose (GONZÁLEZ; ROCHER; ZAPATA, 2003). Eles são responsáveis por detectar alterações na P_{CO_2} no sangue, fornecendo excitação tônica aos neurônios respiratórios do tronco encefálico em condições normais e com aumento da atividade com a queda da P_{O_2} . Além de detectar alterações na concentração de P_{O_2} eles também detectam alterações de P_{CO_2} juntamente com os receptores localizados no encéfalo, denominados quimiorreceptores centrais.

A quimiorrecepção central envolve os ajustes ventilatórios induzidos pela elevação da P_{CO_2} (hipercapnia). Pequenos aumentos na concentração de P_{CO_2} produzem alterações significativas na respiração. Esse aumento da CO_2 é detectado pelos quimiorreceptores com consequente estimulação da ventilação. Assim, os quimiorreceptores sensíveis ao CO_2 fornecem informações sobre a adequação da ventilação alveolar em relação ao metabolismo e podem fornecer uma fonte de informações aferentes excitatórias ou inibitórias para o sistema de controle respiratório, uma clássica alça de controle de feedback (NATTIE; LI, 2012). Os quimiorreflexos minimizam as alterações da P_{aCO_2} corrigindo a ventilação pulmonar e, portanto, eliminando o CO_2 . Essa regulação opera continuamente, pois os quimiorreceptores atuam de modo tônico no processo respiratório (GUYENET;

BAYLISS, 2015). Com relação a localização das células que detectam variações da P_{CO_2} e pH, existem duas vertentes principais. Uma abrange a visão mais clássica e a outra a visão mais atual. Na visão clássica, estas células estão localizadas na região ventral do bulbo, com áreas delineando as três regiões tradicionais (rostral, intermediária e caudal). Já na visão atual, acredita-se que esses quimiorreceptores estejam presentes em muitos locais no tronco encefálico, cerebelo, hipotálamo e mesencéfalo (NATTIE; LI, 2012) (Figura 4).

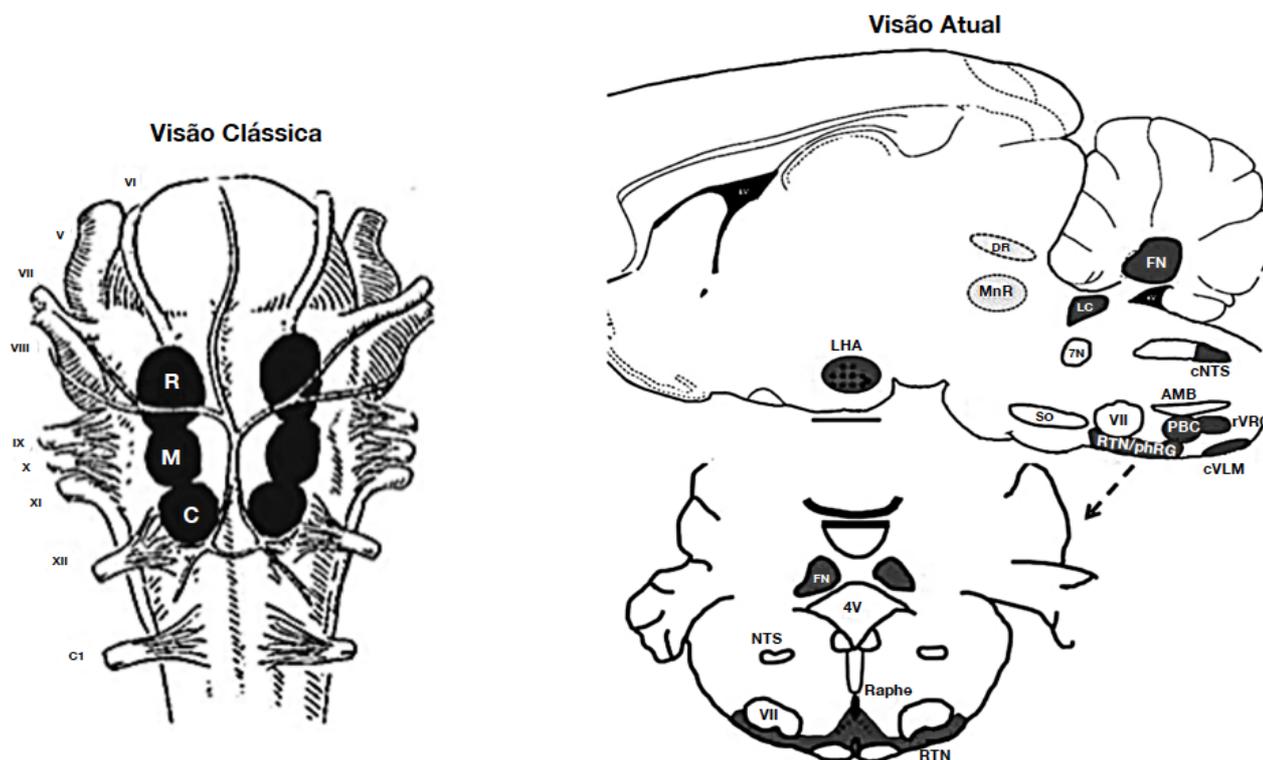


FIGURA 4: LOCALIZAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES CENTRAIS

A localização dos quimiorreceptores centrais está dividida em duas visões principais, sendo elas, a visão clássica e a atual. Na visão clássica (à esquerda), os quimiorreceptores centrais estão majoritariamente na região ventral do bulbo, enquanto que na visão atual (à direita), eles estão localizados no bulbo ventral, cerebelo, hipotálamo e no mesencéfalo. Abreviaturas: R, rostral; M, médio; C, caudal; LHA, hipotálamo lateral; RD, rafe dorsal; FN, núcleo fastigial; 4v, quarto ventrículo; LC, locus coeruleus; 7N, nervo facial; cNTS, núcleo do trato solitário caudal; AMB, ambíguo; VII, núcleo facial; SO, oliva superior; PBC, complexo pré-Bötzinger; rVRG, grupo respiratório ventral rostral; cVLM, bulbo ventrolateral caudal; RTH/pFRG, núcleo retrotrapezóide/grupo respiratório parafacial; e Pn, ponte. Modificado de (NATTIE; LI, 2012).

Considerando a visão atual, os principais quimiorreceptores centrais estão localizados no núcleo retrotrapezóide (RTN), a rafe bulbar rostral (MR) (raphe magnus), a MR caudal (raphe obscurus), o Núcleo do trato solitário caudal (NTS), a região imediatamente dorsal à superfície bulbar ventral caudal e os neurônios orexinérgicos localizados no hipotálamo (MOREIRA et al., 2011).

Para avaliar a resposta dos quimiorreceptores centrais e periféricos são utilizados dois estímulos principais, sendo eles a hipercapnia e a hipóxia respectivamente. A hipercapnia é caracterizada pelo aumento da P_{CO_2} , enquanto que a hipóxia causa uma diminuição da P_{O_2} , estimulando as células quimiossensíveis (GREER; FUNK, 2013).

1.3 MODELOS ANIMAIS PARA INDUÇÃO DA ISQUEMIA

Em geral, existem quatro tipos principais de modelos animais de AVE isquêmico: (1) isquemia cerebral global completa; (2) isquemia global incompleta; (3) isquemia cerebral focal e (4) isquemia cerebral multifocal (GRAHAM; MCCULLOUGH; MURPHY, 2004). O modelo de isquemia focal mais utilizado é a oclusão da artéria cerebral média (MCAo), que consiste em inserir um fio de oclusão na carótida comum e direcioná-lo para a artéria cerebral média, a fim de impedir o fluxo sanguíneo unilateral para as regiões cerebrais irrigadas por este vaso temporariamente (LONGA et al., 1989). Uma das vantagens deste modelo é que ele é transiente e bastante similar com o que acontece na clínica. No entanto, as possíveis sequelas causadas por este método se limitam apenas àquelas regiões irrigadas pela artéria cerebral média.

A isquemia global transiente pode ser realizada através da oclusão de 04 vasos (4-VO) de forma temporária, sendo eles, as duas carótidas comuns e as duas artérias vertebrais. Outra maneira de causar uma isquemia global transiente é através da oclusão de 02 vasos (2-VO), denominada como oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCAo) (TUO; ZOU; LEI, 2021). Este modelo foi inicialmente desenvolvido como um modelo de hipoperfusão, causando lesão secundária da substância cerebral branca. A BCAo pode causar uma redução severa no fluxo sanguíneo cerebral (CBF) temporariamente com recuperação ao nível original após 6 meses de 2-VO (FARKAS; LUITEN; BARI, 2007).

Neste estudo utilizamos o modelo BCAo devido a possibilidade de abranger mais áreas cerebrais, conseqüentemente podendo causar maior dano às células quimiossensíveis localizadas tanto na periferia quanto no sistema nervoso central.

“Quando algo é importante o suficiente, você realiza, mesmo que as chances não estejam a seu favor.”

- Elon Musk

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é considerado a principal causa de incapacidade na população adulta brasileira, gerando grandes prejuízos funcionais nos seus portadores, sendo estes, motores, cognitivos e sensoriais.

Hoje muito se sabe sobre os comprometimentos citados anteriormente, no entanto, poucos estudos mostram o impacto do AVE no controle neural da ventilação. Alguns estudos que investigaram as consequências do AVE na qualidade do sono tiveram a apneia como o distúrbio de sono mais comum entre os pacientes (BLISSITT, 2017) (TOSUN et al., 2008). Segundo Stevens e colaboradores, a apneia do sono pode ser classificada em obstrutiva e central, sendo prevalente em pelo menos 50% dos pacientes com AVE (STEVENS et al., 2018).

Um estudo na literatura mostrou que na apneia obstrutiva do sono (AOS), episódios apneicos/hipoxêmicos iniciam o processo de inflamação e há uma cascata de marcadores inflamatórios como IL 1, IL 6, TNF α e interferon γ (IFERGANE et al., 2016). Esses marcadores inflamatórios danificam o revestimento endotelial dos vasos sanguíneos e há um aumento da agregação de plaquetas que leva a mais estresse oxidativo e dano endotelial vascular. Este estresse oxidativo repetitivo e danos vasculares em pacientes com AOS podem causar o AVE (SHAMSUZZAMAN; GERSH; SOMERS, 2003). No estudo de Tosun e colaboradores, a AOS foi diagnosticada em 73,7% dos casos de AVE (TOSUN et al., 2008). Isso pode sugerir uma relação de causalidade entre a AOS e o AVE. No entanto, pouco se sabe sobre a influência do AVE no controle neural da ventilação e se uma lesão central poderia acarretar um padrão ventilatório alterado. E é com esta motivação que este trabalho foi realizado, visando encontrar respostas relacionadas às possíveis alterações no controle neural da ventilação em ratos pós-AVE isquêmico.

“As pessoas trabalham melhor quando sabem qual é o objetivo e o porquê...”

- Elon Musk

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar um modelo animal de estudo da ventilação pós-isquemia cerebral induzida pela oclusão transitória das carótidas comuns.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os resultados de força, memória e escore neurológico do grupo SHAM e isquemia.

Avaliar as respostas ventilatórias à hipercapnia (aumento de CO₂) e hipóxia (diminuição de O₂) dos animais dos grupos SHAM e isquemia;

Avaliar a presença de apneias, suspiros e apneias pós-suspiro nos registros ventilatórios.

Avaliar possível morte celular em algumas áreas envolvidas no controle neural da ventilação, sendo elas o Núcleo do Trato Solitário (NTS), Raphe obscurus (RO), Raphe Magnus (RM) e Região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM).

“Detalhes importam, vale a pena esperar e fazê-los direito.”

- Steve Jobs

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, com 8-12 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFMG e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas. Os ratos foram acondicionados em gaiolas próprias para a sua alocação, com até cinco animais. As gaiolas foram mantidas em estantes e a sala teve a temperatura controlada para que se mantivesse entre 21°C e 23°C. A umidade relativa do ar foi mantida entre 40% e 70% e o ciclo claro-escuro foi de 12/12 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água "ad libitum". Todos os experimentos foram conduzidos em concordância com os princípios éticos em experimentação animal, após aprovação da CEUA-UFMG pelo número de protocolo CEUA: 268/2020.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em salas exclusivas no laboratório (NNC). Após a eutanásia, as carcaças foram colocadas em sacos plásticos branco (risco biológico) que, por sua vez, foram armazenados em freezer (no bloco B4) disponibilizado pelo departamento para tal fim e recolhidos semanalmente pelo serviço de limpeza do ICB, sendo encaminhados para o abrigo externo onde ficam estocados em contêineres específicos até seu recolhimento por uma empresa terceirizada contratada pela UFMG, que posteriormente realiza a incineração e depósito das cinzas em um aterro sanitário.

Para o descarte dos dejetos e dos cadáveres foram seguidas as instruções fornecidas pela Gerência de Resíduos e Biossegurança do ICB (GERES). O acondicionamento de resíduos biológicos (cadáveres, maravalha, fezes e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação) foi realizado em saco branco leitoso, resistente e com simbologia infectante e armazenado em local determinado pelo ICB (contêineres ou, no caso das carcaças, freezer).

4.2 GRUPOS ISQUEMIA E SHAM

Os animais foram sorteados de maneira aleatória para ambos os grupos. Logo após, os parâmetros ventilatórios dos animais foram medidos, sendo expostos aos estímulos de hipercapnia (7% CO₂ + 21% O₂ + N₂ balanço) e hipóxia (10% O₂ + 90%

N₂). Também foram realizados os testes motor, de memória e déficit neurológico antes do procedimento cirúrgico.

Após as medidas ventilatórias e os testes funcionais e comportamentais, os animais passaram pela cirurgia, sendo que apenas o grupo isquemia teve a oclusão bilateral das carótidas comuns (BCAo) por 30 min. Foram realizadas as medidas das apneias (24h e 7 dias pós-cirurgia) e os testes funcionais e comportamentais (24h, 7 dias e 14 dias pós-cirurgia) nos grupos sham e isquemia, para avaliação das possíveis alterações no controle neural da ventilação pós-cirurgia. Quatorze dias após a cirurgia, estes animais foram expostos novamente a condições de hipercapnia e hipóxia. No décimo oitavo dia os animais foram eutanasiados para a realização da perfusão. Posteriormente foi realizada a histologia por meio da marcação do estriado e do tronco encefálico com Fluoro-Jade.

