

ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL EN GERBILS: EVALUACIÓN DEL NIVEL DE ANASTOMOSIS En EL CÍRCULO DE WILLIS

Nelvys Subirós Martínez^{1*}, Jorge Martín Machado¹, Héctor Pérez Saad¹, Jorge A. Berlanga Acosta¹, Gerardo García Illera¹, José Suárez Alba¹, and Diana García del Barco Herrera¹

¹Departamento de Farmacéuticos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba

Correo electrónico: Nelvys.subiros@cigb.edu.cu

RESUMEN

El jerbo de Mongolia se ha utilizado ampliamente como modelo de isquemia cerebral global debido a su círculo de Willis incompleto. Sin embargo, la variabilidad inter-individual anatómica de esta estructura vascular interfiere con la confiabilidad del modelo. El objetivo de este trabajo fue introducir modificaciones en el protocolo de los experimentos con este modelo para aumentar la confiabilidad y utilidad de este modelo. Nuestro estudio se centró en la evaluación del nivel de anastomosis del círculo de Willis con el fin de evaluar su contribución a los resultados clinicopatológicos. Se establecieron los grupos: Falso operados, Isquémicos, e Isquémicos+Hipotermia. Los animales isquémicos se sometieron a 15 minutos de oclusión de las arterias carótidas comunes. A las 72 horas se perfundieron con solución de azul de bromofenol / gelatina. Los cerebros se procesaron para el análisis anatomopatológico. Se observó daño en hipocampo, núcleo caudado-putamen, neocórtex, y núcleos del tálamo de los animales del grupo Isquémico. En el círculo de Willis de los animales falso operados se encontraron animales con arterias comunicantes posteriores bilaterales (38%), unilaterales (48%) o sin ellas (14%). Una correlación negativa entre el volumen del infarto y el nivel de anastomosis se demostró en el grupo Isquémico, pero no en el grupo isquémico + Hipotermia. Se confirmó que el volumen de infarto disminuyó en el grupo isquémico + hipotermia en comparación con el grupo isquémico. Dado que el nivel de la anastomosis

no se puede predecir, esta variable necesariamente debe evaluarse al analizar los resultados de este modelo.

INTRODUCCIÓN

El jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) se ha utilizado ampliamente como un modelo de isquemia cerebral global tanto para la elucidación de los mecanismos subyacentes de la enfermedad así como para la evaluación preclínica de agentes neuroprotectores (Kirino 1982, Traystman 2003). Levine y Sohn fueron los primeros en describir que la mayoría de los jerbos de Mongolia carecen de arterias comunicantes posteriores (PComA) que conectan los sistemas arteriales carotídeo y vertebrobasilar (Levine y Sohn 1969). La estructura vascular resultante de estas anastomosis se conoce como círculo de Willis, y está situado en la base del cerebro (Kenney 1998). Por lo tanto, se espera que una oclusión bilateral de las carótidas comunes resulte en isquemia cerebral global. Estas ideas han prevalecido como dogma y el jerbo de Mongolia ha trascendido debido a su círculo de Willis incompleto.

El modelo de isquemia cerebral en jerbos se basa habitualmente en una oclusión bilateral de las carótidas comunes durante 5 minutos, lo que restringe los cambios histopatológicos a la región CA1 del hipocampo dorsal (Kirino 1982). Sin embargo, el principal problema de este modelo es su falta de reproducibilidad, probablemente debido a la variabilidad anatómica del círculo de Willis encontrada en las diferentes poblaciones de jerbos de Mongolia (Laidley et al. 2005, Seal et al. 2006). Esa podría ser la principal dificultad en la obtención de daño bilateral reproducible en el hipocampo, especialmente si se utiliza una oclusión de corta duración (Laidley et al. 2005). Por lo tanto, se puede suponer razonablemente que al aumentar el tiempo de oclusión y el seguimiento del nivel de anastomosis en el círculo de Willis daría lugar a un modelo más robusto y confiable de isquemia cerebral global. La relativa simplicidad del procedimiento merece tener en cuenta esta recomendación.

