

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

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DO GÂNGLIO CEREBRAL DO CARACOL  
*MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS* SUBMETIDO À ANOXIA EXPERIMENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***MÁRCIA PEITER***

PORTO ALEGRE  
2011

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

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DO GÂNGLIO CEREBRAL DO CARACOL  
*MEGALOBULIMUS ABBREVIATUS* SUBMETIDO À ANOXIA EXPERIMENTAL

**MÁRCIA PEITER**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Matilde Achaval Elena

PORTO ALEGRE

2011

*"Antes de ter amado um animal, parte  
de nossa alma permanece desacordada."*

*Anatole France*

# *Dedicatoria*

*"Aos meus pais Alceu Peiter (in memoriam) e*

*Leonir Helena Louza Peiter"*

## *Agradecimentos*

Agradeço primeiramente às pessoas que são parte de mim, minha mãe Leonir, meu pai Alceu (pela presença invisível, porém constante), às manas Andréia e Tatiana, que mesmo à distância, me apoiaram para a conclusão desse trabalho. À minha filhota de 4 patas, Meg, pelo amor incondicional há 7 anos, e sua mana Tiken, pelo carinho. E também às companheiras “roedoras” Pandora e Lilica.

Ao Everton, pelo amor, carinho e compreensão constantes, apesar dos quase mil quilômetros de distância.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Matilde Achaval Elena, pela orientação, colaboração e conhecimento.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Denise Zancan, pela confiança que depositou em mim, pela orientação, paciência, conhecimento e incentivo.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Wania Aparecida Partata, pelo apoio e sugestões.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Luciano Strümer de Fraga, pelo conhecimento e auxílio prestados.

À Christiane Lopes e Moema Queirós do CME, pela disponibilidade e contribuição.

À Silvia Barbosa pelo auxílio durante a Microscopia Eletrônica.

À Tutti, pela amizade que se iniciou no decorrer desses dois anos, pelos momentos de risos e também pelo empréstimo de ombro algumas vezes, e pelo apoio durante todo esse período.

À Naédia, pelo auxílio no início dos experimentos, por me apresentar o ultramicrotomo e me ajudar nas técnicas.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio e companhia: Bárbara, Taína, Malcon, Carol, Déia, Maira, Gustavo, Renan, Eliane. Obrigada pelos momentos de descontração!

Às amigas Lauren e Fernanda, por estarem sempre por perto, por todo o apoio, amizade, risadas, ensinamentos, enfim, pelo vínculo que criado por tempo indeterminado.

Aos meus colegas de mestrado, pelo apoio e amizade gerados durante o curso.

Aos demais colegas da turma da Neurociências (da qual eu me sentia parte, pelas tantas cadeiras que fiz).

À tia Ritinha, pelas delícias deixadas na geladeira em momentos estratégicos!

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia e Neurociências, pela dedicação e profissionalismo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que, de alguma maneira, contribuíram pra a realização deste trabalho.

# *Sumário*

Introdução.....	09
Objetivos.....	19
Material e Métodos.....	20
Resultados .....	23
Discussão.....	30
Conclusões.....	34
Legenda de Figuras.....	35
Anexos.....	38
Referências.....	44

O caracol *Megalobulimus abbreviatus* é uma espécie terrestre, com preferência por lugares protegidos, úmidos e possui hábitos noturnos. Durante fases de baixa umidade atmosférica, este caracol costuma enterrar-se, mantendo-se retraído em sua concha, cuja abertura permanece fechada por um envoltório mucoso. Com este comportamento o animal evita a perda excessiva de água durante o período de estivação, mas enfrentará o problema da reduzida disponibilidade de oxigênio. Devido à sua alta taxa de consumo de oxigênio, o cérebro é um dos primeiros órgãos afetados na anoxia. Enquanto algumas poucas espécies de vertebrados, e um número maior de invertebrados, podem sobreviver por períodos prolongados sem oxigênio, o mesmo não se verifica nos mamíferos e os eventos degenerativos ocorrem tão rapidamente após cessar o suprimento de oxigênio que dificulta o entendimento de todas as sequências de mudanças e de eventos bioquímicos e fisiológicos que possam estar ocorrendo. Existe considerável interesse na compreensão dos mecanismos que promovem a tolerância dos organismos à falta de oxigênio, uma vez que a hipóxia-isquemia é a principal causa de lesão tecidual cardíaca e cerebral. Neste trabalho, foram utilizados animais divididos em grupos e submetidos a tempos de 3h e 12h de anoxia, seguidos de 2 tempos de reoxigenação: 15h e 14 dias. Após o experimento, os gânglios cerebrais foram obtidos e seccionados em ultramicrótomo, seguido de análise em microscópio eletrônico de transmissão. Grupos controles apresentaram núcleos arredondados, com cromatina dispersa, aspecto homogêneo, citoplasma eletrolúcido e organelas com características normais. Grupos com 3h de anoxia apresentaram núcleos edematosos, com condensação de cromatina, com Membrana Nuclear (MN) íntegra. O Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) apresentou cisternas claras e poucos ribossomos livres, o Complexo de Golgi (CG) claro e com poucas vesículas, Mitocôndrias (M) pouco visíveis e Membrana Plasmática (MP) vacuolizada. A Célula Glial (CGI) mostrou condensação de cromatina. O grupo de 3h de anoxia com 15h de recuperação apresentou uma diminuição no edema, com ribossomos no interior do RER e