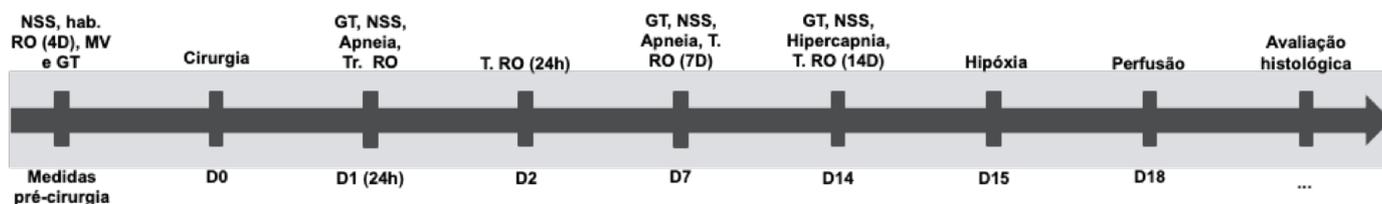


FIGURA 5: LINHA DO TEMPO GERAL

Linha do tempo do experimento considerando as medidas ventilatórias, comportamentais e funcionais pré e pós-cirurgia. NSS – Escore Neurológico; hab. RO – Habituação do Reconhecimento de objetos; MV – medidas ventilatórias; GT – grip test; Tr. RO – treino do reconhecimento de objetos; T. RO – Teste do reconhecimento de objetos.

4.3 ESCALA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA MODIFICADA (mNSS)

Déficits neurológicos foram avaliados pré e pós-cirurgia (24h, 7 dias e 14 dias) de acordo com a escala mNSS (SCHAAR; BRENNEMAN; SAVITZ, 2010). Esta escala classifica o déficit neurológico em uma pontuação de 0 a 15, sendo que, quanto maior a pontuação, maior é o déficit neurológico do animal (n=13). A mNSS inclui um conjunto de testes motores (estado muscular e movimento anormal), sensoriais (visual, tátil e proprioceptivo), de reflexo e equilíbrio. Esta escala avalia 7 importantes características da isquemia, tais como comprometimento motor, reflexo de endireitamento e reflexo de preensão. O teste foi realizado por um segundo pesquisador cego, de modo a evitar o viés de aplicação. Para cada déficit, o animal recebeu 01 ponto, sendo que quanto maior o score, pior o estado do animal.

4.4 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Para avaliar a função cognitiva dos animais foi aplicada a tarefa de reconhecimento de objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988), que consiste em expor os animais a uma caixa de acrílico (50 x 50 x 30 cm) com paredes e pisos pretos. Os animais (n= 13) passaram por 10 minutos de ambientação à sala em que foi realizada a tarefa. Durante três dias seguidos, os animais foram gentilmente colocados no centro do aparato permanecendo durante 20 minutos/dia para habituação, onde puderam explorar livremente o aparato na ausência de objetos.

Após, na sessão de treino, os animais foram colocados no aparato contendo dois objetos iguais (A e A) para livre exploração por 05 minutos. Vinte e quatro horas, 7 dias e 14 dias após a sessão de treino, foram realizadas sessões de teste para avaliar memória de longa duração e persistência da memória. Nas sessões de teste, com duração de 05 minutos cada, um dos objetos foi aleatoriamente substituído por um novo objeto (B). As posições dos objetos foram randomizadas (familiar ou novo), e os mesmos eram feitos de vidro, apresentando iguais características, como altura (não superior a 10 cm), profundidade e textura. A fim de evitar interferências olfativas ou preferências pelos objetos, a caixa e os objetos foram limpos entre as sessões com etanol 70%. O tempo de exploração foi contabilizado e expresso em percentual do total de tempo de exploração computado em segundos (ROSSATO et al., 2007), sendo a exploração definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras a uma distância de 01 a 04 cm. Sentar ou andar ao redor do objeto não foi considerado como exploração. Um índice de discriminação ($ID = (\text{Tempo explorando objeto novo} - \text{Tempo explorando objeto familiar}) / \text{Tempo total de exploração de objeto}$) foi usado como medida de discriminação entre objetos familiares e novos (RADISKE et al., 2017). ID varia entre -1 e +1. Escores de ID positivos indicam a preferência dos ratos por novos objetos. Uma pontuação ID de zero indica desempenho ao acaso (ou seja, sem discriminação). Os dados foram analisados por meio do teste t de uma amostra com média teórica = 0 para determinar a preferência pelo objeto. Houve cegamento tanto para a realização, quanto para a avaliação dos experimentos. Todas as sessões foram filmadas para posterior análise. Esse procedimento foi realizado entre as 13:00h e as 16:00h.

4.5 TESTE DE FORÇA MUSCULAR (GRIP TEST)

O protocolo de mensuração da força muscular foi executado conforme previamente descrito (BONETTO; ANDERSSON; WANING, 2015). Foi utilizado um medidor de força de preensão (Grip Strength Meter, BONTHER, Ribeirão Preto, SP) próprio para pequenos roedores, que contém uma tela com grade, cuja angulação foi ajustada em 45°. O animal foi aproximado da tela de forma que se segurasse na grade somente com as patas dianteiras ou com as patas traseiras, tendo a sua cauda segurada pelo terço proximal e puxada horizontalmente até que se soltasse da grade. Foram realizadas 03 medidas/teste com 1 min de intervalo, sendo a média e o maior valor registrado pelo medidor de força utilizados para análise. Os animais foram submetidos aos testes no período da manhã entre 8:20 e 11:00h. O teste foi realizado de forma cega.

4.6 CIRURGIA DE OCLUSÃO BILATERAL DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS COMUNS

O procedimento cirúrgico utilizado para a indução da isquemia é o de oclusão bilateral das artérias carótidas comuns (BCAo), baseado na modificação do método descrito por (SMITH et al., 1984). A anestesia foi induzida pela inalação de 4% de Isoflurano (O₂ de 70/30%) e mantida pela inalação de 2 - 3% de Isoflurano. Para realização da cirurgia, o animal foi colocado na posição supina na mesa cirúrgica. Foi realizada uma pequena incisão sagital mediana na pele do pescoço e os tecidos divulsionados até que as artérias carótidas comuns (ACC) direita e esquerda pudessem ser visualizadas. As carótidas comuns foram ocluídas com um microclipe (Fine Science tools No.18055-02) cada e permaneceram ocluídas por um período de 30 min. Enquanto a isquemia acontecia, foi realizada uma laparotomia paramediana para inserção do datalogger de temperatura (SubCue, Calgary, AB, Canadá), com o intuito de acompanhar a temperatura interna do animal com mais acurácia. A temperatura foi posteriormente utilizada como parâmetro para a realização dos cálculos das variáveis ventilatórias.

Durante o período da isquemia, os animais foram mantidos aquecidos e hidratados com 1mL de salina intraperitoneal para hidratá-los. Após os 30 minutos de isquemia, os cliques de oclusão foram retirados das carótidas comuns, dando início a reperfusão. Animais SHAM passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, no entanto, sem a efetiva oclusão das artérias carótidas. O grupo SHAM foi suturado, embora não houvesse a necessidade de promover a reperfusão, uma vez que não houve o bloqueio das artérias carótidas comuns com o clipe. Após a cirurgia, estes animais também receberam 1mL de salina intraperitoneal para restabelecimento do volume sanguíneo e foram mantidos aquecidos em uma mesa de recuperação por cerca de duas horas para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38°C e receberam mais 1mL de salina e o opioide tramadol (0,5mL/Kg) via intraperitoneal. Doze horas após a cirurgia, os animais foram pesados e receberam novamente a solução salina e tramadol. Também foi monitorado qualquer efeito adverso possível. Água e ração umedecida foram disponibilizadas no fundo da gaiola para facilitar o acesso do animal. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente até que o animal se recuperasse da cirurgia. Nos primeiros três dias pós-cirurgia, os animais foram pesados diariamente e receberam uma dose subcutânea de 0,5 ml de ringer lactato a cada 12 h. Na segunda semana pós-cirurgia, os animais continuaram sendo pesados e aqueles que recuperaram o seu peso inicial ou ganharam peso, não receberam mais ringer lactato. Os ratos foram acompanhados e pesados diariamente e aqueles que perderam mais de 10% do seu peso inicial foram eutanasiados.

4.7 MEDIDAS VENTILATÓRIAS

4.7.1 PLETISMOGRAFIA DE CORPO INTEIRO

As medidas de ventilação pulmonar foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (MORTOLA; FRAPPELL, 1998). Durante a realização de cada medida de ventilação (Frequência respiratória (FR), equivalente respiratório (VE/VO₂), Volume corrente (VT), Consumo de O₂ (VO₂) e Ventilação (VE)), o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min). As oscilações de pressão causadas pela respiração do animal (ar aquecido e umidificado durante a respiração) foram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor de pressão diferencial e o amplificador de sinais

(ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). O sinal é então enviado para o sistema de aquisição e análise dos dados (PowerLab, ADInstruments). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 ml) com o uso de uma seringa graduada.

Para as medidas ventilatórias pré-cirurgia e 14 dias pós-cirurgia, a câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) por um período de aclimatação de no mínimo 30 minutos. Foram então realizadas as medidas da ventilação controle. O animal foi submetido aos estímulos de hipercapnia e hipóxia, por 30 min. em dias consecutivos, sendo a câmara ventilada com um fluxo de 1400 ml/min por uma mistura gasosa umedecida contendo 7% CO₂, 21% O₂, equilibrada com N₂ (nitrogênio) de balanço para o estímulo de hipercapnia, ou 10% O₂ e N₂ 90% para o estímulo de hipóxia. Após este período, a ventilação foi mensurada. As variáveis volume corrente (VT, ml/kg) e frequência respiratória (FR, ciclos/min) foram quantificadas. E ventilação pulmonar (VE, ml/Kg/min) calculada como o produto do VT e FR.

Como variáveis de controle, a massa corporal dos animais foi registrada para a avaliação do estado de saúde dos mesmos após os procedimentos descritos. A temperatura ambiente foi mantida em 24°C durante os protocolos experimentais.

Após 24 horas e 7 dias da cirurgia, os animais de ambos os grupos (sham e isquemia) foram colocados na câmara pletismográfica para realizar a avaliação da frequência de apneias, suspiros e apneias pós-suspiro dos animais em um sistema de fluxo aberto. Neste, a configuração do sistema é ligeiramente alterada para permitir a manutenção do fluxo de ar contínuo através da câmara e registros com duração maior. Neste sistema, o animal foi colocado dentro da câmara de pletismografia ventilada com ar atmosférico umedecido (21% O₂) por um período de, no mínimo, 50 minutos. A temperatura ambiente foi mantida em 24°C durante os protocolos experimentais. A temperatura do animal foi registrada através do datalogger de temperatura (SubCue, Calgary, AB, Canadá). A duração do ciclo de cada evento respiratório (T_{TOT}) e a sua variabilidade durante a normóxia também foi analisada. A análise de Poincaré foi utilizada para a variabilidade respiratória e calcular a distribuição dos pontos ao longo da variação SD1 (desvio padrão 1) e SD2 (desvio padrão 2) (BRENNAN; PALANISWAMI; KAMEN, 2001).



FIGURA 6: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA MEDIDA VENTILATÓRIA NO ESTÍMULO DE HIPERCAPNIA

Linha do tempo das medidas ventilatórias em ar ambiente e pós-estímulo de hipercapnia utilizando o método de Pletismografia de corpo inteiro.



FIGURA 7: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA MEDIDA VENTILATÓRIA NO ESTÍMULO DE HIPÓXIA

Linha do tempo das medidas ventilatórias em ar ambiente e pós-estímulo de hipóxia utilizando o método de Pletismografia de corpo inteiro.

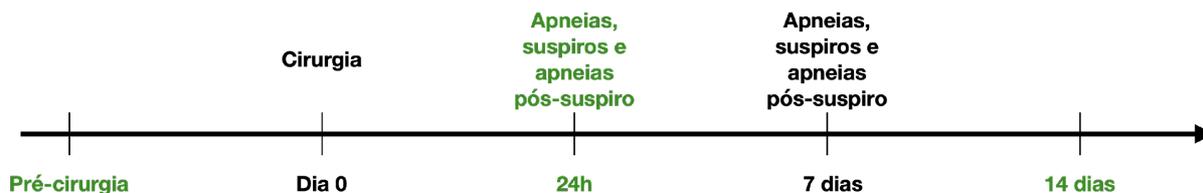


FIGURA 8: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DAS MEDIDAS DE APNEIAS, SUSPIROS E APNEIAS PÓS-SUSPIRO

Linha do tempo das medidas de apneias, suspiros e apneias pós-suspiro realizadas 24h e 7 dias pós-cirurgia.

4.8 SOLUÇÕES

TABELA 1: LISTA DE SOLUÇÕES UTILIZADAS

NOME	COMPONENTES
Tampão Fosfato Salina (PBS – 0,1 M)	NaCl solução 0,9%: 18,0 g de NaCl em 2 litros de água destilada + 3,96 g de Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O + 0,72 g de NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O
Paraformaldeído 4%	40 g de PFA em 1 litro de PBS

	pH = 7,4 ajustado com HCl 1 M
Solução de uretana 28%	28 g de uretana em 100 ml de água destilada.
Solução de sacarose 30%	30 g de sacarose em 100ml de água destilada.
Solução anti-freeze	PBS (0,1 M pH 7.2) Sacarose (30% p/v) Etilenoglicol (30% v/v) Polivinilpirrolidona (PVP 1% p/v)
Fluoro-Jade	10 mg de Fluoro-Jade em 100 ml de água destilada + 60 mg de permanganato de potássio em 100 ml de água destilada + 1 ml de ácido acético para 1 litro de água destilada.

Obs.: Todas as soluções foram medidas em balões volumétricos e acertado o menisco.

4.9 PREPARAÇÃO DO TECIDO CEREBRAL

Os animais foram anestesiados com uretana (0,5 ml/kg a cada 100g) e colocados na posição supina, onde tiveram as patas superiores contidas com o auxílio de fitas adesivas. Após a verificação de ausência de reflexos do animal, foi realizada uma incisão na cavidade abdominal abaixo do osso esterno com o intuito de expor os órgãos presentes na cavidade torácica (pulmões e coração). Com a inserção de uma agulha no ápice do coração do animal direcionada para a artéria aorta, clampeada com uma tesoura hemostática a fim de evitar o retorno da mesma, foi realizada a perfusão de PBS com fluxo de 20 ml/min. Foi realizada uma incisão no átrio direito para facilitar a saída do fluxo sanguíneo. O PBS foi inserido no organismo do animal por aproximadamente 5 min., até a sua saída apresentar uma cor cristalina. Logo

após, o PBS foi substituído pelo PFA com fluxo de 20 ml/min. com o intuito de fixar o tecido cerebral. Este procedimento durou aproximadamente 5 minutos. O cérebro foi retirado e colocado em uma solução de PFA por 24h, posteriormente sendo substituída por uma solução de sacarose (30%). Os cérebros foram fatiados no criostato em cortes coronais de 35 µm em uma temperatura de -20°C tendo como referência visual o núcleo do nervo facial. As fatias foram colocadas em solução crioprotetora até o momento da montagem das lâminas.