El objetivo de este trabajo fue modificar el modelo de isquemia cerebral global en jerbos con el fin de obtener resultados más confiables. Específicamente, el tiempo de oclusión se aumentó a 15 minutos, y se consideró la contribución del nivel de la anastomosis en el círculo de Willis a los resultados clinicopatológicos para la interpretación de los resultados. Se incluyó un grupo control positivo sometido a hipotermia, ya que este procedimiento es bien reconocido como una estrategia neuroprotectora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos con animales y su cuidado se llevaron a cabo de conformidad con las directrices establecidas por el Programa de Uso y Gestión de los Animales de Laboratorio para fines experimentales en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba). Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado Animal del CIGB (La Habana, Cuba).

Jerbos de Mongolia macho adultos (25 a 30 semanas de edad, *M. unguiculatus*, 73 ± 5 g de peso corporal) se obtuvieron del Centro Nacional de Cría de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Los animales fueron alojados y mantenidos bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso libre a comida y agua. A los jerbos se les permitió aclimatarse a las condiciones de laboratorio durante 1 semana antes de la intervención quirúrgica.

Daño isquémico /Falsos isquémicos

Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales: (1) Falsamente operado (n = 29), (2) Isquémicos (n = 53), y (3) Isquémicos + Hipotermia, (n = 11). Los jerbos se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg) y se realizó una incisión en la línea media ventral del cuello con el fin de exponer las arterias carótidas comunes. Se tuvo cuidado de no dañar el nervio vago (Colbourne et al. 1998). Los grupos isquémicos se sometieron a 15 minutos de oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes mediante el uso de micro-clips de aneurisma. Los animales Falsamente operados se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico, excepto por la oclusión de las arterias. Durante la cirugía y todo el tiempo de anestesia (2 horas), los grupos 1 y 2 se mantuvieron a $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, por medio de una manta térmica. La temperatura rectal se monitorizó de forma sistemática mediante el uso de un termómetro digital (Digi-Sense, Coleman Parmer, Barnant Company, EE.UU.). Los animales del grupo 3 se operaron sin ningún procedimiento de calentamiento, y la temperatura corporal se mantuvo a $32 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ durante todo el tiempo de anestesia. La temperatura ambiente fue de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Pruebas neurológicas

Para revelar signos clínicos de infarto, los animales se examinaron en 24, 48 y 72 horas después de la reperfusión, de acuerdo con los criterios propuestos por Lawner y coautores (1979), con algunas modificaciones. La puntuación asignada a cada animal se le llamó grado neurológico e incluyó la evaluación de la ptosis palpebral, la fuerza de

presión, el reflejo flexor, la postura del cuerpo, el patrón de marcha (incluyendo la velocidad al caminar y en circuito), la actividad de exploración y las convulsiones asociadas a la manipulación. A la condición normal se le asignó una puntuación de 0. Cuando el grado neurológico involucró convulsiones continuas o postración extrema, los animales se sacrificaron con el fin de evitar un sufrimiento innecesario.

Evaluación de la vasculatura y las lesiones

En el día 3, los animales se anestesiaron profundamente con éter dietílico y se perfundieron de manera trans-cardíaca con 7 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de 0,5 ml de solución de azul de bromofenol / gelatina 7% con el fin de teñir las arterias cerebrales (Wang et al . 2002, Seal et al. 2006). Los encéfalos se extrajeron rápidamente, se enfriaron en PBS a 0-4 °C e inmediatamente se cortaron en secciones coronales seriadas de 1 mm. El corte más caudal se hizo en -1,8 mm de bregma. La extracción del encéfalo y la realización de los cortes coronales se completaron en 10 minutos después de la perfusión. Estos cortes seriados se incubaron inmediatamente en completa oscuridad a 37°C durante 20 minutos en una placa tapada de fondo plano con solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 0,5%. Después de la tinción, las secciones se lavaron con PBS (tres lavados, 1 min cada uno) y se fijaron en formaldehído al 4% a temperatura ambiente para las evaluaciones histológicas.

Las secciones teñidas y el círculo de Willis (estudiado en la región caudal, de -1,8 mm a -6 mm de Bregma) se fotografiaron bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss, Stemi 2000, Alemania). Se evaluó y se fotografió la presencia de PComA, en caso de existir, para confirmar visualmente la anastomosis entre los sistemas arteriales carotídeo y vertebrobasilar. Después, todas las regiones del encéfalo se procesaron para el análisis histológico.

