

C 739936
R 1512951
02/08/02
R# 6,45

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

**AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA AÇÃO DA (+)-
CATEQUINA EM UM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA
CEREBRAL**

Francisco Romero Cabral

Fortaleza
2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TESTE
616.84
C 118a
2001
ex. 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Avaliação eletrofisiológica da ação da (+)-catequina em um modelo animal de isquemia cerebral

Francisco Romero Cabral

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:

Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Co-orientador:

Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale

Fortaleza

2001



C118a Cabral, Francisco Romero

Avaliação eletrofisiológica da ação da (+)-catequina em um modelo animal de isquemia cerebral / Francisco Romero Cabral. – Fortaleza, 2001.

129f: il.

Orientador (a) : Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Curso de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Isquemia cerebral. 2. Catequina. 3.
Eletroencefalografia. I. Título CDD 616.81

**AVALIAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA AÇÃO DA (+)-CATEQUINA EM UM
MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Francisco Romero Cabral

Data da Defesa: 25/05/2001

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
(Orientadora)



Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale



Profa. Dra. Gisela Costa Camarão

**A meus pais,
Manoel Matias Cabral e
Maria Emília Cabral (“in memorian”)**

**que, apesar das dificuldades e diante de sua humildade, souberam
repassar a mim e a meus irmãos padrões de conduta moral e de como
respeitar, sempre, os limites e direitos do próximo,**

dedico, como forma de agradecimento, este trabalho.

**A Professora
Dra. Helena Serra Azul Monteiro,
Orientadora da presente dissertação,**

**Pelos ensinamentos, incentivo e apoio dedicados desde tempos de
estudante de graduação,**

dedico este trabalho com gratidão.

**Ao Professor
Dr. Otoni Cardoso do Vale,
Co-orientador da presente dissertação,**

**pelos ensinamentos que me proporcionou e pelo incentivo que sempre
me trouxe para que ampliasse meus conhecimentos durante o presente
mestrado,**

dedico com eterna gratidão e respeito este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora **Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, orientadora da presente dissertação, pelo incentivo e apoio, desde épocas prévias ao meu ingresso neste mestrado, e pela compreensão durante minhas atividades de pesquisa.

Ao Professor **Dr. Otoni Cardoso do Vale**, co-orientador da presente dissertação, pelos ensinamentos que me proporcionou e pelo incentivo e apoio dedicados a mim, acreditando em meu potencial como pesquisador, para que ampliasse meus conhecimentos durante o presente mestrado.

Ao Professor **Dr. Manassés Claudino Fonteles**, pelos ensinamentos que com espírito científico me proporcionou, desde épocas prévias ainda como bolsista de aperfeiçoamento e pelo incentivo que me trouxe para que ampliasse meus horizontes, e para que pudesse adotar o método científico como base de minha atividade profissional.

À Professora **Dra. Gisela Costa Camarão**, pela receptividade sempre amigável e desprovida de interesses, bem como, pela orientação, quando me faltava vivência e por me proporcionar experiências em outros centros de pesquisa e ampliar meus horizontes no plano científico.

À grande amiga **Epiane Cavalcante Evangelista**, a quem muito devo, pelo apoio, incentivo e interesse em minha qualificação e por acreditar sempre em mim como ser humano amigo e capaz.

A **Bolivar Saldanha Sousa**, pelo apoio, companheirismo e incentivo, que se tornaram sempre presentes em todas as horas mais difíceis deste trabalho, quando achava que já não tinha mais forças para prosseguir diante das tantas dificuldades encontradas.

Aos meus irmãos, que souberam, com respeito, aceitar minha ausência familiar durante o período da realização deste trabalho e pelo incentivo.

Aos amigos **Sandra Valéria e Paulo Roberto Sampaio**, pelo incentivo, respeito e amizade, e, por estarmos tão próximos, ter proporcionado momentos de seu ambiente familiar acolhedor, imprescindíveis a mim, nos dias mais difíceis.

Aos amigos **Marcelo Loyola Muniz, Ney Wagner Freitas Cavalcante e Margareth Mary**, pelo incentivo.

Aos meus ex-professores do departamento de Farmácia, em especial às professoras **Nirla Rodrigues Romero, Angela Ponciano, Maria Eneida Porto Fernandes e Fátima Coutinho**, pelos ensinamentos, que contribuíram muito para que eu pudesse vencer mais essa etapa em busca de minha qualificação profissional.

À **Drª Arlândia Cristina Lima Nobre**, pelo companheirismo e amizade sempre fiel durante todo este mestrado.

Aos amigos da pós-graduação, **Alice Maria Costa Martins, Karina Moreira de Alencar Cunha, Regilane Matos, Aurenívea, Flávia, Laura Andréa, Inácia Simões, Cristiano, Teles, Nilberto** e tantos outros, pelo prazer da convivência proporcionado durante nossa vida acadêmica.

Ao amigo **Dr. Alexandre Havt Bindá**, pela indispensável ajuda e sempre pronto apoio em todos os momentos e pela cumplicidade.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas, em particular **José Amadeus, Joana, Tereza França e Jociê**, que, com paciência, souberam tolerar minha presença constante na Unidade e que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A **Maria Sílvia Helena Freire de França**, por sua imprescindível ajuda nos trabalhos de pesquisa em laboratório.

À mestrandá **Maria Daniele Azevedo Teixeira** e ao estudante de medicina **Samuel Rachid de Vasconcelos**, pela imprescindível ajuda nos trabalhos de pesquisa, sem a qual, certamente, esta dissertação não se concretizaria.

A **Norma de Carvalho Linhares**, pela eficiente ajuda na aquisição do acervo bibliográfico de apoio a este trabalho científico, bem como, pela orientação a mim dispensada durante a descrição das referências bibliográficas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.	xi
LISTA DE FIGURAS.	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xv
LISTA DE TABELAS.	xviii
RESUMO.	xxiv
ABSTRACT.	xxv
1.0 INTRODUÇÃO.	01
1.1 Generalidades.	01
1.2 Eventos hemodinâmicos relacionados à isquemia cerebral.	02
1.3 Os mecanismos da isquemia cerebral.	05
1.3.1 Falha energética.	05
1.3.2 Glutamato, cálcio, radicais livres e mediadores lipídicos.	06
1.4 Fatores vasoativos derivados do endotélio.	08
1.4.1 Óxido nítrico.	08
1.4.2 Prostaciclina.	11
1.4.2.1 Ciclooxigenase	11
1.4.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF).	13
1.4.4 Endotelinas.	15
1.5 Outros fatores vasoativos derivados do endotélio.	16
1.5.1 Espécies reativas do oxigênio.	16
1.5.2 Monóxido de carbono.	17
1.6 Metabolismo cerebral.	18
1.7 Fisiopatologia do acidente vascular cerebral isquêmico.	19
1.8 Tipos histopatológicos de danos cerebrais isquêmicos.	20
1.9 Patogênese da isquemia cerebral global.	20
1.10 Patogênese da isquemia cerebral moderada.	25
1.11 Reprogramação da expressão gênica após isquemia.	27
1.11.1 Mudanças quantitativas na síntese de RNA e de proteínas.	28
1.12 Mecanismos das citocinas neuroprotetoras.	29
1.12.1 Citocinas neuroprotetoras: TNF- α e TGF β .	30
1.13 O papel dos radicais livres e antioxidantes.	31
2.0 OBJETIVOS.	37
2.1 Objetivos gerais.	37
2.2 Objetivos específicos.	38

3.0 MATERIAL E MÉTODOS.	41
3.1 Animais de laboratório utilizados.	41
3.2 Avaliação eletroencefalográfica e eletrocardiográfica.	41
3.3 Procedimento cirúrgico.	44
4.0 RESULTADOS.	50
4.1 Estudo controle com solução salina 0,9%.	50
4.2 Estudo utilizando a dose de 5,0 mg de (+)-catequina.	62
4.3 Estudo utilizando a dose de 2,5 mg de (+)-catequina.	74
4.4 Estudo utilizando a dose de 0,5 mg de (+)-catequina.	87
5.0 DISCUSSÃO.	100
6.0 CONCLUSÃO.	111
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	microgramas
μl	Microlitros
μV	Microvolts
5-HETE	Ácido 5-hidroxi-eicosa-tetraenóico
A1	Região auricular esquerda
A2	Região auricular direita
AA	Ácido araquidônico
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase(s)	Adenosina trifosfatase(s)
BHE	Barreira hemato-encefálica
C	Controle
$\text{Ca}^{++}_{(i)}$	Cálcio citosólico livre
CAT	Catalase
CCDL	Canais de cálcio dependente de ligantes
CCVD	Canais de cálcio voltagem dependentes
CO	Monóxido de Carbono
Conc.	Concentração
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
Cz	Região central mediana
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Esquerdo
E.P.M.	Erro padrão da média
ECE-1	Enzima Conversora de Endotelina-1
ECE-2	Enzima Conversora de Endotelina-2
ECG	Eletrocardiograma
EDCF	Fator Contrátil Derivado do Endotélio
EDHF	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EDRF	Fator Relaxante Derivado do Endotélio
EEG	Eletroencefalograma
EMSA	Equipamentos médicos sociedade anônima
Eq.	Equação
ERO	Espécies reativas de oxigênio

ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
ET _A	Receptor para Endotelina-A
ET _B	Receptor para Endotelina-B
F3	Região frontal esquerda
F4	Região frontal direita
FSC	Fluxo Sangüíneo Cerebral
g	Grama
GMPc	Guanosina 3'5'- monofosfato cíclico
GTP	Trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO-1	Heme-oxigenase-1
HO-2	Heme-oxigenase-2
Hz	Hertz
I	Isquemia (obstrução das artérias carótidas comuns)
kDa	Quilodaltons
Kg	quilograma
L-Arg	L-Arginina
MAO-A	Monoamino-oxidase A
MCA	Artéria Cerebral Média
MEDLINE	Arquivo de dados da Biblioteca Nacional de Medicina referente a trabalhos publicados em periódicos indexados
min ⁻¹	Por minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
n	Número de animais
NA	Noradrenalina
NADH	Adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido
NO	Óxido nítrico
NOO ⁻	peroxinitrito
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NOSn	Sintetase do óxido nítrico neuronal
O ₂ ^{•-}	Superóxido
°C	Graus centígrados
OH [•]	Radical hidroxil
P	Significância estatística
P23	Transdutor para medição da pressão arterial
P3	Região parietal esquerda
P4	Região parietal direita

PAF	Fator de ativação plaquetária (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina)
PE50	Cânula de polietileno
PG	Prostaglandina
PGH	Prostaglandina H
PGI ₂	Prostaglandina I (Prostaciclina)
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
RNA	Ácido Ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
st	Teste t-student
t	Estatístico
T3	Região correspondente à pata dianteira esquerda
T5	Região correspondente à pata dianteira direita
TF3	Teta da região frontal esquerda
TF4	Teta da região frontal direita
TGFβ	Fator de Crescimento Tumoral β
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
TP3	Teta da região parietal esquerda
TP4	Teta da região parietal direita
TXA ₂	Tromboxano A ₂
x	Exato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de relaxamento dependente do endotélio do músculo vascular cerebral.....	13
Figura 2 – Possíveis mecanismos de lesão cerebral isquêmica.....	22
Figura 3 – Mecanismos dos radicais livres e antioxidantes envolvidos na lesão cerebral.....	33
Figura 4 – Estrutura química da (+)-catequina.....	35
Figura 5 – Rato Wistar da linhagem <i>Rattus norvergicos</i>	41
Figura 6 – Sistema para monitorização eletroencefalográfica e eletrocardiográfica.....	42
Figura 7 – Distribuição dos eletrodos na cabeça do animal para monitorização eletrocardiográfica e eletroencefalográfica.....	43
Figura 8 – Procedimento cirúrgico.....	45
Figura 9 – Protocolo experimental.....	46
Figura 10 – Sistema de captação de dados.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Alfa** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana.....56
- Gráfico 2 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Teta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana.....57
- Gráfico 3 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Delta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana.....58
- Gráfico 4 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Beta 1** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana.....59
- Gráfico 5 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Beta 2** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana.....60
- Gráfico 6 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Beta 3** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana.....61
- Gráfico 7 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **delta** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....68
- Gráfico 8 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **teta** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....69

- Gráfico 9 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **alfa** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....70
- Gráfico 10 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₁** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....71
- Gráfico 11 - Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₂** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....72
- Gráfico 12 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₃** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....73
- Gráfico 13 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **2,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **delta** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....80
- Gráfico 14 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **2,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **teta** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....81
- Gráfico 15 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **2,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **alfa** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....82
- Gráfico 16 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **2,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₁** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....83
- Gráfico 17 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **2,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₂** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....84
- Gráfico 18 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **2,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₃** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....85

- Gráfico 19 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **0,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **delta** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....92
- Gráfico 20 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **0,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **teta** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....93
- Gráfico 21 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **0,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **alfa** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....94
- Gráfico 22 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **0,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₁** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....95
- Gráfico 23 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **0,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₂** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....96
- Gráfico 24 – Efeito da isquemia e infusão de solução contendo **0,5mg de (+)-catequina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₃** do EEG de ratos Wistar anestesiados com uretana.....97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01- Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência alfa processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução **Salina 0.9%**).....51
- Tabela 02 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta_1 processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0.9%).....52
- Tabela 03 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta_2 processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0.9%).....52
- Tabela 04 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta_3 processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução **Salina 0.9%**).....53
- Tabela 05 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência delta processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução **Salina 0.9%**).....53
- Tabela 06 – Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência teta processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias

carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução **Salina 0,9%**).....54

Tabela 07 – Média (μV) \pm erro padrão da média (μV) das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do EEG de grupos de animais (n=8): **Isquemia** (obstrução bilateral das carótidas comuns) e **Infusão de Solução Salina 0,9%**.....54

Tabela 08 – Significância (P) relativa à modificação da amplitude dos potenciais do EEG induzida por infusão intracarotídea de Solução Salina em um grupo de oito ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; D significa direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IS), isquemia e infusão intracarotídea esquerda Solução Salina 0,9%; *p < 0,05.....55

Tabela 09 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **alfa** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução de **5mg de (+)-catequina**).....64

Tabela 10 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **beta₁** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução de **5mg de (+)-catequina**).....64

Tabela 11 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **beta₂** processadas do eletroencefalograma de sete ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução de **5mg de (+)-catequina**).....65

Tabela 12 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **beta₃** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos

controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 µl/100g/min de solução de **5mg de (+)-catequina**).....65

Tabela 13 - Amplitudes absolutas médias (µV) da faixa de frequência **delta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 µl/100g/min de solução de **5mg de (+)-catequina**).....66

Tabela 14 - Amplitudes absolutas médias (µV) da faixa de frequência **teta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 µl/100g/min de solução de **5mg de (+)-catequina**).....66

Tabela 15 - **Média (µV) ± erro padrão da média (µV)** das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do EEG de grupos de animais (n=8): **Isquemia** (obstrução bilateral das carótidas comuns) e **Infusão de (+)-catequina** (mesmos animais com infusão intracarotídea de **5mg de (+)-catequina**).....67

Tabela 16 - **Significância (P)** relativa à modificação da amplitude dos potenciais do EEG induzida por infusão intracarotídea de **5mg de (+)-catequina** em um grupo de oito ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; (t) significa estatístico; (x), exato; (st), teste t-Student; D, direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IC), isquemia e infusão intracarotídea esquerda de 5mg de (+)-catequina; (x) e (t) se referem ao teste "Wilcoxon Signed Rank". *p < 0,05.....67

Tabela 17- Amplitudes absolutas médias (µV) do espectro **alfa** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 µl/100g/min, de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....75

- Tabela 18- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta1** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....75
- Tabela 19- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta2** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....76
- Tabela 20- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta3** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....76
- Tabela 21- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **delta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....77
- Tabela 22- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **teta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....77
- Tabela 23 - Média das amplitudes absolutas médias (μV) \pm erro padrão da média (μV) dos espectros de frequência do EEG processados a partir das amplitudes absolutas médias do exame eletrofisiológico de oito animais: **Isquemia** (obstrução das carótidas comuns) e **Infusão de (+)-catequina** (os mesmos

animais com obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea de solução de **2,5mg de (+)-catequina**).....78

Tabela 24 - Nível de significância (P) com relação a aumento da amplitude dos potenciais do eletroencefalograma induzido por infusão intracaotídea esquerda de **(+)-catequina (2,5mg)** em ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; (t) significa estatístico; (x), exato; (st), teste t-Student; D, direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IC), obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea esquerda de 2,5mg de (+)-catequina; (x) e (t) se referem ao teste "Wilcoxon Signed Rank". *p < 0,05.....78

Tabela 25 - Amplitudes absolutas médias (μ V) do espectro **alfa** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 μ l/100g/min, de solução de **0,5mg de (+)-catequina**).....87

Tabela 26 - Amplitudes absolutas médias (μ V) dos espectros **beta1** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 μ l/100g/min, de solução de **0,5mg de (+)-catequina**).....88

Tabela 27 - Amplitudes absolutas médias (μ V) dos espectros **beta2** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 μ l/100g/min, de solução de **0,5mg de (+)-catequina**).....88

Tabela 28 - Amplitudes absolutas médias (μ V) dos espectros **beta3** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea

esquerda, a 15,8 μ l/100g/min, de solução de **0,5mg de (+)-catequina**).....89

Tabela 29 - Amplitudes absolutas médias (μ V) dos espectros **delta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 μ l/100g/min, de solução de **0,5mg de (+)-catequina**).....89

Tabela 30 - Amplitudes absolutas médias (μ V) dos espectros **teta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 μ l/100g/min, de solução de **0,5mg de (+)-catequina**).....90

Tabela 31 - Média das amplitudes absolutas médias (μ V) \pm erro padrão da média (μ V) dos espectros de frequência do EEG processados a partir das amplitudes absolutas médias do exame eletrofisiológico de oito animais: **Isquemia** (obstrução das carótidas comuns) e **Infusão de (+)-catequina** (os mesmos animais com obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea de solução de 0,5mg de (+)-catequina).....90

Tabela 32 - Nível de significância (P) com relação a aumento da amplitude dos potenciais do eletroencefalograma induzido por infusão intracarotídea esquerda de (+)-catequina (0,5mg) em ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; (t) significa estatístico; (x), exato; (st), teste t-Student; D, direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IC), obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea esquerda de 0,5mg de (+)-catequina; (x) e (t) se referem ao teste "Wilcoxon Signed Rank". *p < 0,05.....91

Título: Avaliação eletrofisiológica da ação da (+)-catequina em um modelo animal de isquemia cerebral.

Autor: Francisco Romero Cabral
Dissertação de Mestrado em Farmacologia – UFC, 2001

RESUMO

No presente trabalho, objetivamos demonstrar uma possível atividade citoprotetora de três diferentes doses de (+)-catequina (0,5mg, 2,5mg, e 5mg), a partir do estudo da atividade elétrica cerebral em ratos Wistar. Os animais foram anestesiados com uretana para indução de isquemia por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns. As ondas eletroencefalográficas foram captadas a partir de eletrodos subcutâneos na região frontal esquerda (F3), frontal direita (F4), parietal esquerda (P3), parietal direita (P4), e no vértex (Cz). A análise eletrofisiológica consistiu da avaliação das amplitudes absolutas médias dos vários espectros de frequência (alfa, beta₁, beta₂, beta₃, teta e delta). O estudo da atividade elétrica cerebral foi feito com a utilização de um sistema computadorizado apropriado para a análise eletrofisiológica. Foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência estudados, após a obliteração de ambas as artérias carótidas comuns e infusão de três doses de (+)-catequina. A infusão intracarotídea esquerda da solução com 0,5mg e 2,5mg de (+)-catequina aumentou as amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do EEG de forma não homogênea. No entanto, na dose de 5,0mg de (+)-catequina o aumento das amplitudes absolutas médias foi constante em todos os espectros de frequência estudados. Concluímos que o modelo utilizado é adequado para o estudo de substâncias citoprotetoras no sistema nervoso central de ratos e que a (+)-catequina exerceu um efeito citoprotetor na isquemia cerebral induzida pela oclusão das artérias carótidas comuns de ratos Wistar.

Electrophysiological evaluation of the effects of (+)-catequina, using an animal model of cerebral ischaemia.

ABSTRACT

In the present work we tried to demonstrate a possible citoprotective activity of three different doses of (+)-catechin (0.5, 2.5 and 5.0mg), studying the cerebral electric activity after ischaemia induced by common carotid arteries bilateral obliteration of urethane anaesthetized Wistar rats. The electroencephalographic waves were recorded from subcutaneous electrodes on left frontal (F3), right frontal (F4), left parietal (P3), right parietal (P4) and vertex (Cz) regions. The electrophysiological analysis consisted of the absolute amplitude means evaluation of the several frequency spectra (alpha, beta₁, beta₂, beta₃, theta and delta). An appropriate hardware and software was used to analyze the cerebral electric activity. We verified a significant increase ($p < 0,05$) of the absolute amplitude means of the several spectra frequencies evaluated after obliteration of both common carotid arteries and infusion of the three different doses of (+)-catechin solution. The left intracarotid infusion of 0.5 and 2.5 mg of (+)-catechin in rats caused a non-homogenous increase of the absolute amplitude means of the EEG spectra frequencies. However, the dose of 5.0 mg of (+)-catechin promoted a constant amplification in all of the absolute amplitude means of the EEG spectra frequencies. We concluded that the method used in this work is adequate to study citoprotective substances for the rat central nervous system and that (+)-catechin exerted a citoprotective effect in cerebral ischaemic rats induced by common carotid arteries bilateral obliteration.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

A doença vascular cerebral isquêmica é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo (American Heart Association, 1991). Mais de 80% de todos os acidentes vasculares cerebrais resultam de isquemia (Mohr et al.,1978).

A isquemia cerebral se caracteriza por uma redução no fluxo sanguíneo cerebral de intensidade suficiente para que se processe uma alteração metabólica ou uma lesão cerebral inquestionável. Em última análise, a redução do fluxo sanguíneo cerebral é secundária à obstrução vascular, ao decréscimo suficientemente importante da pressão arterial ou a um aumento de pressão intracraniana, bem como tissular. Assim sendo, a isquemia cerebral pode ser focal ou regional, quando afeta regiões cerebrais restritas (obstrução vascular, por exemplo) e global ou sistêmica (parada cardíaca ou hipovolemia transitória, por exemplo). O aporte de oxigênio e substrato energético é uma exigência constante do tecido cerebral. Segundo Siesjö et al., 1998 a isquemia cerebral começa a se estabelecer, quando há uma redução de, pelo menos, 50% do controle do fluxo sanguíneo cerebral. Quando o fluxo sanguíneo cerebral se reduz, de modo a atingir cifras de 10 a 15 ml/100g por minuto (normal 50-60 ml/100g por minuto), o cérebro sofre privação de seu substrato

energético (glicose) e do aceptor de elétrons da cadeia mitocondrial no curso da fosforilação oxidativa, ou seja, oxigênio (Pulsinelli, 1992). A glicose é o substrato obrigatório utilizado pelo cérebro (Kety, 1957; Edvinsson et al., 1993).

A compreensão crescente dos mecanismos metabólicos e celulares da isquemia cerebral global e focal enseja uma grande possibilidade de potenciais intervenções terapêuticas e de melhor avaliação clínica e pré-clínica. (Pulsinelli, 1992).

1.2 EVENTOS HEMODINÂMICOS RELACIONADOS A ISQUEMIA CEREBRAL

A oclusão das principais artérias cerebrais produz uma imediata redução do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) para áreas do cérebro supridas por artérias específicas. A redução do fluxo não é homogênea em todo território isquêmico, sendo maior no centro, em uma região denominada núcleo isquêmico. A isquemia torna-se progressivamente menos severa quanto mais distante estiver da região do núcleo isquêmico até que o fluxo retorna ao normal em regiões supridas por artérias adjacentes que não foram ocluídas. A região periférica ao território isquêmico no qual a redução do fluxo é menos severa, corresponde a também chamada penumbra isquêmica. A relativa

manutenção da perfusão na região de penumbra isquêmica é resultado do fluxo colateral originário do território não-isquêmico adjacente (Iadecola, 1998). A distribuição regional da redução do fluxo depende da espécie e do modelo de produção de isquemia focal. Em babuínos com oclusão aguda da artéria cerebral média (MCA), assim como em humanos, o núcleo isquêmico está localizado no estriado e no opérculo do córtex cerebral, uma vez que a área de redução do fluxo menos severa (penumbra) envolve a área adjacente ao córtex cerebral (Symon et al., 1974). No rato, a oclusão da artéria cerebral média produz uma maior redução do fluxo no estriado e a penumbra envolve o córtex parietal (Tamura et al., 1981).

Quando a oclusão arterial é liberada, o fluxo sanguíneo cerebral retorna ao território isquêmico. Inicialmente há uma fase de aumento do fluxo (hiperemia pós-isquêmica) que se segue a um longo período de fluxo reduzido atingindo valores pré-isquêmicos (hipoperfusão pós-isquêmica). Hiperemia pós-isquêmica foi atribuída à liberação de metabólitos vasoativos do cérebro isquêmico, assim como por uma diminuição da viscosidade (Hossmann, 1993). Mecanismos neurogênicos vasodilatadores mediados pela inervação trigeminovascular pode também contribuir para a resposta hiperêmica (Macferlane et al., 1991). Pensou-se que a hipoperfusão pós-isquêmica era resultado da depressão metabólica cerebral que segue à isquemia cerebral e da obstrução microvascular (Iadecola, 1998). Durante esse período pós-isquêmico a circulação cerebral está em estado de vasoplegia. Assim, a reatividade cerebrovascular por hipercapnia está deprimida, auto-regulação cerebrovascular prejudicada, e o aumento no fluxo sanguíneo cerebral produzido por ativação funcional está também reduzido (Iadecola, 1998).

O restabelecimento do fluxo sanguíneo cerebral reperfunde somente partes do tecido anteriormente isquêmico. Esse fenômeno de reperfusão incompleta, é chamada de não-refluxo (Ames et al., 1968), que foi atribuído a uma multiplicidade de fatores incluindo o aumento da viscosidade sanguínea, coagulação intravascular, oclusão microvascular provocada por um edema dos astrócitos e das terminações astrocitárias em torno dos capilares cerebrais, aumento da pressão intracraniana, edema do endotélio, formação de microvilosidades endoteliais, hipotensão pós-isquêmica (Hossmann, 1993). O fenômeno de não-refluxo é mais acentuado no final da isquemia ou quando a isquemia está associada à obstrução de veias, resultando em retenção do sangue em microvasos (Hossmann, 1993). A reperfusão incompleta limita a sobrevivência do tecido pós-isquêmico por impedir a restauração completa do fluxo para o território isquêmico. Elevação da pressão arterial, hemodiluição, e controle do equilíbrio ácido-básico no período pós-isquêmico minimizam o fenômeno de não-refluxo e facilita a recuperação funcional do cérebro isquêmico (Hossmann, 1993).

Embora os mecanismos dos danos provocados pela isquemia cerebral não tenham sido claramente determinados, evidências experimentais acumuladas sugerem que a produção de radicais livres seja possivelmente um dos principais fatores envolvidos (Flamm et al., 1978; Siesjö et al., 1989; Siesjö, 1992). Vários trabalhos têm demonstrado que a produção de radicais livres durante a isquemia representa um papel importante no desenvolvimento do dano neuronal (Chan, 1992; Kinouchi et al., 1991; Kitagawa et al., 1990).

1.3 OS MECANISMOS DA ISQUEMIA CEREBRAL

Para melhor compreensão dos mecanismos que norteiam os danos provocados pela isquemia cerebral é necessário rever conceitos adotados há algumas décadas. Na década de 50, o dano provocado pela isquemia cerebral era considerado imediato e irreversível; essa idéia era dominante em termos de consequência patológica. Nas décadas de 70 e 80 percebeu-se que a penumbra isquêmica poderia ser potencialmente protegida da morte neuronal por tratamentos apropriados, desde que instituídos dentro de, no máximo, horas após a indução da isquemia (Iadecola et al., 1998). Mais recentemente evidências acumuladas demonstram que há processos patogênicos que levam horas ou dias após a indução da isquemia para se estabelecerem. Dessa maneira, os mecanismos que levam ao dano cerebral isquêmico são múltiplos e agem em diferentes momentos após a isquemia, dependendo da região do infarto.

1.3.1 Falha Energética.

A interrupção do suprimento sanguíneo para o cérebro resulta em falha energética. Neurônios submetidos à isquemia severa não podem manter gradientes iônicos por falhas na bomba sódio-potássio ATPase e outras bombas iônicas dependentes de energia (Astrup et al., 1977; Hansen, 1985). Falha energética é provavelmente o mecanismo predominante de morte celular no centro isquêmico (Astrup et al., 1977). No entanto, em relação à periferia

do infarto, outros mecanismos iniciados pela indução da isquemia são responsáveis pelos danos teciduais.