## *Resumo*

vesículas entre as cisternas do CG. As M apresentam-se escuras e conteúdo pouco visualizado. A MP continua vacuolizada e a CGI com mesmo aspecto do grupo 3h. Com 14 dias de recuperação, os neurônios apresentaram uma dispersão da cromatina e MN íntegra. Grande número de ribossomos dispersos pelo citoplasma e no RER. O CG tem suas cisternas dilatadas, e inúmeras vesículas nas suas proximidades. As M permanecem como no grupo 15h de recuperação. Observou-se também interação da CGI com a MP, formando vesículas com conteúdo. O grupo submetido à 12h de anoxia apresentou também núcleo edematoso, com condensação de cromatina e MN íntegra, porém mais demarcada devido ao conteúdo nuclear na periferia do núcleo. Citoplasma com grande número de ribossomos e RER. O CG apresenta poucas cisternas e vesículas próximas à ele. As M pouco observadas e a MP apresenta interação glial como no controle. O grupo com 15h de recuperação mostra o núcleo granuloso, com algumas invaginações na MN. RER com cisternas estreitas e poucos ribossomos, assim como o CG com poucas vesículas. As M são facilmente detectadas e em grande número. CGI semelhante aos demais grupos. Com 14 dias de recuperação, os neurônios já possuem características do controle, com grande quantidade de ribossomos livres e CG dilatados com muitas vesículas. As M aparecem como no grupo 15h recuperado e a MP apresenta-se como no controle.

### **Modelo experimental: o caracol *Megalobulimus abbreviatus***

As condições ambientais nas quais os animais estão expostos podem ser fatores limitantes para sua vida, fazendo com que sejam desenvolvidas estratégias que garantam sua sobrevivência, como esquiva, tolerância e dormência (BROOKS & STOREY, 1997). O Filo Mollusca inclui animais como mariscos, ostras, polvos, lulas e caramujos e constituem o maior filo de invertebrado além dos artrópodos. Está dividido em sete classes, sendo a Classe Gastropoda a que obteve maior sucesso, devido a grande variedade de habitats que conquistou. A sub-classe Pulmonata teve a cavidade do manto convertida em um pulmão, é nesta sub-divisão que está inserido nosso modelo experimental, o caracol *Megalobulimus abbreviatus* (RUPPERT & BARNES, 2005).

O caracol *Megalobulimus abbreviatus* é uma espécie terrestre, com preferência por lugares protegidos, úmidos e possui hábitos noturnos. Durante fases de baixa umidade atmosférica, este caracol costuma enterrar-se, mantendo-se retraído em sua concha, cuja abertura permanece fechada por um envoltório mucoso. Com este comportamento o animal evita a perda excessiva de água durante o período de estivação (JAEGER, 1965), mas enfrentará o problema da reduzida disponibilidade de oxigênio.

O sistema nervoso do caracol é formado por onze gânglios: um par de gânglios bucais, localizados anteriormente; um par de gânglios cerebrais (dorsal ao esôfago), um par de pedais (anterior ao esôfago), um par de pleurais, um par de parietais e um único gânglio visceral (posterior ao esôfago) (ZANCAN, 1994; ZANCAN, 1996). Estes gânglios formam um anel periesofágico. Este estudo está focado no gânglio cerebral, mais complexo, que é dividido em três áreas: pró-cérebro, mesocérebro e metacérebro (CHASE, 2002). O metacérebro também tem sido chamado de pós-cérebro (BULLOCK & HORRIDGE, 1965), sendo que esta divisão

subdivide-se em três lobos: pedal, pleural e comissural (ZANCAN *et al*, 1994; ZANCAN *et al*, 1997).