4.9.1 HISTOQUÍMICA – FLUORO-JADE

Para verificar o insulto isquêmico nas fatias cerebrais e no tronco encefálico foi utilizado o corante Fluoro-Jade (Histo-Chem, Inc., P.O. Box 183, Jefferson, AR 72079, EUA), um fluoróforo bastante útil para marcar neurônios em degeneração no tecido *ex-vivo* do sistema nervoso central, inicialmente descrito por (SCHMUED; ALBERTSON; SLIKKER, 1997). O Fluoro-Jade é um derivado aniônico tribásico de fluoresceína com um peso molecular de 445 daltons. Tem um pico de emissão em 550 nm e picos de excitação em 362 e 390 nm, respectivamente. O pó seco é estável quando armazenado no escuro em um recipiente hermético. A solução estoque a 0,01% é estável por pelo menos 2 meses quando armazenada na geladeira, ao contrário da solução de trabalho que deve ser utilizada no mesmo dia em que foi preparada. As lâminas foram submetidas a banhos sucessivos de etanol absoluto por 3 minutos, etanol 70% por 1 minuto, água destilada (dH₂O) por 1 minuto, permanganato de potássio por 15 minutos em agitação leve, 3 lavagens com dH₂O por 1 minuto, sem seguida, banho na solução de Fluoro-Jade C, que foi preparada e utilizada no mesmo dia, com 30 minutos de agitação branda, 3 lavagens em dH₂O por 1 minuto, secagem das lâminas no ar ambiente. As lâminas foram guardadas na geladeira e protegidas da luz. Para a análise das lâminas no microscópio foi necessário manter o ambiente escuro, a fim de evitar a degradação da marcação com o Fluoro-Jade. Após análise, as lâminas foram recolocadas na geladeira e protegidas com papel alumínio.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Alterações na ventilação foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas (condição gasosa e cirurgia como fatores, e tempo como medida dependente), seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni, quando encontrada interação estatisticamente significativa entre os fatores. Quando necessário, foi utilizada ANOVA de duas vias (condição gasosa, cirurgia). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. O programa utilizado para as análises estatísticas e elaboração dos gráficos foi GraphPadPrism 8.0.2 ®.

5.1 ESCORE NEUROLÓGICO

Para avaliar o escore neurológico dos animais pós-cirurgia de ambos os grupos (sham $n = 06$ e isquemia $n = 07$), foi utilizada a escala de severidade neurológica modificada (SCHAAR; BRENNEMAN; SAVITZ, 2010). A escala é quantificada de 0-15 pontos, sendo que quanto maior o score, pior é o estado do animal. O teste foi realizado pré-cirurgia e 24h, 7 dias e 14 dias pós-cirurgia. Ambos os grupos tiveram um escore semelhante na pré-cirurgia, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P > 0,2790$). Nas 24h pós-cirurgia, fase mais aguda, houve um aumento do escore neurológico do grupo sham e do grupo isquemia em comparação à medida de pré-cirurgia, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,9693$). Com 7 dias pós-cirurgia, os animais de ambos os grupos tiveram uma diminuição do escore, comparado com o grupo de 24h, indicando uma recuperação espontânea, no entanto, não significativa ($P = 0,9843$). Com 14 dias não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,9999$). Os dados foram apresentados como média \pm EPM. (Figura 9).

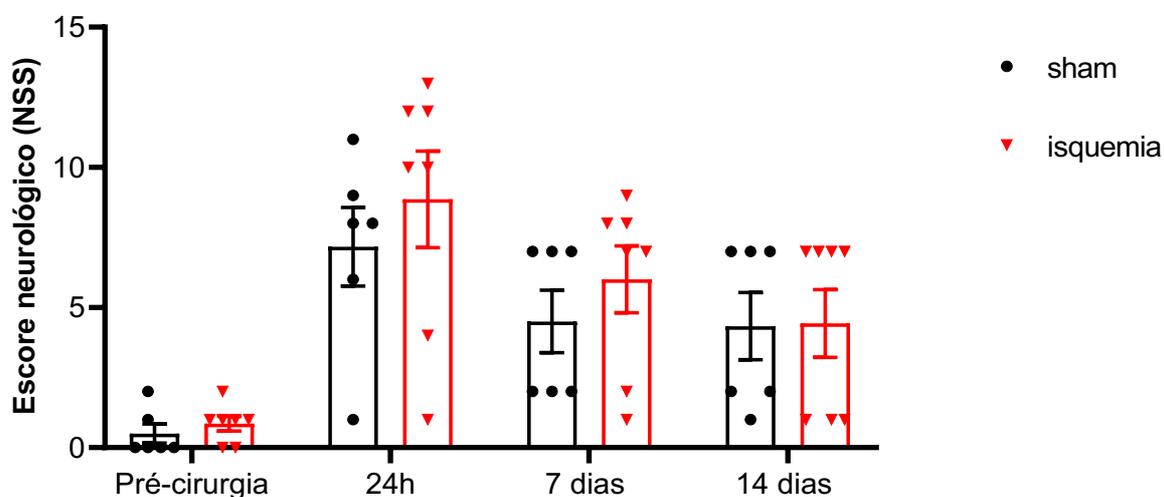


FIGURA 9 – ESCALA DE SEVERIDADE NEUROLÓGICA MODIFICADA (NSS).

Escore neurológico dos animais pré-cirurgia e 24h, 7 dias e 14 dias pós-cirurgia do grupo sham ($n = 06$) e isquemia ($n = 07$). Resultados representados como Média \pm EPM.

5.2 TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Para avaliar a memória de longa duração foi aplicada a tarefa de reconhecimento de objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). A tarefa foi realizada pré-cirurgia e 24h, 7 dias e 14 dias pós-cirurgia. Esta tarefa avalia o percentual do tempo total de exploração dos objetos A (objeto conhecido) e B (objeto novo). No treino, os animais de ambos os grupos (sham e isquemia) foram expostos ao mesmo objeto (A) por 5 min. Nos dias de teste (24h, 7 dias e 14 dias), os animais foram introduzidos a um novo objeto (B), para avaliar o tempo de exploração.

No treino (Figura 10A), não houve diferença significativa entre os grupos sham e isquemia no tempo de exploração ($P > 0,9999$). No ID (Figura 10B), não houve diferença significativa na discriminação entre objeto familiar e novo ao longo do tempo (24h, 7 dias e 14 dias) entre o grupo isquemia e sham. O ID varia entre -1 e +1. Escores de ID positivos indicam a preferência dos ratos por novos objetos. Uma pontuação DI de zero indica desempenho ao acaso (ou seja, sem discriminação). Os dados foram apresentados como média \pm EPM. (Figura 10).

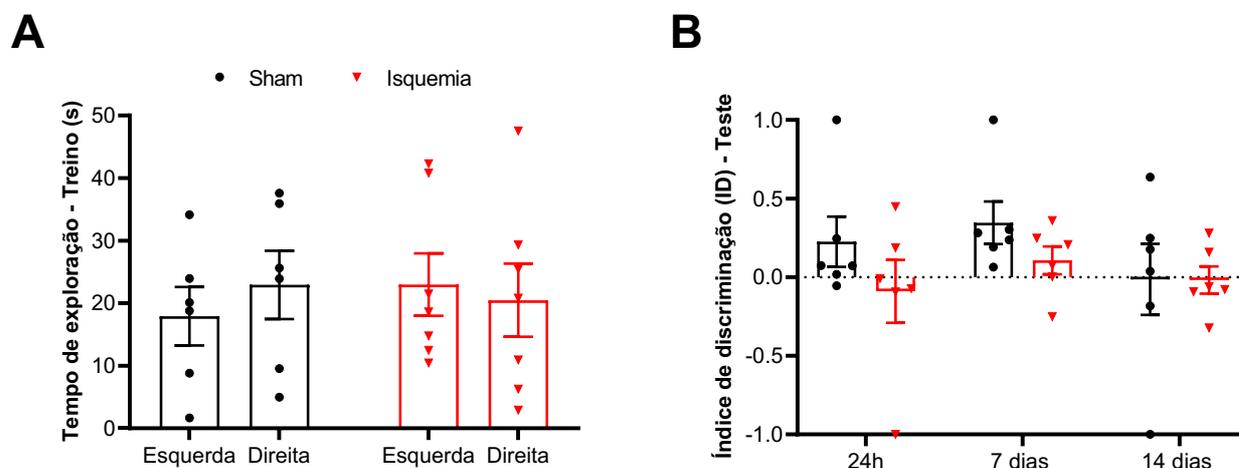


FIGURA 10 – TAREFA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (RO).

RO dos animais pré-cirurgia, 24h, 07 dias e 14 dias pós-cirurgia do grupo sham (n = 06) e isquemia (n = 07). (A) Tempo de exploração (treino) – Direita e esquerda equivalem ao mesmo objeto (A A); (B) Índice de discriminação (teste) ao longo do tempo (24 h, 7 dias e 14 dias). Resultados representados como Média \pm EPM.

5.3 TESTE MOTOR (*GRIP TEST*)

A avaliação de força muscular dos animais foi realizada através do *Grip Test* (BONETTO; ANDERSSON; WANING, 2015). Foram feitas 03 medidas/teste com 1 min de intervalo, sendo a média e o maior valor registrado pelo medidor de força utilizados para análise. Os animais sham (n=6) e isquemia (n=7) passaram pela avaliação das patas anteriores (02 patas) (Figura 11) e das quatro patas (força total) (Figura 12). Os dados foram organizados em força média (A), máxima (C) e força média (B), máxima (D) corrigida pelo peso do animal, tanto no teste de 02 patas quanto no de 04 patas. Com relação ao teste de 02 patas (Figura 11), os resultados de força média (P=0.1623) (A) e máxima (P=0.3951) (C) não tiveram diferença significativa entre os grupos sham e isquemia, e não foi possível observar diferença significativa nos resultados de força média (P=0.1001) (B), máxima (P=0.2612) (D) corrigida pelo peso do animal. O teste de 04 patas (Figura 12) também teve um comportamento similar. Não houve diferença significativa entre grupos (sham e isquemia) nos testes de força média (P=0.3200) (A) e máxima (P=0.1142) (C), e não foi possível observar diferença significativa nos resultados de força média (P=0.1060) (B) e máxima (P=0.0878) (D) corrigida pelo peso do animal (Figura 12). Os dados foram apresentados como média \pm EPM.

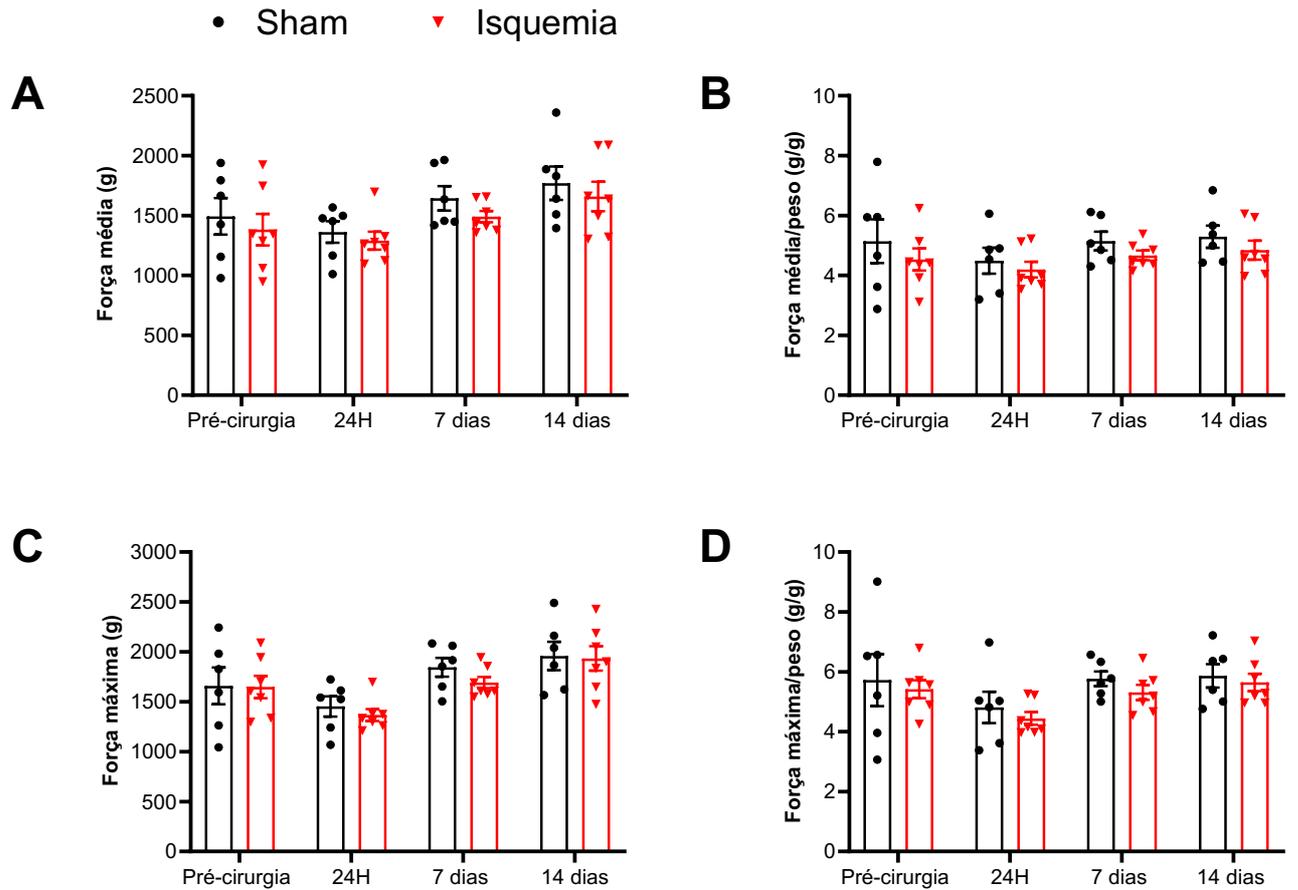


FIGURA 11 – GRIP TEST (TESTE MOTOR) DE 02 PATAS.

Teste de força muscular dos animais pré-cirurgia, 24h, 7 dias e 14 dias pós-cirurgia do grupo sham (n = 06) e isquemia (n = 07). (A) Força média (g); (B) Força média / peso (g/g); (C) Força máxima (g); (D) Força máxima / peso (g/g). Resultados representados como Média \pm EPM.