1.3.2 Glutamato, Cálcio, Radicais Livres e Mediadores Lipídicos.

Na penumbra isquêmica, onde a redução do fluxo não é suficiente para causar uma falha energética rápida, outros mecanismos patogênicos têm lugar. As alterações celulares determinadas por aminoácidos excitatórios constituem, no conjunto, o fenômeno denominado excitotoxicidade (Hugon et al., 1996). Os danos provocados pela excitotoxicidade do glutamato, por uma sobrecarga de cálcio e por radicais livres são fatores importantes que afetam a sobrevivência dos neurônios da região de penumbra (Choi, 1990). Inicialmente pensava-se que esses mecanismos agiam independentemente. No entanto, evidências recentes sugerem que eles estejam altamente relacionados (Choi, 1990; Siesjö & Bengtsson, 1989). De acordo com evidências iniciais, a isquemia induz liberação de glutamato, ativando receptores do mesmo, o que resulta em acúmulo de cálcio citosólico de origem tanto extracelular quanto intracelular. A despolarização da membrana ativa canais de cálcio dependente de voltagem, amplificando o acúmulo de cálcio. Assim, o aumento do cálcio intracelular é iniciado por uma ampla variedade de processos, muitos deles dependentes do próprio cálcio e que, direta ou indiretamente, contribuem para a morte do neurônio afetado (Choi, 1990).

A elevação da concentração do cálcio intracelular é também responsável pela produção de radicais livres tóxicos. O cálcio induz a ativação de fosfolipase A2 e C, levando a liberação de ácidos graxos livres, incluindo o ácido araquidônico, a partir de fosfolipídios de membrana (Bazan, 1989). As enzimas envolvidas no metabolismo dos ácidos graxos livres, como ciclooxigenases e lipoxigenases, geram espécies reativas do oxigênio que contribuem para o lesão celular (Chan, 1996). Outra enzima que é ativada pela elevação do cálcio intracelular é a sintetase de óxido nítrico neuronal (NOSn). O cálcio induz ativação da NOSn que leva à produção de óxido nítrico (NO), um radical livre que contribui para a morte neuronal (Iadecola, 1997; Samdeni et al., 1997). Os mecanismos de toxicidade do NO inclui reação com superóxido para produzir o potente oxidante peroxinitrito, inibição da produção de energia e indução de defeitos no DNA (Iadecola, 1997). Além da ciclooxigenase, lipoxigenase, e NOS neuronal, outras importantes fontes de radicais livres na isquemia cerebral incluem a via metabólica da xantina oxidase, citocinas ativadoras da micróglia e infiltrado de células polimorfonucleares e mononucleares (Traystman et al., 1991). Como a geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) requer oxigênio, acredita-se que sua contribuição para a lesão esteja aumentada em modelos de isquemia nos quais há algum fluxo residual ou na isquemia temporária seguida de reperfusão (Traystman et al., 1991).

Além de radicais livres, os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como os decorrentes da ação da ciclooxigenase e da lipoxigenase (leucotrienos, prostaglandinas, e tromboxanos) contribuem para o lesão por promover edema cerebral, produzindo vasoconstrição e induzindo agregação

plaquetária (Feuerstein & Miller, 1997; Hsu et al., 1989). Outro produto do metabolismo dos fosfolípidios é o fator ativador de plaquetas (PAF), um potente vasoconstrictor que pode contribuir para uma piora na redução do fluxo sangüíneo na região isquêmica (Yue & Feurstein, 1994; Braquet et al., 1989). PAF pode também agir como um fator de transcrição e induzir inflamação relacionada ao gene COX-2 (Bazan et al., 1994).

1.4 FATORES VASOATIVOS DERIVADOS DO ENDOTÉLIO

1.4.1 Óxido nítrico

A produção e liberação de potentes fatores vasoativos pelo endotélio tem um papel importante na regulação do tono vascular. Talvez, a mais importante dessas substâncias em relação à regulação do tono vascular seja o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), a substância que foi inicialmente descrita por Furchgott & Zawadski (1980) em aorta de coelhos. Várias evidências obtidas em estudos subseqüentes sugerem que o EDRF seja o óxido nítrico (NO) ou um composto a ele relacionado. Embora, inicialmente a produção de óxido nítrico tenha sido primeiramente detectada no endotélio vascular, hoje está claro que a mesma também ocorra em alguns tipos de células com participação de isoenzimas conhecidas como NO sintetases.

O óxido nítrico é um potente dilatador de vasos sangüíneos cerebrais, tanto “in vitro” quanto “in vivo” (Yang et al., 1991). Após ser liberado pelo endotélio, o NO estimula a guanilato ciclase solúvel no músculo liso vascular, resultando em aumento da concentração de guanosina 3’5’-monofosfato cíclico (GMPc) e, portanto, relaxamento deste músculo (Waldman & Murad., 1987).

Óxido nítrico pode ser inativado, sem afetar a guanilato ciclase, por uma reação com o ânion superóxido (Katusic, 1996; Moncada & Higgs, 1995). A reação do óxido nítrico com o ânion superóxido resulta na formação de peroxinitrito (Beckman & Koppenol, 1996), um potente oxidante que pode produzir citotoxicidade, incluindo nitrosilação de proteínas e danos ao DNA (Beckman & Koppenol, 1996; Beckman, 1991). Óxido nítrico reage com o ânion superóxido a uma proporção três vezes maior que a dismutação do ânion superóxido pela superóxido dismutase (Beckman & Koppenol, 1996; Beckman, 1991).

Mesmo que a formação de peroxinitrito (como resultado da interação do NO com o ânion superóxido) tenha o poder de ser citotóxico, a inativação do superóxido pelo óxido nítrico também parece ser protetor sob as mesmas condições, particularmente “in vivo” quando a degradação de produtos é não-tóxica (Billiar, 1995). A formação de peroxinitrito nem sempre é tóxica, visto que, sob algumas condições fisiológicas, peroxinitrito inibe a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos ao endotélio (efeito protetor) sem evidência de lesão celular (Billiar, 1995; Lefer et al., 1997). Dessa maneira, as

conseqüências da interação entre NO e superóxido parecem ser dependentes, em parte, de fatores como proteínas no plasma, tióis reduzidos e da relação entre NO e superóxido (Billiar, 1995). Mesmo que o peroxinitrito possa também causar relaxamento dos vasos sanguíneos, a concentração de peroxinitrito necessária para produzir esses efeitos é de 50 a 1000 vezes maior que a de NO (Beckman & Koppenol, 1996).

O óxido nítrico é produzido a partir da L-arginina (L-Arg) pela ação da NO sintetase. NO pode ativar a guanilato ciclase resultando em aumento da produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O NO pode também reagir rapidamente com o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Peroxinitrito pode formar radical hidroxil (OH^{\bullet}), que produz lesão vascular. Ânion superóxido pode ser formado a partir do metabolismo do ácido araquidônico por ação da ciclooxigenase ou por outras fontes incluindo NADH/NADPH oxidase e leucócitos. O ânion superóxido pode, também, ser formado pela NO sintetase na ausência de L-arginina. Os ânions superóxido são dismutados pela superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é degradado pela catalase (CAT) e glutathione-peroxidase (GSH-Px) no cérebro, produzindo água e oxigênio, ou também, via reação de Haber-Weiss, por ação catalítica do radical hidroxil.

1.4.2 Prostaciclina

Prostaciclina é um metabólito do ácido araquidônico produzido com outras prostaglandinas e tromboxanos por duas enzimas limitadoras de ciclooxigenase (COX), denominadas prostaglandina H (PGH) sintetases (Wu, 1995). A expressão das duas isoformas de ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) é determinada por genes separados (Wu, 1995; Williams & Dubois, 1996). A COX-1 é expressada constitutivamente (em vários níveis) na maioria das células, incluindo endotélio (Smith et al., 1996). Elementos reguladores em algumas regiões podem modular a expressão de COX-1, destacando-se entre eles o estresse de tensão (Wu, 1995).

1.4.2.1 Ciclooxigenase

Ciclooxigenase-2 é uma isoforma induzida que é expressada primariamente em macrófagos, fibroblastos, endotélio e músculo vascular (Smith et al., 1996; Wu, 1995). Embora esta seja caracterizada como uma isoforma induzida (indetectável na maioria dos tecidos de mamíferos sob condições normais), COX-2 é expressada constitutivamente em alguns órgãos incluindo o cérebro (Smith et al., 1996). Alguns estímulos que são responsáveis pela expressão da NO sintetase induzida também estimulam a expressão de COX-2 (Williams & Dubois, 1996; Wu, 1995; Mitchell, et al., 1995). Dentre esses estímulos se incluem lipopolissacarídeos, AMPc, hipoxia, algumas citocinas, fatores de crescimento e hormônios (Breder & Saper,

1996). A expressão de COX-2 está envolvida na inflamação e pode ser a principal fonte de prostaglandinas sob essas condições (Liu et al., 1996). Os níveis de RNA mensageiros para COX-1 e COX-2 aumentam no cérebro em resposta à isquemia (Collaco-Moraes et al., 1996), após administração sistêmica de polissacarídeos (Breder & Saper, 1996), e em resposta a doença viral Borna. A expressão de COX-2 também está aumentada no cérebro por períodos prolongado de tempo após repetidos episódios de depressão alastrante cortical (Caggiano et al., 1996).

Os fatores que regulam o gene que expressa COX e produção de prostaciclina no endotélio cerebral não estão completamente definidos. Vários estímulos, incluindo bradicinina, trombina e A-23187, aumentam a produção de prostaciclina nas artérias cerebrais e culturas de endotélio cerebral (Moore et al., 1998; Xu et al., 1992).

A expressão de COX-2 nos vasos cerebrais pode influenciar o tonus vascular. RNA mensageiro para COX-2 é expressado em microvasos cerebrais em resposta a lipopolissacarídeos (Cao et al., 1995) e interleucina - 1 β (Cao et al., 1996), e interleucina-1 aumenta a produção de prostaciclina no endotélio cerebral (McCarron, 1992). Interleucina-1 promove uma dilatação das arteríolas cerebrais em porcos recém-nascidos; esta é inibida por indometacina (Shibata et al., 1996) e presumivelmente mediada por ativação de COX-2.

1.4.3 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

Além da produção e liberação de NO e prostaciclina, o endotélio pode também induzir relaxamento do músculo vascular subjacente pela liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (Beny e Von der Weid, 1991; Cohen e Vanhoutte, 1995) (fig.1).

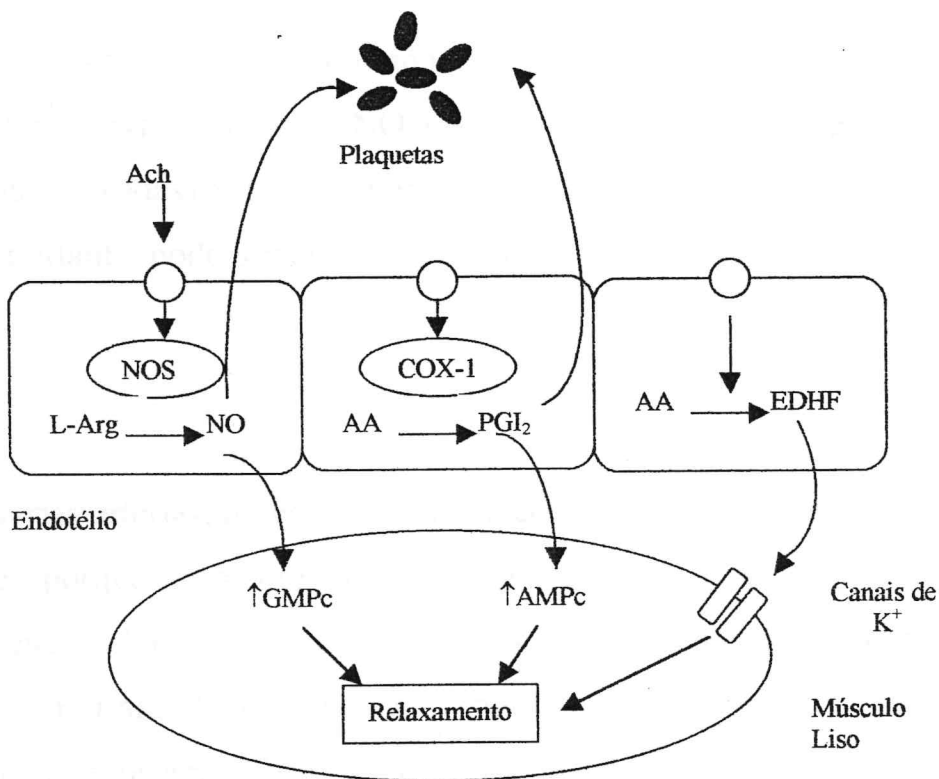


Figura 1 - Alguns mecanismos de relaxamento dependente do endotélio do músculo vascular cerebral.

Nas grandes artérias cerebrais, por exemplo, acetilcolina, substância P, e bradicinina produzem hiperpolarização dependente do endotélio e

relaxamento do músculo vascular (Brayden, 1990; Mombouli et al., 1996), que parece ser mediado, em parte, por um EDHF. Embora EDHF seja mais difícil para se realizar ensaios biológicos que o EDRF, recentes evidências indicam que EDHF é um fator difusível (transferível) que causa relaxamento por hiperpolarização subjacente do músculo vascular (Cohen & Vanhoutte, 1995; Mombouli et al., 1996).

A identidade do EDHF continua sendo objeto de investigação. Em algumas artérias extracranianas, NO (às vezes, somente em concentrações relativamente elevadas) produz hiperpolarização da membrana do músculo vascular e portanto pode funcionar como um EDHF (Cohen & Vanhoutte, 1995).

Em várias artérias, no entanto, parece claro que EDHF não é NO ou um prostanóide, porque inibidores da NO sintetase e COX não atenuam a hiperpolarização dependente do endotélio ou relaxamento do músculo vascular (Chen et al., 1991; Cohen & Vanhoutte, 1995). Grandes evidências, obtidas inicialmente em estudos com vasos sanguíneos coronários, sugerem que o EDHF tem como produto do metabolismo do ácido araquidônico um citocromo P-450 monooxigenase (Bauersachs et al., 1994; Chen & Cheung, 1996). O produto do araquidonato que medeia esses efeitos parece ser o ácido epoxieicosatrienóico. O ácido epoxieicosatrienóico, na forma de ácido 11,12-epoxieicosatrienóico produz hiperpolarização e relaxamento das artérias coronárias in vitro (Campbell et al., 1996).

O ácido epoxieicosatrienóico é produzido no cérebro (Amruthesh et al., 1992; Gebremedhin et al., 1992) e por astrócitos (Alkayed et al., 1996), e um pouco do ácido epoxieicosatrienóico produz relaxamento dos vasos sanguíneos cerebrais (Amruthesh et al., 1992).

1.4.4 Endotelina

Em adição aos fatores relaxantes, o endotélio pode liberar substâncias que produzem contração dos vasos sanguíneos. O fator contrátil derivado do endotélio (EDCF) mais estudado foi a endotelina, um peptídeo originalmente isolado do endotélio aórtico (Yanagisawa et al., 1989). Há três isopeptídeos da endotelina, todos com 21 aminoácidos, que são produtos de genes separados, endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) (Rubanyl & Polokoff, 1994). Todas as endotelinas são sintetizadas como grandes pré-proformas (~ 200 aminoácidos), que são convertidos por endopeptidases a pró-peptídeos (também conhecidos como “endotelinas gigantes”). A pré-proendotelina-1 é clivada a endotelina gigante ET-1, que é por sua vez convertida a ET-1 pela ação da enzima conversora de endotelina (ECE-1 e ECE-2). Dos três isopeptídeos, somente ET-1 é produzido normalmente pelo endotélio (Rubanyl & Polokoff, 1994), e o RNAm para ET-1 pode ser detectado no endotélio cerebral.

Endotelinas são conhecidas por mediar efeitos nos vasos sanguíneos através da ativação de dois receptores, endotelina-A (ET_A) e endotelina-B (ET_B), que foram clonados (Arai et al., 1990; Goto et al., 1996). Em geral, os

receptores ET_A são expressados no músculo vascular e medeiam a contração por endotelina (Gray & Webb, 1996).

A resposta à ativação dos receptores ET_B no tono vascular depende da localização deste receptor. Receptores ET_B são expressados no músculo liso de alguns vasos sanguíneos, onde medeiam a contração. Entretanto, a ativação de receptores ET_B (que são geralmente expressados no endotélio) produz relaxamento dos vasos sanguíneos através da liberação de prostaciclina ou EDRF (Gray & Webb, 1996; Rubanyl & Polokoff, 1994).

Receptores para endotelina-A são expressados geralmente nos vasos sanguíneos cerebrais (Hori et al., 1992); o mecanismo predominante da vasoconstrição em resposta a endotelina nesses vasos se faz pela ativação de receptores ET_A (Adner et al., 1994; Adner et al., 1993).

1.5 OUTROS FATORES VASOATIVOS DERIVADOS DO ENDOTÉLIO.

1.5.1 Espécies Reativas do Oxigênio.

Em adição aos fatores descritos anteriormente, o endotélio cerebral pode produzir várias substâncias vasoativas adicionais incluindo espécies

reativas do oxigênio, monóxido de carbono e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs), além de endotelinas. Espécies reativas do oxigênio são dilatadores de vasos da microcirculação cerebral em várias espécies (Kontos, 1985; Kontos et al., 1985).

Das espécies reativas do oxigênio de potencial importância na isquemia cerebral se incluem radicais superóxido e hidroxil.

1.5.2 Monóxido de Carbono.

Recentes evidências sugerem que o monóxido de carbono pode também funcionar como EDRF em alguns vasos (Zakhary et al., 1996). Monóxido de carbono é produzido da fração heme por ação de duas isoformas de heme oxigenase (HO-1 e HO-2) (Maines, 1993), e HO-2 é expressada constitutivamente no endotélio das artérias cerebrais (Zakhary et al., 1996). O monóxido de carbono (CO) produz relaxamento de alguns vasos sanguíneos, incluindo aorta, mas não produz relaxamento das artérias cerebrais por ação direta (Brian et al., 1994).

1.6 METABOLISMO CEREBRAL

O metabolismo cerebral se caracteriza por um alta atividade e um alto consumo de oxigênio. Um suprimento constante de energia é necessário para manter a função neuronal. Essa energia vital é dependente de processos que incluem o estabelecimento de potenciais de membrana, manutenção de gradientes iônicos transmembrana, transporte através de membranas e síntese de constituintes celulares como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e neurotransmissores. A energia necessária para isso é fornecida em forma de fosfato altamente energético proveniente do trifosfato de adenosina (ATP), que é sintetizado tanto no cérebro, como em outros sistemas orgânicos através da via glicolítica, do ciclo de Krebs (ácido cítrico), e da cadeia respiratória (transporte de elétrons).

Sob condições aeróbicas, glicose é efetivamente metabolizada através da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e da cadeia respiratória para produzir 38 moles de ATP por mol de glicose. Sob condições anaeróbicas, o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória não podem ser ativados (por falta de oxigênio); portanto, o piruvato derivado da glicólise é metabolizado a lactato, produzindo somente 2 moles de ATP por mol de glicose. Outra fonte de fosfato de alta energia é o fosfato de creatina. Este composto é ainda mais abundante que o ATP no cérebro e é usado para regenerar ATP de difosfato de adenosina (ADP), sendo portanto, importante para manutenção dos níveis de ATP nos tecidos. Embora o glicogênio esteja presente e o cérebro seja capaz de sintetizá-lo rapidamente e consumi-lo, o papel do mesmo no metabolismo

cerebral não é completamente conhecido. Os astrócitos armazenam glicogênio e têm como fonte o lactato, o qual pode ser usado pelos neurônios para produzir glicose.

1.7 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO.

A patogênese da lesão cerebral provocada pela oclusão cerebrovascular pode ser separado em dois processos seqüenciais:

- a) eventos vascular e hematológico que causam a redução inicial e subsequente alteração do fluxo sanguíneo cerebral local;
- b) anormalidades na química celular induzidas por isquemia que produzem necrose dos neurônios e de células da glia.

As conseqüências moleculares da isquemia cerebral incluem mudanças na sinalização celular, na transdução de sinal (receptores, canais iônicos, segundos mensageiros, reações de fosforilação), no metabolismo (carboidrato, proteína, ácido graxo, radicais livres) e na regulação e expressão de genes.

1.8 TIPOS HISTOPATOLÓGICOS DE LESÕES CEREBRAIS ISQUÊMICAS

As lesões histopatológicas provocadas pela oclusão cerebrovascular dependem do grau e da duração do fluxo sanguíneo prejudicado. Em sua forma mais suave, a isquemia provoca a destruição, unicamente, de neurônios vulneráveis, como os neurônios piramidais das zonas CA1 e CA4 do hipocampo, ao mesmo tempo em que poupa outros neurônios e todas as células gliais (Brierly., 1976). Embora lesão seja usualmente encontrada após a isquemia global transitória em pacientes que sofreram parada cardíaca, a isquemia cerebral focal breve pode também destruir esses neurônios seletivamente vulneráveis. Uma hora de isquemia focal causa infarto cerebral, que é caracterizado por morte dos neurônios, da glia, e de outras células de suporte antes de afetar o leito vascular (Pulsinelli., 1992).

1.9 PATOGÊNESE DA ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL

Na isquemia cerebral severa persistente, a escassez de fosfato de alta energia é um determinante crucial para lesão, a menos que o fluxo sanguíneo cerebral e o local do tecido para a troca de energia (ATP) sejam restauradas, a necrose é inevitável. Todavia, a falha energética não é a causa imediata de morte celular de vez que: a) todas as células cerebrais toleram a redução dos níveis de ATP por vários minutos e a grande maioria dos neurônios e glia

recuperam completamente quando o fluxo sanguíneo seja restaurado até depois de uma hora de isquemia completa (Hossmann & Kleihues., 1973), b) um ou mais dos mecanismos (figura 2) podem independentemente destruir células cerebrais e c) depois de iniciado, cada mecanismo pode não mais requerer o evento desencadeador. Por exemplo, neurônios hipocâmpais da região CA1 restauram ATP e fosfocreatina a concentrações normais previamente depletadas por isquemia severa transitória, somente sucumbindo dias depois do evento iniciado (Pulsinelli et al., 1982) por não mais requerer depleção de energia (Pulsinelli & Duffy, 1983).

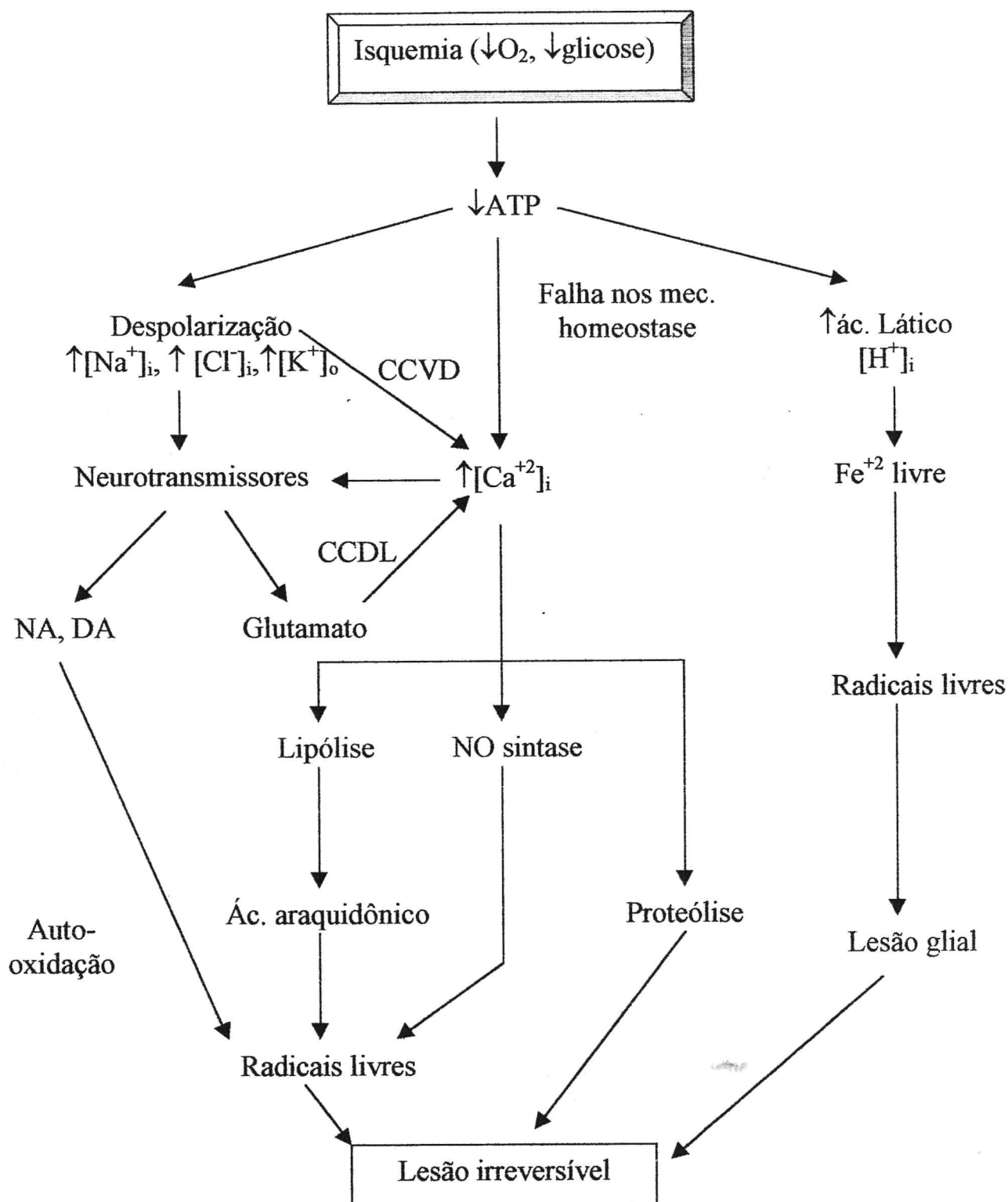


Figura 2 - Possíveis mecanismos de lesão cerebral isquêmica.

CCVD = canais de Ca^{++} voltagem dependente; CCDL = canais de Ca^{++} dependente de ligante; NA = Noradrenalina; DA = Dopamina.

Quando o fluxo sanguíneo cerebral diminui, atingindo valores aproximadamente de 10–15 ml/100g por min. (o normal é de 50–60 ml/100g por min.) em primatas, o cérebro se priva de seu substrato energético (glicose) e do aceptor de elétrons mitocondrial (oxigênio) necessários para o metabolismo oxidativo normal. Dentro de minutos, após o início da isquemia, a demanda energética excede a capacidade de o cérebro sintetizar ATP anaerobicamente a partir de seus escassos estoques de glicose e glicogênio e fosfatos de alta energia (o combustível para sua síntese são depletados). Lactato e íons hidrogênio (H^+) não tamponados se acumulam no tecido na mesma proporção dos estoques de carboidratos presentes no início da isquemia. A toxicidade dos íons hidrogênio, especialmente sua habilidade em depositar íon ferroso mediando formação de radicais livres (Siesjö et al., 1989) pode ser importante na lesão astrogial. O último mecanismo pode parcialmente ser seqüencial ao aumento dos níveis de carboidratos cerebrais antes do início da isquemia. Isto gradativamente aumenta e/ou acelera o infarto em animais submetidos a isquemia severa (Ginsberg, 1990).

Além da rápida mudança do equilíbrio ácido-básico no tecido, há uma falha de todos os mecanismos dependentes de energia, incluindo bombas iônicas, levando a deterioração do gradiente iônico de membrana, abertura de canais iônicos seletivos e não-seletivos e equilíbrio da maioria dos íons intracelulares e extracelulares (despolarização anóxica). Como consequência da despolarização anóxica, íons potássio (K^+) deixam a célula e íons sódio (Na^+), cloro (Cl^-) e cálcio (Ca^{++}) entram na mesma e alguns neurotransmissores, incluindo aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato), são liberados em concentrações potencialmente tóxicas (Obrenovitch et al.,

1990). Uma exceção conhecida desse modelo é a compartimentalização intracelular dos íons hidrogênio em algumas células astrogliais (Kraig & Chesler, 1990). A acidose intracelular seletiva dessas células pode contribuir para sua morte e, conseqüentemente, para o infarto (Plum, 1983).

Em que pese algumas observações experimentais comprovando morte celular secundária a anóxia e sem participação do cálcio, muitos trabalhos envolvendo cultura de neurônios indicam um aumento do cálcio intracelular como desencadeador potencial de muitos processos de lesão (Choid, 1987).

O cálcio ativa fosfolipases, as quais hidrolisam glicerofosfolipídios limitados à membrana em ácidos graxos livres, e estes, por sua vez, facilitam a peroxidação de radicais livres em outros lipídios de membrana. Outros exemplos do potencial papel catalítico do cálcio na lesão celular incluem ativação de proteases que lisam proteínas estruturais (Seubert et al., 1989) e a ativação da NO sintetase (Garthwaite 1991), iniciando mecanismos de produção de radicais livres.

Visto que a concentração extracelular do íon cálcio é de 10^4 a 10^5 vezes maior que sua concentração intracelular e que muitos mecanismos que mantêm esse gradiente são direta ou indiretamente dependentes de energia, perda de ATP rapidamente provoca um influxo, em massa, de cálcio e liberação de cálcio dos compartimentos intracelulares (Siesjö & Bengtsson, 1989). O influxo de cálcio através de canais iônicos, tanto o regulado por

ligante como o regulado por voltagem, contribui para o acúmulo intracelular deste íon. No entanto, a falha de potentes antagonistas de outros tipos de canais em sustar a morte celular no tecido gravemente isquêmico indica que possivelmente outros mecanismos patológicos de liberação de cálcio são até quantitativamente mais importantes, quando se trata de isquemia severa ou que a morte celular em tais regiões pode não ser dependente de cálcio.