Análisis de imágenes y evaluación histológica

El diámetro de las arterias comunicantes se midió mediante el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU.). Se realizaron varias mediciones del diámetro de la arteria y el diámetro más pequeña se registró para el análisis.

El área de infarto también se midió utilizando el software ImageJ. Específicamente se tomaron los datos para las siguientes áreas: núcleo caudado-putamen, corteza cerebral, hipocampo y núcleos del tálamo. Finalmente, el volumen total de infarto se calculó

multiplicando el área de infarto por el grosor del corte. Después de la tinción con TTC, todos los cortes se sumergieron en parafina, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina-eosina para el examen histológico. La densidad neuronal se determinó en la región CA1 del hipocampo. Se digitalizó un campo regular de CA1 de ambos hemisferios (40 aumentos). El área total de cada imagen fue de 118 604 μm^2 . La viabilidad se evaluó de acuerdo con los siguientes criterios: núcleo muy bien delineado con forma elipsoide o redonda; nucléolo céntrico claramente distinguible dentro del núcleo; núcleo ligeramente más oscuro que neuropilo circundante; citoplasma neuronal claramente separado del neuropilo circundante y menos de un tercio de la neurona rodeado por vacuolización confluyente (Stummer et al. 1994).

Análisis estadístico

Se utilizaron los softwares GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.) y Statistica 8.0 (Statsoft, 2007). Los datos de supervivencia se analizaron utilizando la prueba de log-rank. Para cada grupo, la relación entre el nivel de la anastomosis y el volumen del infarto o grado neurológico se estudió calculando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Las diferencias en el volumen de infarto entre los grupos se evaluaron mediante análisis de covarianza (ANCOVA); el nivel de anastomosis se utilizó como covariable. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significación de 5% ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

Resultados clínicos e histopatológicos

Tres días después de la inducción de isquemia cerebral global por oclusión de las carótidas durante 15 minutos, hubo una tasa de mortalidad del 42% en el grupo Isquémico, lo que contrasta con la ausencia de muertes en el grupo Isquémico + Hipotermia. La mayoría de las muertes ocurrieron en las primeras 24 horas de isquemia, principalmente como consecuencia de crisis tónico-clónicas generalizadas. Esta tasa de mortalidad es similar a los de reportes anteriores (Stummer et al. 1994).

En cuanto a los síntomas neurológicos, algunos animales del grupo isquémico se manifestaron de manera hiperexcitable durante la manipulación en las primeras 24 horas después de la reperusión. A las 72 horas los principales signos neurológicos se relacionaron con anomalías en la marcha (dando vueltas, movimientos lentos), disminución de la fuerza de agarre y reducción del peso corporal. Ninguno de estos

síntomas se observaron en los animales del grupo Isquémico + Hipotermia o en los falsamente operados.

El análisis histopatológico de los animales falsamente operados mostró que todas las regiones cerebrales mantienen su morfología normal; incluso las neuronas piramidales CA1 del hipocampo se conservaron completamente (Fig. 1A, B). En todos los jerbos isquémicos, se observaron áreas de daño tisular en el núcleo caudado-putamen y en el hipocampo (Fig. 1A, C y Fig. 2). Cincuenta y dos por ciento de los animales mostró áreas bien definidas de necrosis en al menos una de las siguientes regiones: neocórtex, caudado-putamen núcleo, núcleos talámicos o hipocampo. En el resto de los jerbos isquémicos se evidenció muerte neuronal selectiva en el hipocampo y el núcleo caudado-putamen, mientras que las células gliales y endoteliales se conservaron parcialmente. El grupo Isquémico + Hipotermia no presentó ninguna zona necrótica (Fig. 1A, D y Fig. 3).

Evaluación de la anastomosis en el círculo de Willis cerebral

Las arterias comunicantes posteriores tenían un diámetro promedio de $36,4 \pm 12,4 \mu\text{m}$. La distribución de los animales con PComA unilateral, bilaterales o sin ellas en el círculo de Willis se muestra en la Tabla I. Es de destacar que todos los sobrevivientes del grupo isquémico tenían al menos una PComA, es decir, no había animales en este grupo con carencia de PComA en el momento de la evaluación de la vasculatura.