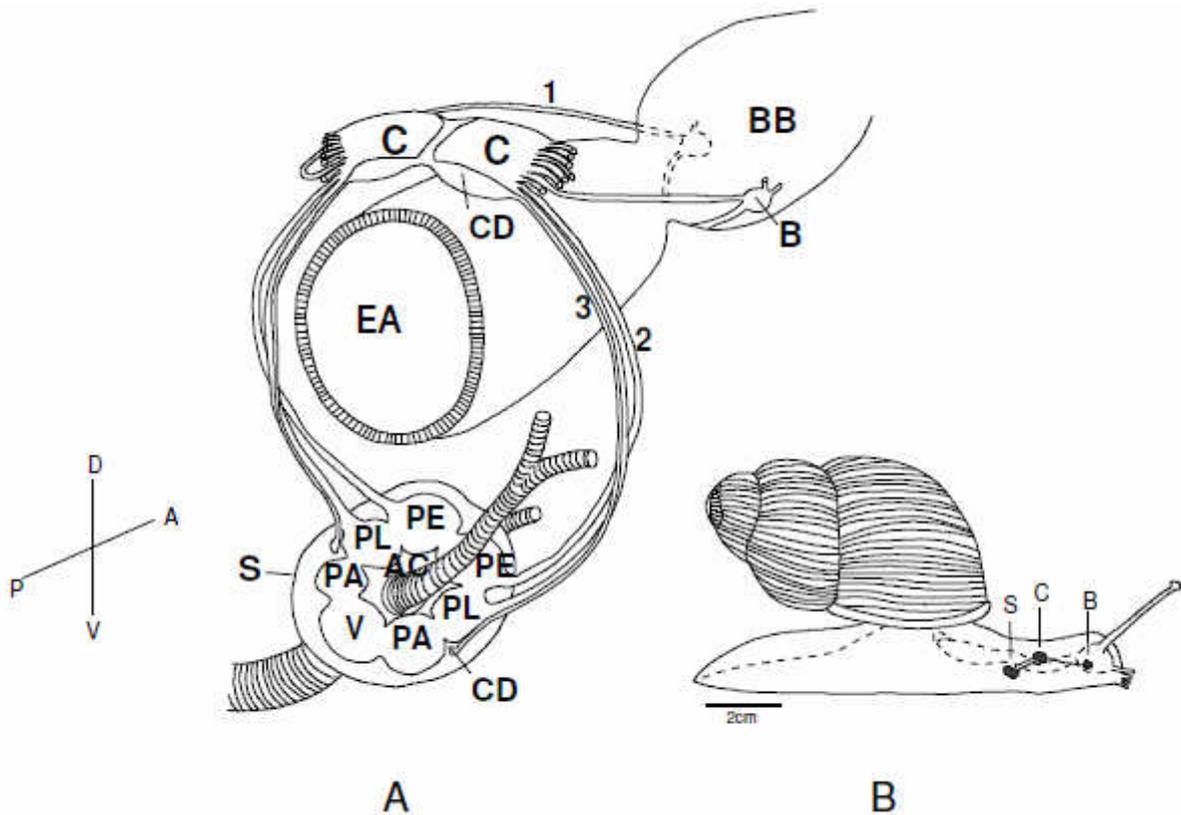


Figura 01. Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. **A:** Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. AC, artéria cefálica; BB, bulbo bucal; CD, corpo dorsal; EA, esôfago anterior; PA, gânglios parietais; PE, gânglios pedais; PL, gânglios parietais; V, gânglio visceral. Os gânglios bucais (B), cerebrais (C) e o complexo ganglionar subesofageal (S) estão unidos entre si pelos conetivos neurais cérebro-bucal (1), cérebro-pedal (2) e cérebro-pleural (3). **B:** Esboço de um caracol pulmonado, vista lateral com os pés estendidos, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (B), cerebrais (C) e do complexo ganglionar subesofageal (S). Orientação da figura: D: dorsal, V: ventral, P: posterior, A: anterior (ZANCAN, 1996).

Diversos estudos vêm sendo realizados com este molusco com relação à nocicepção (ACHAVAL *et al*, 2005; SWAROWSKY *et al*, 2005; KALIL-GASPAR *et al*, 2007; RIGON *et al*, 2009), alterações morfológicas no ciclo reprodutivo (HORN *et al*, 2005), metabolismo

## *Introdução*

do sistema nervoso central sob anoxia e reoxigenação (DE FRAGA et al, 2004; DE FRAGA, 2007 tese; DE FRAGA et al, 2010), caracterização de células gliais (DOS SANTOS et al, 2002; DOS SANTOSa et al, 2005; DOS SANTOSb et al, 2005), caracterização da concha (FARINA & ANDRADE, 2003), plexo e músculo pedal (FACCIONI-HEUSER *et al*, 1999; FACCIONI-HEUSER *et al*, 2004), vascularização e barreira hemolinfa-neural do sistema nervoso (NÓBLEGA *et al*, 2006), ultraestrutura de órgãos sensoriais (DAL PIVA, 2004), de músculos e proteínas contráteis (RIGON *et al*, 2009) e da glândula corpo dorsal (MORAES *et al*, 2010).