1.10 PATOGÊNESE DA ISQUEMIA CEREBRAL MODERADA

Durante a isquemia moderada, em contraste com os eventos catastróficos que ocorrem no tecido gravemente isquêmico, vários mecanismos compensatórios agem em conjunto para manutenção dos gradientes iônicos de membrana e das concentrações de ATP normais e preservação, pelo menos temporariamente, da viabilidade celular. A redução do fluxo sanguíneo cerebral para aproximadamente 50% do valor normal suprime a atividade eletroencefalográfica (EEG isoeletrico) e aumenta apenas ligeiramente a isquemia, inibindo completamente a transmissão sináptica. A redução de síntese de ATP pode se constituir num mecanismo de preservação de níveis energéticos suficientes para restaurar o gradiente iônico de membrana, dissipado durante a atividade sináptica. Logo, a falha de mecanismos dependentes de energia não podem esclarecer nem a supressão nem o “silêncio” do eletroencefalograma durante isquemia moderada. O pequeno aumento observado na condutância do íon potássio na membrana pode hiperpolarizar membranas pré e pós-sinápticas, desse modo reduzindo a

liberação do neurotransmissor e a responsividade dos receptores pós-sinápticos aos neurotransmissores. O mecanismo responsável pelo aumento da condutância do íon potássio pode envolver a modulação de canais de potássio regulados por ATP e/ou regulados por cálcio (Obrenovitch et al., 1990).

Apesar de mecanismos compensatórios sacrificarem a atividade eletrofisiológica para reduzir o consumo de energia e preservar a viabilidade celular, a morte celular acontece se a isquemia moderada perdurar por várias horas. Esporadicamente processos desconhecidos superam a hiperpolarização das membranas, causando breve mas recorrentes episódios de despolarização (despolarização anóxica recorrente), implicando em mudanças iônicas consumo de energia para restaurar seu gradiente iônico. Mecanismos presumíveis, portanto ainda não comprovados destas recorrentes despolarizações envolvem liberação dependente de cálcio de grandes quantidades por neurotransmissores a partir de seus estoques pré-sinápticos (Pulsinelli, 1992).

O desequilíbrio de homeostase do íon causa morte celular, tanto na isquemia cerebral moderada, quanto na isquemia severa. No entanto, a preservação parcial de mecanismos dependentes de energia que continuam a regular as concentrações intracelulares do íon cálcio na isquemia moderada é muito diferente da depleção de ATP e do total colapso da homeostase do cálcio na isquemia severa. O fluxo anormal do cálcio através de canais de membrana regulados por voltagem e regulados por ligantes contribuem enormemente para o aumento do cálcio intracelular na isquemia moderada

liberação do neurotransmissor e a responsividade dos receptores pós-sinápticos aos neurotransmissores. O mecanismo responsável pelo aumento da condutância do íon potássio pode envolver a modulação de canais de potássio regulados por ATP e/ou regulados por cálcio (Obrenovitch et al., 1990).

Apesar de mecanismos compensatórios sacrificarem a atividade eletrofisiológica para reduzir o consumo de energia e preservar a viabilidade celular, a morte celular acontece se a isquemia moderada perdurar por várias horas. Esporadicamente processos desconhecidos superam a hiperpolarização das membranas, causando breve mas recorrentes episódios de despolarização (despolarização anóxica recorrente), implicando em mudanças iônicas consumo de energia para restaurar seu gradiente iônico. Mecanismos presumíveis, portanto ainda não comprovados destas recorrentes despolarizações envolvem liberação dependente de cálcio de grandes quantidades por neurotransmissores a partir de seus estoques pré-sinápticos (Pulsinelli, 1992).

O desequilíbrio de homeostase do íon causa morte celular, tanto na isquemia cerebral moderada, quanto na isquemia severa. No entanto, a preservação parcial de mecanismos dependentes de energia que continuam a regular as concentrações intracelulares do íon cálcio na isquemia moderada é muito diferente da depleção de ATP e do total colapso da homeostase do cálcio na isquemia severa. O fluxo anormal do cálcio através de canais de membrana regulados por voltagem e regulados por ligantes contribuem enormemente para o aumento do cálcio intracelular na isquemia moderada

nas em menor grau na isquemia severa, na qual muitos mecanismos falham ao levar a uma sobrecarga de cálcio (Siesjö & Bengtsson, 1989). Assim, bloqueadores farmacológicos de canais de membrana permeáveis ao cálcio podem reduzir o cálcio intracelular a valores abaixo da concentração tóxica na isquemia moderada mas, não na isquemia severa.

Estudos “in-vivo” e “in-vitro” com canais de membrana pós-sinápticos regulados por voltagem (canal do tipo L) e regulados pelo glutamato indicam que o cálcio que se movimenta através de canais regulados pelo glutamato pode estar mais diretamente envolvido na lesão celular(Choi, 1990).

1.11 REPROGRAMAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA APÓS ISQUEMIA.

As células cerebrais e de outros tecidos respondem às lesões isquêmicas com diversas mudanças na expressão de genes. A distribuição e especificidade celular de cada resposta no cérebro difere consideravelmente após isquemia global e focal e é fortemente dependente da duração e severidade das deficiências no fluxo sanguíneo.

1.11.1 Mudanças Quantitativas na Síntese de RNA e de Proteínas.

O processo bioquímico de transcrição de genes e de transdução de RNAm na proteína depende da viabilidade de ambos os nucleosídeos trifosfatos (adenosina trifosfato, ATP; guanosina trifosfato, GTP), e assim mantém o metabolismo energético. Portanto não é surpresa que experiências em tecidos isquêmicos diminuam a síntese de RNAm e de proteínas durante intervalos de graves deficiências no fluxo sanguíneo (Yoshimine et al., 1987).

Medidas quantitativas da incorporação de aminoácidos na isquemia focal tem estabelecido um fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em torno de 40-60 mL/100g/min para manter a síntese de proteínas no cérebro de ratos (Mies et al., 1991). Há então um importante aumento na taxa de perfusão necessária para manter a produção de ATP (Mies et al., 1991; Xie et al., 1989), demonstrando então que outros fatores que fornecem energia estão envolvidos na regulação da síntese de proteínas após isquemia.

Recentes estudos têm identificado um FSC limiar de 25-30 mL/100g/min para a síntese de RNAm *c-fos* durante isquemia focal, comparado com um limiar de 35-40 mL/100g/min para o acúmulo de proteína *Fos* nos mesmos animais (Kamiya et al., 1995), indicando que a manutenção da atividade transcripcional está intimamente ligada ao metabolismo energético.

A evolução temporal da recuperação da síntese de proteínas e RNAm pós-isquemia foi extensivamente estudado após isquemia global. Em cada modelo, a magnitude da redução do fluxo sanguíneo está portanto abaixo do limiar de falha energética, e profunda deficiência tanto na transcrição quanto na transdução é observado. A síntese de RNA recupera rapidamente na recirculação após isquemia transitória (Matsumoto et al., 1990). Em contraste, a deficiência na síntese de proteínas pode persistir por várias horas de recirculação após isquemia global (Cooper et al., 1977; Dienel et al., 1980; Nowak et al., 1985) ou após oclusão focal transitória (Abe et al., 1988). Além disso, estudos auto-radiográficos demonstraram que a taxa de recuperação da síntese de proteínas reflete a relativa vulnerabilidade de populações individuais de neurônios, com rápida e completa recuperação da atividade transducional em populações de neurônios destinadas a sobreviver, mas com recuperação pequena e incompleta em populações de células como os neurônios CA1 hipocámpais que se perderão (Araki et al., 1990; Dienel et al., 1980; Johansen, 1990).

1.12 MECANISMOS DAS CITOCINAS NEUROPROTETORAS.

Evidências experimentais continuam dando suporte ao envolvimento de fatores inflamatórios e imunológicos na patogênese da lesão cerebral isquêmica.

Perfurações induzidas por isquemia na barreira hemato-encefálica (BHE) permitem a entrada de mediadores inflamatórios humorais como os neutrófilos e macrófagos (Clark et al., 1994; Barone et al., 1992), uma vez que células microgliais residentes do sistema nervoso central são ativadas através da lesão isquêmica (Kim et al., 1995). Essas células tornam-se imunologicamente reativas, participando de uma rápida mas complexa cascata inflamatória envolvendo a liberação de mediadores inflamatórios neuroativos.

1.12.1 Citocinas Neuroprotetoras: Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α) e Fator de Crescimento Tumoral- β (TGF β).

Citocinas são pequenas proteínas solúveis produzidas e secretadas por células imunocompetentes (células T, macrófagos, e micróglia) e não imunocompetentes (neurônios e astrócitos), e têm múltiplos e diferentes efeitos biológicos, dependendo da quantidade liberada e da população de células-alvo.

Estudos têm revelado significantes propriedades neuroprotetoras das famílias de citocinas TNF α e TGF β . TNF α e TGF β são duas pequenas citocinas (17KDa) intimamente relacionadas que são sintetizadas e liberadas por uma variedade de tipos de células, incluindo macrófagos e da micróglia (TNF α), assim como células T ativadas (TNF β).

Em humanos, o TNF α é produzido como um pró-hormônio de 223 aminoácidos que é processado em uma proteína madura secretada (157 aminoácidos) pela clivagem de um peptídeo residual (Pennica et al., 1984). O pró-hormônio precursor está presente nas células como uma proteína transmembrana, normalmente com a sequência madura secretada exposta no lado extracelular, permitindo bioatividade local.

1.13 O PAPEL DOS RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES.

Antioxidantes são componentes de um conjunto de processos que retardam a oxidação de radicais livres *in vivo*. O termo antioxidação inclui todos os processos que reduzem ou param a oxidação de radicais livres. Os processos de antioxidação incluem: 1) remoção de radicais para prevenir sua propagação; 2) hidrólise enzimática de ésteres com o intuito de remover ácidos graxos peroxidados de lipídios; 3) seqüestro de íons de metais de transição e 4) redução de enzimas catalizadas por peróxidos. O processo 1 define como um antioxidante trabalha. Os outros três processos não atuam diretamente sobre as reações dos radicais. Entretanto, eles previnem o acúmulo de moléculas que podem promover reações de radicais livres, ou seja, promovem a geração desses radicais livres, que são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado. Dentre os radicais livres, que apresentam importância biológica, podemos destacar o óxido nítrico, o radical superóxido, oxigênio molecular e o radical hidroperoxil lipídico (Thomas, 2000).

As células devem manter um balanço próprio entre os níveis de radicais livres e antioxidantes para garantir a integridade estrutural de componentes críticos. Quando os níveis de radicais livres excedem os de antioxidantes durante o estresse oxidativo, biomoléculas sensíveis como os lipídios, proteínas e DNA, em particular, podem ser danificadas. Como resultado, numerosas doenças degenerativas crônicas podem se desenvolver (Halliwell, 1994).

Espécies reativas do oxigênio podem ter um papel importante em organismos vivos tais como no sistema de defesa biológica e no metabolismo do ácido araquidônico. Mas, está também aceito seu envolvimento em várias doenças (Harman, 1981), como na inflamação (McCord & Roy, 1982), isquemia (Ikeda & Long, 1990), no câncer relacionado à idade (Ames, 1983) e na arteriosclerose (Steinberg et al., 1989).

Essas espécies reativas do oxigênio (ERO) (ex. peróxido de hidrogênio) e espécies reativas do nitrogênio (ex. peroxinitrito) podem ser especialmente destrutivas quando presentes em excesso. Elas podem causar lesões irreparáveis ao DNA, levando à mutagênese e até ao câncer (Simic, 1988).

Ác. Araquidônico
COX / NADH / NADPH oxidase
leucócitos

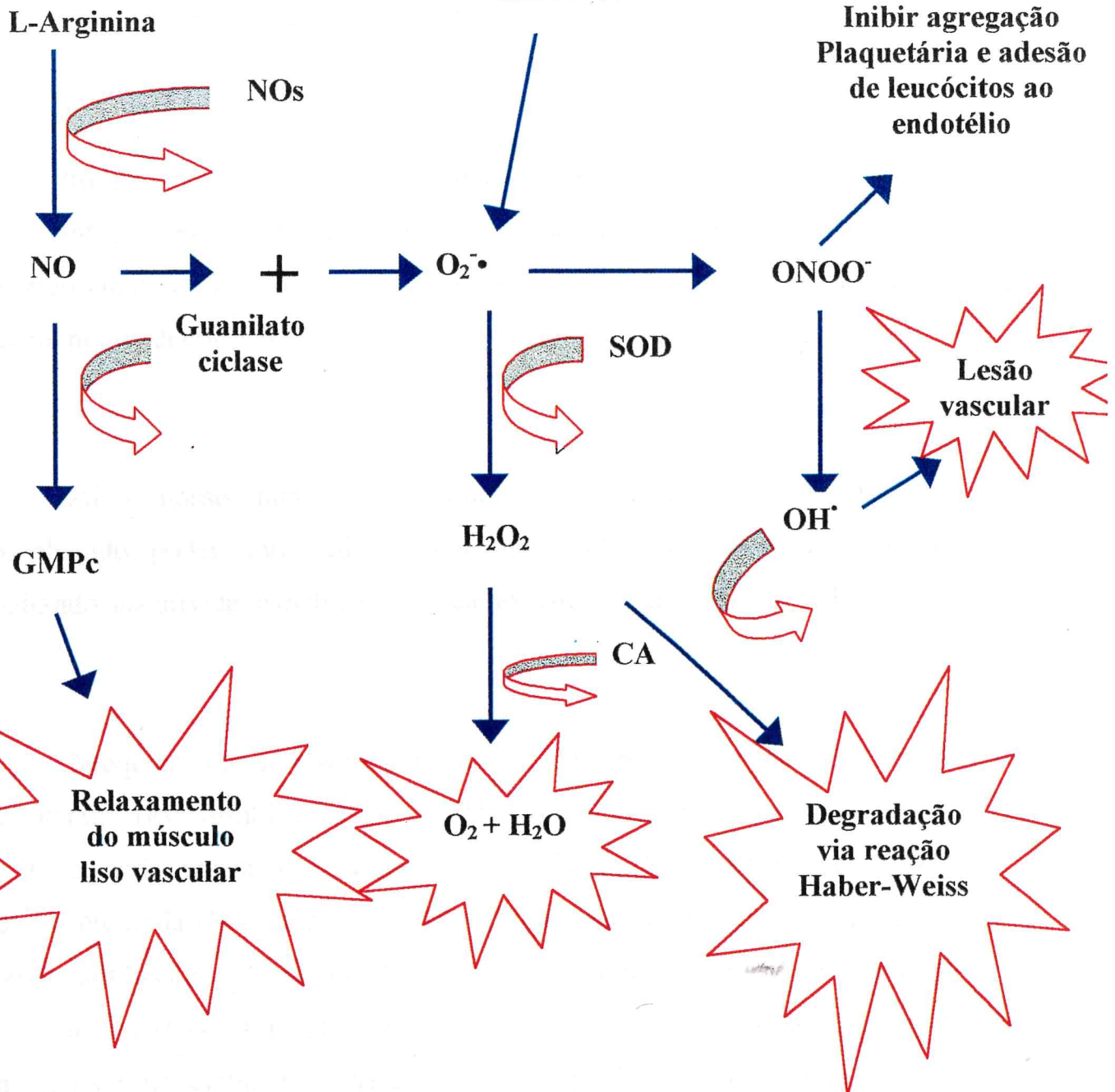


Figura 3 – Mecanismos dos radicais livres e antioxidantes envolvidos na lesão cerebral.

Um potente removedor de espécies reativas do oxigênio pode ser um possível meio preventivo ou tratamento para doenças relacionadas à ERO. Dessa maneira, há profundo interesse em identificar removedores de radicais livres ou antioxidantes que inibam a lesão oxidativa nas células.

Produtos naturais derivados de plantas continuam sendo extremamente importantes como fonte de agentes medicinais e como modelo para desenvolvimento de síntese e semi-síntese de novas substâncias para o tratamento de doenças humanas.

Daí, o nosso interesse em testar (+)-catequina, uma substância de reconhecido poder anti-oxidante, em um modelo de isquemia cerebral, avaliando sua atividade eletrofisiológica no sistema nervoso central de ratos.

Catequinas são derivados poli-hidroxi-flavona-3-ol contidos em extratos de plantas (Matsuzaki & Hara, 1985). A catequina demonstrou possuir múltiplas ações farmacológicas como anticarcinogênica (Freig & Loeb, 1994), ação bactericida (Sakanaka et al., 1989), hipocolesterolêmica (Fukuyo et al., 1986), antidiabética (Chakravarthy, 1982) e inibidora da enzima conversora de angiotensina (Uchida et al., 1987). Outra importante característica da (+)-catequina é sua facilidade de oxidação (Okuda et al., 1983) e efeito removedor de oxigênio reativo (Hatano et al., 1989), o qual depende de grupos poli-hidroxil contidos em suas moléculas.

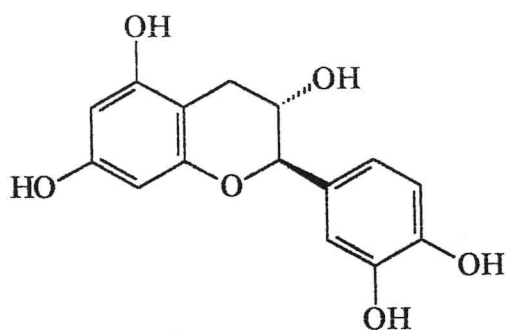


Figura 4 – Estrutura química da (+)-catequina.

Diante de tais evidências, nos propomos usar a (+)catequina em nosso estudo na averiguação de citoproteção ou minimização das lesões causadas pela isquemia cerebral.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Na isquemia cerebral diversas alterações fisiológicas ocorrem em decorrência dos níveis de oxigênio e glicose se encontrarem reduzidos. Essas alterações fisiológicas são passíveis de avaliação por métodos complementares, fornecendo dados importantes a respeito da evolução e prognóstico do processo, e até mesmo permitindo uma avaliação dos mecanismos estruturais e bioquímicos envolvidos no processo de isquemia, proporcionando uma avaliação da ação citoprotetora ou citotóxica de várias substâncias em modelos de isquemia cerebral.

Deste modo, nosso trabalho experimental se propõe a:

- a) Avaliar a possível ação citoprotetora ou citotóxica da (+)-catequina no sistema nervoso central;
- b) Verificar as possíveis alterações eletroencefalográficas em animais experimentais, após administração parenteral da substância.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aqui propomos uma avaliação eletrofisiológica da ação da (+)-Catequina, uma substância já utilizada em diversos trabalhos científicos com reconhecida atividade anti-radicais livres, durante isquemia cerebral em ratos. Assim sendo, em ratos Wistar anestesiados com uretana por via intraperitoneal nosso estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar os possíveis efeitos da (+)-catequina após indução de isquemia cerebral em ratos por obstrução bilateral das artérias carótidas comuns sobre as amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência do eletroencefalograma;

- b) Mensurar as modificações sobre as amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência do eletroencefalograma induzidas por infusão intracarotídea esquerda de solução contendo 0,5mg de (+)-catequina em ratos submetidos previamente a oclusão das artérias carótidas comuns;

- c) Mensurar as modificações sobre as amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência do eletroencefalograma induzidas por infusão intracarotídea esquerda de solução contendo 2,5 mg de (+)-catequina em ratos submetidos previamente a oclusão das artérias carótidas comuns;
- d) Mensurar as modificações sobre as amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência do eletroencefalograma induzidas por infusão intracarotídea esquerda de solução 5,0 mg de (+)-catequina em ratos submetidos previamente a oclusão das artérias carótidas comuns.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE LABORATÓRIO UTILIZADOS.

Foram utilizados ratos Wistar da linhagem *Rattus norvegicus*, machos, em jejum durante vinte e quatro horas prévias, com livre acesso à água e pesando entre 320-480 gramas (peso médio 370 gramas). Durante todo o procedimento experimental, os animais permaneceram anestesiados com uretana por via intraperitoneal (1,5 g/kg de peso).



Figura 5 - Rato Wistar da linhagem *Rattus norvegicus*.

3.2 AVALIAÇÃO ELETROENCEFALOGRÁFICA E ELETROCARDIOGRÁFICA

Para monitorização eletroencefalográfica e eletrocardiográfica, foi usado o sistema EMSA[®], constituído de um painel de eletrodos (pré-

amplificador), amplificadores com as constantes de tempo reajustáveis, conversor analógico-digital com precisão de conversão de 12 bits, e um microcomputador compatível com a marca IBM, além do “software” Braintech[®], para estudo da atividade espectral e da amplitude absoluta média das diversas faixas de frequência do eletroencefalograma (Figura 3). Este programa calcula os componentes de frequência com precisão de 0,35 Hz e utiliza épocas de 2,84 segundos.

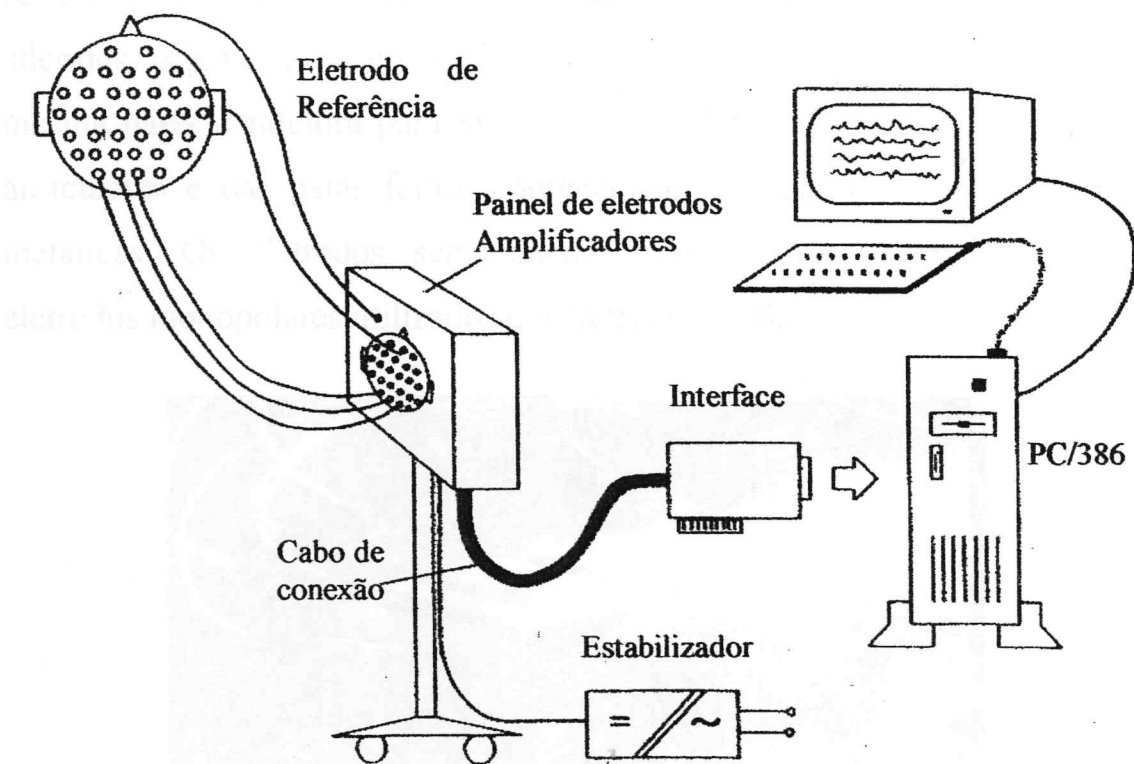


Figura 6 – Sistema para monitorização eletroencefalográfica e eletrocardiográfica constituído de um painel de eletrodos (pré-amplificador), amplificador, conversor analógico-digital, microcomputador compatível com o software Braintech[®].

Foram inseridos eletrodos subcutâneos na região frontal direita (F4), frontal esquerda (F3), ambos inseridos em local correspondente à distância de 4mm posteriores às órbitas de cada lado, parietal direita (P4) e parietal esquerda (P3), ambos inseridos em local correspondente à distância de 10mm posterior à inserção dos eletrodos frontais. Os eletrodos de referência (Cz) e terra foram inseridos na região do náseo, separados entre si por uma distância aproximada de 4mm. Os eletrodos-referência (eletrodos de superfície) A1 e A2 foram aderidos às orelhas esquerda e direita, respectivamente, utilizando-se pastas condutoras especiais. Eletrodos, também de superfície, foram aderidos às patas dianteiras direita e esquerda (T3 e T5) com a utilização da mesma pasta condutora para monitorização eletrocardiográfica. Os eletrodos auriculares e das patas foram confeccionados a partir de pequenas pinças metálicas. Os eletrodos subcutâneos foram confeccionados a partir de eletrodos monopolares utilizados em eletromiografia.



Figura 7 - Distribuição dos eletrodos na cabeça do animal para monitorização eletrocardiográfica e eletroencefalográfica.

Períodos de cerca de três em cada seis minutos de registro da atividade eletrofisiológica (EEG e ECG) foram gravados no disco rígido do microcomputador para posterior análise. Períodos adicionais de registro foram eventualmente gravados, caso algum aspecto de interesse fosse detectado durante a visualização da monitorização.

A análise quantitativa das amplitudes absolutas médias das diversas faixas de frequência eletroencefalográficas foi feita pela escolha de épocas de 2,84 segundos do eletroencefalograma gravado no disco rígido. Épocas contendo artefatos foram rejeitadas. Quinze a quarenta épocas de cada registro por grupo experimental gravado foram escolhidas para o processamento computadorizado das amplitudes absolutas médias regionais de cada faixa de frequência espectral do EEG (delta, teta, alfa, beta₁, beta₂ e beta₃). não se inclui nesta avaliação a atividade eletrocardiográfica captada pelos eletrodos T3 e T4. As seguintes faixas de frequência da atividade eletroencefalográfica foram usadas em nosso estudo: delta (0,35 a 3,87 Hz), teta (4,22 a 7,73 Hz), alfa (8,09 a 12,66 Hz), beta₁ (13,01 a 19,69 Hz), beta₂ (20,84 a 26,02 Hz) e beta₃ (26,37 a 32,70 Hz).

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 320 e 480 gramas, em jejum com livre acesso à água nas vinte e quatro horas prévias. Os animais foram anestesiados com uretana (1,5g/kg de peso) por via

intraperitoneal. O procedimento cirúrgico consistiu sumariamente em uma incisão cervical mediana, após limpeza do campo, com exposição da traquéia e identificação das artérias carótidas comuns. Estas foram obliteradas com fio cirúrgico de algodão. Uma cânula de polietileno (PE 50) foi inserida e fixada no segmento cefálico (distal) da artéria carótida comum esquerda e acoplada a uma bomba de infusão, por meio da qual se realizará a infusão da substância utilizada no estudo experimental a 37°C e a um pH de 7,4; outra cânula semelhante foi inserida no segmento cefálico (distal) da artéria carótida comum direita, conectada a um transdutor de pressão P23 Staham, sendo este, por sua vez, conectado ao fisiógrafo Narco Bio System para registro da pressão intracarotídea ou arterial.

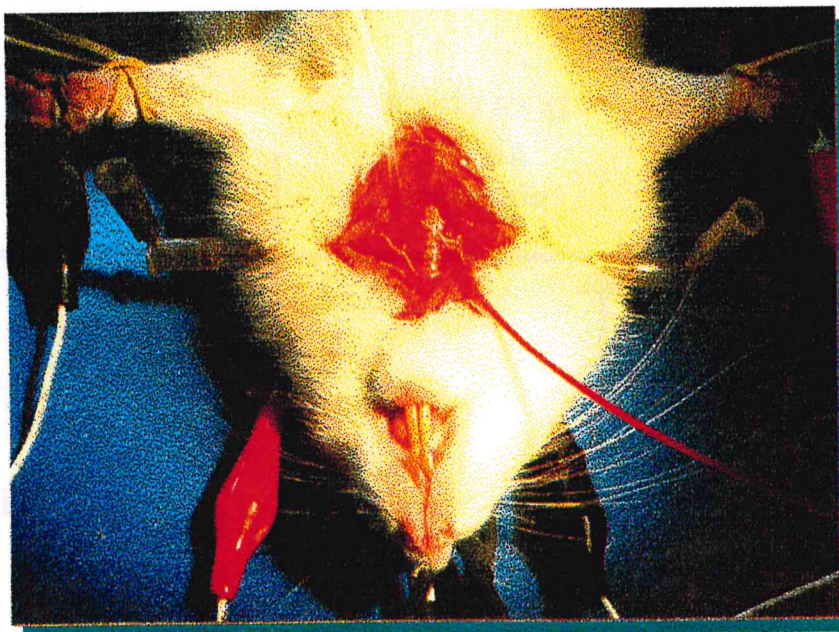


Figura 8 – Procedimento cirúrgico.

Todos os animais foram submetidos a isquemia por obstrução de ambas as artérias carótidas comuns (esquerda e direita) durante 30 minutos. Cada animal foi submetido a exame de eletroencefalograma (EEG) e eletrocardiograma (ECG) durante os trinta minutos subsequentes à isquemia.

Os mesmos animais de cada grupo se submeteram a tratamento com solução contendo respectivamente 0,5mg, 2,5mg e 5,0mg de catequina, a 37°C e pH 7.4. Concomitante à infusão da droga foi realizado outro exame eletroencefalográfico e eletrocardiográfico para que fosse possível a avaliação da atividade eletrofisiológica durante a isquemia e no momento seguinte durante o tratamento.