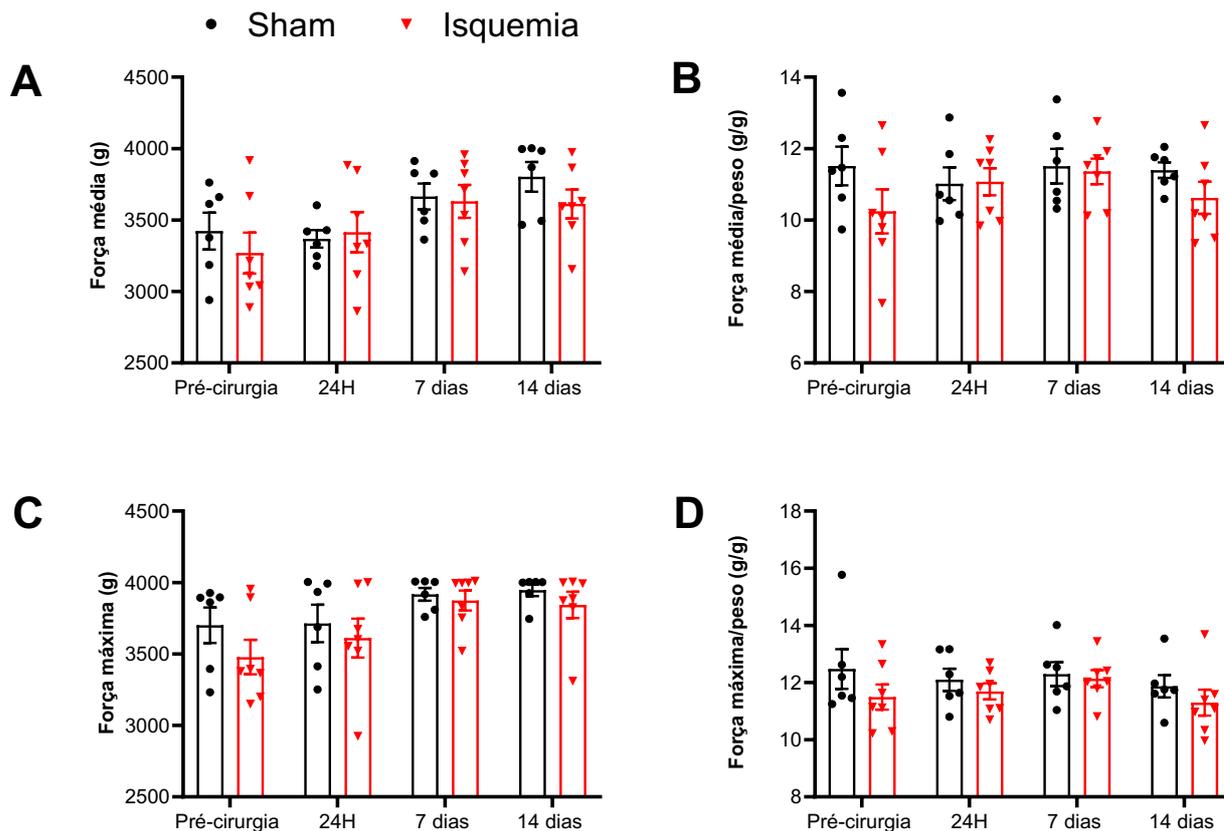


FIGURA 12 – GRIP TEST (TESTE MOTOR) DE 04 PATAS.

Teste de força muscular dos animais pré-cirurgia, 24h, 7 dias e 14 dias pós-cirurgia do grupo sham ($n = 06$) e isquemia ($n = 07$). (A) Força média (g); (B) Força média / peso (g/g); (C) Força máxima (g); (D) Força máxima / peso (g/g). Resultados representados como Média \pm EPM.

5.4 RESPOSTAS VENTILATÓRIAS À HIPERCAPNIA E À HIPÓXIA 14 DIAS PÓS-CIRURGIA

Para avaliar a função dos quimiorreceptores centrais e periféricos, foi realizada a pletismografia de corpo inteiro dos animais, utilizando os estímulos de hipercapnia e hipóxia (MORTOLA; FRAPPELL, 1998). As respostas ventilatórias, térmica e de consumo de O_2 à hipercapnia e hipóxia foram avaliadas. Em ambos os estímulos foram quantificadas a Frequência Respiratória (FR); Volume corrente (VT); Ventilação (VE); Consumo de oxigênio (VO_2); equivalente ventilatório (VE/VO_2); e temperatura corporal.

No estímulo de hipercapnia (Figura 13), foi encontrado diferença significativa entre os grupos sham e isquemia nas variáveis de FR ($P=0.0126$) (A), VE ($P=0.0259$) (E) e VO_2 ($P=0.0225$) (D). Não houve diferença significativa entre os grupos nas

variáveis VT ($P=0.6622$) (C) e VE/VO_2 ($P=0.9868$) (B). Não houve diferença significativa na temperatura durante o estímulo de hipercapnia ($P=0.3942$) (F) entre sham e isquemia.

Com relação a resposta ventilatória à hipóxia (Figura 14), foi encontrada diferença estatística entre os grupos sham e isquemia nas variáveis de FR ($P=0.0064$) e VE ($P=0.0088$). Não houve diferença entre grupos nas variáveis VT ($P=0.9286$), VE/VO_2 ($P=0.4393$) e VO_2 ($P=0.3360$). Também não houve diferença estatística na temperatura durante o estímulo de hipóxia ($P=0.4284$) (FIGURA 14). Os dados foram apresentados como média \pm EPM.

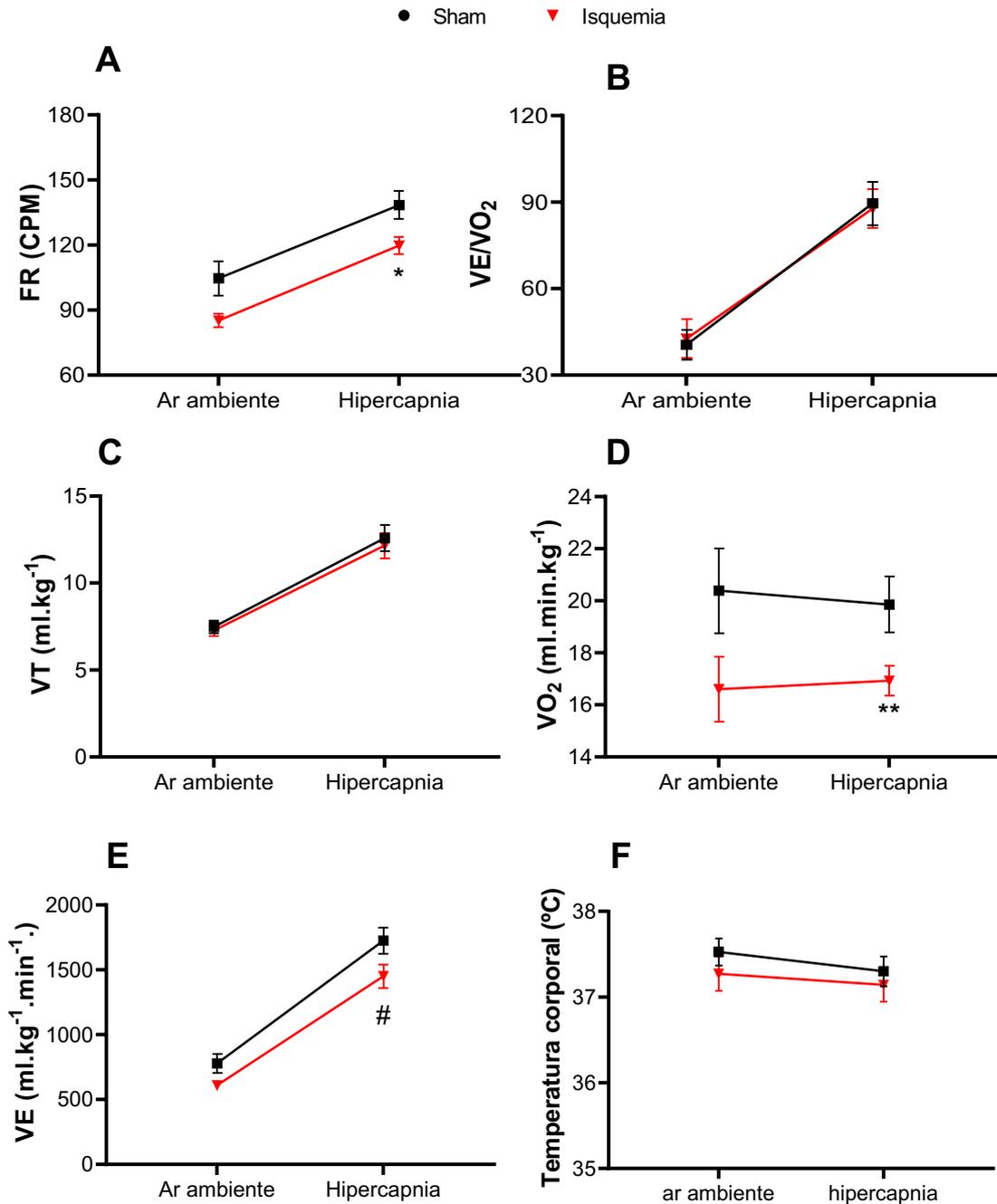


FIGURA 13 – RESULTADO DAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS À HIPERCAPNIA.

Ventilação dos animais sham (n = 12) e isquemia (n = 14) sob o estímulo de hipercapnia. (A) FR (frequência respiratória); (B) VE/VO₂ (equivalente ventilatório); (C) VT (volume corrente); (D) VO₂ (consumo de O₂); (E) VE (ventilação); (F) temperatura corporal. Resultados representados como Média ± EPM. * grupo isquemia significativamente diferente na FR; ** grupo isquemia significativamente diferente no VO₂; # grupo isquemia significativamente diferente na VE.

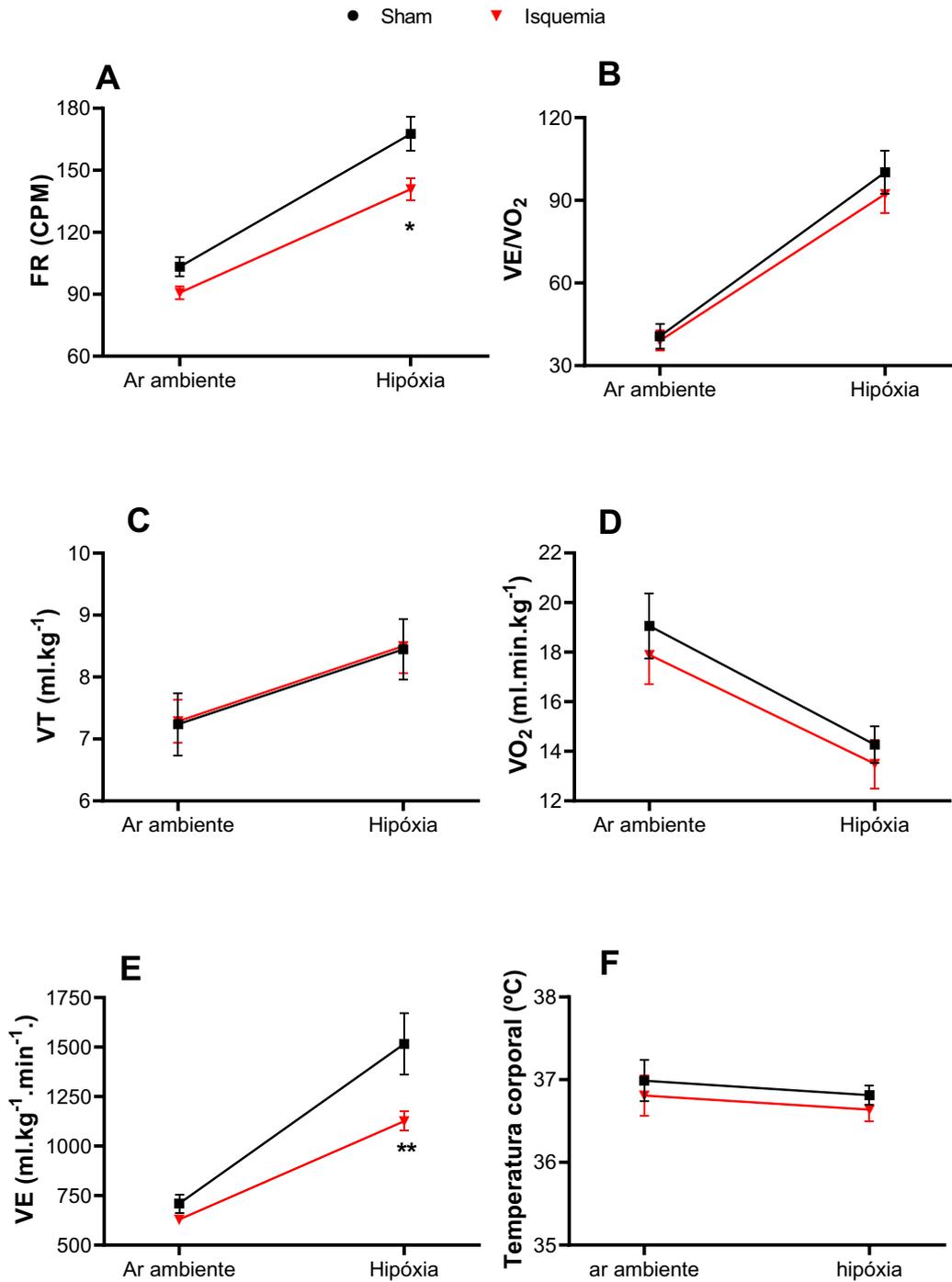


FIGURA 14 – RESULTADO DAS VARIÁVEIS RESPIRATÓRIAS APÓS O ESTÍMULO DE HIPÓXIA.

Ventilação dos animais sham (n = 12) e isquemia (n = 14) sob o estímulo de hipóxia. (A) FR (frequência respiratória); (B) VE/VO₂ (equivalente ventilatório); (C) VT (volume corrente); (D) VO₂ (consumo de O₂); (E) VE (ventilação); (F) temperatura corporal. Resultados representados como Média ± EPM. * grupo isquemia significativamente diferente na FR; ** grupo isquemia significativamente diferente na VE.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE APNEIAS, APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS) E SUSPIROS

Análise das medidas ventilatórias em ar ambiente foi realizada a quantificação do número de apneias, apneias pós-suspiro e suspiros 24h e 7 dias após a cirurgia dos grupos (sham n=12 e isquemia n=14) (Figura 15). Não houve diferença significativa entre os grupos sham e isquemia no número de apneias ($P=0.2507$) (A); número de APS ($P>0.9999$) (B) e no número de suspiros ($P=0.4582$) (C). Os dados foram apresentados como média \pm EPM.