De maneira específica, os efeitos da anoxia e posterior reoxigenação por diferentes períodos sobre o sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, vêm sendo estudados por este grupo de pesquisa. De Fraga (2002) analisou o metabolismo de carboidratos no sistema nervoso deste animal, através de análise bioquímica e histoquímica, verificando concentrações de glicose livre, glicose hemolinfática, glicogênio e da enzima glicogênio fosforilase. Em trabalho posterior, em 2004, o mesmo autor analisou outras variáveis relacionadas ao metabolismo, assim como atividades enzimáticas, verificando redução nas atividades e possível ativação de mecanismo de depressão metabólica.

Em uma análise morfológica inicial (dados não publicados) realizada nos gânglios cerebrais de *Megalobulimus abbreviatus*, observa-se, em nível óptico, uma nítida alteração estrutural nos neurônios dos animais submetidos à anoxia experimental, como um aumento do volume celular, porém sem a subsequente ruptura e liberação dos conteúdos celulares, conferindo um aspecto de "aparente" reversibilidade (recuperação do aspecto celular basal) dessas alterações nos animais em que foi permitida a recuperação pós-anoxia. Parece surpreendente que quase inexistem estudos nas espécies tolerantes à anoxia que identifiquem as alterações celulares que caracterizam uma condição de lesão ou alteração reversível compatível com o caráter de tolerância a condições anóxicas que é atribuído a esses animais.

A vantagem adicional dos moluscos para este tipo de abordagem é o fato destes possuírem neurônios de grande tamanho ou agrupamentos neuronais facilmente identificáveis entre os gânglios dos diferentes indivíduos (CHASE, 2002) o que facilita uma análise comparativa morfofuncional tanto qualitativa como quantitativa para diferentes tratamentos.

### **Efeitos da falta de oxigênio sobre o tecido neural**

Devido à sua alta taxa de consumo de oxigênio, o cérebro é um dos primeiros órgãos afetados na anoxia (NILSSON & LUTZ, 2004). Enquanto algumas poucas espécies de vertebrados, e um número maior de invertebrados, podem sobreviver por períodos prolongados sem oxigênio, o mesmo não se verifica nos mamíferos e os eventos degenerativos ocorrem tão rapidamente após cessar o suprimento de oxigênio que dificulta o entendimento de todas as sequências de mudanças e de eventos bioquímicos e fisiológicos que possam estar ocorrendo (LUTZ *et al*, 1984).

### **Apoptose e Necrose**

Em toda a vida adulta, células do sistema nervoso de mamíferos (e provavelmente similar em outros organismos) morrem por vários mecanismos de morte celular programada. Um destes processos é a chamada apoptose, amplamente estudada. Algumas mudanças morfológicas podem ser observadas na apoptose, incluindo encolhimento da célula, formação de bolhas no citoplasma, fragmentação nuclear e condensação de cromatina, sendo preservadas estruturas como as mitocôndrias e retículos endoplasmáticos (SIEGEL, 2006).

Outro processo de morte celular é chamado de necrose, e neste também ocorrem alterações morfológicas importantes, tais como: inchaço celular, desarranjo de estruturas

como mitocôndria e retículos, perdendo duas funções e rompimento da membrana nuclear. A necrose diferencia-se da apoptose pelo fato de que a primeira ocorre após danos físicos traumáticos e acidente vascular cerebral, onde grande população de células morrem, enquanto a apoptose ocorre em células individuais, e as circunvizinhas sobrevivem (SIEGEL, 2006; KAMINSKI *et al*, 2003).

CHO *et al* (2010) e EASTMAN (1993) subclassificam a morte celular baseando-se em alterações morfológicas e bioquímicas. Morfologicamente, a apoptose apresenta encolhimento de toda a célula e organelas, enquanto na necrose ocorre um inchaço, sem mudanças significativas nas organelas. Na apoptose, ocorre condensação da cromatina, com formação de corpos apoptóticos e a membrana plasmática se mantém íntegra, enquanto na necrose, ocorre a ruptura da membrana.