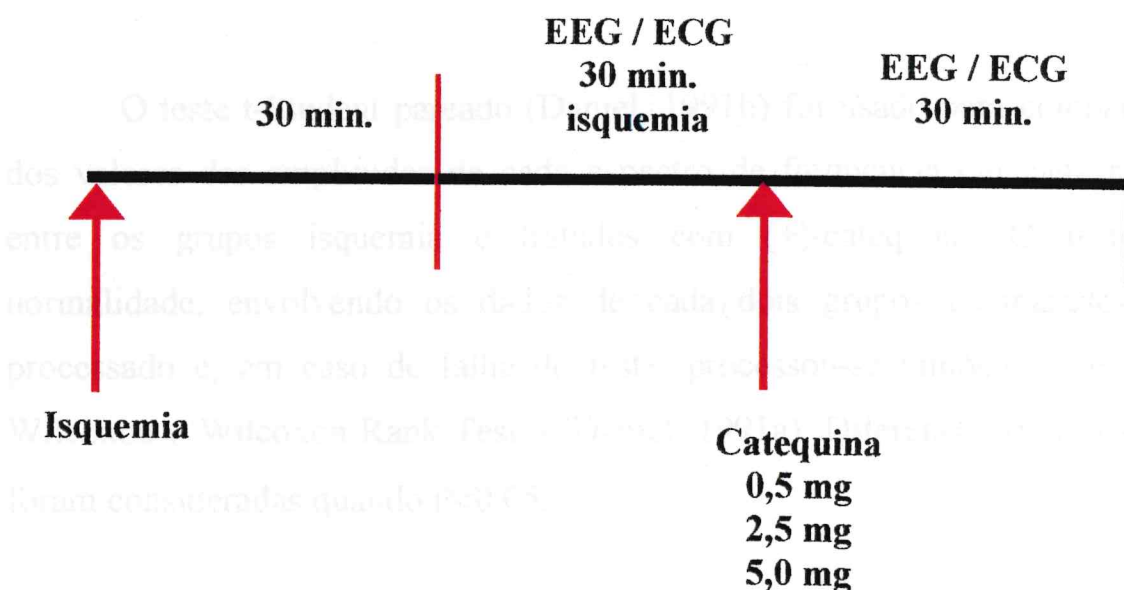


Figura 9 – Protocolo experimental.

Todos os animais foram submetidos a isquemia por obstrução de ambas as artérias carótidas comuns (esquerda e direita) durante 30 minutos. Cada animal foi submetido a exame de eletroencefalograma (EEG) e eletrocardiograma (ECG) durante os trinta minutos subsequentes à isquemia.

Os mesmos animais de cada grupo se submeteram a tratamento com solução contendo respectivamente 0,5mg, 2,5mg e 5,0mg de catequina, a 37°C e pH 7.4. Concomitante à infusão da droga foi realizado outro exame eletroencefalográfico e eletrocardiográfico para que fosse possível a avaliação da atividade eletrofisiológica durante a isquemia e no momento seguinte durante o tratamento.

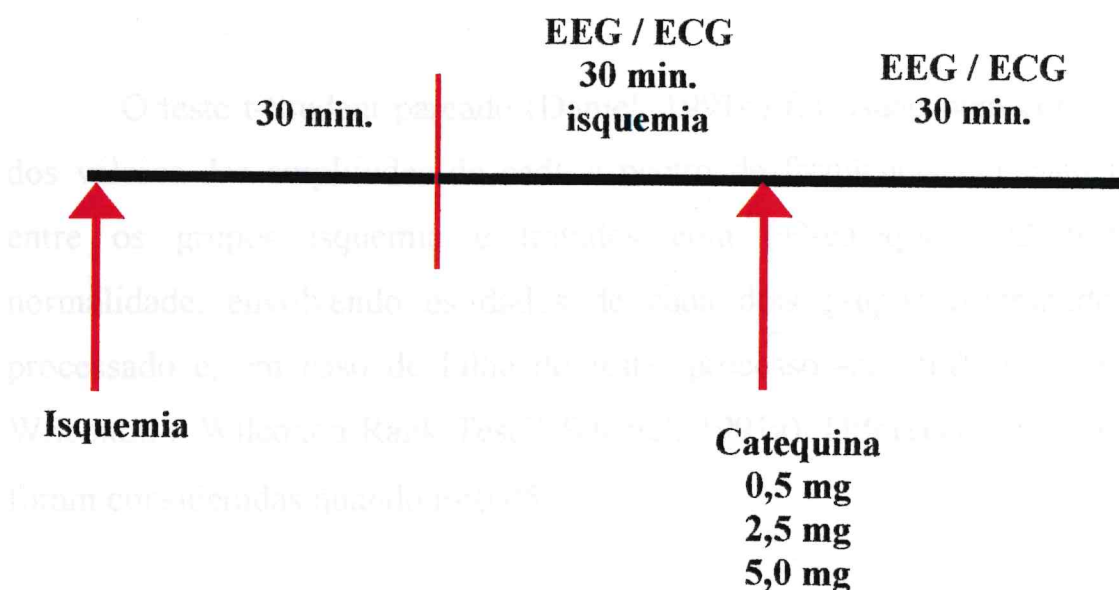


Figura 9 – Protocolo experimental.

Caso a monitorização da pressão intracarotídea ou o registo eletrocardiográfico denotasse instabilidade autonômica (variação importante da pressão ou arritmia cardíaca), o animal era eliminado da análise. Os animais foram sacrificados com dose letal de uretana após o término do experimento.

A análise das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência do eletroencefalograma foi realizado a partir da escolha aleatória de 15 a 40 épocas, de 2,84 segundos, do registo, conforme descrito no item 3.2.

O teste t-Student pareado (Daniel, 1991b) foi usado para comparação dos valores das amplitudes de cada espectro de frequência em cada região entre os grupos isquemia e tratados com (+)-catequina. O teste de normalidade, envolvendo os dados de cada dois grupos comparados, foi processado e, em caso de falha do teste, processou-se também o teste de Wilcoxon (“Wilcoxon Rank Test”) (Daniel, 1991a). Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

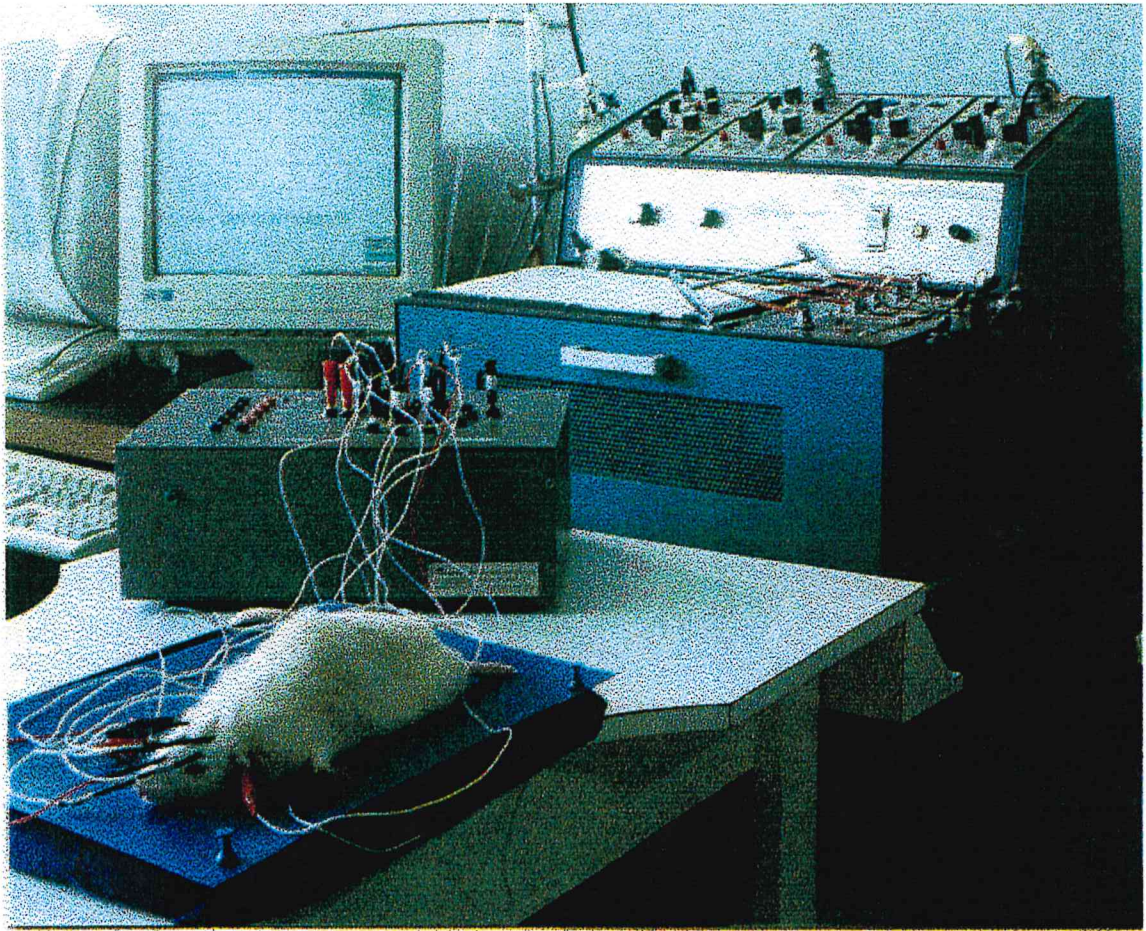


Figura 10 – Sistema de captação de dados.

RESULTADOS

1. RESULTADOS

1.1 Ação da solução salina 0,9% em infusão intracarotídea esquerda a 15,8 μ l/100g/min, durante trinta minutos, sobre as amplitudes absolutas médias dos espectros eletroencefalográficos de ratos com oclusão das artérias carótidas comuns.

As tabelas 1 a 6 demonstram os valores das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma (alfa, beta₁, beta₂, beta₃, delta e teta) obtidos a partir de sua avaliação quantitativa no grupo controle (ratos anestesiados com isquemia induzida por obstrução das artérias carótidas comuns) e no grupo tratado (mesmos ratos, nos quais se promoveu infusão intracarotídea esquerda de solução salina 0,9%). A tabela 7 demonstra os valores das médias das amplitudes médias absolutas \pm erro padrão da média, e a tabela 8 demonstra os valores de P.

No presente estudo foram utilizados oito ratos, com o intuito de avaliarmos a possível interferência da solução diluente (solução salina 0,9%) utilizada na preparação da droga testada, (+)-Catequina. As médias das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de ondas do eletroencefalograma são individualmente apresentadas nas tabelas 1 a 6. O teste de normalidade envolvendo os valores médios das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma não falhou nas diversas regiões.

A tabela 7 e os gráficos 1 a 6 demonstram que não houve elevação significativa das médias das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma em todas as regiões.

Assim, a infusão intracarotídea de solução salina a 15,8 μ l/100g/min, durante 30 minutos, em ratos Wistar submetidos previamente a obstrução bilateral das carótidas comuns, não determinou aumento significativo das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma.

Alfa (região frontal esquerda)		Alfa (região frontal direita)		Alfa (região parietal esquerda)		Alfa (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina
31,73	35,01	36,81	41,46	38,31	42,29	52,79	56,46
51,50	46,50	49,19	45,02	59,90	51,04	74,66	64,61
61,95	57,38	66,07	58,60	53,64	59,16	43,23	49,43
38,78	36,50	46,80	47,20	49,20	48,78	65,80	66,20
36,87	35,20	43,89	45,80	52,60	52,68	75,80	72,25
49,75	45,80	52,45	50,20	37,50	39,58	6,80	66,25
52,60	55,00	45,80	44,60	39,80	42,10	70,80	72,40
37,80	39,20	45,90	50,30	39,87	41,50	69,50	66,80

Tabela 01- Amplitudes absolutas médias (μ V) da faixa de frequência alfa processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com retana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 μ l/100g/min de solução Salina 0.9%).

Beta ₁ (região frontal esquerda)		Beta ₁ (região frontal direita)		Beta ₁ (região parietal esquerda)		Beta ₁ (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina
22,52	28,49	31,98	36,53	33,86	45,46	48,53	61,88
39,17	16,80	37,57	35,18	50,78	46,20	63,16	57,04
56,38	54,21	61,39	52,74	47,50	56,90	47,34	52,13
48,54	42,50	38,45	37,60	48,50	50,20	52,40	54,20
29,60	30,50	35,20	34,50	42,50	44,80	50,50	53,20
47,80	46,23	38,70	36,40	46,50	44,80	52,80	54,98
45,80	50,40	39,87	36,50	42,90	46,80	51,65	48,23
37,96	40,26	45,80	43,60	39,62	40,50	59,20	60,30

abela 02 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta₁ processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com retana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0.9%).

Beta ₂ (região frontal esquerda)		Beta ₂ (região frontal direita)		Beta ₂ (região parietal esquerda)		Beta ₂ (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina
13,26	16,89	13,17	17,01	22,54	23,63	23,26	23,30
17,98	16,80	17,67	18,28	26,74	25,49	32,19	31,63
21,31	22,59	21,65	21,83	26,80	25,08	26,01	28,89
20,42	21,50	23,01	22,15	28,50	27,52	27,58	28,57
19,58	20,10	20,15	21,45	25,80	26,40	26,54	27,50
15,80	16,54	17,20	16,80	23,50	24,10	25,40	26,80
16,80	17,20	18,50	16,80	24,80	23,90	26,89	25,70
20,50	21,80	23,50	22,70	25,41	25,80	27,50	28,54

abela 03 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta₂ processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com retana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0.9%).

Beta ₃ (região frontal esquerda)		Beta ₃ (região frontal direita)		Beta ₃ (região parietal esquerda)		Beta ₃ (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina
12,50	12,01	13,45	14,06	23,50	24,50	26,20	25,40
11,43	11,49	12,08	13,22	19,80	20,18	17,47	20,84
12,59	12,32	12,57	12,94	20,80	20,25	17,66	19,31
13,21	13,54	13,87	13,65	16,57	15,56	16,25	16,84
11,25	11,26	11,57	12,52	14,52	15,24	16,52	16,75
12,54	12,84	12,79	13,10	14,01	16,23	17,02	18,56
14,20	14,90	13,65	14,52	15,68	16,54	18,52	19,54
14,01	14,68	13,54	12,06	13,25	16,20	16,80	17,05

abela 04 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta₃ processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com retana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0.9%).

Delta (região frontal esquerda)		Delta (região frontal direita)		Delta (região parietal esquerda)		Delta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina
145,5	142,2	155,2	155,0	83,5	82,9	93,72	96,8
142,2	141,5	166,3	165,2	92,9	87,77	100,1	97,26
156,7	160,4	160,1	161,8	102,4	109,8	74,85	73,14
145,6	144,9	170,3	169,2	98,8	99,10	88,40	89,6
154,8	157,2	175,2	173,5	96,8	98,5	102,1	100,8
145,3	148,2	165,2	166,8	79,8	80,7	95,2	98,2
135,6	138,0	168,0	170,3	80,2	81,3	90,5	92,5
160,2	165,1	168,2	170,8	84,5	85,9	93,5	95,9

abela 05 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência delta processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com retana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0.9%).

Teta (região frontal esquerda)		Teta (região frontal direita)		Teta (região parietal esquerda)		Teta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina	Isquemia	Infusão de Salina
56,00	54,90	63,53	65,40	50,37	65,21	89,00	88,86
96,01	94,50	92,82	90,50	79,28	68,14	78,00	81,81
80,85	81,40	87,70	89,81	73,58	74,72	58,00	57,74
85,65	86,20	88,40	89,00	78,50	77,20	75,80	74,00
83,00	85,60	90,20	91,00	79,50	77,50	74,80	77,00
80,90	83,20	73,80	75,20	68,20	69,80	88,40	89,70
81,20	82,90	76,80	78,10	75,90	79,00	76,10	77,00
84,80	86,20	78,90	80,50	77,70	79,80	84,90	86,20

abela 06 – Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência teta processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com retana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução Salina 0,9%).

Grupo		Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Frontal esquerdo	Isquemia	12,72 ± 0,378	18,21 ± 0,982	41,35 ± 3,64	45,12 ± 3,64	81,05 ± 3,988	148,24 ± 2,919
	Infusão de Salina	12,88 ± 0,489	19,17 ± 0,911	38,67 ± 4,44	43,82 ± 3,12	81,86 ± 4,10	149,69 ± 3,519
Frontal direito	Isquemia	12,94 ± 0,292	19,36 ± 1,217	41,12 ± 3,21	48,36 ± 2,99	81,52 ± 3,538	166,06 ± 2,172
	Infusão de Salina	13,26 ± 0,283	19,63 ± 0,932	39,13 ± 2,18	47,90 ± 1,85	82,44 ± 3,276	166,575 ± 2,093
Parietal esquerdo	Isquemia	17,30 ± 1,300	25,64 ± 0,605	44,02 ± 1,94	46,35 ± 3,02	72,88 ± 3,48	89,87 ± 3,16
	Infusão de Salina	18,09 ± 1,150	25,37 ± 0,485	46,96 ± 1,71	47,14 ± 2,43	73,92 ± 1,94	90,75 ± 3,72
Parietal direito	Isquemia	18,31 ± 1,156	26,92 ± 0,899	53,20 ± 1,90	64,55 ± 3,98	78,13 ± 3,524	92,30 ± 2,963
	Infusão de Salina	19,25 ± 1,015	27,62 ± 0,871	55,25 ± 1,56	64,30 ± 2,76	79,04 ± 3,675	93,03 ± 3,091

abela 07 – Média (μV) ± erro padrão da média (μV) das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do EEG de grupos de animais (n=8): Isquemia (obstrução bilateral das carótidas comuns) e Infusão de Solução Salina 0,9%.

Grupos comparados	P					
	Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Frontal E (I) Frontal E (IS)	0,3075	0,0788	0,4108	0,2972	0,1697	0,1786
Frontal D (I) Frontal D (IS)	0,3210	0,6688	0,1653	0,7620	0,1059	0,4276
Parietal E (I) Parietal E (IS)	0,1497	0,3519	0,1658	0,6236	0,6929	0,4938
Parietal D (I) Parietal D (IS)	0,0702	0,1626	0,3492	0,8944	0,1719	0,4064

Tabela 08 – Significância (P) relativa à modificação da amplitude dos potenciais do EEG induzida por infusão intracarotídea de Solução Salina em um grupo de oito ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; D significa direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IS), isquemia e infusão intracarotídea esquerda Solução Salina 0,9%; (*) estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Gráficos: Isquemia e Infusão de Solução Salina 0,9%

Espectro Alfa

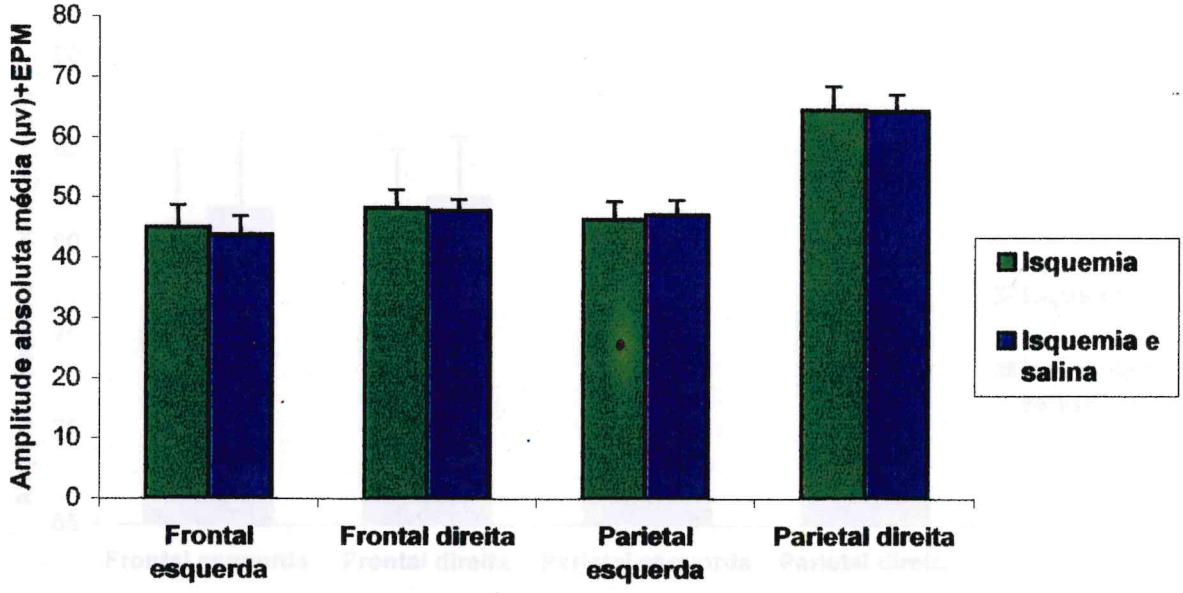


Gráfico 1 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de solução salina sobre a amplitude absoluta média do espectro Alfa do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. * P<0,05;

Espectro Teta

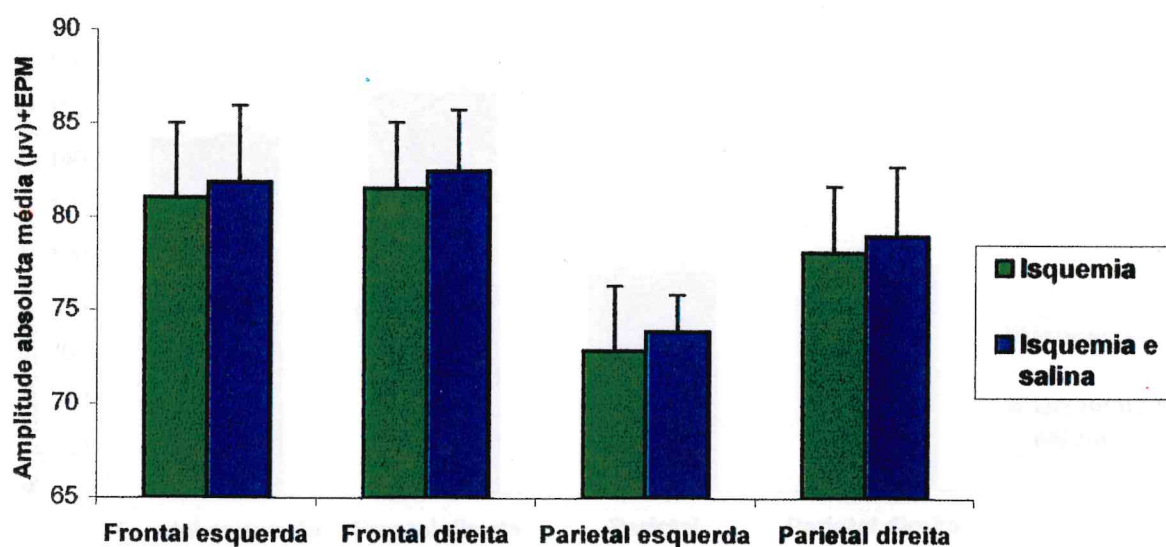


Gráfico 2 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Teta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. * $P < 0,05$;

Espectro Delta

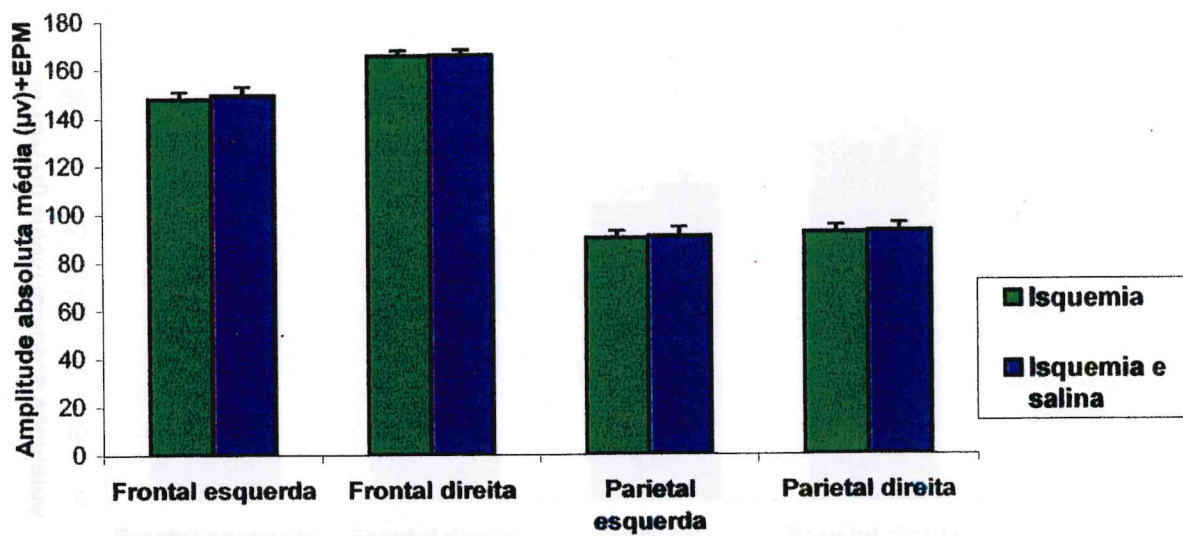


Gráfico 3 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Delta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. * P<0,05;

Espectro Beta 1

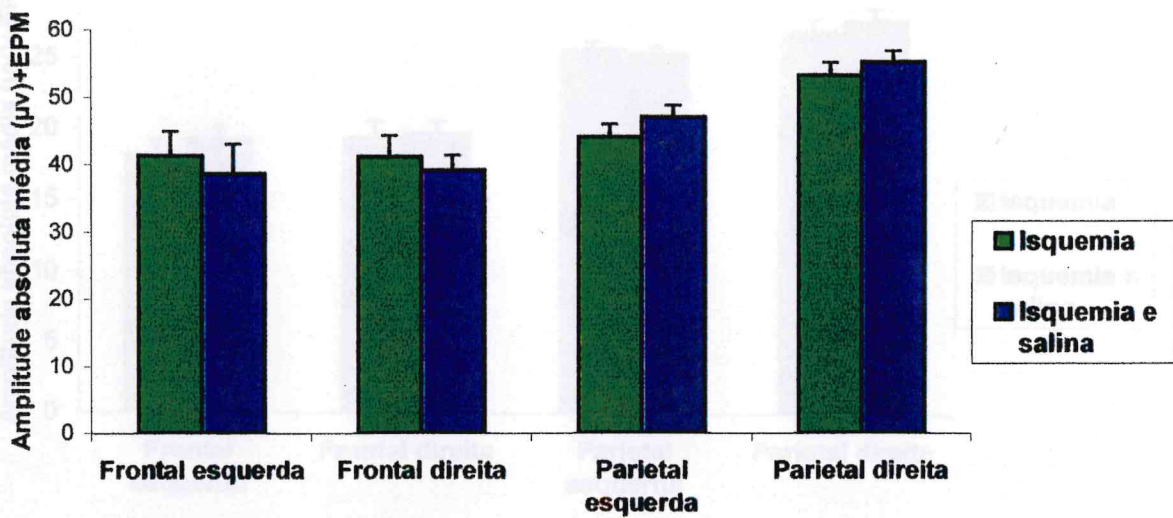


Gráfico 4 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de solução salina sobre a amplitude absoluta média do espectro **Beta 1** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. * $P < 0,05$;

Espectro Beta 2

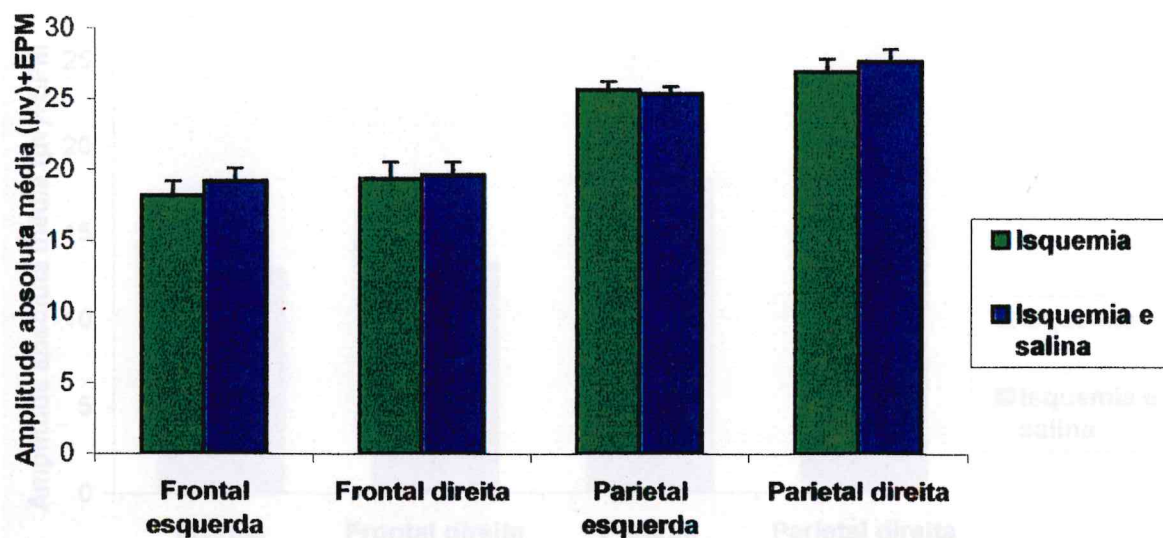


Gráfico 5 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de solução salina sobre a amplitude absoluta média do espectro Beta 2 do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. * P<0,05;

Espectro Beta 3

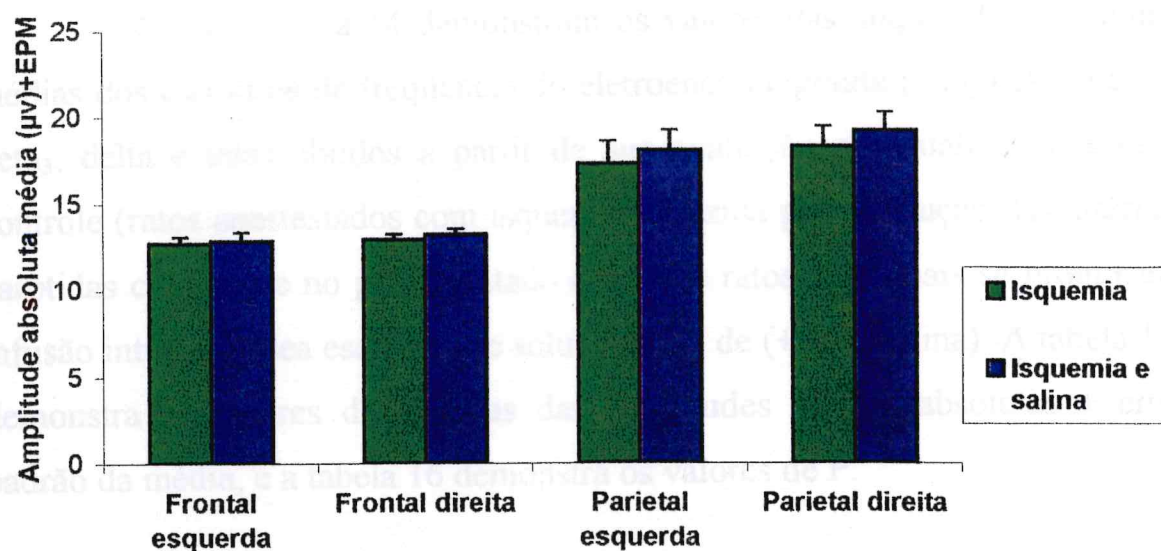


Gráfico 6 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns e infusão de **solução salina** sobre a amplitude absoluta média do espectro **Beta 3** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. * $P < 0,05$;

.2 Ação da solução de 5mg de (+)-catequina em infusão intracarotídea esquerda a 15,8 μ l/100g/min, durante trinta minutos, sobre as amplitudes absolutas médias dos espectros eletroencefalográficos de ratos com oclusão das artérias carótidas comuns

As tabelas 9 a 14 demonstram os valores das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma (alfa, beta₁, beta₂, beta₃, delta e teta) obtidos a partir de sua avaliação quantitativa no grupo controle (ratos anestesiados com isquemia induzida por obstrução das artérias carótidas comuns) e no grupo tratado (mesmos ratos, nos quais se promoveu infusão intracarotídea esquerda de solução 5mg de (+)-catequina). A tabela 15 demonstra os valores das médias das amplitudes médias absolutas \pm erro padrão da média, e a tabela 16 demonstra os valores de P.