Se demostró una correlación negativa entre el volumen de infarto total y los diámetros de las PComA para el grupo Isquémico (Fig. 4A). Por el contrario, no se encontró esta correlación en el grupo Isquémico + Hipotermia (Fig. 4B). Cuando se compara el volumen del infarto en los grupos Isquémico y Isquémico + Hipotermia mediante un análisis de ANCOVA (considerando el nivel de la anastomosis como covariable), se demostró un área lesionada más pequeña para el último grupo ($F_1 = 33,2$, $p = 0,000003$) (Tabla II).

DISCUSIÓN

El círculo de Willis es una fuente importante de suministro de flujo sanguíneo colateral en el cerebro humano, y las variantes morfológicas del desarrollo son muy frecuentes en esta estructura vascular, en especial las relativas a las anastomosis en la circulación posterior (Cucchiara y Detre 2008, Manninen et al. 2009). Krabbe- Hartkamp y coautores (1998) encontraron un círculo posterior incompleto en 72 de 150 (48%)

voluntarios sanos utilizando imágenes de resonancia magnética. Esta variabilidad anatómica también es evidente en los roedores (Laidley et al. 2005, Seal et al. 2006).

Desde 1969, los jerbos de Mongolia fueron considerados el paradigma de un círculo de Willis incompleto, dada la ausencia de arterias comunicantes posteriores en esta estructura vascular. Esta característica promovió el uso extensivo de esta especie como modelo de isquemia cerebral global debido al procedimiento quirúrgico considerablemente simple. Sin embargo, algunos estudios publicados en la última década han cuestionado la reproducibilidad del modelo después del hallazgo de una mayor incidencia de arterias comunicantes posteriores en diferentes poblaciones de jerbos de Mongolia. Laidley y coautores (2005) han sugerido incluso que el jerbo de Mongolia debe desestimarse como modelo experimental de isquemia cerebral. Por otra parte, Wang y colaboradores (2002) establecieron un método de tamizaje en que los jerbos con diámetros de las PComA medianos a grandes se excluyen del análisis. Sin embargo, consideramos que este procedimiento puede no ser adecuado para las poblaciones de jerbos con un alto número de animales con PComA.

En este trabajo hemos demostrado que incluso los jerbos con un círculo de Willis completo mostraron lesión de los tejidos después de 15 minutos de oclusión de las carótidas. En un intento por aumentar la confiabilidad y utilidad de este modelo, hemos implementado dos modificaciones principales: en primer lugar, el tiempo de oclusión de las arterias carótidas se aumentó de 5 a 15 minutos, ya que la duración de la oclusión isquémica está fuertemente asociada con la severidad de la enfermedad cerebrovascular isquémica (Castillo y otros. 1999, Shuaib y Hussain 2008); y en segundo lugar, el control del nivel de la anastomosis en el círculo de Willis se incorporó a la rutina experimental y esta información se consideró para la interpretación de los resultados. El resultado de este enfoque fue un modelo más reproducible y severo de isquemia cerebral, que puede imitar una situación clínica.

Contribución de la anastomosis en el círculo de Willis a los resultados clínico-patológicos en la isquemia cerebral aguda global en jerbos

Cuando se considera la presencia de arterias comunicantes posteriores en la población de jerbos utilizada en este estudio, llama la atención que los animales isquémicos que carecen de anastomosis no sobrevivieron a las 72 horas después de la isquemia (Tabla I). El grado de reducción del flujo sanguíneo es una de las variables que determinan el alcance de los daños después de la isquemia cerebral (Lipton 1999). En jerbos

isquémicos que carecen de PComA la disminución del flujo sanguíneo es más notable que en el resto de los animales, por lo tanto se espera que el daño tisular sea mayor.