Em resposta a um evento de hipóxia-isquemia cerebral em encéfalos de mamíferos, têm sido observadas duas formas de morte neuronal. Foi demonstrado que os neurônios das regiões nas quais a falta de oxigênio é mais severa sofrem necrose (ou necrose oncótica), enquanto que nas regiões circundantes, nas quais o fluxo sanguíneo não diminuiu totalmente, os neurônios podem sofrer tanto uma necrose ou uma forma de morte celular geneticamente controlada, dita apoptose, ou necrose apoptótica (BEILHARZ *et al.*, 1995; ZENG e XU, 2000; NORTHINGTON *et al.*, 2001). Em alguns casos, aspectos mistos de apoptose e necrose também foram descritos para os mesmos neurônios após uma lesão cerebral (MARTIN *et al.*, 1998). Como cada um dos tipos de morte celular podem envolver diferentes eventos moleculares e bioquímicos, a compreensão da natureza da morte celular após hipóxia ou a caracterização dos aspectos citológicos de pré-lesão reversíveis são importantes para determinar agentes terapêuticos eficientes.

Um estudo ultra-estrutural pode auxiliar no reconhecimento das alterações estruturais que indiquem lesões celulares reversíveis ou irreversíveis. WINKELMANN e colaboradores,

em 2003, e WINKELMAN (2006) realizaram uma análise ultraestrutural na área CA1 do hipocampo de ratos wistar, após isquemia cerebral global transitória. Esta análise permitiu classificar três fases de dano neuronal durante a isquemia: fase inicial, intermediária e final, e neurônios foram encontrados em todas estas fases de necrose oncótica. A vantagem da utilização de ultraestrutura é permitir a visualização de alterações morfológicas nas próprias organelas, facilitando o entendimento do processo como um todo.

Outro estudo envolvendo microscopia eletrônica realizado por PAGNUSSAT em 2005, também puderam verificar alterações morfológicas importantes em neurônios da área CA1 do hipocampo de ratos wistar, envolvendo necrose apoptótica e oncótica, com posterior recuperação, mesmo que aparente, após reperfusão.

SIEGEL (2006) descreve diferentes características de organelas em processo apoptótico. A mitocôndria, por exemplo, apresenta alterações de potencial de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de canais de potássio, aumento na captura de cálcio, aumento na permeabilidade da membrana e liberação de citocromo c e fator de indução a apoptose (AIF). Segundo BLOMGREN *et al* (2003), as mitocôndrias são reguladoras fundamentais no processo de morte celular e sobrevivência, devido ao seu papel no metabolismo energético e homeostase do cálcio, e também por liberar proteínas pró-apoptóticas.

Alterações dramáticas podem ser observadas na membrana plasmática, como encolhimento e formação de vacúolos. O critério para identificar uma célula em apoptose é a caracterização do núcleo, com a cromatina se tornando condensada e fragmentada.

O processo de necrose é caracterizado por um desbalanço de íons, resultando em edema celular, dilatação mitocondrial e do retículo endoplasmático rugoso, além de formação de vacúolos no citoplasma (SIEGEL, 2006). A célula, ao final, se rompe, extravasando seu conteúdo, provocando uma reação inflamatória e prováveis danos nas células vizinhas.

### **Animais tolerantes a anoxia**

Os vertebrados são, em geral, intolerantes à falta de oxigênio. Alguns podem sobreviver sob hipóxia, como alguns peixes, anfíbios, répteis, insetos e moluscos, mas quase nenhum é capaz de sobreviver sob anoxia severa (HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002). Existem exceções nas espécies de peixes, como a carpa cruciana (*Carassius carassius*) e o peixe-dourado (*Carassius auratus*), e entre tartarugas de água doce, como a *Chrysemys picta* e *Trachemys scripta elegans* (LUTZ, 1992; NILSSON & LUTZ, 2004; WILLMORE & STOREY, 1997; MEHRANI & STOREY, 1995). Durante o processo de anoxia nas tartarugas, ocorre uma vasoconstrição periférica e brusco controle autônomo, queda na frequência cardíaca e débito cardíaco em até 80%, deixando-as virtualmente em coma. Em contraste, frequência cardíaca, débito cardíaco e controle autonômico são mantidos por vários dias na carpa cruciana durante a anoxia, assim ela continua nadando, mas em níveis reduzidos (NILSSON & LUTZ, 2004).