No presente estudo foram utilizados oito ratos. As médias das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de ondas do eletroencefalograma são individualmente apresentadas nas tabelas 9 a 14. O teste de normalidade envolvendo os valores médios das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma não falhou nas diversas regiões, com exceção dos espectros delta na região frontal esquerda e do espectro alfa na região parietal direita. A análise estatística no último caso também incluiu o teste "Wilcoxon Signed Rank" (já referido).

.2 Ação da solução de 5mg de (+)-catequina em infusão intracarotídea esquerda a 15,8 µl/100g/min, durante trinta minutos, sobre as amplitudes absolutas médias dos espectros eletroencefalográficos de ratos com oclusão das artérias carótidas comuns

As tabelas 9 a 14 demonstram os valores das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma (alfa, beta₁, beta₂, beta₃, delta e teta) obtidos a partir de sua avaliação quantitativa no grupo controle (ratos anestesiados com isquemia induzida por obstrução das artérias carótidas comuns) e no grupo tratado (mesmos ratos, nos quais se promoveu infusão intracarotídea esquerda de solução 5mg de (+)-catequina). A tabela 15 demonstra os valores das médias das amplitudes médias absolutas ± erro padrão da média, e a tabela 16 demonstra os valores de P.

No presente estudo foram utilizados oito ratos. As médias das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de ondas do eletroencefalograma são individualmente apresentadas nas tabelas 9 a 14. O teste de normalidade envolvendo os valores médios das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma não falhou nas diversas regiões, com exceção dos espectros delta na região frontal esquerda e do espectro alfa na região parietal direita. A análise estatística no último caso também incluiu o teste “Wilcoxon Signed Rank” (já referido).

A tabela 15 e os gráficos 7 a 12 demonstram uma elevação das médias das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma em todas as regiões, com exceção do espectro teta nas regiões frontais e parietal esquerda, e do espectro delta nas regiões frontal e parietal direitas com a infusão (+)-catequina 5mg (15,8 μ l/100g/min). Tal elevação é estatisticamente significativa (tabela 16).

Assim, a infusão intracarotídea de (+)-catequina 5mg a 15,8 μ l/100g/min, durante 30 minutos, em ratos Wistar submetidos previamente a obstrução bilateral das carótidas comuns, determinou aumento significativo das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros do eletroencefalograma.

Observa-se um aumento constante da média das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de ondas do eletroencefalograma nos grupos **Isquemia e Infusão de 5mg de (+)-catequina** (Tabela 15). O aumento da média da amplitude absoluta média em todos os espectros nas diversas regiões estudadas (**Grupos Isquemia e Infusão de (+)-catequina**) foram estatisticamente significativos, com exceção do espectro β 1 na região parietal direita (tabela 16).

Alfa (região frontal esquerda)		Alfa (região frontal direita)		Alfa (região parietal esquerda)		Alfa (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
64,11	58,92	45,59	47,94	90,26	97,83	78,18	84,69
64,93	88,99	52,28	64,42	57,81	66,61	53,57	61,29
42,67	56,71	40,26	57,48	82,58	120,50	64,07	114,50
56,13	65,55	40,49	53,34	39,69	44,18	47,77	55,13
53,34	64,21	35,00	46,26	66,05	80,36	54,05	63,53
49,62	57,71	39,40	51,89	53,60	79,33	50,26	73,24
56,26	65,64	42,50	48,60	74,40	94,69	70,44	96,70
61,16	69,98	63,44	69,51	57,82	59,52	46,22	49,15

Tabela 09 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência alfa processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução de 5mg de (+)-catequina).

Beta ₁ (região frontal esquerda)		Beta ₁ (região frontal direita)		Beta ₁ (região parietal esquerda)		Beta ₁ (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
43,51	50,70	34,02	44,72	85,99	98,79	74,68	86,93
52,84	58,61	40,31	47,50	54,46	57,36	52,80	54,06
39,76	55,76	32,26	55,57	70,67	131,60	59,58	126,40
48,00	48,59	36,13	41,14	39,85	44,09	43,07	47,21
41,42	50,83	27,25	35,91	66,12	74,91	53,90	59,77
39,15	50,98	26,76	40,60	61,12	88,51	45,43	65,21
44,74	53,05	38,48	43,98	70,79	96,64	71,11	100,30
48,56	50,18	47,57	50,17	57,55	61,35	58,34	61,36

Tabela 10 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência beta₁ processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a $15,8 \mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$ de solução de 5mg de (+)-catequina).

Beta ₂ (região frontal esquerda)		Beta ₂ (região frontal direita)		Beta ₂ (região parietal esquerda)		Beta ₂ (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
18,81	30,28	17,12	30,36	41,73	61,84	36,37	55,32
21,88	25,77	20,34	23,23	23,55	31,70	25,09	30,10
17,78	37,39	16,84	38,34	38,00	86,11	30,73	81,45
21,55	22,46	16,62	20,29	22,99	26,84	21,45	26,74
26,94	29,98	19,57	24,89	42,06	50,46	39,53	42,26
17,54	25,86	13,15	19,76	24,76	43,84	26,12	36,47
22,44	27,48	21,59	28,62	42,12	60,76	47,39	67,29
24,40	25,01	24,38	25,13	33,36	36,67	37,86	39,33

Tabela 11 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **beta₂** processadas do eletroencefalograma de sete ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu l/100g/min$ de solução de 5mg de (+)-catequina).

Beta ₃ (região frontal esquerda)		Beta ₃ (região frontal direita)		Beta ₃ (região parietal esquerda)		Beta ₃ (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
10,96	23,01	10,03	23,12	25,00	42,88	22,14	38,37
12,29	16,04	12,34	13,76	15,87	20,56	16,19	20,25
11,79	27,89	11,08	27,82	25,68	65,13	24,94	63,06
14,16	16,50	10,91	12,90	18,70	21,11	15,22	22,34
19,93	25,60	13,36	23,02	25,75	38,12	25,91	33,89
13,13	18,93	7,75	13,42	19,03	32,02	16,92	26,52
15,04	19,56	14,08	20,84	27,51	45,61	32,75	51,92
14,87	14,90	14,52	15,06	19,07	21,90	25,02	26,02

Tabela 12 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **beta₃** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu l/100g/min$ de solução de 5mg de (+)-catequina).

Delta (região frontal esquerda)		Delta (região frontal direita)		Delta (região parietal esquerda)		Delta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
121,80	140,30	96,92	114,60	104,50	123,40	92,60	108,80
138,00	158,00	102,70	121,40	69,75	79,56	67,29	79,81
97,84	115,40	102,40	122,80	99,96	112,00	65,02	86,53
130,60	137,90	106,20	121,10	35,98	33,92	46,52	48,54
119,40	153,70	90,29	121,40	82,09	97,12	70,50	83,73
138,70	160,30	134,10	166,10	68,39	98,73	110,60	142,80
131,40	150,90	112,80	124,40	102,50	116,70	81,21	88,58
169,6	216,0	186,8	234,1	79,12	91,08	62,57	66,31

Tabela 13 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **delta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu l/100g/min$ de solução de 5mg de (+)-catequina).

Teta (região frontal esquerda)		Teta (região frontal direita)		Teta (região parietal esquerda)		Teta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
90,52	98,89	68,84	78,96	110,40	125,20	97,49	107,60
90,53	116,30	74,53	92,01	70,44	70,71	62,56	65,18
71,20	72,32	68,56	74,31	97,77	120,30	82,93	112,70
76,78	89,66	59,70	81,12	37,37	42,72	50,43	58,73
83,24	92,14	62,91	71,25	83,29	86,59	62,20	65,19
73,84	87,27	66,74	83,39	88,84	103,80	75,20	95,72
91,97	111,70	80,16	86,09	99,26	119,80	99,93	110,80
94,94	109,7	93,54	113,8	67,39	77,49	65,13	72,10

Tabela 14 - Amplitudes absolutas médias (μV) da faixa de frequência **teta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana, e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu l/100g/min$ de solução de 5mg de (+)-catequina).

Grupo		Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Frontal esquerdo	Isquemia	14,02 ± 0,99	21,42 ± 1,16	44,75 ± 1,69	56,03 ± 2,66	84,10 ± 3,24	130,9 ± 7,22
	Infusão de catequina	20,30 ± 1,676	28,03 ± 1,62	52,34 ± 1,17	65,96 ± 3,67	97,20 ± 5,23	154,1 ± 10,22
Frontal direito	Isquemia	11,76 ± 0,804	18,70 ± 1,23	35,35 ± 2,45	44,90 ± 3,20	71,90 ± 3,83	116,5 ± 11,04
	Infusão de catequina	18,74 ± 2,005	26,33 ± 2,15	44,95 ± 2,17	54,90 ± 2,94	85,10 ± 4,70	140,7 ± 14,49
Parietal esquerdo	Isquemia	22,10 ± 1,54	33,60 ± 3,05	63,30 ± 4,82	65,30 ± 5,84	81,80 ± 8,17	80,30 ± 8,11
	Infusão de catequina	35,90 ± 5,46	49,80 ± 6,87	81,70 ± 9,93	80,40 ± 8,51	93,30 ± 10,28	94,10 ± 9,97
Parietal direito	Isquemia	22,40 ± 2,13	33,10 ± 3,09	57,40 ± 3,95	58,10 ± 4,09	74,50 ± 6,28	74,50 ± 7,02
	Infusão de catequina	35,30 ± 5,37	47,40 ± 6,75	75,20 ± 9,59	74,80 ± 7,92	86,00 ± 8,12	88,10 ± 9,96

Tabela 15 - Média (μV) \pm erro padrão da média (μV) das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do EEG de grupos de animais (n=8): **Isquemia** (obstrução bilateral das carótidas comuns) e **Infusão de (+)-catequina** (mesmos animais com infusão intracarotídea de 5mg de (+)-catequina).

Grupos comparados	P					
	Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Frontal E (I) Frontal E (IC)	0,0119*	0,0223*	0,0039*	0,0100*	0,0016*	0,0309(st)* 0,0078(x)* 0,0143(t)*
Frontal D (I) Frontal D (IC)	0,0117*	0,0149*	0,0043*	0,0006*	0,0006*	0,0007*
Parietal E (I) Parietal E (IC)	0,0145*	0,0164*	0,0339*	0,0102*	0,0051*	0,0036*
Parietal D (I) Parietal D (IC)	0,0175*	0,0421*	0,0560	0,0210(st)* 0,0143(t)* 0,0078(x)*	0,0097*	0,0060*

Tabela 16 - **Significância (P)** relativa à modificação da amplitude dos potenciais do EEG induzida por infusão intracarotídea de 5mg de (+)-catequina em um grupo de oito ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; (t) significa estatístico; (x), exato; (st), teste t-Student; D, direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IC), isquemia e infusão intracarotídea esquerda de 5mg de (+)-catequina; (x) e (t) se referem ao teste "Wilcoxon Signed Rank". (*) estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Gráficos: Isquemia e infusão de Solução de 5mg de (+)-catequina.

Espectro Delta

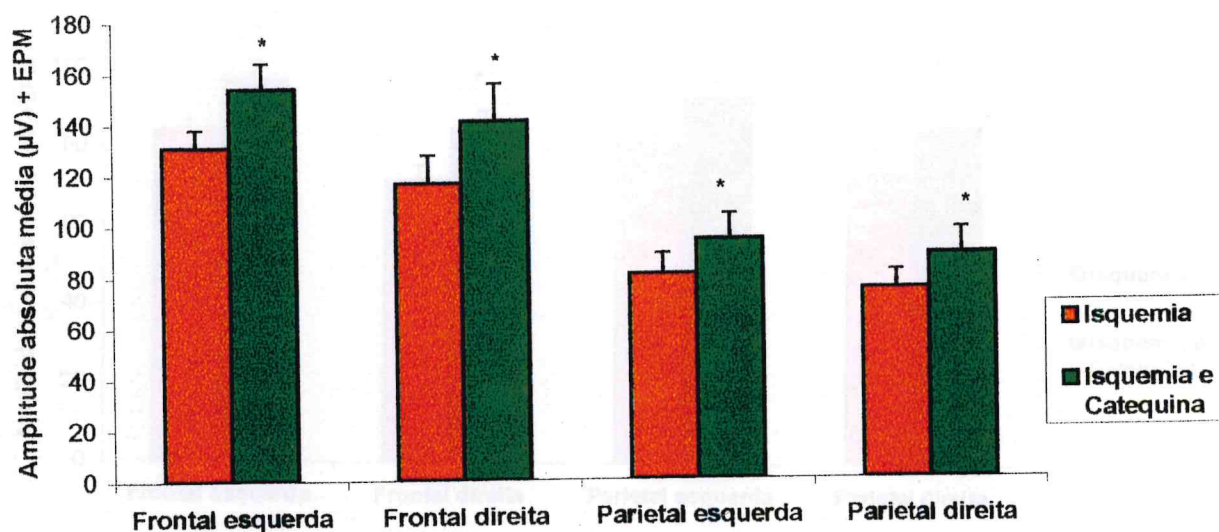


Gráfico 7 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta média do espectro **delta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Há aumento da amplitude absoluta média do espectro **delta** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * $P < 0,05$;

Espectro Teta

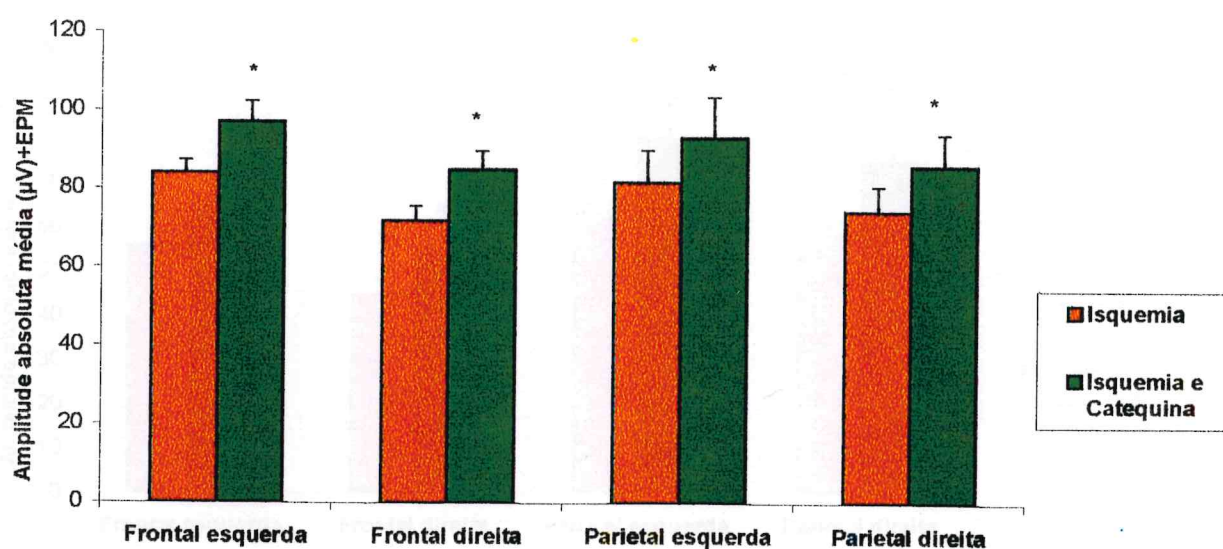


Gráfico 8 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta média do espectro **teta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Há aumento da amplitude absoluta média do espectro **teta** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * $P < 0,05$;

Espectro Alfa

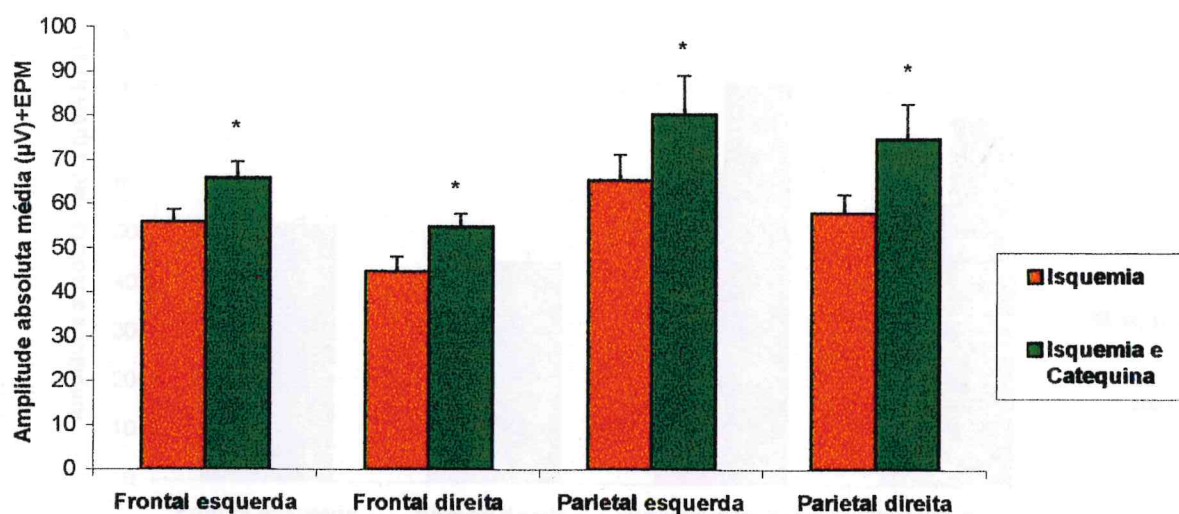


Gráfico 9 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta média do espectro **alfa** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Há aumento da amplitude absoluta média do espectro **alfa** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * $P < 0,05$;

Espectro Beta₁

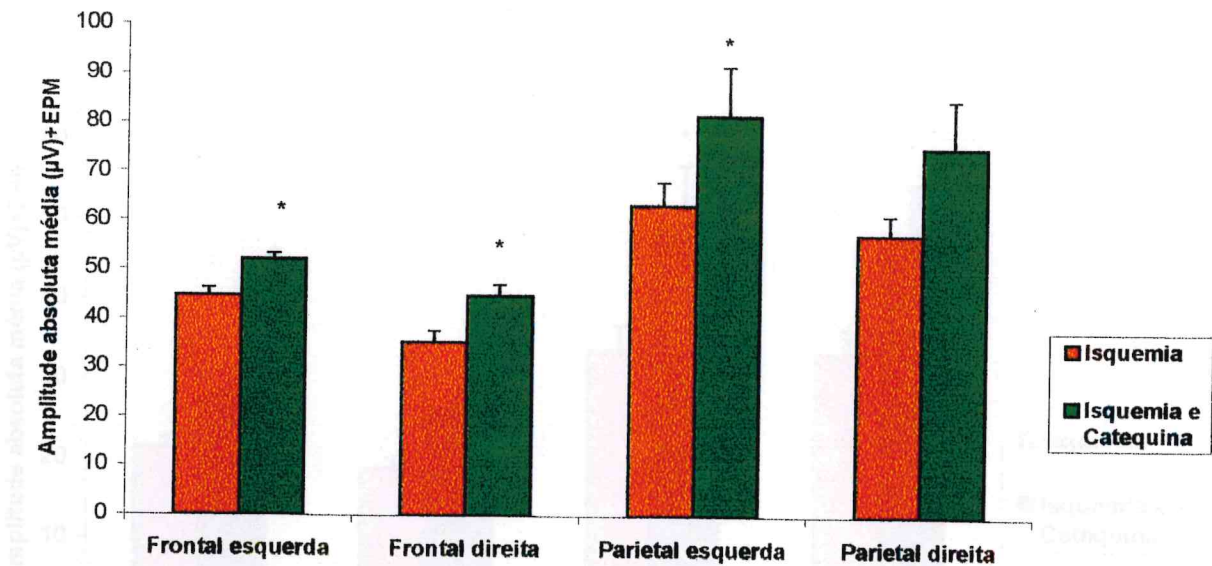


Gráfico 10 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₁** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Há aumento da amplitude absoluta média do espectro **beta₁** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * P<0,05;

Espectro Beta₂

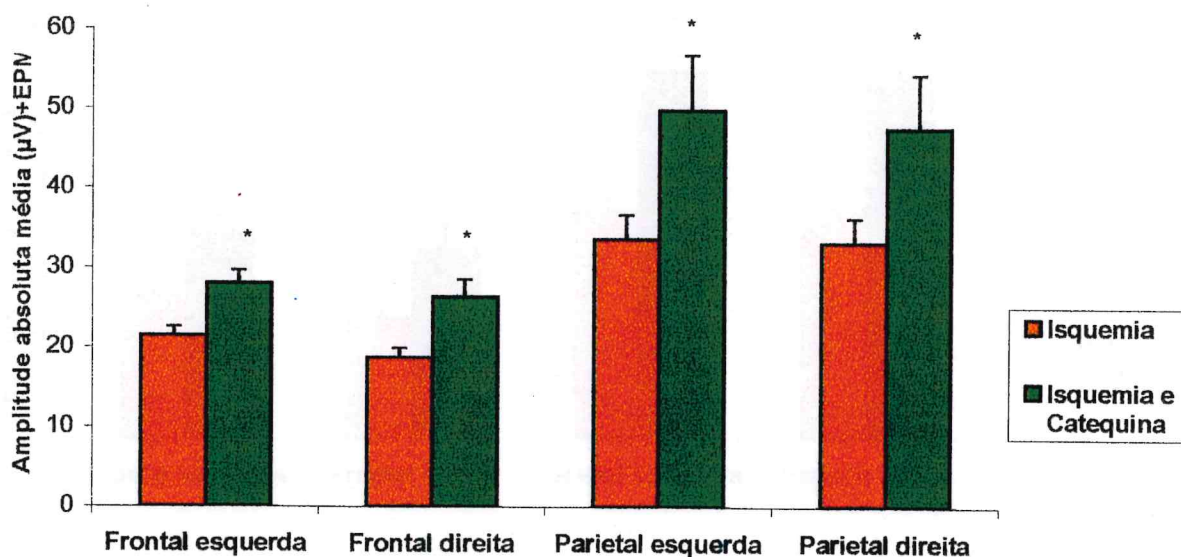


Gráfico 11 - Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₂** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Há aumento da amplitude absoluta média do espectro **beta₂** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * P<0,05;

Espectro Beta₃

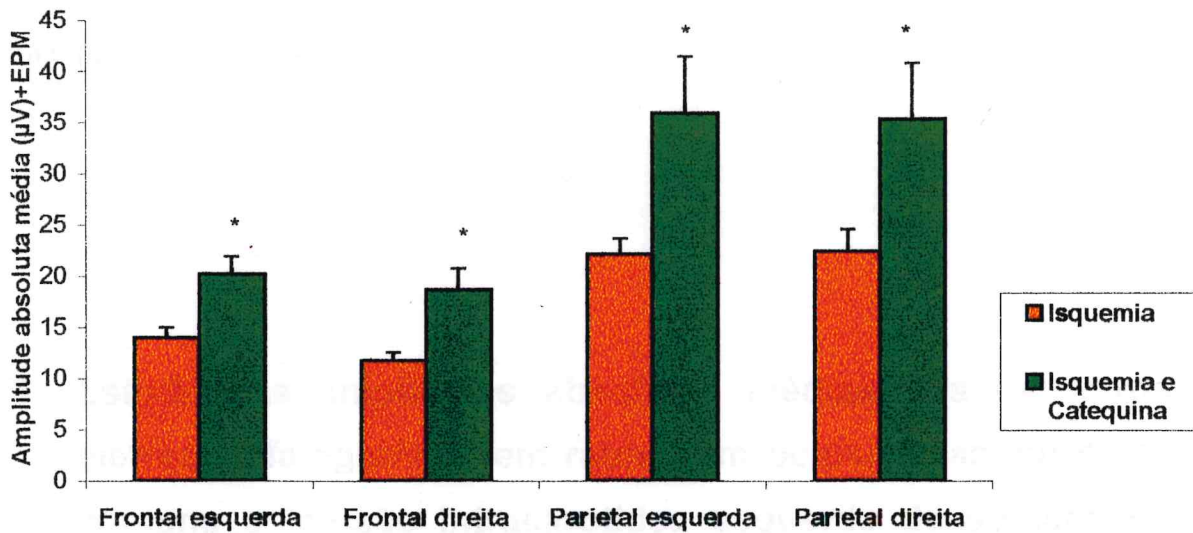


Gráfico 12 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta média do espectro **beta₃** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Há aumento da amplitude absoluta média do espectro **beta₃** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * $P < 0,05$;

Em conclusão, a infusão intracarotídea esquerda de solução 5mg de (+)-catequina, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, durante 30 minutos, determinou no EEG de ratos anestesiados com uretana e com isquemia induzida por obstrução das carótidas comuns um aumento constante e significativo, das amplitudes absolutas médias de todos os espectros de frequência da atividade eletroencefalográfica, com exceção da região beta₁ parietal direita.

4.3 Estudo das amplitudes absolutas médias dos espectros eletroencefalográficos em ratos com oclusão das carótidas comuns e infusão intracarotídea esquerda de solução de 2,5mg de (+)-catequina.

As tabelas 17 a 22 demonstram os valores das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma (alfa, beta₁, beta₂, beta₃, delta e teta) obtidos a partir de sua avaliação quantitativa no grupo controle (ratos anestesiados com isquemia induzida por obstrução das artérias carótidas comuns) e no grupo tratado (mesmos ratos, nos quais se promoveu infusão intracarotídea esquerda a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, durante trinta minutos, de solução de 2,5mg de (+)-catequina). As tabelas 23 e 24 demonstram os valores das médias das amplitudes absolutas \pm erro padrão da média e de P respectivamente. Os gráficos 13 a 18 resumem os achados estatísticos.