Un bajo nivel de anastomosis en el círculo de Willis se ha asociado a mayor daño neuronal del hipocampo después de 5 minutos de oclusión de las carótidas comunes (Laidley et al. 2005, Seal et al. 2006). Nosotros también encontramos una correlación negativa entre la anastomosis en el círculo de Willis y el volumen total de infarto en el grupo isquémico. Además, hemos demostrado que también con este tiempo de oclusión más largo, el nivel de anastomosis en el círculo de Willis determina la extensión del daño en las distintas regiones cerebrales del hipocampo (Fig. 4A).

La evaluación de la contribución del nivel de anastomosis en el círculo de Willis a los resultados clínico-patológicos podría permitir un análisis más realista cuando se estudian enfoques neuroprotectores. Para apoyar esta idea, se evaluaron los efectos de la hipotermia en el modelo de 15 minutos de isquemia cerebral global, ya que esta estrategia induce potentes mecanismos endógenos de neuroprotección (Linares y Mayer 2009, Macleod y otros. 2010). En el grupo de Isquémicos + Hipotermia, no se encontró correlación entre el nivel de anastomosis y el grado neurológico o el volumen de infarto.

Con respecto a la utilización del ANCOVA, este procedimiento tiene la ventaja de considerar el efecto de variables diferentes de los tratamientos sobre los resultados clínicos y patológicos y es una herramienta muy útil en la evaluación de estrategias neuroprotectoras en este modelo de isquemia cerebral global.

Las modificaciones introducidas en el modelo de isquemia cerebral global en jerbos de Mongolia aumentaron la severidad del modelo y nos permitió mejorar la interpretación de los resultados. La neuroprotección en este contexto representaría una prueba de principio adicional en apoyo de cualquier otra estrategia terapéutica potencial.

CONCLUSIÓN

En nuestra opinión, el modelo global de isquemia cerebral en jerbos de Mongolia debe continuar en uso, teniendo en cuenta la simplicidad de su procedimiento quirúrgico. Sin embargo, con el fin de reducir los posibles inconvenientes asociados con este modelo es esencial evaluar el nivel de anastomosis en el círculo de Willis de cada animal e incluir esta información en el análisis de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Castillo J, Martí-Vilalta JL, Martínez-Vila E, Matías-Guiu J (1999) Handbook of Cerebrovascular Diseases (in Spanish). Prous Science, Barcelona, ES.
- Colbourne F, Auer RN, Sutherland GR (1998) Behavioral testing does not exacerbate ischemic CA1 damage in gerbils. *Stroke* 29: 1967–1970.
- Cucchiara B, Detre J (2008) Migraine and cerebral circle of Willis anomalies. *Med Hypotheses* 70: 860–865.
- Kenney CA (1998) A historical review of the illustrations of the cerebral circle of Willis from antiquity to 1664. *J Biocommun* 25: 26–31.
- Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57–69.
- Krabbe-Hartkamp MJ, van der Grond J, de Leeuw FE, de Groot JC, Algra A, Hillen B, Breteler MM, Mali WP (1998) Cerebral circle of Willis: morphologic variation on three-dimensional time-of-flight MR angiograms. *Radiology* 207: 103–111.
- Laidley DT, Colbourne F, Corbett D (2005) Increased behavioral and histological variability arising from changes in cerebrovascular anatomy of the Mongolian gerbil. *Curr Neurovasc Res* 2: 401–407.
- Lawner P, Laurent J, Simeone F, Fink E, Rubin E (1979) Attenuation of ischemic brain edema by pentobarbital after carotid ligation in the gerbil. *Stroke* 10: 644–647.
- Levine S, Sohn D (1969) Cerebral ischemia in infant and adult gerbils. Relation to incomplete cerebral circle of Willis. *Arch Pathol* 87: 315–317.
- Linares G, Mayer SA (2009) Hypothermia for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Crit Care Med* 37: S243–S249.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews* 79: 1431–1568.
- Macleod MR, Petersson J, Norrving B, Hacke W, Dirnagl U, Wagner M, Schwab S (2010) Hypothermia for Stroke: call to action 2010. *Int J Stroke* 5: 489–492.
- Manninen H, Makinen K, Vanninen R, Ronkainen A, Tulla H (2009) How often does an incomplete cerebral circle of Willis predispose to cerebral ischemia during closure of carotid artery? Postmortem and clinical imaging studies. *Acta Neurochir (Wien)* 151: 1099–1105.
- Seal JB, Buchh BN, Marks JD (2006) New variability in cerebrovascular anatomy determines severity of hippocampal injury following forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain Res* 1073-1074: 451–459.
- Shuaib A, Hussain MS (2008) The past and future of neuroprotection in cerebral ischaemic stroke. *Eur Neurol* 59: 4–14.

Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O (1994) Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 25: 1862–1869.

Traystman RJ (2003) Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal* 44: 85–95.

Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY (2002) Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 958: 439–447.

ANEXOS

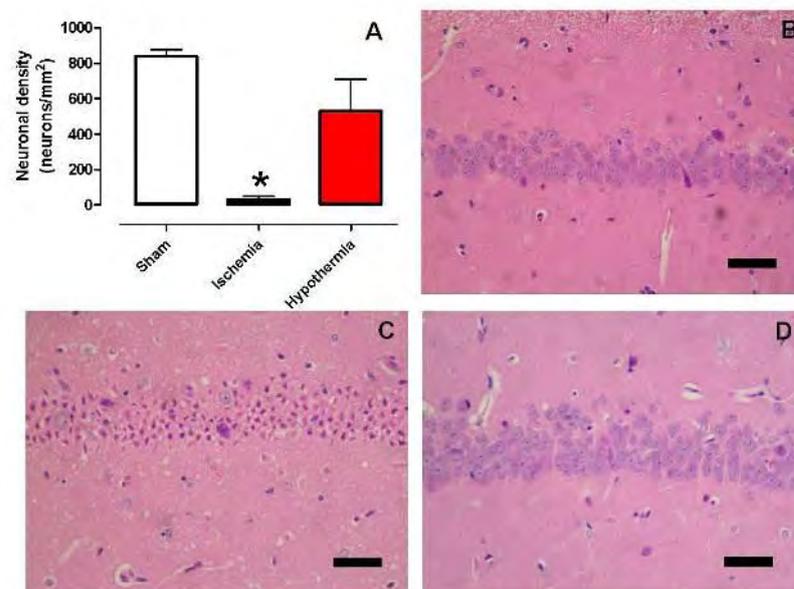


Fig. 1. (A) Neuronal density in the hippocampal CA1 region. (B) CA1 region of a Sham-operated animal. (C) CA1 region of an Ischemic animal. (D) CA1 region of an Ischemic + Hypothermia animal, showing a normal morphology. Scale bars are 50 μ m.

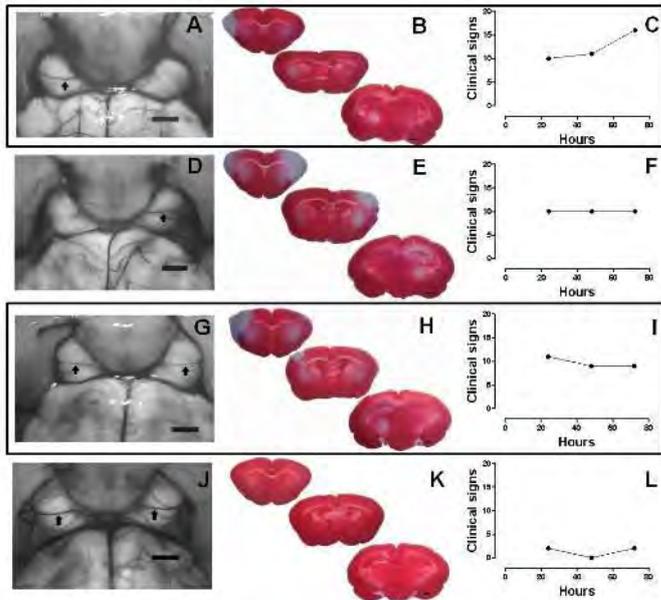


Fig. 2. Influence of the characteristics of the cerebral circle of Willis on infarct volume and clinical signs in four representative Ischemic animals. Each row corresponds to one animal. A, D, G, J: Posterior cerebral vasculature. B, E, H, K: TTC-stained serial slices. C, F, I, L: Clinical evolution of infarct signs. In the Ischemic group, all animals lacking both posterior communicating arteries (PComAs) died before 72 hours. Unilateral infarcts were found in the hemispheres with PComA deficiency (rows 1 and 2). In the cases of bilateral communication, the PComAs diameter influenced both the extent of injury and the clinical score (rows 3 and 4). The arrows indicate PComAs connecting both arterial systems. Scale bars are 1 mm.