No momento em que a disponibilidade de oxigênio cessa, é preciso suprir o déficit de energia do cérebro, por isso há um aumento no processo de glicólise (LUTZ, 1992). O funcionamento das bombas de íons fica comprometido (ERECINSKA & SILVER, 1994; BOUTILIER, 2001). Ocorrem despolarização e liberação de neurotransmissores como aspartato e glutamato, que se acredita serem responsáveis pelos danos cerebrais causados pela isquemia ou anoxia em mamíferos (MELDRUM, 1985). Na célula despolarizada, ocorrem movimentos de íon cloro e sódio para dentro da mesma, levando consigo água, causando inchaço e danos celulares estruturais (BROWN & BRIERLEY, 1973; ERECINSKA & SILVER, 1994). Um aumento de cálcio intracelular citosólico resulta na ativação de fosfolipases e proteases cálcio-dependentes, que aceleram a taxa de despolarização da

membrana, levando a um edema celular descontrolado e, finalmente, à necrose celular (HOCHACHKA, 1986).

As alterações estruturais celulares resultantes de situações de baixa disponibilidade de oxigênio não vêm sendo muito estudadas em espécies tolerantes à hipóxia ambiental. Um trabalho realizado com linhagens mutantes (receptor insulina/IGF-homólogo alterado) do nematódeo *Caenorhabditis elegans* mostrou menor fragmentação nuclear, diminuindo a morte celular em miócitos e neurônios em resposta à hipóxia (SCOTT et al., 2002).

Clegg e colaboradores (2000) verificaram também que embriões encistados do camarão *Artemia franciscana* podem sobreviver vários anos sob anoxia, e sua taxa metabólica é indetectável. O experimento de anoxia teve duração de 38 dias para um grupo e 3,3 anos o outro grupo e após estes períodos foram realizadas análises ultraestruturais. Após 38 dias de anoxia, as células embrionárias mostravam condensação da cromatina e formação de regiões com heterocromatina, o citoplasma manteve grande quantidades de ribossomos livres e de retículos endoplasmáticos rugosos, além de material granular associado às mitocôndrias. O grupo que foi mantido 3,3 anos em anoxia apresentou intensa e mais proeminente condensação de cromatina que o grupo com 38 dias de anoxia. E o citoplasma destes animais se encontrava-se mais denso que no grupo com 38 dias de anoxia. As mitocôndrias mostram alterações das cristas aos 38 dias de anoxia, e ficam menos visíveis com 3,3 anos de anoxia. De uma maneira geral, está análise revelou uma notável preservação das estruturas das células anóxicas (CLEGG et al., 2000).

Os efeitos da anoxia são mais estudados sobre aspectos bioquímicos em alguns animais tolerantes, buscando um possível mecanismo de proteção que faz com que resistam à este estresse. Em 2009, Kesaraju e colaboradores analisaram a modulação de proteínas relacionadas ao estresse e reguladores apoptóticos no cérebro da tartaruga tolerante *Trachemys scripta*. Elas foram submetidas à 1, 4 e 24h de anoxia e períodos de reoxigenação.

## Introdução

verificaram que na primeira hora de anoxia, as proteínas de estresse aumentaram, tais como Hsp72, Hsp60, Hsp27, Grp94, HO-1, enquanto reguladores apoptóticos, como Bcl-2 e Bax, diminuíram, sugerindo uma adaptação molecular envolvendo mecanismos de sobrevivência e inibição de vias apoptóticas. Outro estudo envolvendo esta tartaruga, realizado por RAMNANAN e colaboradores, em 2010, analisou a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), e verificou diminuição de sua atividade em 30% no fígado e 40% no músculo, após 1h de anoxia e 50% após 20h de anoxia. Este rápido intervalo de tempo para sua desativação e mudanças nos parâmetros cinéticos sugerem que esta bomba seja regulada por mecanismo pós-traducional, e que sua fosforilação ou desfosforilação é tecido-dependente. Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que conferem tolerância a anoxia nas tartarugas incluem profunda depressão na taxa metabólica, modificação de proteínas pós-traducionais, defesas anti-oxidantes, ativação de fatores de transcrição específicos ao estresse e maior expressão de proteínas cito-protetoras (KRIVORUCHKO & STOREY, 2010).

LARADE E STOREY (2007) verificaram as taxas de transcrição de mRNA no caracol marinho *Littorina littorea*, tendo em vista sua tolerância a longo período de anoxia, utilizando mecanismos compensatórios, como depressão da taxa metabólica global. A taxa de transcrição diminuiu em 68% nos animais em anoxia, quando comparados aos normóxicos. Também observaram que um dos fatores ribossômicos (eIF-2 $\alpha$ ) se encontrava na forma fosforilada inativa sob ação da anoxia, indicando que seria o mecanismo chave para a supressão da formação de proteínas neste caracol.