Alfa (região frontal esquerda)		Alfa (região frontal direita)		Alfa (região parietal esquerda)		Alfa (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
44,77	42,38	41,67	46,50	75,91	79,00	60,38	62,03
43,70	56,11	39,02	46,28	65,54	82,34	59,00	76,53
46,93	49,07	43,30	48,51	94,54	102,90	90,93	97,77
42,44	44,67	26,59	27,02	72,48	87,14	76,91	91,78
27,06	36,83	21,29	31,69	47,70	70,85	48,01	68,14
48,06	50,82	54,38	60,69	69,73	70,38	69,06	68,56
41,47	53,38	19,25	29,51	79,36	97,38	74,60	90,95
27,52	31,89	24,55	29,17	57,74	71,37	46,31	57,50

Tabela 17- Amplitudes absolutas médias (μV) do espectro **alfa** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Beta1 (região frontal esquerda)		Beta1 (região frontal direita)		Beta1 (região parietal esquerda)		Beta1 (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
34,13	34,12	38,20	36,37	75,86	78,26	61,28	61,13
34,12	39,89	31,02	32,74	77,66	88,03	77,03	87,42
36,10	38,48	31,88	35,11	87,11	103,40	78,43	90,28
31,74	34,56	21,60	21,03	67,52	85,32	69,30	89,48
27,03	37,85	21,19	31,74	44,29	73,17	45,47	70,23
38,35	34,20	42,48	38,04	65,28	60,57	63,68	57,22
37,00	42,28	20,23	19,75	79,73	94,13	80,26	87,63
26,73	28,88	20,30	19,92	60,22	69,92	43,68	52,13

Tabela 18- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta1** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Beta2 (região frontal esquerda)		Beta2 (região frontal direita)		Beta2 (região parietal esquerda)		Beta2 (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
17,75	17,46	18,73	19,71	41,07	45,15	32,27	33,47
15,53	19,86	16,17	16,90	44,33	48,37	49,32	53,18
16,49	18,72	14,63	16,32	42,61	52,71	37,01	46,82
13,16	16,84	8,01	10,38	33,99	47,58	33,13	47,09
14,15	21,67	12,46	19,12	44,29	44,79	23,30	40,30
16,71	19,04	16,86	17,84	33,96	37,75	31,82	33,24
17,75	19,97	9,42	9,95	41,64	48,61	42,45	49,54
14,54	17,92	10,82	10,45	31,18	38,84	25,12	28,08

Tabela 19- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta2** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Beta3 (região frontal esquerda)		Beta3 (região frontal direita)		Beta3 (região parietal esquerda)		Beta3 (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
9,58	10,70	11,95	11,97	20,79	25,45	17,95	19,72
10,01	12,38	9,79	10,70	26,29	31,33	32,14	34,95
10,17	12,73	8,87	10,40	22,96	33,96	19,89	29,25
8,20	10,83	4,97	6,05	23,73	32,56	19,96	29,41
8,72	15,65	6,75	12,81	15,31	31,59	14,06	26,30
10,98	14,22	9,40	11,43	21,11	28,17	19,03	24,41
12,16	14,73	7,20	8,59	28,69	34,30	25,87	28,71
10,40	12,61	7,23	7,19	18,55	24,93	15,04	18,46

Tabela 20-Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta3** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Delta (região frontal esquerda)		Delta (região frontal direita)		Delta (região parietal esquerda)		Delta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
135,40	161,50	112,60	147,30	121,90	157,30	78,87	122,20
110,30	127,10	118,80	124,00	92,96	97,29	78,51	104,60
163,00	153,60	164,00	161,00	135,90	140,60	130,80	133,80
100,30	95,11	90,47	83,40	99,15	124,80	108,90	134,30
54,37	82,39	57,21	80,26	82,89	125,10	89,44	128,70
119,60	123,60	134,00	140,80	90,89	95,99	90,01	99,67
71,33	85,50	40,82	41,20	153,40	208,00	145,80	197,30
75,02	94,15	99,71	114,00	101,50	138,00	70,17	108,10

Tabela 21- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **delta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Teta (região frontal esquerda)		Teta (região frontal direita)		Teta (região parietal esquerda)		Teta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
73,69	77,94	71,99	79,10	93,74	105,50	73,62	81,02
64,88	87,28	61,41	77,32	88,72	114,10	85,54	109,50
77,11	81,65	72,59	83,27	118,10	127,30	111,30	124,30
59,48	60,19	43,84	39,67	92,27	97,89	91,99	106,40
37,92	52,36	31,08	43,59	66,63	101,90	67,39	99,63
82,74	74,96	90,36	87,46	85,72	84,46	86,34	86,74
54,82	61,50	27,14	27,62	99,89	126,10	102,80	126,30
41,32	46,55	43,34	44,64	74,86	90,56	59,37	75,41

Tabela 22- Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **teta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Grupo		Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Região frontal esquerda	Isquemia	10,03 ± 0,440	15,76 ± 0,601	33,15 ± 1,54	40,24 ± 2,93	61,50 ± 5,77	103,7 ± 12,77
	Infusão de catequina	12,98 ± 0,628	18,94 ± 0,552	36,28 ± 1,48	45,64 ± 2,95	67,80 ± 5,20	115,4 ± 10,89
Região frontal direita	Isquemia	8,27 ± 0,767	13,39 ± 1,35	28,363 ± 3,12	33,76 ± 4,45	55,22 ± 7,90	102,2 ± 14,11
	Infusão de catequina	9,89 ± 0,844	15,08 ± 1,464	29,338 ± 2,76	39,92 ± 4,32	60,33 ± 8,37	111,5 ± 14,31
Região parietal esquerda	Isquemia	22,18 ± 1,50	39,13 ± 1,85	69,70 ± 4,75	70,40 ± 5,00	90,00 ± 5,51	109,8 ± 8,74
	Infusão de catequina	30,29 ± 1,30	45,48 ± 1,79	81,60 ± 4,91	82,70 ± 4,39	106,0 ± 5,52	135,9 ± 12,68
Região parietal direita	Isquemia	20,49 ± 2,09	34,30 ± 3,04	64,89 ± 5,05	65,70 ± 5,37	84,80 ± 6,20	99,10 ± 9,57
	Infusão de catequina	26,40 ± 1,92	41,47 ± 3,20	74,44 ± 5,68	76,70 ± 5,34	101,2 ± 6,74	128,6 ± 10,90

Tabela 23 - Média das amplitudes absolutas médias (μV) \pm erro padrão da média (μV) dos espectros de frequência do EEG processados a partir das amplitudes absolutas médias do exame eletrofisiológico de oito animais: **Isquemia** (obstrução das carótidas comuns) e **Infusão de (+)-catequina** (os mesmos animais com obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea de solução de 2,5mg de (+)-catequina).

Grupos comparados	P					
	Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Frontal E (I) Frontal E (IC)	0,0018(t)* 0,0078(x)* 0,0143(st)*	0,0051*	0,0836	0,0244*	0,0872	0,0487*
Frontal D (I) Frontal D (IC)	0,0490(t)* 0,0234(x)* 0,0300(st)*	0,0618	0,5581	0,0010*	0,0947	0,1035
Parietal E (I) Parietal E (IC)	0,0006*	0,0034*	0,0129*	0,0027*	0,0074*	0,0067*
Parietal D (I) Parietal D (IC)	0,0037*	0,0113*	0,0312*	0,0047*	0,0025*	0,0016*

Tabela 24 - Nível de significância (P) com relação a aumento da amplitude dos potenciais do eletroencefalograma induzido por infusão intracarotídea esquerda de (+)-catequina (2,5mg) em ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; (t) significa estatístico; (x), exato; (st), teste t-Student; D, direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IC), obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea esquerda de 2,5mg de (+)-catequina; (x) e (t) se referem ao teste "Wilcoxon Signed Rank". (*) estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Gráficos: Isquemia e Infusão de solução de 2,5mg de (+)-Catequina.

Espectro Delta

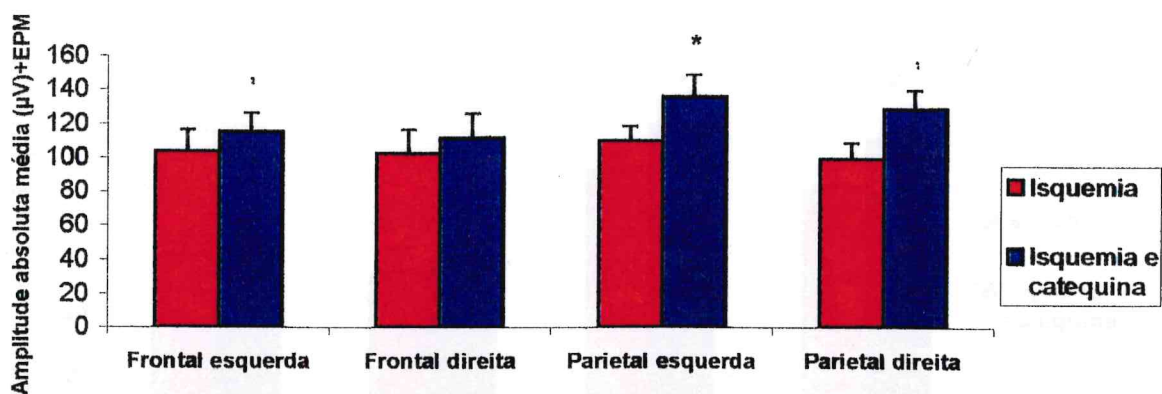


Gráfico 13 – Amplitude absoluta média do espectro **delta** do EEG de ratos Wistar com oclusão das artérias carótidas comuns (Isquemia) e os mesmos animais com oclusão das artérias carótidas comuns e infusão de **2,5mg de (+)-catequina** (Isquemia e infusão de (+)-catequina). Há um aumento significativo na amplitude absoluta dos espectros do EEG de ratos com infusão de (+)-catequina em todas as regiões estudadas, com exceção da região frontal direita. * $p < 0,05$.

Espectro Teta

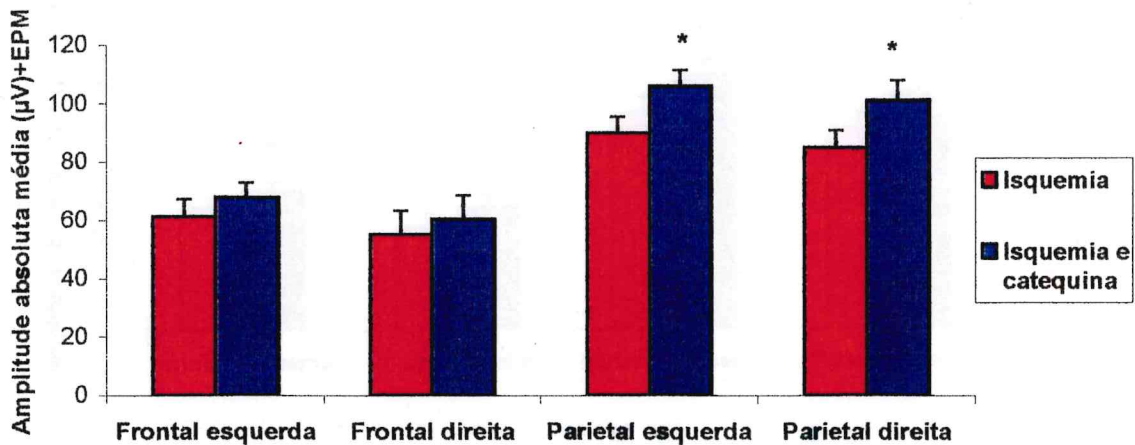


Gráfico 14 – Amplitude absoluta média do espectro **teta** do EEG de ratos Wistar com oclusão das artérias carótidas comuns (Isquemia) e os mesmos animais com oclusão das artérias carótidas comuns e infusão de **2,5mg de (+)-catequina** (Isquemia e infusão de (+)-catequina). Há um aumento significativo na amplitude absoluta dos espectros do EEG de ratos com infusão de (+)-catequina na região parietal esquerda e direita. * $p < 0,05$.

Espectro Alfa

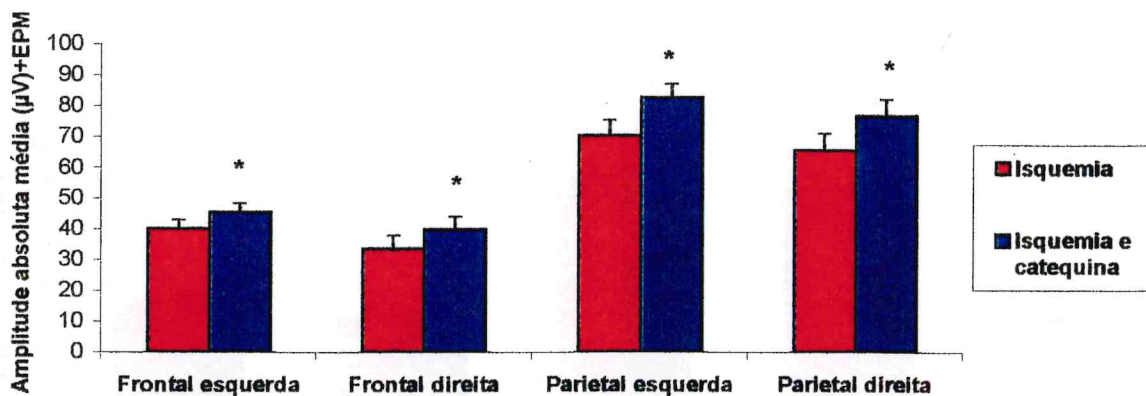


Gráfico 15 – Amplitude absoluta média do espectro **alfa** do EEG de ratos Wistar com oclusão das artérias carótidas comuns (Isquemia) e os mesmos animais com oclusão das artérias carótidas comuns e infusão de **2,5mg de (+)-catequina** (Isquemia e infusão de (+)-catequina). Há um aumento significativo na amplitude absoluta dos espectros do EEG de ratos com infusão de (+)-catequina em todas as regiões. * $p < 0,05$.

Espectro Beta₁

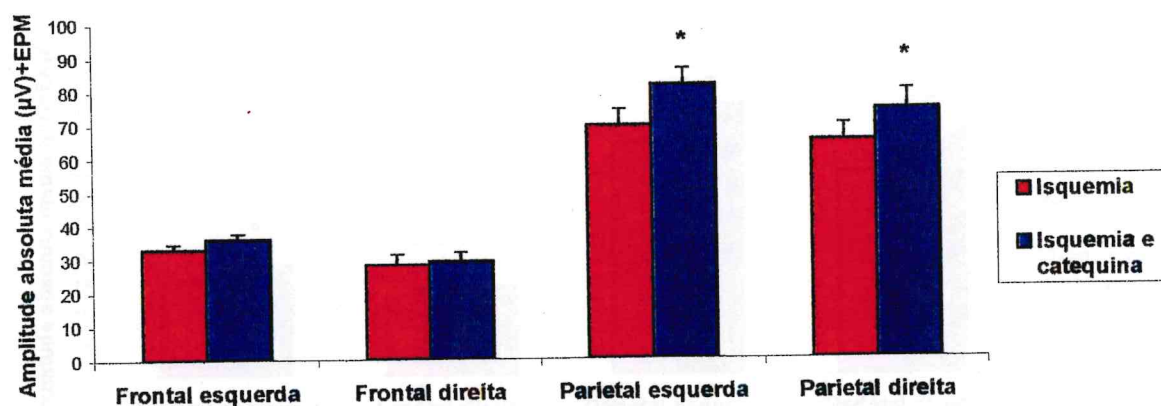


Gráfico 16 – Amplitude absoluta média do espectro **beta₁** do EEG de ratos Wistar com oclusão das artérias carótidas comuns (Isquemia) e os mesmos animais com oclusão das artérias carótidas comuns e infusão de **2,5mg de (+)-catequina** (Isquemia e infusão de (+)-catequina). Há um aumento significativo na amplitude absoluta dos espectros do EEG de ratos com infusão de (+)-catequina nas regiões parietais esquerda e direita. * $p < 0,05$.

Espectro Beta₂

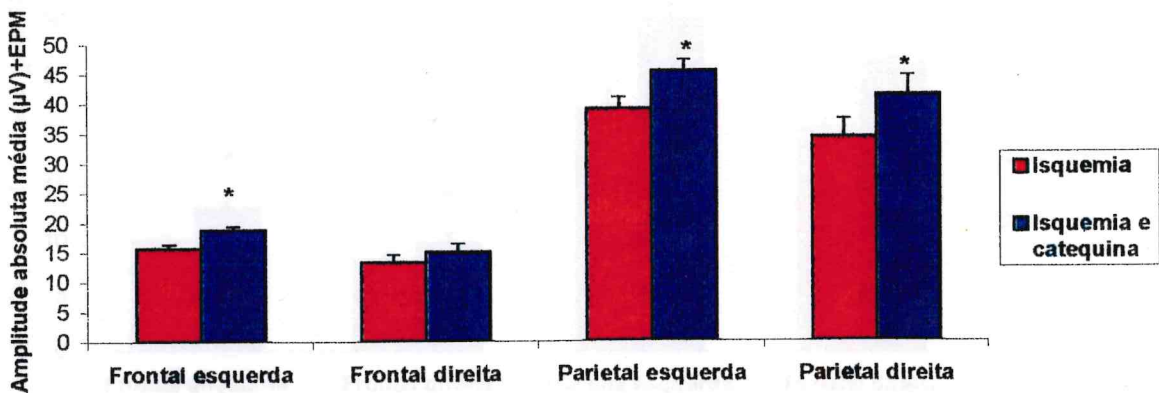


Gráfico 17 – Amplitude absoluta média do espectro **beta₂** do EEG de ratos Wistar com oclusão das artérias carótidas comuns (Isquemia) e os mesmos animais com oclusão das artérias carótidas comuns e infusão de **2,5mg de (+)-catequina** (Isquemia e infusão de (+)-catequina). Há um aumento significativo na amplitude absoluta dos espectros do EEG de ratos com infusão de (+)-catequina em todas as regiões, com exceção da região frontal direita. * $p < 0,05$.

Espectro Beta₃

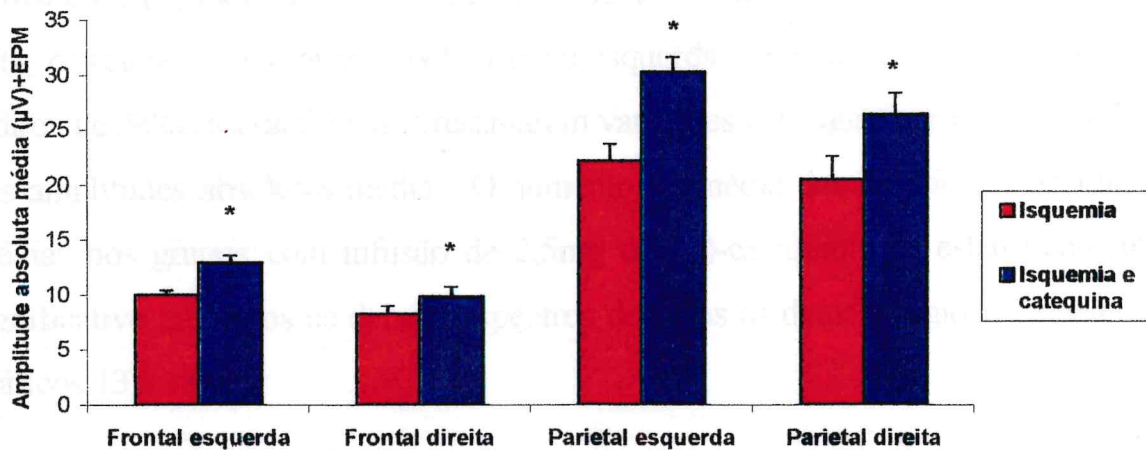


Gráfico 18 – Amplitude absoluta média do espectro **beta₃** do EEG de ratos Wistar com oclusão das artérias carótidas comuns (Isquemia) e os mesmos animais com oclusão das artérias carótidas comuns e infusão de **2,5mg de (+)-catequina** (Isquemia e infusão de (+)-catequina). Há um aumento significativo na amplitude absoluta dos espectros do EEG de ratos com infusão de (+)-catequina em todas as regiões. * $p < 0,05$.

A avaliação estatística dos dados apresentados nas tabelas 17 a 24 detectou uma falha do teste de normalidade na avaliação das amplitudes absolutas médias do espectro β_3 na região frontal esquerda e direita. A análise estatística, neste caso, incluiu o teste “Wilcoxon Signed Rank” (tabela 24). As tabelas 23 e 24 e os gráficos 13 a 18 demonstram um aumento da média das amplitudes absolutas médias de todos os espectros de frequência do eletroencefalograma nos grupos **Infusão de (+)-catequina** em todas as regiões estudadas. Entretanto os espectros β_2 da região frontal direita; β_1 frontal esquerda e direita; teta frontal esquerda e direita e delta frontal direita apresentaram variações não significativas das médias das amplitudes absolutas médias. O aumento da média das amplitudes absolutas médias nos grupos com infusão de 2,5mg de (+)-catequina foi estatisticamente significativo em todos os demais espectros de todas as demais regiões (tabela 23, gráficos 13 a 18).

4.4 Estudo das amplitudes absolutas médias dos espectros eletroencefalográficos em ratos com oclusão das carótidas comuns e infusão intracarotídea esquerda de solução de 0,5mg de (+)-catequina.

As tabelas 25 a 30 demonstram os valores das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma (alfa, beta₁, beta₂, beta₃, delta e teta) obtidos a partir de sua avaliação quantitativa no grupo controle (ratos anestesiados com isquemia induzida por obstrução das artérias carótidas comuns) e no grupo tratado (mesmos ratos, nos quais se promoveu infusão intracarotídea esquerda a 15,8µl/100g/min, durante trinta minutos, de solução de 0,5mg de (+)-catequina). As tabelas 31 e 32 demonstram os valores das médias das amplitudes médias absolutas ± erro padrão da média e de P respectivamente. Os gráficos 19 a 24 resumem os achados estatísticos.

Alfa (região frontal esquerda)		Alfa (região frontal direita)		Alfa (região parietal esquerda)		Alfa (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
46,56	51,29	44,27	49,82	51,56	56,01	44,97	45,57
7,26	8,98	8,11	13,10	9,42	17,90	10,32	18,59
89,01	81,51	43,61	46,89	122,70	111,90	103,10	99,45
64,35	55,41	55,30	48,30	79,33	90,95	76,03	78,70
55,60	57,71	67,73	73,55	65,40	77,41	56,28	69,56
67,57	75,36	63,33	71,79	52,93	61,70	46,05	57,17
87,14	91,35	65,45	70,59	91,27	96,14	85,78	90,36
28,27	35,78	46,14	62,03	57,76	77,86	69,80	88,60

Tabela 25 - Amplitudes absolutas médias (µV) do espectro alfa processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 µl/100g/min, de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Beta1 (região frontal esquerda)		Beta1 (região frontal direita)		Beta1 (região parietal esquerda)		Beta1 (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
33,20	41,21	31,83	40,02	52,17	61,86	44,90	53,12
5,42	9,24	7,59	13,47	10,50	26,06	10,50	18,89
68,68	73,80	40,87	43,09	108,20	121,90	92,39	104,90
49,28	41,68	41,56	36,43	73,99	81,71	68,55	66,46
39,87	44,41	46,96	50,30	65,36	79,20	55,97	70,58
60,34	61,08	51,41	53,96	44,84	55,43	40,17	50,83
72,98	69,43	55,92	52,80	95,63	89,30	93,75	87,64
24,07	28,97	34,90	43,25	55,88	66,05	61,04	72,80

Tabela 26 - Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta1** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Beta2 (região frontal esquerda)		Beta2 (região frontal direita)		Beta2 (região parietal esquerda)		Beta2 (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
16,76	22,62	15,38	21,08	21,32	35,68	20,22	30,22
3,17	6,85	4,58	8,96	7,70	20,36	5,59	12,84
31,04	31,93	21,95	22,25	56,08	56,05	48,03	48,89
20,01	20,32	18,81	16,33	37,66	41,72	33,46	33,11
15,77	20,14	19,13	22,35	31,85	42,84	28,68	36,65
28,49	31,95	21,70	26,96	23,64	32,97	18,49	31,73
33,71	33,56	25,45	25,56	49,16	50,05	48,55	49,85
12,76	16,92	17,41	23,01	30,39	42,06	33,38	45,27

Tabela 27 - Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta2** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Beta3 (região frontal esquerda)		Beta3 (região frontal direita)		Beta3 (região parietal esquerda)		Beta3 (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
10,90	15,48	9,89	14,25	17,82	27,95	16,03	23,14
3,09	6,60	2,98	6,79	9,85	18,70	4,18	10,44
17,80	17,64	11,97	11,71	27,89	28,08	24,74	25,20
11,38	13,76	10,76	10,66	21,20	26,52	18,86	19,99
9,72	14,05	11,84	14,06	20,26	25,26	18,22	23,35
15,79	20,81	13,01	15,74	13,65	24,07	12,79	23,70
18,29	20,58	13,51	15,55	25,96	31,32	26,91	32,22
8,45	12,28	10,90	15,51	19,86	30,33	22,46	33,48

Tabela 28 - Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **beta3** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu l/100g/min$, de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Delta (região frontal esquerda)		Delta (região frontal direita)		Delta (região parietal esquerda)		Delta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
99,02	136,10	99,05	137,30	59,94	74,76	53,52	70,70
35,32	34,66	24,18	33,11	25,70	41,89	36,10	34,85
212,20	219,40	142,00	134,90	164,40	149,90	139,70	138,70
125,70	124,10	118,00	115,60	141,40	144,90	122,40	121,30
151,50	149,70	163,60	169,50	85,49	88,73	87,53	102,50
148,20	180,70	147,30	183,00	75,52	91,57	53,97	73,12
222,60	227,30	210,70	194,10	147,20	133,60	123,10	117,90
80,12	112,30	115,90	154,30	66,85	86,75	83,33	109,70

Tabela 29 - Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros **delta** processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu l/100g/min$, de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Teta (região frontal esquerda)		Teta (região frontal direita)		Teta (região parietal esquerda)		Teta (região parietal direita)	
Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina	Isquemia	Infusão de catequina
59,71	88,12	61,28	87,63	63,04	67,58	54,20	66,10
19,51	20,11	19,16	22,48	22,34	26,91	26,36	28,29
117,50	125,20	68,95	70,93	145,80	130,50	124,00	115,90
91,65	87,96	76,71	74,31	95,84	106,20	88,67	90,20
84,92	93,37	97,84	116,70	75,93	82,23	70,07	83,79
101,20	111,00	85,83	110,80	63,81	79,46	46,32	64,78
152,60	163,30	123,00	136,60	127,10	142,70	119,80	135,00
47,92	60,04	76,83	90,92	70,30	83,46	84,98	101,50

Tabela 30 - Amplitudes absolutas médias (μV) dos espectros teta processadas do eletroencefalograma de oito ratos Wistar anestesiados com uretana e com obstrução das artérias carótidas comuns, cada um deles fazendo parte dos grupos controle (Isquemia) e tratado (mesmos animais com infusão intracarotídea esquerda, a 15,8 $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$, de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Grupo		Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Região frontal esquerda	Isquemia	11,93 ± 1,82	20,21 ± 3,65	44,23 ± 8,20	55,72 ± 9,91	84,38 ± 14,78	134,3 ± 22,52
	Infusão de catequina	15,15 ± 1,65	23,04 ± 3,23	46,23 ± 7,60	57,17 ± 9,36	93,64 ± 15,09	147,9 ± 22,02
Região frontal direita	Isquemia	10,61 ± 1,67	18,05 ± 2,21	38,88 ± 5,29	49,24 ± 6,81	76,2 ± 10,59	127,6 ± 19,15
	Infusão de catequina	13,03 ± 1,11	20,81 ± 2,03	41,67 ± 4,59	54,51 ± 7,08	88,8 ± 12,31	140,2 ± 17,88
Região parietal esquerda	Isquemia	19,56 ± 2,10	32,23 ± 5,48	63,32 ± 10,76	66,30 ± 11,71	83,02 ± 13,83	95,81 ± 17,41
	Infusão de catequina	26,53 ± 1,41	40,22 ± 3,84	72,69 ± 9,87	73,73 ± 10,23	89,88 ± 12,94	101,51 ± 13,37
Região parietal direita	Isquemia	18,02 ± 2,56	29,55 ± 5,20	58,41 ± 9,76	61,54 ± 10,14	76,80 ± 12,18	87,46 ± 13,46
	Infusão de catequina	23,94 ± 2,54	36,07 ± 4,31	65,65 ± 9,13	68,50 ± 9,53	85,70 ± 11,75	96,02 ± 12,03

Tabela 31 - Média das amplitudes absolutas médias (μV) ± erro padrão da média (μV) dos espectros de frequência do EEG processados a partir das amplitudes absolutas médias do exame eletrofisiológico de oito animais: Isquemia (obstrução das carótidas comuns) e Infusão de (+)-catequina (os mesmos animais com obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea de solução de 0,5mg de (+)-catequina).

Grupos comparados	P					
	Beta ₃	Beta ₂	Beta ₁	Alfa	Teta	Delta
Frontal E (I) Frontal E (IC)	0,0010 *	0,0081 *	0,3124	0,5391	0,0274 *	0,1073 (t) 0,1094 (x) 0,0602 (st)
Frontal D (I) Frontal D (IC)	0,0078 *	0,0388 *	0,1518	0,0501	0,0128 *	0,1480
Parietal E (I) Parietal E (IC)	0,0010 *	0,0048 *	0,0061 *	0,0493 *	0,0949	0,2743
Parietal D (I) Parietal D (IC)	0,0036 *	0,0101 *	0,0423 (t) 0,0391 (x) 0,0275 (st) *	0,0313 *	0,0312 *	0,0830

Tabela 32 - Nível de significância (P) com relação a aumento da amplitude dos potenciais do eletroencefalograma induzido por infusão intracarotídea esquerda de (+)-catequina (0,5mg) em ratos Wistar com obstrução das carótidas comuns; (t) significa estatístico; (x), exato; (st), teste t-Student; D, direito; E, esquerdo; (I), isquemia; (IC), obstrução das carótidas comuns e infusão intracarotídea esquerda de 0,5mg de (+)-catequina; (x) e (t) se referem ao teste "Wilcoxon Signed Rank". (*) estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Gráficos: Isquemia e Infusão de solução de 0,5mg de (+)-Catequina.