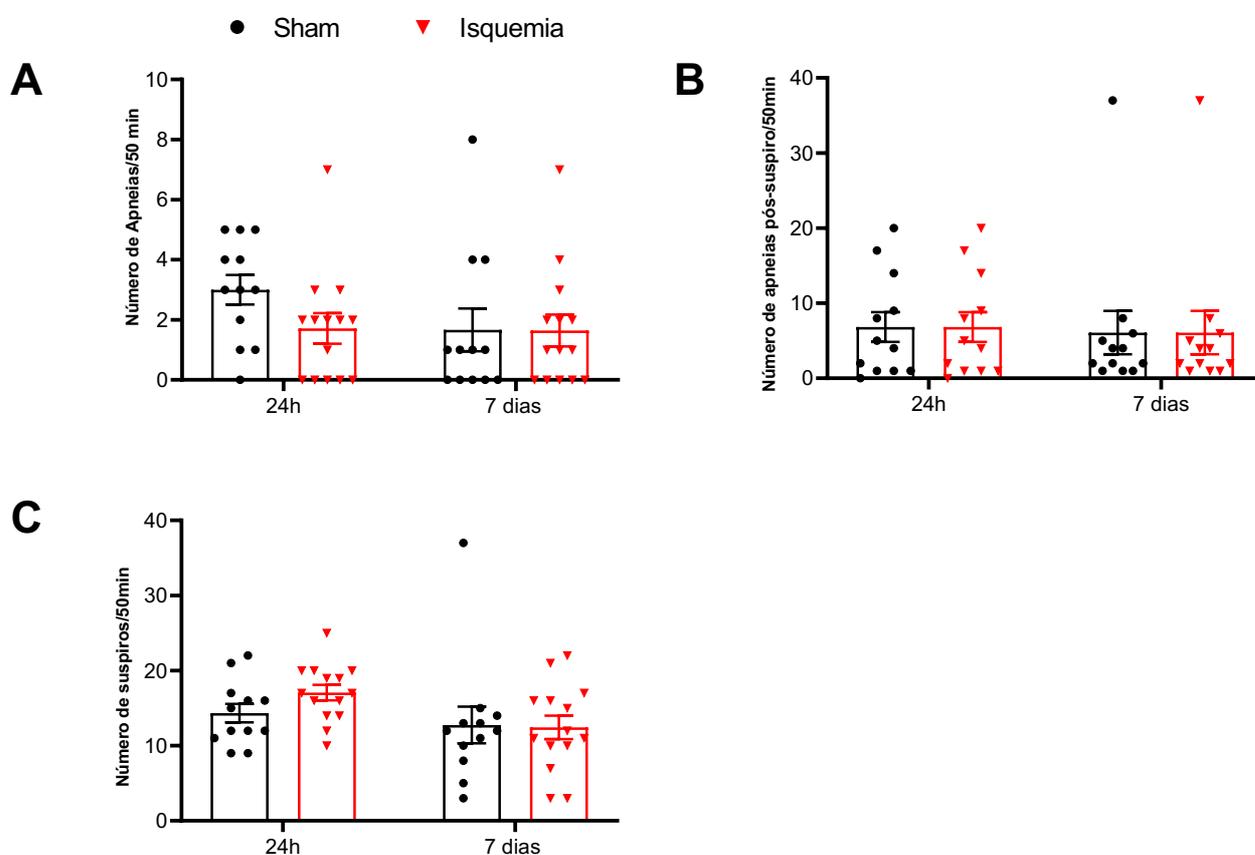


FIGURA 15 – QUANTIFICAÇÃO DE APNEIAS (A), APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS) (B) E SUSPIROS (C).

Quantificação de apneias (A), APS (B) e suspiros (C) dos animais sham (n = 12) e isquemia (n = 14) 24h e 7 dias pós-cirurgia em um registro com duração de 50min. Resultados representados como Média \pm EPM.

5.6 DURAÇÃO DAS APNEIAS E APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS)

A duração das apneias (A) e APS (B) 24h e 7 dias após a cirurgia dos grupos sham (n=12) e isquemia (n=14) também foi quantificada em segundos (Figura 16). Não houve diferença significativa entre os grupos sham e isquemia na duração das apneias ($P=0.3292$) (A) e das APS ($P=0.0500$) (B). Os dados foram apresentados como média \pm EPM (Figura 16).

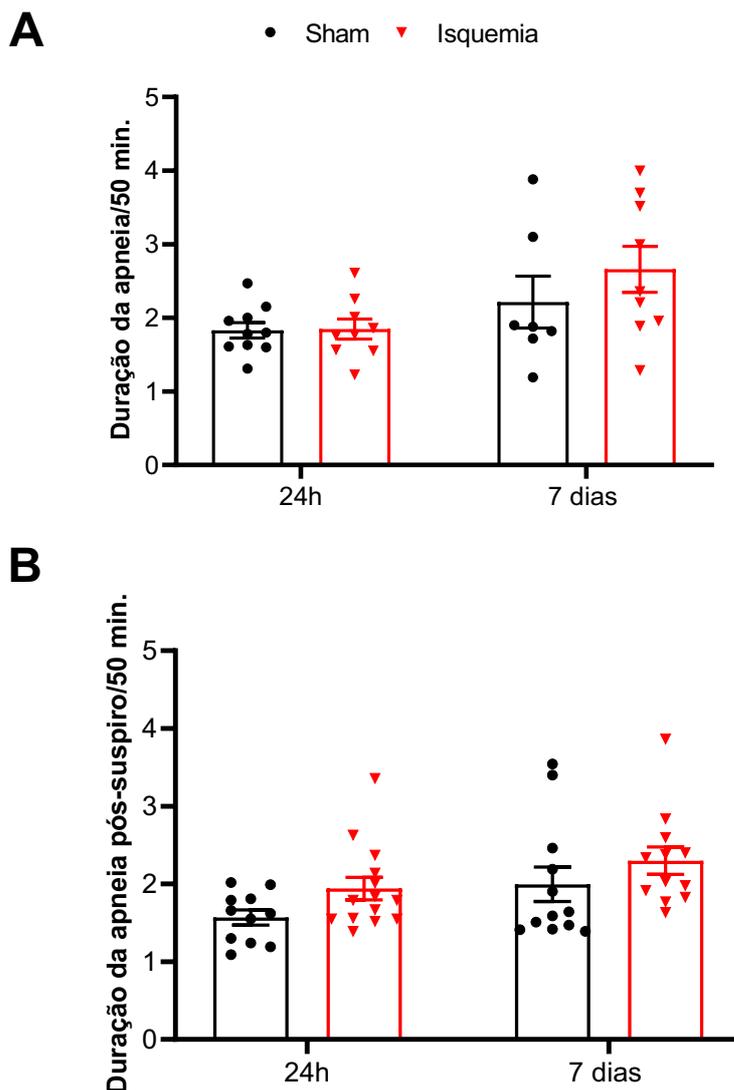


FIGURA 16 – DURAÇÃO DAS APNEIAS E APNEIAS PÓS-SUSPIRO (APS).

Duração das apneias e APS dos animais sham (n = 12) e isquemia (n = 14) 24h e 07 dias pós-cirurgia, durante um registro de 50min. (A) duração da apneia em segundos; (B) duração da APS em segundos. Resultados representados como Média \pm EPM.

5.7 VARIABILIDADE RESPIRATÓRIA (FR)

Os resultados seguintes mostram gráficos de Poincaré da variabilidade respiratória dos animais sham e isquemia 24 h (Figura 17) e 7 dias pós-cirurgia (Figura 18). Os gráficos mostram os valores da variabilidade da duração do ciclo (TTOT) em ar ambiente para animais sham e isquemia (A e B). Os parâmetros SD1 e SD2 foram utilizados para calcular a distribuição dos pontos (C e D).

A isquemia causou um aumento significativo na variabilidade respiratória 24 h pós-cirurgia (SD1 $P=0.0354$ e SD2: $P=0.0187$) (Figura 17) em comparação com o grupo sham. Considerando uma janela temporal maior de 7 dias pós-cirurgia, também foi possível observar um aumento significativo na variabilidade da frequência respiratória do grupo isquemia (SD1 $P=0.0176$ e SD2: $P=0.0187$) (Figura 18) em comparação com o grupo sham.

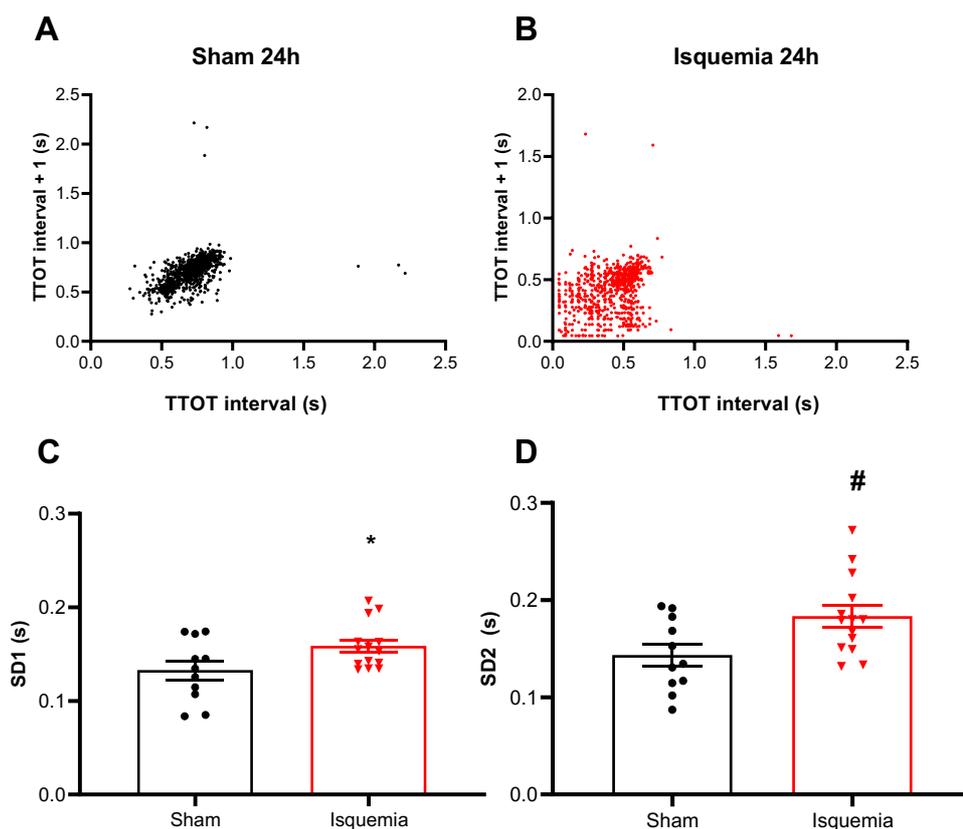


FIGURA 17 – VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA 24H PÓS-CIRURGIA.

Gráficos representativos de plotagem de Poincaré para duração da respiração (TTOT) vs. duração da respiração subsequente (TTOT N+1), durante condições de normóxia dos grupos sham e isquemia. Resultados representados como Média \pm EPM. * grupo isquemia significativamente diferente no SD1; # grupo isquemia significativamente diferente no SD2.

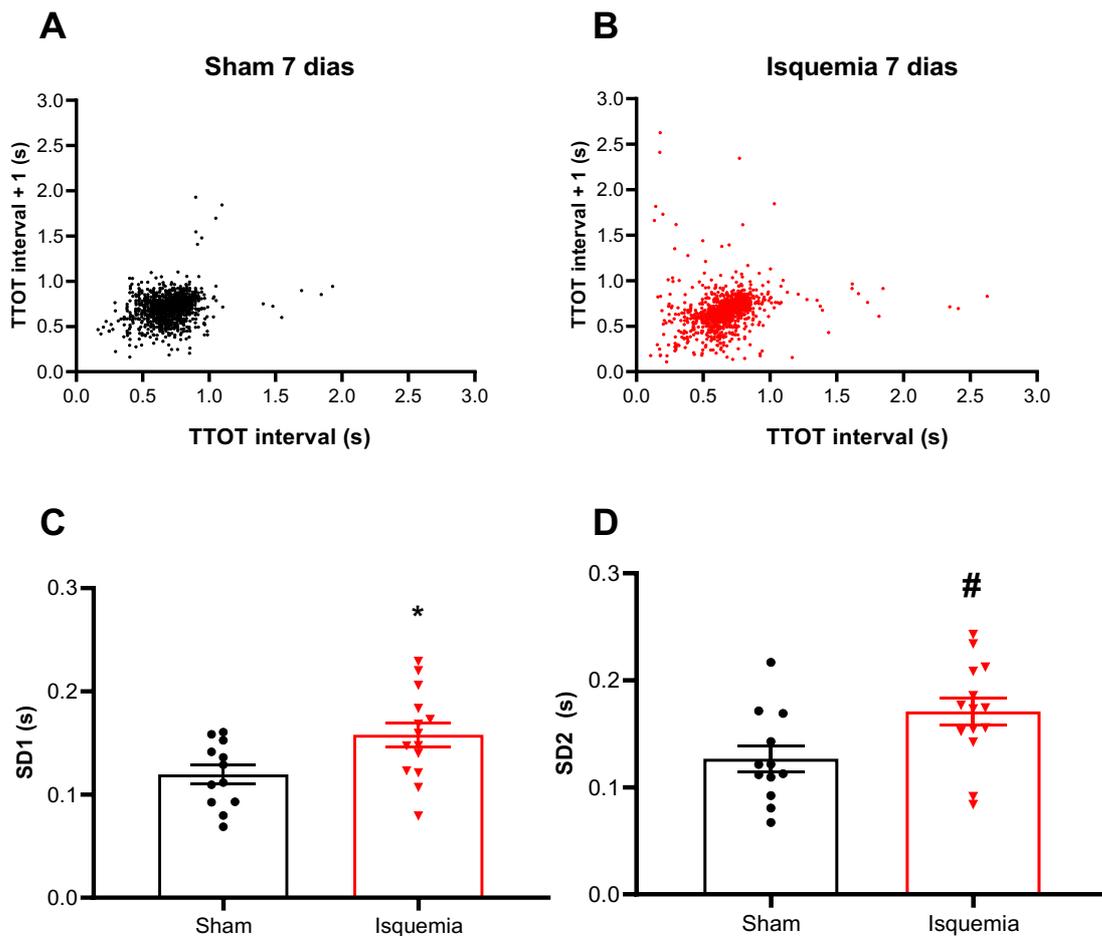


FIGURA 18 – VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA 7 DIAS PÓS-CIRURGIA.