Table I: Distribution of posterior communicating arteries (PComAs)

Experimental groups	No PComAs	Unilateral PComA	Bilateral PComA
Sham	14 %	48 %	38 %
Ischemic	0 %	56 %	44 %
Ischemic + Hypothermia	9 %	64 %	27 %

Percentages are referred to the total number of animals of each group

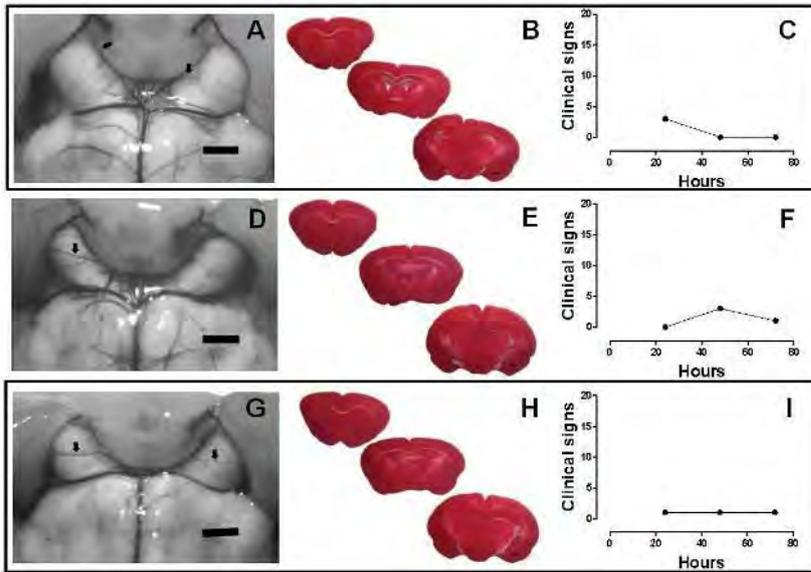


Fig. 3. Posterior cerebral vasculature (A, D, G), infarct lesions (B, E, H) and clinical evolution of infarct signs (C, F, I) of three representative Ischemic +Hypothermia animals. Each row corresponds to one animal. The hypothermic treated animal represented in the first row had no anastomosis between the arterial systems; the arrows indicate vessels that do not reach the carotid system. Second and third rows correspond to hypothermic animals with unilateral or bilateral anastomosis, with no infarct lesions and low clinical scores. The arrows indicate posterior communicating arteries connecting both arterial systems. Scale bars are 1 mm.

Table II. Clinical and morphological data of experimental groups

Experimental groups	Mortality (%)	Neurologica grade	Infart volume (mm ³)
Ischemic	42	8.1 ± 4.7	15.8 ± 14.3
Ischemic + hypothermia	0 *	1.2 ± 1.3 *	0.007 ± 0.02 *

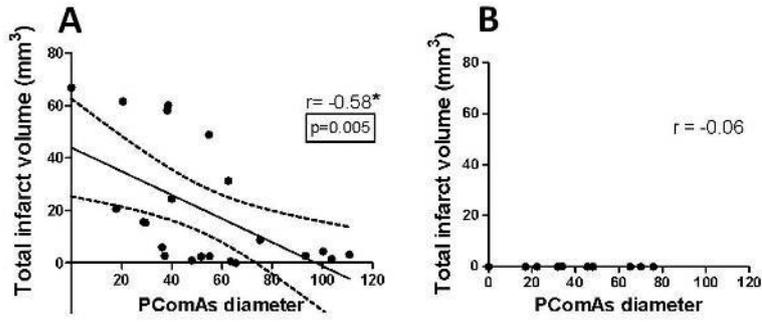


Fig. 4. Spearman's rank correlation between total infarct volume and diameter of the posterior communicating arteries in ISCH (A) and ISCH+Hypothermia (B) animals. (r) Spearman r.