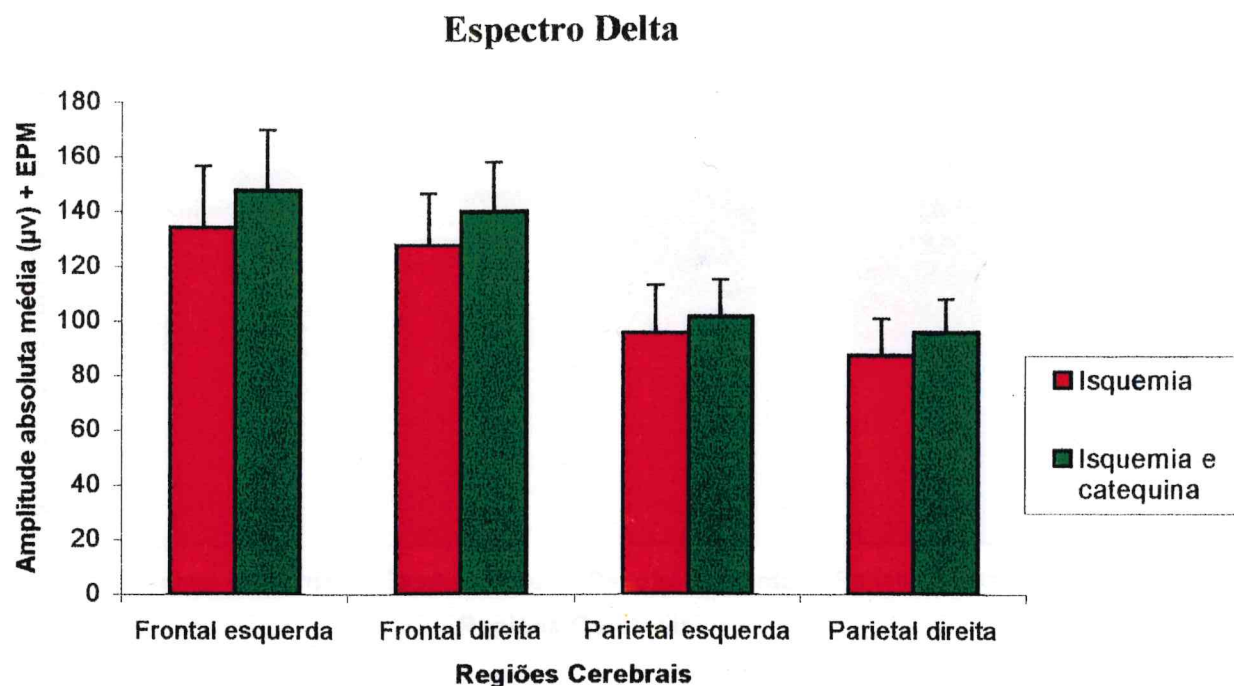


Gráfico 19 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta do espectro **delta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Aumento da amplitude média absoluta do espectro **delta** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **0,5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina).

Espectro Teta

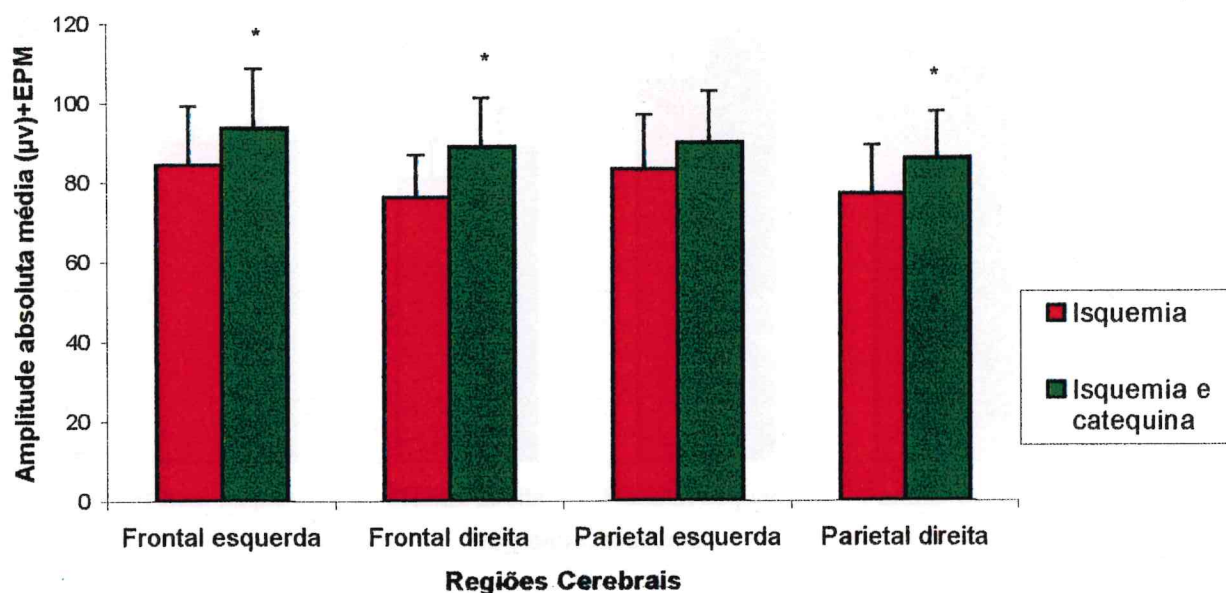


Gráfico 20 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta do espectro **teta** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Aumento da amplitude média absoluta do espectro **teta** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **0,5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * $P < 0,05$;

Espectro Alfa

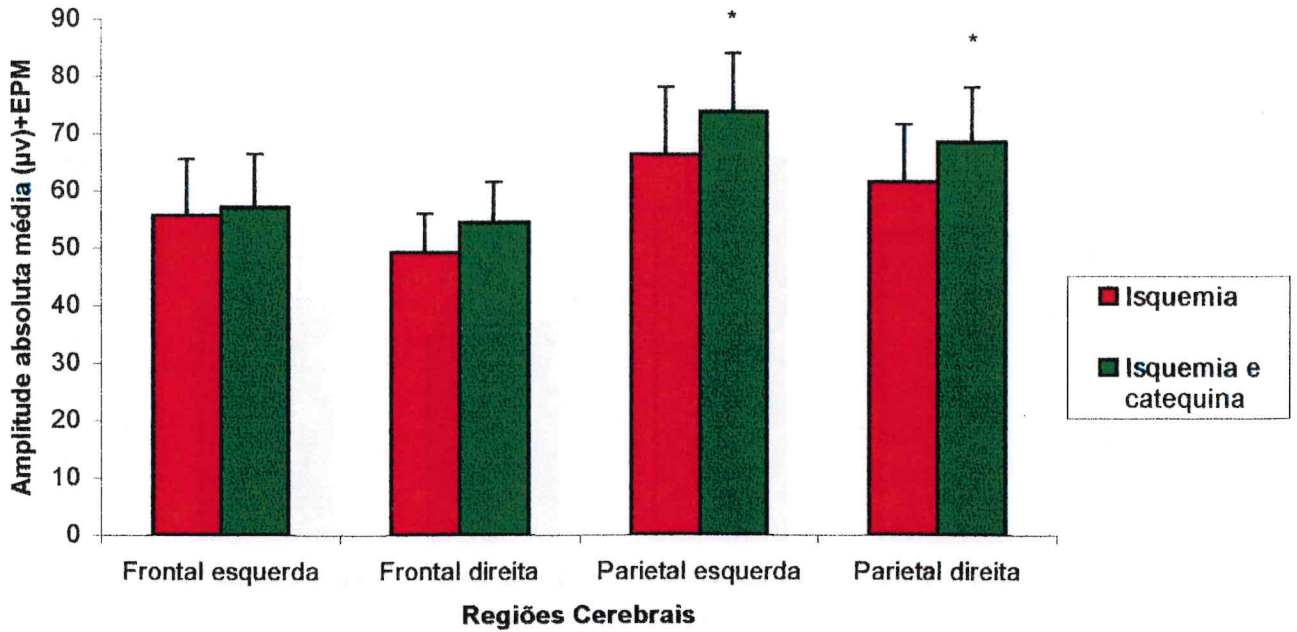


Gráfico 21 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta do espectro **alfa** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Aumento da amplitude média absoluta do espectro **alfa** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **0,5mg** de **(+)-catequina** (isquemia e infusão de **(+)-catequina**). * $P < 0,05$;

Espectro Beta₁

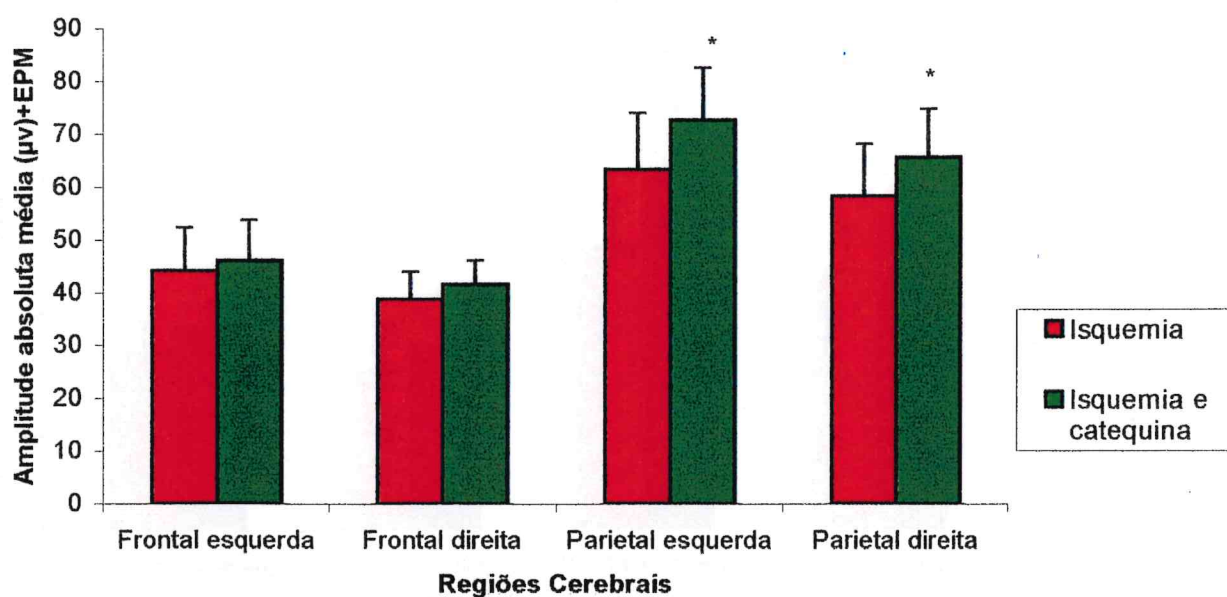


Gráfico 22 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta do espectro **beta₁** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Aumento da amplitude média absoluta do espectro **beta₁** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **0,5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * P<0,05;

Espectro Beta₂

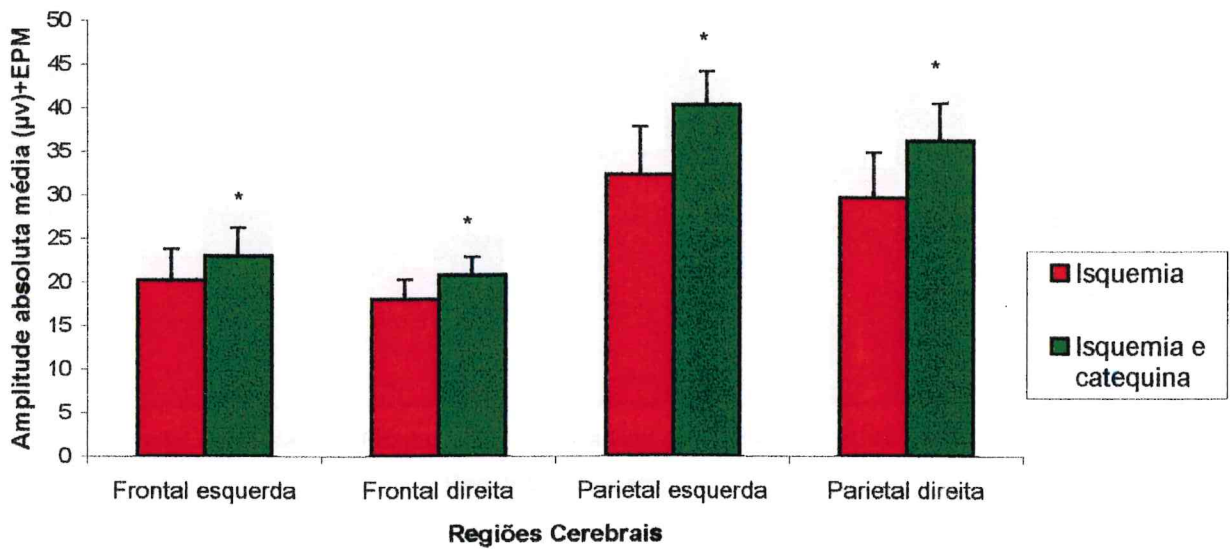


Gráfico 23 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta do espectro **beta₂** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Aumento da amplitude média absoluta do espectro **beta₂** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **0,5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * P<0,05;

Espectro Beta₃

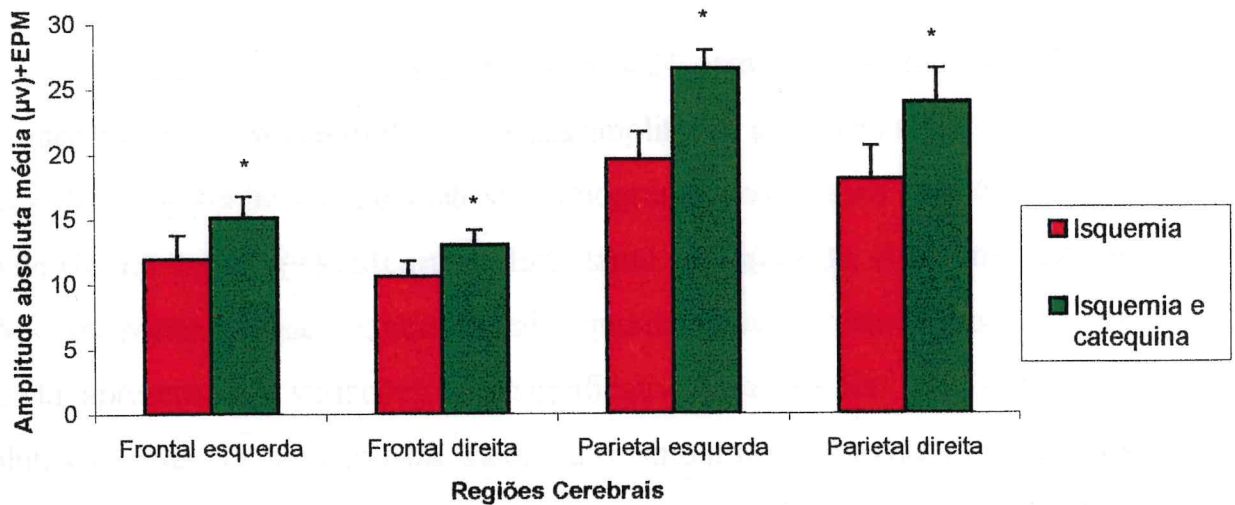


Gráfico 24 – Efeito da obstrução das artérias carótidas comuns sobre a amplitude absoluta do espectro **beta₃** do eletroencefalograma de ratos Wistar anestesiados com uretana. Aumento da amplitude média absoluta do espectro **beta₃** induzido por infusão intracarotídea esquerda de **0,5mg de (+)-catequina** (isquemia e infusão de (+)-catequina). * $P < 0,05$;

A avaliação estatística dos dados apresentados nas tabelas 25 a 32 detectou uma falha do teste de normalidade na avaliação das amplitudes absolutas médias do espectro β_1 na região parietal direita e no espectro delta na região frontal esquerda. A análise estatística, neste caso, incluiu o teste “Wilcoxon Signed Rank” (tabela 32).

As tabelas 31 e 32 e os gráficos 19 a 24 demonstram uma variação de modo inconstante no aumento da média das amplitudes absolutas médias de todos os espectros de frequência do eletroencefalograma nos grupos **Isquemia com infusão de 0,5 mg de (+)-catequina**. Entretanto os espectros, delta em todas as regiões; teta parietal esquerda; alfa frontal esquerda e direita; β_1 frontal esquerda e direita apresentaram variações não significativas nas médias das amplitudes absolutas médias. O aumento na média das amplitudes absolutas médias nos grupos com infusão de 0,5mg de (+)-catequina foi estatisticamente significativo em todos os demais espectros de todas as demais regiões, com destaque para os espectros β_2 e β_3 onde observa-se um aumento significativo das médias das amplitudes médias em todas as regiões cerebrais (tabela 31, gráficos 19 a 24).

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

A fisiopatologia da isquemia cerebral tem sido extensivamente estudada em ratos por vários métodos, incluindo oclusão de múltiplos vasos, hipotensão e hipovolemia, para produzir alterações globais no fluxo sanguíneo cerebral e no metabolismo.

As principais observações eletrofisiológicas com um quadro panorâmico de depressão de atividade elétrica cerebral, verificadas logo após a oclusão carotídea, dão conta da existência de fenômenos metabólicos com repercussões claras no eletroencefalograma (Do Vale et al., 2000).

A isquemia cerebral causa um grupo de modificações seqüenciais, envolvendo redistribuição iônica, modificações das reações enzimáticas, que são próprias do metabolismo e da sinalização intracelular (Zagrean et al., 1995). Portanto, essas alterações iônicas, em si, já podem justificar muitos dos elementos eletrofisiológicos observados durante a isquemia cerebral.

Estudos de espectroscopia com ressonância nuclear magnética com ^{31}P (^{31}P -NMR) em ratos com artérias vertebrais obstruídas por eletrocoagulação (Naruse et al., 1984) demonstraram que os mais altos valores de ATP e fosfocreatina (PCr) diminuíram concomitantemente com os mais altos valores de fosfatos inorgânicos (Pi), depois de quatro minutos de

obliteração das artérias carótidas comuns. Os fosfatos de alta energia são importantes fatores para estabilidade iônica da membrana em função, principalmente, da bomba de sódio. Estas mudanças atingiram valores mais significativos trinta minutos depois. Ao mesmo tempo, uma evidente redução de pH tissular foi observada. Houve uma redução da amplitude das ondas do eletroencefalograma imediatamente após a indução da isquemia. Os autores observaram uma recuperação rápida do metabolismo energético, embora o padrão de decremento da amplitude no eletroencefalograma persistisse doze horas após a recirculação.

No método deste estudo, nós usamos grupos pareados de animais e, assim, foi reduzida substancialmente a possibilidade de que o anestésico usado pudesse influenciar a comparação dos resultados obtidos na análise das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência. Do Vale et al., 1998, demonstrou em ratos uma importante redução estatisticamente significativa das amplitudes das ondas do eletroencefalograma, quando ambas as artérias carótidas comuns foram obstruídas, sem prévia obliteração das artérias vertebrais. Os modelos experimentais utilizados anteriormente por outros pesquisadores (Naruse et al., 1984) consistiam na oclusão dos quatro vasos, ou seja, oclusão permanente das artérias vertebrais e transitória das artérias carótidas comuns ou hipotensão arterial associada à oclusão de ambas as artérias carótidas comuns (Eklöf & Siesjö, 1972). Portanto, o método estabelecido por Do Vale et al., 1998 e utilizado neste trabalho é absolutamente original neste aspecto.

As observações aqui procedidas pertinentes à análise computadorizada do EEG em ratos com obstrução bilateral das artérias carótidas comuns podem ser usadas para monitorização de substâncias citoprotetoras endógenas ou exógenas na isquemia cerebral, desde que se consiga observar uma reversão significativa da redução das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência eletroencefalográficos induzida por isquemia, quando, neste caso, são usadas tais substâncias (Do Vale, 2000).

Recentemente, graças ao notável avanço tecnológico em neuroimagem, à disposição da prática médica, novas entidades clínicas estão sendo incorporadas ao conjunto das já classicamente conhecidas. Dentre aquelas, se destaca a doença vascular cerebral isquêmica silenciosa, quando suas manifestações não são reconhecidas ou noticiadas pelos portadores (Vingerhoets & Bogousslavsky, 1998). Além da tomografia computadorizada do encéfalo e da ressonância nuclear magnética, relatos na literatura testemunham a utilidade da abordagem eletrofisiológica na investigação destes casos em seres humanos (Chao & Knight, 1998; Shigeta et al., 1995) ou em modelos animais (Chichibu et al., 1995).

Outros estudos prévios demonstraram uma importante redução das amplitudes das ondas teta superficiais e profundas em decorrência da isquemia cerebral (Monmaur et al., 1986). As alterações do eletroencefalograma verificadas por estes autores foram relacionadas à excessiva perda de células piramidais na região CA₁ do hipocampo. Tem sido sugerido que os

componentes neurais desta área são importantes como fonte de ondas teta superficiais e profundas, bem como para sua manutenção.

Embora as alterações circulatórias, bioquímicas e morfológicas da lesão cerebral isquêmica já estejam, de certo modo, caracterizadas (Suzuki, et al., 1983; Urban et al., 1990a, Urban et al, 1990b), as modificações da atividade elétrica cerebral ainda não são bem conhecidas. Segundo Do Vale et al. (1998), a obliteração das artérias carótidas comuns produz em ratos Wistar, quando anestesiados com uretana por via intraperitoneal, uma redução estatisticamente significativa das amplitudes absolutas das faixas espectrais clássicas do eletroencefalograma, sugerindo que o EEG pode ser um meio sensível e útil para avaliar os efeitos cerebrais da isquemia, mesmo os que não tiveram expressão clínica.

Neste estudo experimental, demonstrou-se que a possível ação neuroprotetora da (+)-Catequina pôde ser avaliada usando o modelo experimental descrito por Do Vale et al., 1998.

Diante destas evidências experimentais, resolvemos avaliar, através do eletroencefalograma, a atuação da (+)-catequina administrada por via intracarotídea em ratos que se submeteram previamente à obstrução bilateral das artérias carótidas comuns. Em um trabalho anterior, Do Vale 2000, demonstrou que a obstrução das artérias carótidas comuns em ratos Wistar determinava uma redução estatisticamente significativa das amplitudes

absolutas médias dos diversos espectros de frequência do eletroencefalograma, quando da infusão de Glutation 1,2 mM e ácido α -Lipóico 6,06 mM.

O aumento das amplitudes absolutas médias de todos os espectros de frequência, a grande maioria estatisticamente significativo, observado durante a infusão intracarotídea esquerda de solução contendo 0,5mg, 2,5mg e 5,0mg de (+)-catequina em ratos com obstrução bilateral das carótidas comuns, foi um achado inédito (Tabelas 01-32; Gráficos 01-24), porquanto nenhum estudo eletroencefalográfico, envolvendo a ação desta substância em modelos animais de isquemia cerebral foi encontrado em análise muito recente do arquivo "MEDLINE". A reversão da redução das amplitudes absolutas médias induzida por obstrução das artérias carótidas comuns ocorreu praticamente em todas as faixas espectrais.

Em artigo de revisão, Erecinska & Silver (1996) mencionam a vulnerabilidade dos neurônios hipocâmpais, em particular os da região CA₁, à lesão isquêmica global, ressaltando os diversos aspectos das alterações de sinalização celular em que estão envolvidas as alterações da homeostase do Ca⁺². A vulnerabilidade dos neurônios do hipocampo, em particular, das estruturas envolvidas no mecanismo da memória torna a avaliação complementar importante, sobretudo em pacientes com deficiência cognitiva que se instalou após isquemia global secundária a parada cardíaca transitória. Vários estudos experimentais (Togashi et al., 1996; De La Torre et al., 1992; De Jong et al., 1999; Bothe et al, 1986; Gionet et al, 1991; Block & Schwarz,

1997) e clínicos (Bachevalier & Meunier, 1996; Shaw & Alvord, 1997; Nishimura et al., 1998; Woods, et al., 1982; Morgan et al., 1992) demonstram que neurônios hipocampais são o substrato anatômico de lesões secundárias a isquemia global transitória e que podem ser responsabilizadas pelo comprometimento cognitivo observado nestes casos.

O presente trabalho experimental sugere, através da recuperação estatisticamente significativa do decremento das amplitudes absolutas médias dos diversos espectros de frequência, principalmente os espectros teta originários do hipocampo, que com o modelo experimental empregado foi possível avaliar o efeito citoprotetor da (+)-catequina sobre as lesões hipocampais induzidas pela isquemia.

Em ratos com obstrução carotídea bilateral, efetuamos estudo eletrofisiológico com infusão intracarotídea esquerda de solução contendo 0,5mg de (+)-catequina, durante trinta minutos. Outro grupo com 2,5mg e outro com 5,0mg de (+)-catequina, durante trinta minutos. Com isso, observaríamos se a administração desta substância, já citada em trabalhos anteriores como anticarcinogênica (Feig e Loeb, 1994), bactericida (Sakanaka et al., 1989), hipocolesterolêmica (Fukuyo et al., 1986), antidiabética (Chakravarthy, 1982), inibidora da enzima conversora de angiotensina (Uchida et al., 1987) e removedora de espécies reativas do oxigênio (Hatano et al., 1989) resultaria em recuperação das alterações eletrofisiológicas induzidas pela isquemia cerebral secundária possivelmente por ação removedora de radicais livres.

Em um outro grupo de oito animais, com obstrução carotídea bilateral, realizamos a infusão de solução salina 0,9% para que fosse possível analisar a solução diluente (solução salina 0,9%), observando se a mesma provocava alguma alteração significativa na atividade eletrofisiológica dos animais submetidos a isquemia prévia.

Em paralelo, vários estudos têm demonstrado efeitos neuroprotetores de antioxidantes, tanto na isquemia global, quanto na isquemia focal. Várias diferentes classes de antioxidantes mostraram efeito benéfico na isquemia. O reagente *N-ter-butyl- α -fenilnitrona* mostrou melhorar a recuperação do estado energético cerebral em ratos durante isquemia focal transitória e também reduziu o tamanho da área de infarto (Folbergrova et al., 1995). Outra nitrona eliminadora de radical livre foi reportado como sendo um agente neuroprotetor na isquemia cerebral (Hensley et al., 1997). O análogo do α -tocoferol MDL 74, 722 está relacionado com a inibição dependente de íon e indutora de lesão cerebral isquêmica após oclusão transitória da artéria cerebral média de ratos (van der Worp et al., 1999). Um análogo da glutathione peroxidase, Ebselen, mostrou ser neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral focal transitória em ratos (Dawson et al., 1995). O 21-amino-esteróide, Tirilazad, comprovou ser eficaz em modelo de acidente vascular focal em ratos (Meden et al., 1996), entretanto o 21-amino-esteróide, U-74389G, mostrou ser eficaz no modelo de isquemia global em ratos com oclusão dos quatro vasos (Lee et al., 1996). Em conclusão ao que foi descrito podemos afirmar que a ação citoprotetora apresentada pela (+)-Catequina pode ser acrescentada a essa variada classe de substâncias antioxidantes com atividade anti-isquêmica.

Hasegawa et al., 1992 reportou inicialmente que o extrato de catequinas, como a (+)-catequina (CA), (-)-epicatequina (EC) e (-)-epicatequina galato (EGg), inibiam a autoxidação do ácido linoléico e eliminava o oxigênio reativo produzido pelo sistema xantina-xantina oxidase ou por macrófagos de ratos.

Estudos de isquemia cerebral temporária (Oliver et al., 1990) ou do coração (Zweier et al., 1987) mostraram que havia um aumento na quantidade de espécies reativas do oxigênio nos tecidos, levando, conseqüentemente, a uma lesão tecidual. Também se demonstrou que na inflamação (Oyanagui, 1992), o oxigênio reativo acelera o metabolismo do ácido araquidônico provocando edema.

Estes fatos justificaram nosso intuito em utilizar (+)-catequina de vez que esta substância tem ação removedora destes radicais em isquemia cerebral experimental.

Através da infusão intracarotídea esquerda de solução contendo 0,5mg de (+)-catequina em ratos com obstrução prévia de ambas as artérias carótidas comuns, verificou-se de modo não homogêneo, modificação discreta mas, estatisticamente significativa das amplitudes absolutas médias dos espectros do eletroencefalograma secundária à isquemia (tabelas 31 e 32;

Gráficos 19-24), com exceção do espectro delta em todas as regiões estudadas e dos espectros alfa e β_1 na região frontal que não foram estatisticamente significativos.

Com a administração de (+)-catequina na dose de 2,5mg, sob as mesmas condições, verificamos uma reversão significativamente estatística das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma secundária à isquemia (tabelas 23 e 24; gráficos 13-18). Com exceção dos espectros β_2 e delta frontal direita; β_1 e teta frontal esquerda e direita não houve reversão significativa das amplitudes absolutas médias.

Quando a dose foi elevada para 5,0mg de (+)-catequina, sob as mesmas condições de estudo, verificou-se uma melhora nos resultados, obtendo-se um restabelecimento das amplitudes dos espectros de frequência do eletroencefalograma em todas as regiões, com exceção do espectro β_1 na região parietal direita ($p=0,0560$) (tabelas 15 e 16; gráficos 7-12). Deste modo, com utilização desta dose, observamos uma possível melhora na ação citoprotetora da (+)-catequina em ratos com obstrução das artérias carótidas comuns. Estes resultados sugerem que a ação é provavelmente dose-dependente.

Com a administração de solução salina 0,9%, sob as mesmas condições, verificamos que não houve uma alteração significativamente

estatística das amplitudes absolutas médias dos espectros de frequência do eletroencefalograma secundária à isquemia (tabelas 07 e 08; gráficos 01–06). Estes resultados sugerem que a solução salina 0,9% utilizada na diluição da droga não interferiu nos resultados.

A reversão da depressão das amplitudes dos diversos espectros do eletroencefalograma no modelo de isquemia cerebral proporcionada pela infusão intracarotídea de (+)-catequina nas diversas doses estudadas pode ser interpretada como sendo decorrente de sua ação inibidora do estresse oxidativo, principalmente relacionado às espécies reativas do oxigênio.