Gráficos representativos de plotagem de Poincaré para duração da respiração (TTOT) vs. duração da respiração subsequente (TTOT N+1), durante condições de normóxia dos grupos sham e isquemia. Resultados representados como Média \pm EPM. * grupo isquemia significativamente diferente no SD1; # grupo isquemia significativamente diferente no SD2.

5.8 ANÁLISE QUALITATIVA DA MARCAÇÃO DE *FLUORO-JADE* NO TRONCO ENCEFÁLICO E ESTRIADO

Para verificar a morte neuronal em regiões do tronco encefálico foi utilizado o corante *Fluoro-Jade*, um fluoróforo para marcação de neurônios em degeneração em tecido *ex-vivo* do sistema nervoso central (SCHMUED; ALBERTSON; SLIKKER, 1997). No tronco encefálico foram avaliadas regiões que contêm grupamentos de neurônios respiratórios envolvidos na geração de ritmo e padrão, bem como quimiorrecepção central, sendo elas: o Núcleo do Trato Solitário (NTS) (Figura 19), Raphe Obscurus (RO) (Figura 20), Raphe Magnus (RM) (Figura 21) e a região rostral

ventrolateral do bulbo (RVLM) (Figura 22), que inclui uma parte do Grupo Respiratório Ventral (VRG) e o RTN.

As regiões citadas anteriormente não apresentaram a marcação com o *Fluoro-Jade* no grupo isquemia (n=05) comparado ao grupo sham (n=05), indicando que não houve morte celular nestas regiões.

Foi possível observar a marcação com o *Fluoro-Jade* no estriado de 01 animal do grupo isquemia (n=3), enquanto que grupo sham (n=03) não apresentou nenhuma marcação, indicando que a técnica cirúrgica de isquemia (BCAo) e a histoquímica funcionaram (Figura 23).

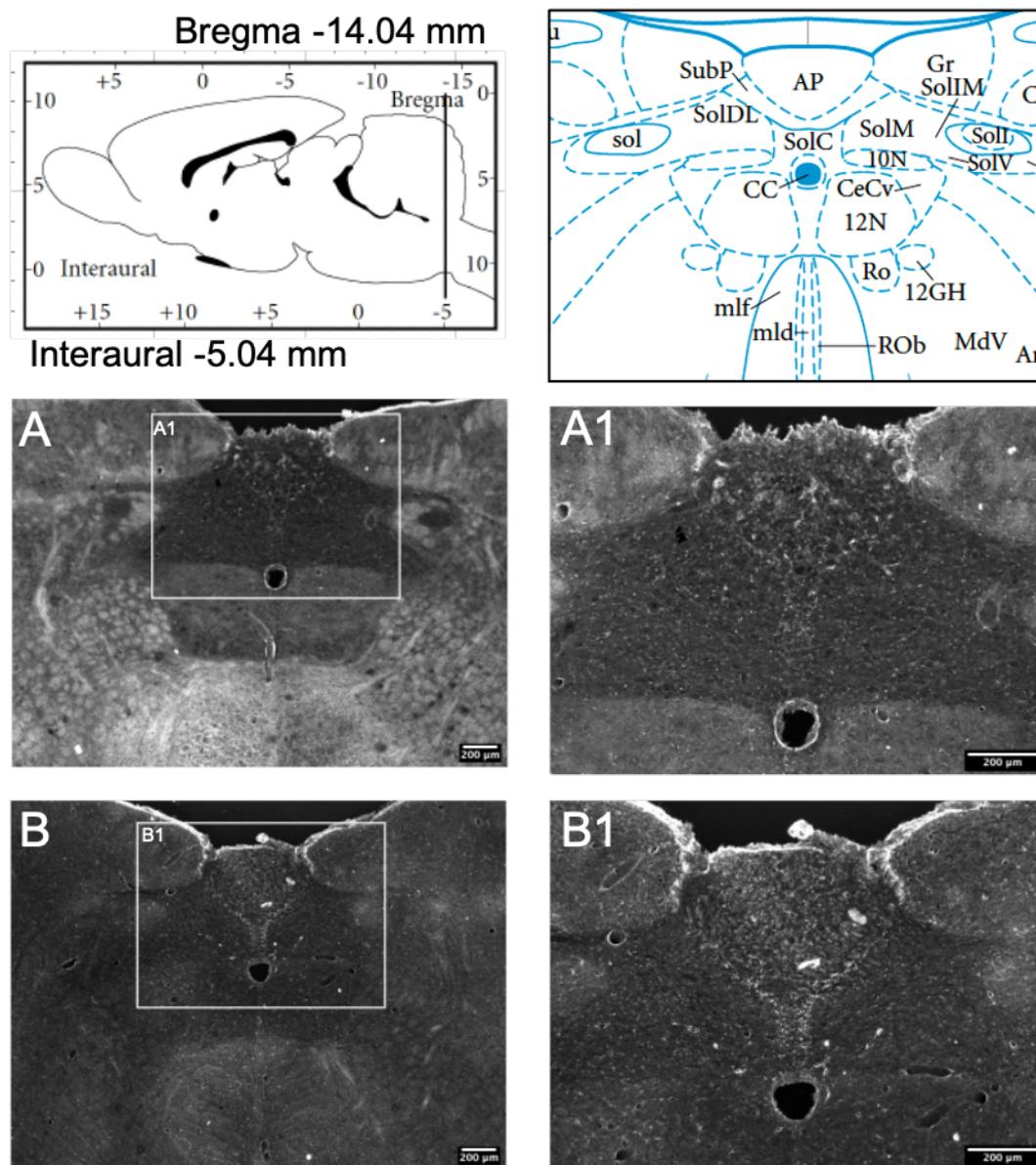


FIGURA 19 – MARCAÇÃO COM *FLUORO-JADE* DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO O NTS.

Representação dos grupos sham (A e A1) e isquemia (B e B1). Imagens representativas de 01 animal do grupo sham (n=05) e 01 animal do grupo isquemia (n=05). Imagens com 200 µm.

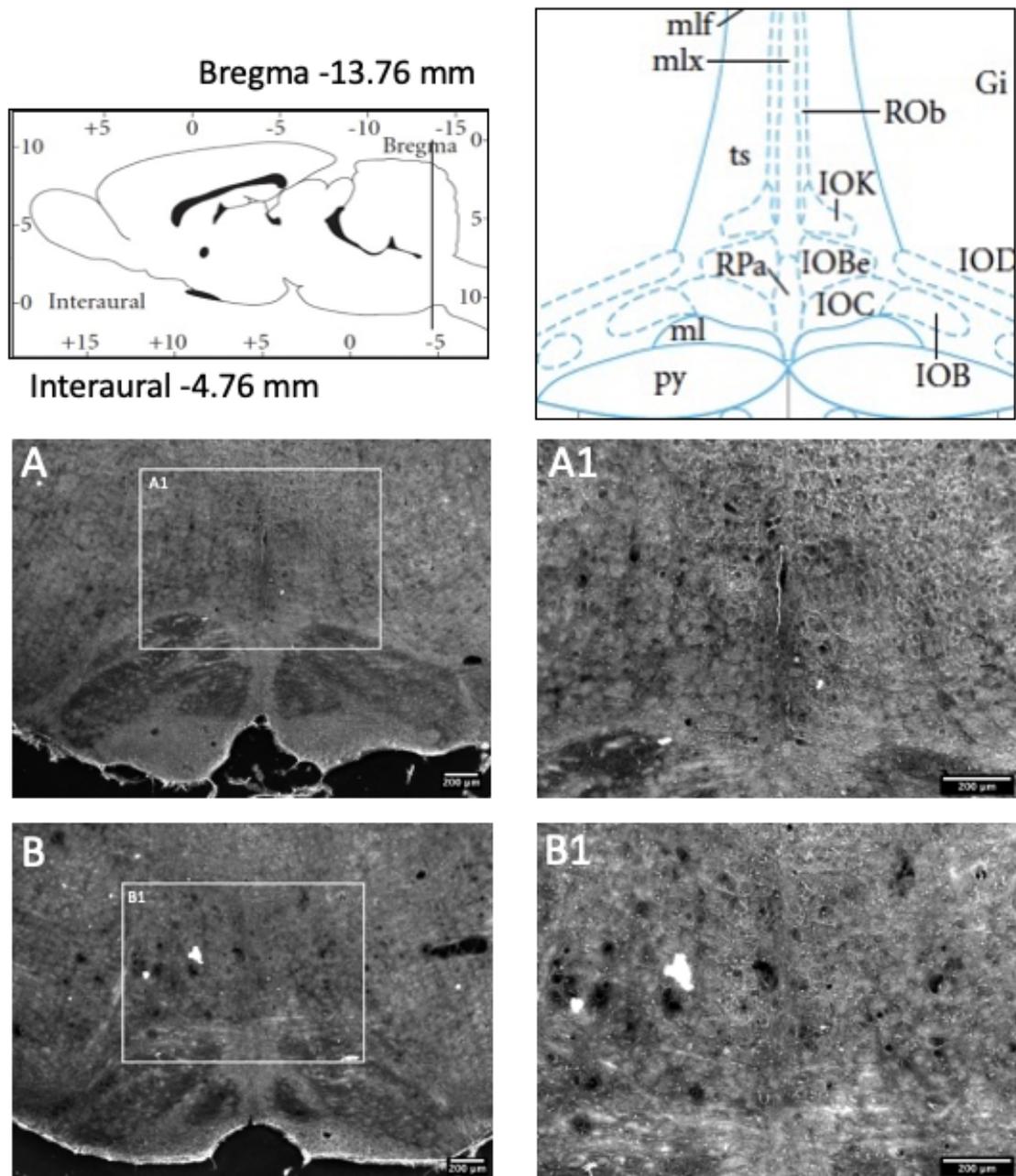


FIGURA 20 – MARCAÇÃO COM *FLUORO-JADE* DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A RAPHE OBSCURUS.

Representação dos grupos sham (A e A1) e isquemia (B e B1). Imagens representativas de 01 animal do grupo sham (n=05) e 01 animal do grupo isquemia (n=05). Imagens com 200 µm.

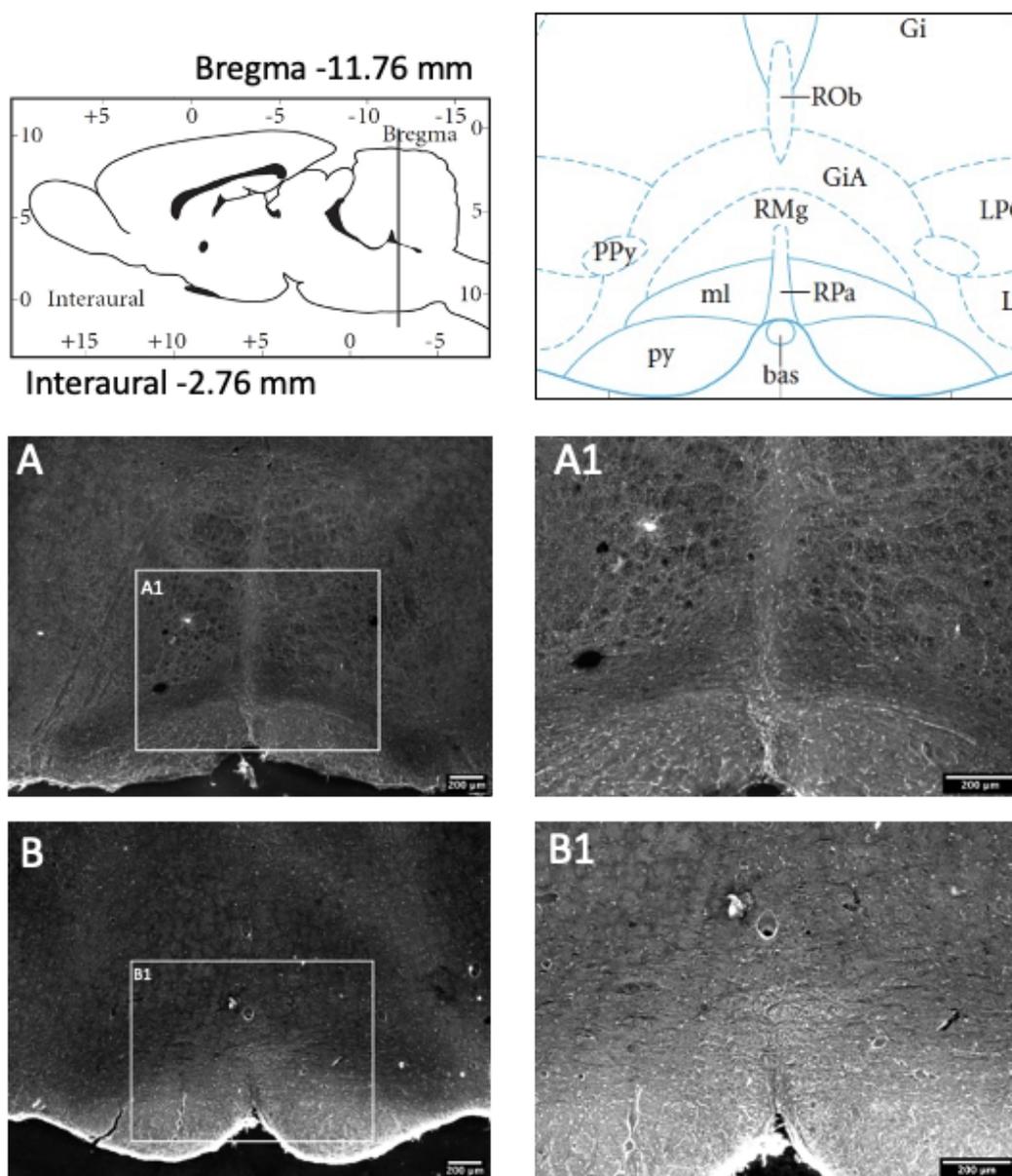


FIGURA 21 – MARCAÇÃO COM FLUORO-JADE DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A RAPHE MAGNUS.

Representação dos grupos sham (A e A1) e isquemia (B e B1). Imagens representativas de 01 animal do grupo sham (n=05) e 01 animal do grupo isquemia (n=05). Imagens com 200 μm.