LIGHTON E SCHILMAN (2007) analisaram os efeitos da reperfusão em *Drosophila melanogaster*, tendo em vista que em mamíferos este processo é responsável por inúmeros efeitos deletérios. A anoxia aconteceu entre 7,5 e 120 minutos e já nos primeiros minutos, observaram um pico de emissão de  $\text{CO}_2$ , seguido pela parada da respiração mitocondrial. A reperfusão realizada em seguida provocou uma reativação bimodal da respiração

mitocondrial. A anoxia causou depressão na taxa respiratória mitocondrial e danos na integridade do sistema de controle do espiráculo.

Tendo em vista todos os aspectos acima relacionados, existe considerável interesse na compreensão dos mecanismos que promovem a tolerância dos organismos à falta de oxigênio, uma vez que a hipóxia-isquemia é a principal causa de lesão tecidual cardíaca e cerebral (LUTZ et al. 2003). Animais que passam regularmente por situações de hipóxia ou anoxia evoluíram uma capacidade de tolerância natural para evitar danos da hipóxia aos tecidos nervosos ou outros órgãos vitais (BICKLER et al. 2005). Os moluscos terrestres são organismos altamente tolerantes à anoxia e tem se revelado como um modelo interessante para o estudo dos efeitos da anoxia sobre o metabolismo energético (DE FRAGA *et al.* 2004, 2010). Mesmo em relação aos invertebrados em geral, existe uma escassez de trabalhos sobre o metabolismo energético do sistema nervoso, ainda que exista um grande interesse em estudos neurofisiológicos em moluscos, pois estes são amplamente reconhecidos como excelentes modelos para os mecanismos celulares da base neural de diversos comportamentos (KANDEL et al. 2001, BARCO et al. 2006).

## *Objetivos*

Realizar análises ultraestruturais de neurônios e células gliais do gânglio cerebral de animais submetidos à anoxia e reoxigenação, para que seja caracterizado o quadro de alterações citológicas decorrentes deste evento.

# *Material e Métodos*

## Coleta e Manutenção dos animais

Os caracóis adultos da espécie *Megalobulimus abbreviatus* foram coletados no Município de Charqueadas, em caixas de plástico contendo uma fina camada de água. Os animais tinham peso de  $69.35 \pm 0.65$ g e suas conchas mediram  $73.72 \pm 0.20$ mm de comprimento e  $37.76 \pm 0.14$ mm de largura (valores expressos como média  $\pm$  erro padrão). Eles foram mantidos em um terrário no Laboratório de Neurobiologia Comparada, alimentados diariamente com alface e água fresca à vontade.

Os primeiros vinte dias foram utilizados para aclimação dos animais, para excluir possíveis variáveis ambientais. Durante este período, foram mantidos temperatura de 24–28°C, com variação de temperatura circadiana e fotoperíodo de ciclo de 12h claro : 12h escuro, com fotofase das 7 AM – 7 PM. Todos os dias, a terra era umedecida e remexida, para manter a umidade relativamente alta.

Os animais foram tratados de acordo com a Lei Nº. 6638 de Maio/1979, que regulamenta o uso de animais para fins didático-científicos.

## Exposição à Anoxia

Todos os animais submetidos à anoxia foram retirados do terrário as 7AM, na manhã do dia do experimento, lavados, pesados, suas conchas mensuradas e colocados em caixas separados por grupos (grupo controle, grupo 3h de anoxia e grupo 12h de anoxia). Eles foram mantidos em jejum até o início do experimento (próximo às 13:30PM) e com uma camada de água na caixa para manter umidade.

Às 13:30 PM, cada grupo foi colocado em um dessecador de vidro, em cima de uma plataforma perfurada. Abaixo disso, foi colocado 500 ml de água para manter a umidade durante o teste. O dessecador foi fechado e selado com vaselina para evitar a entrada de oxigênio. Durante 10 minutos, foi realizada a aeração, com 100% de gás nitrogênio, através

## *Material e Métodos*

de um tubo conectado diretamente a um cilindro de nitrogênio e o dessecador. Um tubo lateral foi mantido aberto durante este período, para a saída de nitrogênio. A pressão de oxigênio ( $PO_2$ ) foi medida durante todo o procedimento com auxílio de um oxímetro (Oxel-1/ISO2, World Precision Instruments, Sarasota, FL), mantendo a  $PO_2$  de 0% durante todo o período de anoxia. No final de 10 minutos de aeração com nitrogênio, a abertura lateral foi fechada e começou a contar o tempo de anoxia de 3h ou 12h. O grupo controle foi mantido nas mesmas condições dos grupos experimentais, colocados em recipientes de vidro e também manipulados, mas mantido em condições aeróbias.