É possível que esta ação de recuperação das alterações eletrofisiológicas pós-isquemia, pelo menos em parte, possa ter relação com a atividade anti-radicaís livres do oxigênio provocada pela (+)-catequina.

CONCLUSÃO

6.0 CONCLUSÃO

Os conhecimentos disponíveis na literatura especializada, aliados à interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho permitiram inferir as seguintes conclusões:

1. O modelo experimental de isquemia cerebral utilizado no presente estudo é adequado para o estudo de substâncias citoprotetoras no sistema nervoso central.
2. Foi possível, com o presente modelo experimental, avaliar a atividade citotóxica da isquemia cerebral, através da quantificação da redução das amplitudes absolutas médias dos espectros do eletroencefalograma, induzida por oclusão das artérias carótidas comuns em ratos Wistar e a ação citoprotetora da substância (+)-catequina.
3. Os resultados nos levam a sugerir que a (+)-catequina promoveu um efeito citoprotetor na isquemia cerebral induzida por obstrução das artérias carótidas comuns em ratos Wistar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K., ARAKI, T., and KOGURE, K. Recovery from edema and of protein synthesis differs between the cortex and caudate following transient focal ischemia in rats. *J. Neurochem.* v. 51, p. 1470 – 1476, 1988.

ADNER, M., JANSEN, I. and EDVISSON L. Endothelin-A receptors mediate contraction in human cerebral, meningeal and temporal arteries. *J. Auton. Nerv. Syst.* v. 49, *Suppl.*: S117 – S121, 1994.

ADNER, M., YOU, J. and EDVINSSON L. Characterization of endothelin-A receptors in the cerebral circulation. *Neuroreport* v. 4, p. 441 – 443, 1993.

ALKAYED, N. J. NARAYANAN, D. GEBREMEDHIN, M. MEDHORA, R. ROMAN, J. and HARDER D. R. Molecular characterization of na arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke* v. 27, p. 971 – 979, 1996.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart and stroke facts. Dallas, TX. 1991.

AMES, A. I., WRIGHT, R. L., KOWADA, M., THURSTON, J. M., and MAJNO, G. Cerebral Ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am. J. Pathol.* v. 52, p. 437 – 453, 1968.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogenes. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science.* v. 221, p. 1256 – 1264, 1983.

AMRUTHESH, S. C., FALCK, J. R. and ELLIS E. F. Brain synthesis and cerebrovascular action of epoxygenase metabolites of arachidonic acid. *J. Neurochem.* v. 58, p. 503 – 510, 1992.

ARAI, H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBO, H. and NAKANISHI. S. Cloning and expression of a cDNA encoding na endothelin receptor. *Nature* v. 348, p. 730 – 732, 1990.

- ARAKI, T., KATO, H., INOUE, T., and KOGURE, K. Regional impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol.* v. 79, p. 501 – 505, 1990.
- ASTRUP, J., SYMON, L., BRANSTON, N. M., and LASSEN, N. A. Cortical evoked potential and extracellular K^+ and H^+ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* v. 8, p. 51 – 57, 1977.
- BACHEVALIER, J., and MEUNIER, M. Cerebral ischemia: are the memory deficits associated with hippocampal cell loss? *Hippocampus*, v. 6, p. 553 – 560, 1996.
- BARONE, F. C., SCHMIDT, D. B., HILLEGASS, L. M., PRICE, W. J., WHITE, R. F., FEUERSTEIN, G. Z., CLARK, R. K., LEE, E. V., GRISWOLD, D. E., and SARAU, H. M. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke* v. 23, p. 1337 – 1348, 1992.
- BAUERSACHES, J., M. HECKER, and R. BUSSE. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br. J. Pharmacol.* v. 113, p. 1548 – 1553, 1994.
- BAZAN, N. G. Arachidonic acid in the modulation of excitable membrane function and at the onset of brain damage. *Ann. NY. Acad. Sci.* v. 559, p. 1 – 16, 1989.
- BAZAN, N. G., FLETCHER, B. S., HERSCHMAN, H. R., and MUKHERJEE, P. K. Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 91, p. 5252 – 5256, 1994.
- BECKMAN, J. S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol.* v. 15, p. 53 – 59, 1991.
- BECKMAN, J. S., and KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* v. 271 (*Cell Physiol.* 40), p. C1424 – C1437, 1996.
- BENY, J. L., and VON DER WEID, P. Y. Hyperpolarizing factors. *Coronary Artery Dis.* v. 2, p. 300 – 306, 1991.

BILLIAR, T. R. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* v. 108, p. 603 – 605, 1995.

BLOCK, F., and SCHWARZ, M. Correlation between hippocampal neuronal damage and spatial learning deficit due to global ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 56, p. 755 – 761, 1997.

BOTHE, H. W., BOSMA, H. J., HOFER, H., HOSSMANN, K. A., and ANGERMEIER, W. F. Selective vulnerability of hippocampus and disturbances of memory storage after mild unilateral ischemia of gerbil brain. *Stroke*, v. 17, p. 1160 – 1163, 1986.

BRAQUET, P., SPINNEWYN, B., DEMERLE, C., HOSFORD, D., MARCHESSELLI, V., ROSSOWSKA, M., and BAZAN, N. G. The role of platelet-activating factor in cerebral ischemia and related disorders. *Ann. NY. Acad. Sci.* v. 559, p. 296 – 312, 1989.

BRAYDEN, J. E. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation. *Am. J. Physiol.* v. 259 (*Heart Circ. Physiol.* 28), p. H668 – H673, 1990.

BREDER, C. D., and SAPER, C. B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res.* v. 713, p. 64 – 69, 1996.

BRIAN, J. E., HEISTAD, D. D. and FARACI, F. M. Effects of carbon monoxide on rabbit cerebral arteries. *Stroke* v. 25, p. 639 – 644, 1994.

BRIERLEY J. Cerebral Hypoxia. In: Blackwood W, Corsellis J, eds. *Greenfield's neuropathology*. London: Edward Arnold, p. 43-85, 1976.

CAGGIANO, A. O., BREDER, C. D., and KRAIG, R. P. Long-term elevation of cyclooxygenase-2 but not lipoxygenase, in regions synaptically distant from spreading depression. *J. Comp. Neurol.* v. 376, p. 447 – 462, 1996.

CAMPBELL, W. B., GEBREMEDHIN, D., PRATT, P. F. and HARDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* v. 78, p. 415 – 423, 1996.

CAO, C., MATSUMURA, K., YAMAGATA, K. and WATANABE, Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 β : a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res.* v. 733, p. 263 – 272, 1996.

_____ Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain: its possible role in the febrile response. *Brain Res.* v. 697, p. 187 – 196, 1995.

CHAKRAVARTHY, B. K., GRUPTA, S., and GODE, K. D. Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan induced diabetic rats by (-)-epicatechin. *Life Sci.* v. 31, p. 2693 – 2697, 1982.

CHAN, P. H. Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: Role of CuZn-Superoxide dismutase. *J. Neurotrauma.* v. 9 (suppl. 2), p. S417 – S423, 1992.

_____ Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* v. 27, p. 1124 – 1129, 1996.

CHAO, L. L., and KNIGHT, R. T. Contribution of humanprefrontal cortex to delay performance. *J. Cogn. Neurosci.* v. 10, p. 167 – 177, 1998.

CHEN, G., and CHEUNG, D. W. Modulation of endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in rat mesenteric artery by cytochrome P450 enzyme activity. *Circ. Res.* v. 79, p. 827 – 833, 1996.

CHEN, G., YAMAMOTO, Y., MIWA, K. and SUZUKI, H. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *Am. J. Physiol.* v. 260 (Heart Circ. Physiol. 29), p. H1888 – H1892, 1991.

CHICHIBU, S., OHTA, Y., CHIKUGO, T., and SUZUKI, T. Temporal and spatial properties of slow waves in the electroencephalogram of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.*, v. 1, p. S288 – S289, 1995.

CHOI, D. W. Cerebral hypoxia: Some new approaches and unanswered questions. *J. Neurosci.* v. 10, p. 2493 – 2501, 1990.

CHOID, D. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* v. 7, p. 369 – 379, 1987.

CLARK, R. K., LEE, E. V., WHITE, R. F., JONAK, Z. L., FEUERSTEIN, G. Z., and BARONE, F. C. Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. *Brain Res. Bull.* v. 35, p. 387 – 392, 1994.

COHEN, R. A., and P. M. VANHOUTTE. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic cGMP. *Circulation* v. 92, p. 3337 – 3349, 1995.

COLLACO-MORAIS, Y., ASPEY, B., HARRISON, M., and DE BELLEROCHE, J. Cyclooxygenase-2 messenger RNA induction in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 16, p. 1366 – 1372, 1996.

COOPER, H. K., ZALEWSKA, T., HOSSMANN, K.-A., and KLEIHUES, P. The effect of ischemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. *J. Neurochem.* v. 28, p. 929 – 934, 1977.

DANIEL, W. W. *Biostatistic: a foundation for analysis in the health sciences.* 5th ed. New York: John Wiley, cap. 11: Nonparametric and distribution-free statistics, p. 576 – 630, 1991a.

_____. *Biostatistic: a foundation for analysis in the health sciences.* 5th ed. New York: John Wiley, cap. 6: Hypothesis testing, p. 218 – 225, 1991b.

De JONG, R. N. Medullary and related syndromes. In: De JONG, R. N. (Ed.) *The neurologic examination.* Cambridge: Haper & Row, cap. 18, p. 256 – 267; 1999.

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

DIENEL, G. A., PULSINELLI, W. A., and DUFFY, T. E. Regional protein synthesis in rat brain following acute hemispheric ischemia. *J. Neurochem.* v. 35, p. 1216 – 1226, 1980.

Do VALE, O. C. Avaliação eletrofisiológica da ação dos antioxidantes glutatona e ácido α -lipóico em um modelo animal de isquemia cerebral. *Tese para obtenção do grau de doutor em Farmacologia*, Universidade Federal do Ceará, 2000.

Do VALE, O. C., FONTELES, D.S.R., and FONTELES, M.C. Electrophysiological studies in a cerebral ischemic model of the anesthetized rat. *J. Brain Sci.* v. 24, p. 88-100, 1998.

Do VALE, O. C., FONTELES, D.S.R., CABRAL, F. R., TEIXEIRA, M. D. A., and FONTELES, M.C. Electrophysiological Effects of Glutathione in an Animal Model of Cerebral Ischemia. *Research Communications in Biological Psychology and Psychiatry*, June 2001.

EDVINSSON, L., MACKENZIE, E. T., McCULLOCH, J. Cerebral blood flow and metabolism. *New York: Raven Press* p. 161-168. 1993.

EKLÖF, B., and SIESJÖ, B. K. The effect of bilateral carotid artery ligation upon acid-base parameters and substrate levels in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.* v. 86, p. 528 – 538, 1972.

ERECINSKA, M., and SILVER, I. A. Calcium handling by hippocampal neurons under physiologic and pathologic conditions. In: SIESJÖ, B. K., WIELOCH, T. (Eds.) *Advances in neurology: cellular and molecular mechanisms of ischemic brain damage*. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 71, p. 119 – 136, 1996.

FELETOU, M., and VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* v. 23, p. 1082 – 1090, 1996.

FEURSTEIN, G., and MILLER, A. Vasoactive mediators of cerebral vessels, in *Primer on Cerebrovascular Diseases* (Welsh M., Caplan L., Sijsjo B., Weir B. and Reis D. J., eds) Academic, San Diego, CA. p. 8 – 13, 1997.

FLAMM, E. S., DEMOPOULOS, H. B., SELIGMAN, M. L., POSER, R.G., and RASONOFF, J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, v. 9, p. 445 – 447, 1978.

FREIG, D. I., and LOEB, L. A. Oxygen radical induced mutagenesis in DNA polymerase specific. *J. Mol. Biol.* v. 235, p. 33 – 41, 1994.

FUKUYO, M., HARA, Y., and MURAMATSU, K. Effect of tea leaf catechin, (-)-epicatechin gallate, on plasma cholesterol level in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* v. 39, p. 495 – 500, 1986.

FURCHGOTT, R. F., and ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, p. 373 – 376, 1980.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* v. 14, p. 60 – 67, 1991.

GEBREMEDHIN, D., MA, Y. H., FALCK, J. R., ROMAN, R. J., VANROLLINS, M. and D. R. HARDER. Mechanism of action of cerebral epoxieicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* v. 263 (*Heart Circ. Physiol.* 32), p. H519 – H525, 1992.

GINSBERG, M. Metabolic responses to cerebral ischemia. *Cerebrovasc. Brain Meta. Rev.* v. 2, p. 58 – 93, 1990.

GIONET, T. X., THOMAS, J. D., WARNER, D. S., GOODDLETT, C. R., WASSERMAN, E. A., and WEST, J. R. Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. *Stroke*, v. 22, p. 1040 – 1047, 1991.

GOTO, K., HAMA, H. and KASUYA, Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn. J. Pharmacol.* v. 72, p. 261 – 290, 1996.

GRAY, G. A., and WEBB, D. J. The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* v. 72, p. 109 – 148, 1996.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, v. 52, p. 253-265, 1994.

HANSEN, A. J. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* v. 65, p. 101 – 148, 1985.

HARMAN, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 78, p. 7124 – 7128, 1981.

HASEGAWA, H., OKUDA, S., MATSUOKA, Y. SAKAMOTO, Y. KOJIMA, S., and KUBOTA, K. Protection by tea catechin of nerve cell damage. *Folia Pharmacol. Japon.* v. 100, p. 6P, 1992.

HATANO, T., EDAMATSU, R., HIRAMATSU, M., MORI, A., FUJITA, Y., YASUHARA, T., YOSHIDA, T. and OKUDA, T. Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* v. 37, p. 2016 – 2021, 1989.

HORI, S., KOMATSU, Y., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N. and NAKANISHI, S. Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology* v. 130, p. 1885 – 1895, 1992.

HOSSMANN, K., and KLEIHUES, P. Reversibility of ischemic brain damage. *Arch. Neurol.* v. 29, p. 375 – 384, 1973.

HOSSMANN, K-A. Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation.* v. 26, p. 225 – 235, 1993.

HSU, C. Y., LIU, T. H., XU, J., HOGAN, E. L., CHAO, J., SUN, G., TAI, H. H., BECKMAN, J. S., and FREEMAN, B. A. Arachidonic acid and metabolites in cerebral ischemia. *Ann. NY Acad. Sci.* v. 559, p. 282 – 295, 1989.

HUGON, J., VALLAT, J. M., and DUMAS, M. Rôle du glutamate et de l'excitotoxicité dans les maladies neurologiques. *Rev. Neurol.*, v. 152, p. 239-248, 1996.

IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain damage. *Trends Neurosci.* v. 20, p. 132 – 138, 1997.

IADECOLA, C. Cerebral circulatory dysregulation in ischemia, in *Cerebrovascular Diseases* (Ginsberg M. D., and Bogousslavsky J., eds.), Blackwell, Cambridge, MA. p. 319-332, 1998.

IADECOLA, C., ZHANG, F., NOGAWA, S., and ROSS, M. E. Post-ischemic gene expression and cerebral ischemia damage: Role of inducible nitric oxide synthase in: *Frontiers in Cerebrovascular Disease: Mechanisms, Diagnosis and Treatment* (Robertson, J.T. and Nowak, t. s., eds.) New York, Futura Publications, p. 299 – 313, 1998.

IKEDA, Y., and LONG, D. M. Molecular basis of brain injury and edema. Role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*. v. 27, p. 1 – 11, 1990.

JOHANSEN, F. F., and DIEMER, N. H. Temporal profile of interneuron and pyramidal cell protein synthesis in rat hippocampus following cerebral ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* v. 81, p. 14 – 19, 1990.

KAMIYA, T., JACEWICZ, M., PULSINELLI, W.A., and NOWAK, T. S., JR. CBF thresholds for RNA and protein synthesis after focal ischemia and the effect of MK-801. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 15, p. S1, 1995.

KATUSIC, Z. S. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radical Biol. Med.* v. 20, p. 443 – 448, 1996.

KETTY, S. S. The general metabolism of the brain in vivo. In: *RICHTER, D. (Ed) The metabolism of the nervous system*. London: Pergamon Press, p. 221-237. 1957.

KIM, J. S., GAUTAM, S. C., CHOPP, M., ZALOGA, C., JONES, M. L., WARD, P. A., and WELCH, K. M. A. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in rat. *J. Neuroimmunol.* v. 56, p. 127 – 134, 1995.

KINOUCI, H., EPSTEIN, C. J., MIZUI, T., CARLSON, E., CHEN, S. F., and CHAN, P. H. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 88, p. 11,158 – 11,162, 1991.

KITAGAWA, K., MATSUMOTO, M., ODA, T., NIINOBE, M., HATA, R., HANDA, N., FUKUNAGA, R., ISAKA, Y., KIMURA, K., and MAEDA, H. Free radical generation during brief periods of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience* v. 35, p. 551 – 558, 1990.

KONTOS, H. A. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ. Res.* v. 57, p. 508 – 516, 1985.

KONTOS, H. A., WEI, E. P., ELLIS, E. F., JENKINS, L. W., POVLISHOCK, J.T., ROWE, G. T. and HESS, M. L. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.* v. 57, p. 142 – 151, 1985.

KRAIG, R., and CHESLER, M. Astrocytic acidosis in hyperglycemia and complete ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 10, p. 104 – 114, 1990.

LEFER, D. J., SCALIA, R., CAMPBELL, B., NOSSULI, T., HAYWARD, R., SALAMON, M., GRAYSON, J., and LEFER, A. M. Peroxynitrite inhibits leukocytes-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Clin. Invest.* v. 99, p. 684 – 691, 1997.

LIU, S. F., NEWTON, R., EVANS, T. W., and BARNES, P. J. Differential regulation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Clin. Sci.* v. 90, p. 301 – 306, 1996.

MACFARLANE, R., TASDEMIROGLU, E., MOSKOWITZ, M. A, UEMURA, Y., WEI, E. P., and KONTOS, H. A Chronic trigeminal ganglionectomy or topical capsaicin application to pial vessels attenuates postocclusive cortical hyperemia but does not influence postischemic hypoperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 11, p. 261 – 271, 1991.

MAINES, M. D. Carbon monoxide: an emerging regulator of cGMP in the brain. *Mol. Cell. Neurosci.* v. 4, p. 389 – 397, 1993.

MATSUMOTO, K., YAMADA, K., HAYAKAWA, T., SAKAGUCHI, T., and MOGAMI, H. Synthesis and processing in the gerbil brain after transient hindbrain ischemia. *Neurol. Res.* v. 12, p. 45 – 48, 1990.

MATSUZAKI, T., and HARA, Y. Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* v. 59, p. 120 – 134, 1985.

McCARRON, R. M. IL-1-induced prostacyclin production by cerebral vascular cells inhibits myelin basic protein-specific lymphocyte proliferation. *Cell. Immunol.* v. 145, p. 21 – 29, 1992.

MCCORD, J. M., and ROY, R. S. The pathophysiology of superoxide: Roles in inflammation and ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v. 60, p. 1346 – 1352, 1982.

MIES, G., ISHIMARU, S., XIE, Y., SEO, K., and HOSSMANN, K.-A. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 11, p. 753 – 761, 1991.

MITCHELL, J. A., LARKIN, S. and WILLIAMS, T. J. Cyclooxygenase-2 regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* v. 50, p. 1535 – 1542, 1995.

MOHR, J. P., CAPLAN, L. R., MELSKI, J. W., GOLDSTEIN, R. J., DUNCAN, G. W., KISTLER, J. P., PESSIN, M. S., and BLEICH, H. L. The Harvard Cooperative Stroke Registry: a prospective registry. *Neurology* v. 28, p. 754 – 762, 1978.

MOMBOULI, J.-V., BISSIRIOU, I., AGBOTON, V. D., and VANHOUTTE, P. M. Bioassay of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 221, p. 484 – 488, 1996.

MONCADA, S., and HIGGS, E. A. Molecular mechanisms and therapeutics strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* v. 9, p. 1319 – 1330, 1995.

MONMAUR, P., THOMSON, M. A., M'HARZI, M. Temporal changes in hippocampal theta activity following twenty minutes of forebrain ischemia in the chronic rat. *Brain Res.* v. 378, p. 262 – 273, 1986.

MOORE, S. A., SPECTOR, A. A., and HART, M. N. Eicosanoid metabolism in cerebromicrovascular endothelium. *Am. J. Physiol.* v. 254 (*Cell Physiol.* 23), p. C37 – C44, 1988.

MORGAN, Z. S., SQUIRE, L. R., REMPEL, N. L., CLOWER, R. P., and AMARAL, D. G. Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *J. Neuroscience.* v. 12, p. 2582 – 2596, 1992.

NARUSE, S., HORIKAWA, Y., TANAKA, C., HIRAKAWA, K., NISHIKAWA, H., and VATARI, H. In vivo measurement of energy

metabolism and the concomitant monitoring of electroencephalogram in experimental cerebral ischemia. *Brain Res.*, v. 296, p. 370 – 372, 1984.

NISHIMURA, T., FUKUCHI, K., HAYASHIDA, K., HIROSE, Y., and IWAMOTO, B. Decreased hippocampal blood flow related to memory impairment after cardiovascular surgery: assessment by reconstructed SPECT parallel to the longitudinal axis of the hippocampal formations. *Clin. Nucl. Med.*, v. 23, p. 356 – 360, 1998.

NOWAK, T. S., JR., FRIED, R. L., LUST, W. D., and PASSONNEAU, J. V. Changes in brain energy metabolism and protein synthesis following transient bilateral ischemia in the gerbil. *J. Neurochem.* v. 44, p. 487 – 494, 1985.

OBRENOVITCH, T., SARNA, G., and SYMON, I. Ionic homeostasis and neurotransmitter changes in ischemia. In: *Krieglstein, J., Oberpichler, H., eds. Pharmacology of cerebral ischemia. Stuttgart: WVS, p. 97 – 112, 1990.*

OKUDA, T., KIMURA, Y., YOSHIDA, T., HATANO, T., OKUDA, H., and ARACHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medical plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem. Pharm. Bull.* v. 31, p. 1625 – 1631, 1983.

OLIVER, C. N., STARKE-REED, P.E., STADTMAN, E.R., LIV, G.J., CARNEY, J. M., and FLOYD, R. A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radical during ischaemia reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 5144 - 5147, 1990.

OYANAGUI, Y. Progress of active oxygen research in infalmmation. *JPN. J. Inflammation.* v. 12, p. 9 - 18, 1992.

PENNICA, D., NEDWIN, G. E., HAYFLICK, J. S., SEEBERG, P. H., DERYNCK, R., PALLADINO, M. A., KOHR, W. J., AGGARWARL, B. B., and GOEDDLE, D. V. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, v. 312, p. 724 – 729, 1984.

PLUM, F. What causes infarction in the ischemic brain? The Robert Watenberg Lecture. *Neurology* v. 33, p. 222 – 233, 1983.

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

PULSINELLI, W., and DUFFY, T. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.* v. 40, p. 1500 – 1503, 1983.

PULSINELLI, W., BRIERLY, J., and PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Am. Neurol.* v. 11, p. 491 – 498, 1982.

RUBANYL, G. M. and POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Parmacol. Ver.* v. 46, p. 325 – 415, 1994.

SAKANAKA, S., KIM, M., TANIGUCHI, M., and YAMAMOTTO, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutant*, a carcinogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem.* v. 53, p. 2307 – 2311, 1989.

SAMDENI, A. F., DAWSON, T. M., and DAWSON, V. L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke.* v. 28, p. 1283 – 1288, 1997.

SEUBERT, P., LEE, K., and LYNCH, G. Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. *Brain Res.* v. 492, p. 366 – 370, 1989.

SHAW, C. M., and ALVORD, E. C. Jr. Neuropathology of the limbic system. *Neuroimaging Clin. North Am.*, v. 7 p. 101 – 142, 1997.

SHIBATA, M., PARFENOVA, H., ZUCKERMANN, S. L., SEYER, J. M., KRUEGER, J. M. and LEFFLER, C. W. Interleukin-1 β peptides induce cerebral pial arteriolar dilation in anesthetized newborn pigs. *Am. J. Physiol.* v. 268 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 37), p. R1044 – R1050, 1996.

SHIGETA, M., JULIN, P., ALMKVIST, O., BASUN, H., RUDBERG, G. U., and WAHLUND, L. O. EEG in successful aging; a 5 year follow-up

study from the eighth to ninth decade of life. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* v. 95, p. 77 – 83, 1995.

SIESJÖ, B. K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* v. 77, p. 169 – 184, 1992.

SIESJÖ, B. K., and BENGTSSON, F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 9, p. 127 – 140, 1989.

SIESJÖ, B. K., KRISTIÁN, T., and KATSURA, K-I. Overview of bioenergetic failure and metabolic cascades in brain ischaemia. In: GINSBERG, M. D., BOGOUSSLAVSKY, J. (Eds) *Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis and management. Massachusetts: Blackwell Science*, p. 3-13. 1998.

SIESJÖ, B., AGARDH, C. D., and BENGTSSON, F. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* v. 1, p. 165 – 211, 1989.

SIMIC, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* v. 202, p. 377 – 386, 1988.

SMITH, W. L., GARAVITO, R. M., and DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* v. 271: p. 33157 – 33160, 1996.

STEINBERG, D., PARTHASARATHY, S., CAREW, T. E., KHOO, J. C., and WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* v. 320, p. 915 – 924, 1989.

SUZUKI, R., YAMAGUCHI, T., and KLATZO, I. The effects of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils: II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropathol.*, v. 60, p. 217 – 222, 1983.

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

TAMURA, A, GRAHAM, D, I., McCULLOCH, J., and TEASDALE, G. M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [14C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 1, p. 61 – 69, 1981.

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition.* v. 16, p. 716 – 718, 2000.

TOGASHI, H., KIMURA, S., MATSUMOTO, M., YOSHIOKA, M., MINAMI, M., and SAITO, H. Cholinergic changes in the hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, v. 27, p. 520 – 526, 1996.

TRAYSTMAN, R. J., KIRSCH, J. R., and KOEHLER, R. C. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.* v. 71, p. 1185 – 1195, 1991.

UCHIDA, S., IKARI, N., OHTA, H., NIWA, M., NONAKA, G., NISHIOKA, I. and OZAKI, M. Inhibitory effects of condensed tannins on angiotensin converting enzyme. *Jpn. J. Pharmacol.* v. 43, p. 242 – 246, 1987.

URBAN, L., NEILL, K. H., CRAIN, B. J., NADLER, J. V., and SOMJEN, G. G. Postischemic synaptic excitation and N-methyl-D-aspartate receptor activation in gerbils. *Stroke*, v. 21, suppl. 3, p. 3 – 27, 1990a

_____ Effects of transient forebrain ischemia in area CA1 of the gerbil hippocampus: an in vitro study. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 268, p. 491 – 500, 1990b.

VINGERHOETS, F., and BOGOUSLAVSKY, J. Silent strokes. In: GINSBERG, M. D., and BOGOUSLAVSKY, J. (Eds.) *Cerebrovascular disease: Pathophysiology, diagnosis and management*. Massachusetts: Blackwell Science, p. 1182 – 1186, 1998.

WADMAN, S. A., and MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* v. 39, p. 163 – 196, 1987.

WILLIAMS, C. S., and DUBOIS, R. N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am. J. Physiol.* v. 270 (Gastrointest. Liver Physiol. 33), p. G393 – G400, 1996.

WOODS, B. T., SCHOENE, W., and KNEISLEY, L. Are hippocampal lesions sufficient to cause lasting amnesia? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v. 45, p. 243 – 246, 1982.

WU, K. K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv. Pharmacol.* v. 33, p. 170 – 207, 1995.

XIE, Y., MIES, G., and HOSSMANN, K.-A. Ischemic threshold of brain protein synthesis after unilateral carotid artery occlusion in gerbils. *Stroke* v. 20, p. 620 – 626, 1989.

XU, J., QU, Z. X., MOORE, S. A., HSU, C. Y., and HOGAN, E. L., Receptor-linked hydrolysis of phosphoinositides and production of prostacyclin in cerebral endothelial cells. *J. Neurochem.* v. 58, p. 1930 – 1935, 1992.

YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. and MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* v. 332, p. 411 – 415, 1989.

YANG, S. T., MAYLAN, W. G., FARACI, F. M., and HEISTAD, D. D. Endothelium-dependent responses of cerebral blood vessels during chronic hypertension. *Hypertension*, v. 17, p. 612 – 618, 1991.

YOSHIMINE, T., HAYAKAWA, T., KATO, A., YAMADA, K., MATSUMOTO, K., USHIO, Y., and MOGAMI, H. Autoradiographic study of regional protein synthesis in focal cerebral ischemia with TCA wash and image subtraction techniques. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* v. 7, p. 387 – 393, 1987.

YUE, T. L., and FEUERSTEIN, G. Z. Platelet-activating factor: a putative neuromodulator and mediator in the pathophysiology of brain injury. *Crit. Rev. Neurobiol.* v. 8, p. 11 – 24, 1994.

ZAGREAN, L., VATASESCU, R., OPRICA, M., NITIU, O, and FERECHEDE, D. A comparative study of EEG suppressions induced by global ischemia and anoxia. *Rom. J. Physiol.* v. 32, p. 1 – 4, 1995.

ZAKHARY, R., GAINE, S. P., DINERMAN, J. L., RAUT, M., FLAVAHAN, N. A. and SNYDER, S. H. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 93, p. 795 – 798, 1996.

ZWEIER, J.L., FLAHERTY, J. T., and WEISFELDT, M. L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischaemia myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 1404 - 1407, 1987.