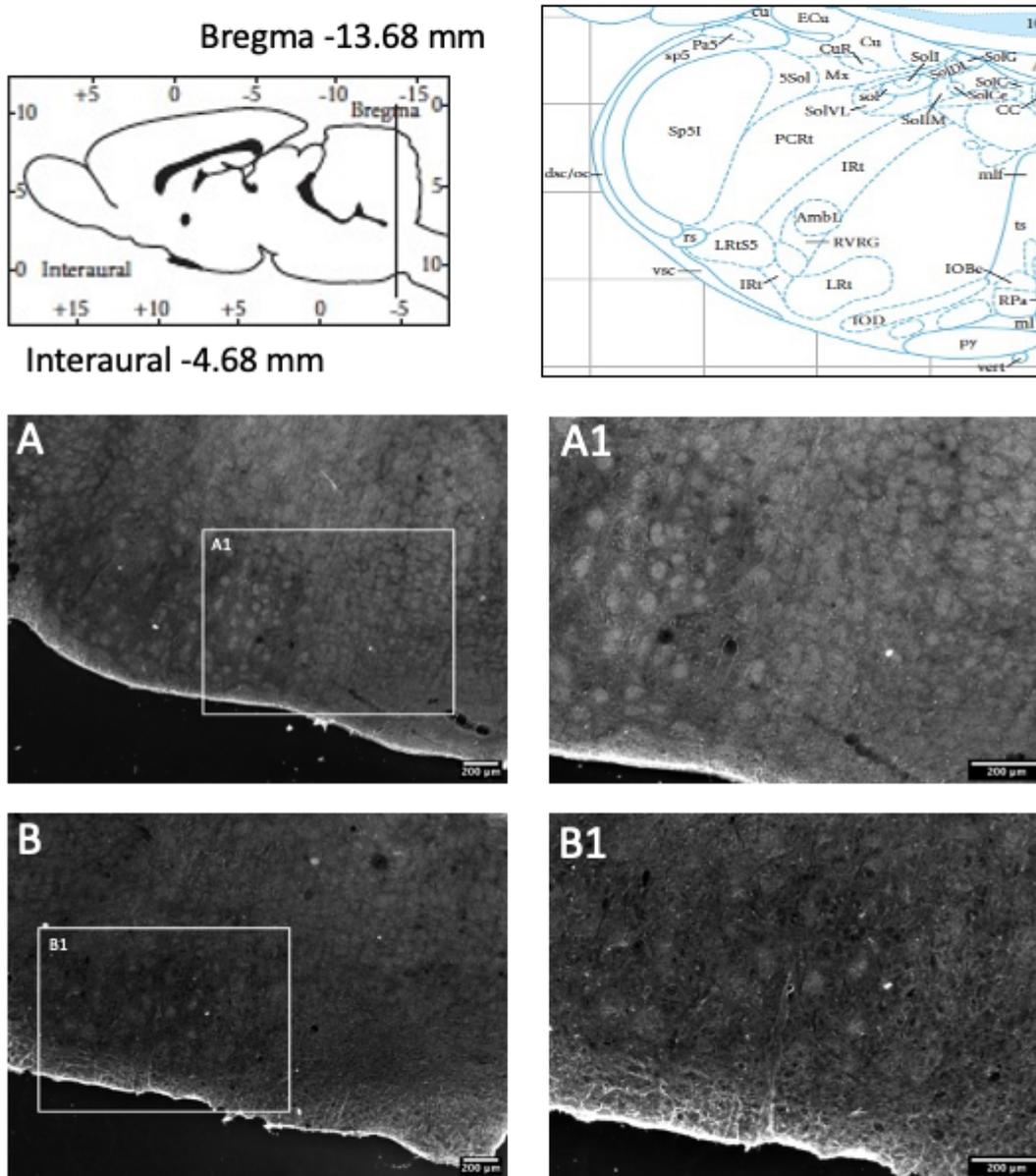


FIGURA 22 – MARCAÇÃO COM FLUORO-JADE DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A REGIÃO ROSTRAL VENTROLATERAL DO BULBO.

Representação dos grupos sham (A e A1) e isquemia (B e B1). Imagens representativas de 01 animal do grupo sham (n=05) e 01 animal do grupo isquemia (n=05). Imagens com 200 µm.

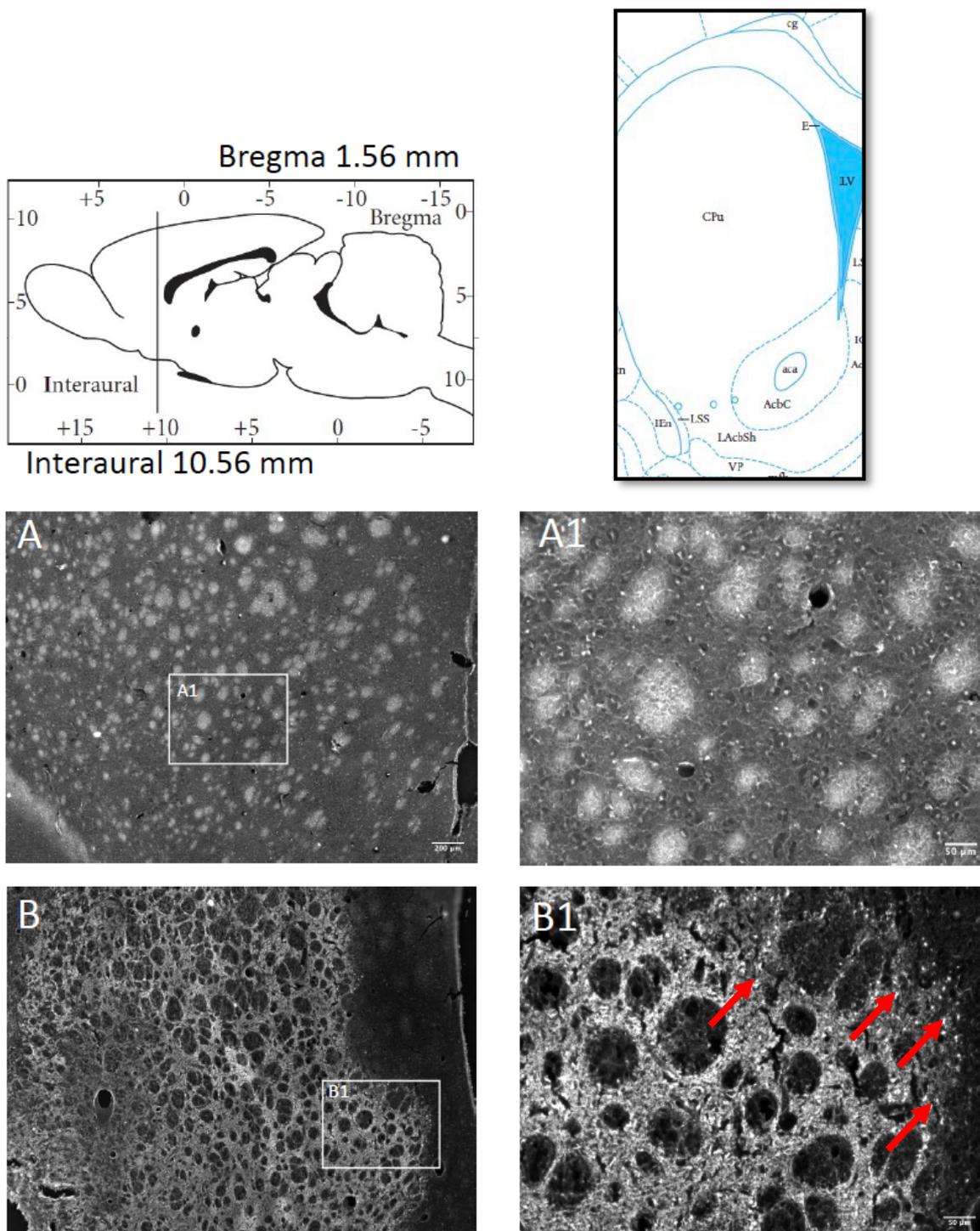


FIGURA 23 – MARCAÇÃO COM FLUORO-JADE DO TRONCO ENCEFÁLICO REPRESENTANDO A REGIÃO DO ESTRIADO.

Representação dos grupos sham (A e A1) e isquemia (B e B1). Imagens representativas de 01 animal do grupo sham (n=03) e 01 animal do grupo isquemia (n=03). Imagens com 200 µm (A e B) e em 50 µm (A1 e B1). Setas indicam morte celular.

“Acreditar que os pontos vão se conectar dará a você a confiança necessária para seguir seu coração.”

- Steve Jobs

No presente estudo avaliamos o impacto do AVE no controle neural da ventilação por meio da pletismografia de corpo inteiro, utilizando os estímulos de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, equilibrada com N₂ de balanço) e hipóxia (10% O₂ e N₂ 90%). Nossos dados sugerem que a cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns (BCAo), considerada como um modelo de isquemia global (TUO; ZOU; LEI, 2021), não foi eficiente para causar morte neuronal nas áreas responsáveis pela quimiorrecepção central, sendo as áreas investigadas: o Núcleo do Trato Solitário (NTS), Raphe Obscurus (RO), Raphe Magnus (RM) e Grupo Respiratório Ventral (VRG), no entanto, o insulto isquêmico pode ter causado danos na circuitaria destes neurônios, uma vez que os dados obtidos mostraram alterações em algumas variáveis respiratórias.

As artérias carótidas comuns (CCA) são artérias que fornecem sangue para a cabeça, face e pescoço. Cada CCA se bifurca em artérias carótidas interna e externa. Após a bifurcação das CCA, as artérias carótidas internas entram no cérebro e fornecem sangue por meio de seus ramos terminais, contribuindo para a formação do Polígono de Willis. A artéria carótida interna se ramifica na artéria cerebral anterior, e esta supre o lobo frontal medial e superiormente. O ramo cerebral médio da carótida interna supre a porção lateral dos lobos frontais e a metade superior dos lobos temporais. O suprimento sanguíneo das artérias cerebrais médias é tão vasto que chega a suprir alguns dos núcleos profundos e a porção anterior dos lobos parietais (NGUYEN; DUONG, 2021). Isto indica que, mesmo utilizando um modelo de isquemia global (BCAo), não esperávamos encontrar morte neuronal no tronco encefálico, mais especificamente no bulbo, já que o suprimento sanguíneo desta região é proveniente da circulação posterior (artérias vertebrais), por meio da artéria basilar.

A marcação de morte neuronal no cérebro dos animais mostra morte neuronal no estriado de 01 animal, sendo que nem todos os animais apresentaram esta lesão. Isso mostra a eficiência do modelo de isquemia global, apesar de alguns animais não apresentarem morte neuronal nesta região. É importante lembrar que, assim como em humanos, cada animal possui suas particularidades fisiológicas que podem interferir nas sequelas apresentadas futuramente. Cirillo e colaboradores citaram que o déficit inicial, o tamanho da lesão, a localização e a natureza da lesão (isquêmica ou hemorrágica), são elementos cruciais que regulam os processos de recuperação pós-AVE (CIRILLO et al., 2020). Não observamos através do score neurológico

diferença significativa entre os grupos sham e isquemia, mostrando que a cirurgia de isquemia causou apenas danos leves nestes animais. Outro fator que indica a recuperação dos animais é o ganho de peso. Ambos os grupos (sham e isquemia) ganharam peso após o procedimento cirúrgico, indicando uma recuperação espontânea. Nos primeiros dias pós-cirurgia, ou seja, na fase aguda, é comum que os animais percam peso devido ao procedimento invasivo realizado na região do pescoço, o que pode prejudicar a deglutição, movimentação da cabeça e mastigação (FARKAS; LUITEN; BARI, 2007). No entanto, com o passar dos dias e com os devidos cuidados pós-operatórios, os animais recuperam o peso inicialmente perdido e conseguem se alimentar de forma independente novamente. Animais do grupo sham, que passaram por todo o procedimento cirúrgico sem a oclusão das CCA, tendem a recuperar o seu peso mais rapidamente, enquanto que os animais BCAo demoram mais tempo (FARKAS et al., 2002). Não observamos isso no nosso trabalho, pois ambos os grupos tiveram uma recuperação similar.

Outro aspecto que avaliamos foi a memória de longa duração. O processo isquêmico tem grande influência na memória do animal, podendo afetar drasticamente a sua capacidade de lembrar algumas tarefas, tais como, reconhecer um novo objeto, por afetar regiões do hipocampo. A cognição envolve uma variedade de funções neurológicas importantes, incluindo memória e emoções. Muitos testes comportamentais foram desenvolvidos para avaliar a memória em animais. Em primatas, como humanos e macacos, o reconhecimento visual é comumente usado para refletir a memória (RUAN; YAO, 2020). No nosso trabalho optamos pelo teste de reconhecimento de objetos, devido à sua ampla utilização em modelos animais de isquemia. Um trabalho de Gulinello e colaboradores mostrou que ratas com isquemia global transitória gastaram significativamente menos tempo de exploração no novo objeto após a lesão em comparação com ratas controle, indicando déficits de memória de trabalho visual de curto prazo após acidente vascular cerebral (GULINELLO et al., 2006). Da mesma forma, esses ratos isquemiados gastaram muito menos tempo de exploração do objeto no novo local após a lesão em comparação com os controles, indicando déficits de memória espacial. Neste estudo não encontramos diferença significativa entre os grupos sham e isquemia no tempo de exploração do novo objeto, o que indica que os animais não apresentaram alterações cognitivas após a isquemia. No estudo citado anteriormente, além da oclusão transitória das CCV, as artérias

vertebrais foram expostas através de uma incisão occipital-suboccipital na linha média e coaguladas com cauterização bipolar entre o primeiro e o segundo corpos vertebrais cervicais. Isto pode ter aumentado a severidade da isquemia nestes animais, conseqüentemente gerando mais sequelas, pois sem o aporte sanguíneo proveniente das artérias vertebrais os animais ficam sem a circulação colateral. Acreditamos que no nosso trabalho, os animais não apresentaram muitas sequelas devido ao fluxo sanguíneo compensado pela circulação cerebral posterior.

Para avaliar a função de força muscular dos animais, realizamos o "*Grip Strength Test*", anteriormente descrito por Bonetto, Andersson e Waning (BONETTO; ANDERSSON; WANING, 2015). É possível encontrar vários trabalhos na literatura que mostraram alterações motoras em ratos pós AVE-isquêmico (SCHAAR; BRENNEMAN; SAVITZ, 2010) (ZVEJNIECE et al., 2012) (DING et al., 2002), no entanto estes trabalhos optaram pelo modelo de oclusão da artéria cerebral média, que mimetiza o AVE isquêmico clínico. Não encontramos diferença significativa entre os grupos sham e isquemia no teste de força média e máxima, indicando que o modelo global de isquemia utilizado (BCAo), pode ter causado apenas uma isquemia leve nos animais. Em roedores, o estriado dorsal pode ser subdividido em regiões dorsolateral (DLS) e dorsomedial (DMS), correspondendo em primatas ao putâmen e núcleo caudado, respectivamente. Acredita-se que o estriado dorsal esteja principalmente envolvido no movimento, particularmente em habilidades finas automatizadas e micro movimentos incorporados em uma ação (CATALDI et al., 2022). Lesões no estriado dorsal produzem deficiências motoras notáveis, dependendo do local e método da lesão, da tarefa comportamental e do que é medido (MINK, 1996). Como citado anteriormente, no nosso trabalho apenas 01 animal apresentou morte neuronal no estriado, no entanto, esta morte não foi suficiente para gerar sequelas motoras.

Para a avaliação das variáveis respiratórias, utilizamos a pletismografia de corpo inteiro, descrita por Mortola e Frappell (MORTOLA; FRAPPELL, 1998). Segundo Greer e Funk, níveis elevados de CO₂ (hipercapnia) causam um aumento na ventilação e este fenômeno está 80% atribuído aos quimiorreceptores centrais. Já a diminuição dos níveis de O₂ (hipóxia) está diretamente ligada aos quimiorreceptores periféricos (GREER; FUNK, 2013). No nosso trabalho, vimos que em ambos os estímulos (hipercapnia e hipóxia), os animais dos grupos sham e isquemia tiveram

um aumento na FR e na VE, sendo consistente com a literatura. No entanto, o grupo isquemia apresentou uma resposta significativamente menor do que o grupo sham, em ambos os estímulos (hipercapnia e hipóxia). O grupo isquemia também apresentou uma variabilidade na FR significativamente maior em comparação ao grupo sham. Acreditamos que no grupo isquemia, isto pode estar relacionado a alguma alteração na capacidade dos quimiorreceptores centrais responderem às alterações na P_{CO_2} , comparado aos animais sham. Entretanto, quando corrigida pelo VO_2 (VE/VO_2), não há diferença nas respostas ventilatórias à hipercapnia e à hipóxia. Como discutimos anteriormente, não encontramos morte neuronal nas áreas responsáveis pela quimiorrecepção central, sendo as áreas investigadas: o Núcleo do Trato Solitário (NTS), Raphe Obscurus (RO), Raphe Magnus (RM) e Região rostral ventrolateral do bulbo, entretanto, acreditamos que a isquemia pode ter causado alguma alteração na circuitaria destes neurônios. A diátese é definida como a perda da funcionalidade em regiões cerebrais distantes da lesão primária, que é causada pela diferenciação dessas regiões, com hipoestimulação consecutiva (CIRILLO et al., 2020). Além disso, uma diminuição substancial do metabolismo celular, que pode ser transitória ou persistente, neste último caso causando lesões secundárias, está presente nessas regiões. Um estudo de Cai e colaboradores, mostrou que um AVE subcortical em humanos reduziu a densidade da substância cinzenta distante do core isquêmico nos pedúnculos cerebrais, substância negra, ponte, cerebelo e tálamo dos pacientes (CAI et al., 2016). Há também estudos na literatura que correlacionam o processo inflamatório gerado pós-AVE com alterações na respiração. Ainda, dano alveolar difuso com edema e inflamação pulmonar foram observados pós-AVE isquêmico agudo em camundongos, associados ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e a uma capacidade fagocitária reduzida de macrófagos pulmonares (SAMARY et al., 2018). Não realizamos a medida de citocinas pró-inflamatórias, mas achamos pertinente considerar esta possibilidade em trabalhos futuros. Vimos que algumas áreas de quimiorrecepção central não apresentaram morte neuronal, como mostrado pela marcação de Fluoro-Jade, no entanto, os neurônios destas regiões podem ter tido alguma alteração no seu metabolismo devido à isquemia global, sendo que posteriormente, o metabolismo foi recuperado pela circulação colateral proveniente das artérias vertebrais.

O AVE pode levar a distúrbios respiratórios do sono, como apneia do sono central ou obstrutiva (ROCHESTER; MOHSENIN, 2002). Na quantificação e duração das apneias, apneias pós-suspiro (APS) e suspiros, não encontramos diferença significativa entre os grupos sham e isquemia na quantidade e duração das apneias, mesmo a apneia sendo um evento comum em pacientes pós-AVE. Isto pode estar relacionado ao fato de o bulbo não ter apresentado morte neuronal e ao fato de a isquemia global ter sido leve para os animais.

Ao que sabemos, este é um dos primeiros estudos que avaliou especificamente o impacto do AVE no controle neural da ventilação. Estes resultados são importantes, pois além de caracterizar o modelo de AVE e controle neural da ventilação, abrirá novos caminhos para a investigação através de outros métodos de indução da isquemia.

“Eu NUNCA desisto. Precisaria estar morto ou completamente incapacitado.”

- Elon Musk

No presente estudo avaliamos o impacto do AVE no controle neural da ventilação por meio da pletismografia de corpo inteiro, utilizando os estímulos de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, equilibrada com N₂ de balanço) e hipóxia (10% O₂ e N₂ 90%). Nossos dados sugerem que a cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns (BCAo), considerada como um modelo de isquemia global, causou uma atenuação da resposta ventilatória dos animais nos estímulos de hipercapnia e hipóxia, sendo que na hipercapnia os animais isquemia apresentaram diferenças significativas na frequência respiratória (FR), na ventilação (VE) e no consumo de O₂ (VO₂). No estímulo de hipóxia, eles apresentaram diferenças significativas na FR e na VE. Este modelo de isquemia não foi eficiente para causar morte celular nas áreas responsáveis pela quimiorrecepção central, sendo as áreas investigadas: o Núcleo do Trato Solitário (NTS), Raphe Obscurus (RO), Raphe Magnus (RM) e Grupo Respiratório Ventral (VRG), no entanto, o insulto isquêmico pode ter causado danos na circuitaria destes neurônios, uma vez que os dados obtidos mostraram alterações em algumas variáveis respiratórias. Mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão destas alterações, o que proporcionará novas descobertas acerca do impacto do AVE no controle neural da ventilação.

“As coisas não precisam mudar o mundo para serem importantes.”

- Steve Jobs

ALAWIEH, A.; ZHAO, J.; FENG, W. Factors affecting post-stroke motor recovery: Implications on neurotherapy after brain injury. **Behavioural Brain Research**, Neuropathological, Cellular and Behavioral Mechanisms in Traumatic Brain injury: Insights on different Animal Models of Neurotrauma. v. 340, p. 94–101, 15 mar. 2018.

AL-QAZZAZ, N. K. et al. Cognitive impairment and memory dysfunction after a stroke diagnosis: a post-stroke memory assessment. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 1677–1691, 2014.

BLISSITT, P. A. Sleep-Disordered Breathing After Stroke. **Stroke**, v. 48, n. 3, p. e81–e84, mar. 2017.

BOEHME, A. K.; ESENWA, C.; ELKIND, M. S. V. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. **Circulation Research**, v. 120, n. 3, p. 472–495, 3 fev. 2017.

BONETTO, A.; ANDERSSON, D. C.; WANING, D. L. Assessment of muscle mass and strength in mice. **BoneKEy Reports**, v. 4, p. 732, 19 ago. 2015.

BRENNAN, M.; PALANISWAMI, M.; KAMEN, P. Do existing measures of Poincaré plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? **IEEE transactions on biomedical engineering**, v. 48, n. 11, p. 1342–1347, nov. 2001.

BRUCH, G. E. et al. Liposomes for drug delivery in stroke. **Brain Research Bulletin**, v. 152, p. 246–256, 1 out. 2019.

CAI, J. et al. Contralateral Cortical Structural Reorganization Contributes to Motor Recovery after Sub-Cortical Stroke: A Longitudinal Voxel-Based Morphometry Study. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, p. 393, 3 ago. 2016.

CATALDI, S. et al. Interpreting the role of the striatum during multiple phases of motor learning. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 8, p. 2263–2281, 2022.

CIRILLO, C. et al. Post-stroke remodeling processes in animal models and humans. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 40, n. 1, p. 3–22, jan. 2020.

DEL NEGRO, C. A.; FUNK, G. D.; FELDMAN, J. L. Breathing matters. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 351–367, jun. 2018.

DEME, S. et al. Effectiveness of Respiratory Muscle Training on Respiratory Muscle Strength, Pulmonary Function, and Respiratory Complications in Stroke Survivors: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease**, v. 12, p. 75–84, 5 abr. 2022.

DING, Y. et al. Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion. **Behavioural Brain Research**, v. 132, n. 1, p. 29–36, 15 abr. 2002.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 9, p. 391–397, set. 1999.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory

in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1 nov. 1988.
 FARKAS, E. et al. Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. **Brain Research**, v. 954, n. 1, p. 32–41, 1 nov. 2002.

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. M.; BARI, F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 1, p. 162–180, 1 abr. 2007.

FRENCH, B. et al. Repetitive task training for improving functional ability after stroke. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, p. CD006073, 14 nov. 2016.

GONZÁLEZ, C.; ROCHER, A.; ZAPATA, P. [Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptative and homeostatic function of the carotid body]. **Revista De Neurologia**, v. 36, n. 3, p. 239–254, 1 fev. 2003.

GRAHAM, S. M.; MCCULLOUGH, L. D.; MURPHY, S. J. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 5, p. 486–496, out. 2004.

GREER, J. J.; FUNK, G. D. Respiration. Em: PFAFF, D. W. (Ed.). **Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical**. New York, NY: Springer, 2013. p. 1423–1462.

GRYSIEWICZ, R. A.; THOMAS, K.; PANDEY, D. K. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. **Neurologic Clinics**, v. 26, n. 4, p. 871–895, vii, nov. 2008.

GULINELLO, M. et al. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. **Hormones and behavior**, v. 49, n. 2, p. 246–260, fev. 2006.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946–961, set. 2015.

HOSSMANN, K. A. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 4, n. 1, p. 23–36, jan. 1994.

IFERGANE, G. et al. Obstructive Sleep Apnea in Acute Stroke: A Role for Systemic Inflammation. **Stroke**, v. 47, n. 5, p. 1207–1212, maio 2016.

KATSURA, K.; KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B. K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 4, p. 991–996, nov. 1994.

KIM, J. S. et al. Inability to control anger or aggression after stroke. **Neurology**, v. 58, n. 7, p. 1106–1108, 9 abr. 2002.

LEIRÃO, I. P. et al. Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3271–3283, 2018.

LIMA, I. N. et al. Acute effects of volume-oriented incentive spirometry on chest wall volumes in patients after a stroke. **Respiratory Care**, v. 59, n. 7, p. 1101–1107, jul. 2014.

LONGA, E. Z. et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, v. 20, n. 1, p. 84–91, jan. 1989.

MARTIN, R. L.; LLOYD, H. G.; COWAN, A. I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 6, p. 251–257, jun. 1994.

MARTINS, S. C. O. et al. Past, present, and future of stroke in middle-income countries: the Brazilian experience. **International Journal of Stroke: Official Journal of the International Stroke Society**, v. 8 Suppl A100, p. 106–111, out. 2013.

MENEZES, K. K. et al. Respiratory muscle training increases respiratory muscle strength and reduces respiratory complications after stroke: a systematic review. **Journal of Physiotherapy**, v. 62, n. 3, p. 138–144, jul. 2016.

MENEZES, K. K. et al. Efficacy of Interventions to Improve Respiratory Function After Stroke. **Respiratory Care**, v. 63, n. 7, p. 920–933, jul. 2018.

MINK, J. W. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. **Progress in Neurobiology**, v. 50, n. 4, p. 381–425, nov. 1996.

MOCHIZUKI, L. et al. The effect of gait training and exercise programs on gait and balance in post-stroke patients. **MedicalExpress**, v. 2, ago. 2015.

MOREIRA, T. S. et al. Central chemoreceptors and neural mechanisms of cardiorespiratory control. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 883–889, set. 2011.

MORTOLA, J. P.; FRAPPELL, P. B. On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, n. 10–11, p. 937–944, nov. 1998.

NATTIE, E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. **Progress in Neurobiology**, v. 59, n. 4, p. 299–331, 1 nov. 1999.

NATTIE, E.; LI, A. Central Chemoreceptors: Locations and Functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221–254, jan. 2012.

NGUYEN, J. D.; DUONG, H. **Anatomy, Head and Neck, Anterior, Common Carotid Arteries**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021.

PAUL, T. et al. **The role of corticospinal and extrapyramidal pathways in motor impairment after stroke**. [s.l.] Neurology, 7 maio 2022. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.05.06.22274684>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

RADISKE, A. et al. BDNF controls object recognition memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, n. Pt A, p. 79–84, jul. 2017.

ROCHESTER, C. L.; MOHSENIN, V. Respiratory complications of stroke. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 23, n. 3, p. 248–260, jun. 2002.

ROSSATO, J. I. et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & Memory**, v. 14, n. 1–2, p. 36–46, 2007.

RUAN, J.; YAO, Y. Behavioral tests in rodent models of stroke. **Brain hemorrhages**, v. 1, n. 4, p. 171–184, dez. 2020.

SAMARY, C. S. et al. Focal ischemic stroke leads to lung injury and reduces alveolar macrophage phagocytic capability in rats. **Critical Care (London, England)**, v. 22, n. 1, p. 249, 5 out. 2018.

SCHAAR, K. L.; BRENNEMAN, M. M.; SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. **Experimental & Translational Stroke Medicine**, v. 2, n. 1, p. 13, dez. 2010.

SCHELLINGER, P. D.; FIEBACH, J. B.; HACKE, W. Imaging-Based Decision Making in Thrombolytic Therapy for Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 34, n. 2, p. 575–583, 1 fev. 2003.

SCHMUED, L. C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Research**, v. 751, n. 1, p. 37–46, 14 mar. 1997.

SHAMSUZZAMAN, A. S. M.; GERSH, B. J.; SOMERS, V. K. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. **JAMA**, v. 290, n. 14, p. 1906–1914, 8 out. 2003.

SIEGLER, J. E. et al. Identification of modifiable and nonmodifiable risk factors for neurologic deterioration after acute ischemic stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases: The Official Journal of National Stroke Association**, v. 22, n. 7, p. e207-213, out. 2013.

SMITH, J. C. et al. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5032, p. 726–729, 1 nov. 1991.

SMITH, M. L. et al. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 69, n. 6, p. 385–401, jun. 1984.

STEVENS, D. et al. Post-Stroke Sleep-Disordered Breathing—Pathophysiology and Therapy Options. **Frontiers in Surgery**, v. 5, p. 9, 26 fev. 2018.

TOSUN, A. et al. Obstructive Sleep Apnea in Ischemic Stroke patients. **Clinics**, v. 63, n. 5, p. 625–630, out. 2008.

TUO, Q.; ZOU, J.; LEI, P. Rodent Models of Vascular Cognitive Impairment. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 5, p. 1–12, maio 2021.

VIRANI, S. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update. **Circulation**, v. 143, n. 8, p. e254–e743, 23 fev. 2021.

ZVEJNIECE, L. et al. The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90- and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 208, n. 2, p. 197–204, 15 jul. 2012.