No final dos períodos de anoxia, os caracóis dos grupos 3 horas e 12 horas (3 animais para cada grupo) foram retirados do dessecador e seu sistema nervoso (gânglios cerebral e supraesofágico, aproximadamente 50 mg) foi obtida após anestesiados pelo frio (5 min). O mesmo processo foi feito com os três animais do grupo controle. Os grupos reoxigenação de 15 h foram retirados do dessecador e colocados em caixas de plástico de novo e lá permaneceram por 15 horas. Após este tempo, o sistema nervoso foi obtido (três animais do grupo 3 h de anoxia e três animais do grupo 12 h anoxia).

Além disso, outro grupo foi analisado: 14 dias de reoxigenação. Assim, três animais para o grupo 3h de anoxia e três animais para o grupo de 12 horas de anoxia, com um grupo de controle único (3 animais). Os animais submetidos à reoxigenação foram devolvidos ao terráreo e tiveram sua alimentação e condições ambientais retomadas. Todos esses grupos totalizam 24 animais no experimento.

### Obtenção e fixação do sistema nervoso

Os gânglios cerebrais removidos foram fixados em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 1% diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por 1 h 30 min em temperatura ambiente. Após a lavagem de 1 h com o tampão fosfato, o material foi pós-fixado em

## *Material e Métodos*

Tetróxido de Ósmio 1% diluído em tampão fosfato por 1 h em temperatura ambiente. Mais uma vez lavados por 1 hora, seguida da desidratação e inclusão de material.

### Inclusão, Secções e Coloração

O material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e acetona e incluídos em resina Araldite, diluído em acetona 50% por 18h. Após 24 h em Durkupan absoluta. Após este período, o material foi colocado em moldes para blocos e em estufa a 60°C, onde permaneceram por pelo menos 48 h para a polimerização da resina.

As secções semifinas (1 µm) foram obtidas em Ultramicrotomo MT 6000-XL (Departamento de Ciências morfológicas, ICBS, UFRGS), montados em lâminas e corados com Azul de Toluidina a 1%. A área de interesse foi selecionada (neurônio gigante do mesocérebro), e as secções ultrafinas (70nm) foram realizadas. Os cortes foram montados em grades de cobre 150mesh.

Após período de 24 h de secagem, as grades foram primeiramente coradas com acetato de uranila 5% diluído em metanol 50% por 40 min. Após a lavagem em água destilada, foram secas e coradas com citrato de chumbo a 2% por 30 min. Depois, novamente secas e armazenadas em telário próprio.

As secções ultrafinas foram examinadas e fotografadas no Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS, utilizando o Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM 1200 EX II.

O neurônio gigante, da região do mesocérebro dos animais submetidos à anoxia, apresentou diferenças morfológicas no volume celular e nuclear, nas organelas e na disposição da cromatina no núcleo, na maioria dos grupos experimentais. A ordem em que as figuras aparecem ao longo do texto estão de acordo com sua disposição dentro de cada plate.

### **Grupo Controle**

Os neurônios controles têm de 130-175 $\mu$ m de tamanho. Possuem núcleos ligeiramente arredondados e em alguns animais a membrana nuclear possui indentações. A cromatina apresenta-se dispersa, com aspecto homogêneo e existem vários nucléolos dispersos. O citoplasma possui muitos filamentos finos, o que o deixa com aspecto eletrolúcido, além da presença de organelas em grande quantidade.

Retículos endoplasmáticos rugosos (RER) estão presentes em grande quantidade, desde as proximidades do núcleo e também em todo o citoplasma, de maneira uniforme. Suas cisternas têm aspecto normal, com considerável quantidade de ribossomos entre as mesmas, e muitos dispersos pelo citoplasma (Fig.5f).

Complexos de Golgi (CG) também ocorrem em grande quantidade, com cisternas dilatadas e grande quantidade de vesículas secretoras na extremidade da organela e nas proximidades da membrana plasmática (MP) (Fig.3f, 5f).

As mitocôndrias aparecem em número considerável, possuem aspecto arredondado, definição da membrana dupla, mas pouca definição de suas cristas (Fig.5c,f). A matriz tem cor escura.

Em alguns neurônios existem corpos lamelares, com aspecto eletrodense, além de vacúolos que parecem ter conteúdo não identificável e também lisossomos.

A MP apresenta-se íntegra e com interação da célula glial formando o trofospôngio no limite de todo o neurônio e em alguns exemplares projeções de células gliais invaginam-se no citoplasma, formando cavéolas (Fig. 3a). A glia está disposta de maneira muito próxima à MP. Esta possui núcleo grande, amorfo, com conteúdo homogêneo e membrana nuclear bem demarcada, apresentando pouco citoplasma, com presença marcante de RER e demais organelas. Ao lado do núcleo, observa-se uma vesícula com conteúdo, provavelmente um lisossomo. A célula glial possui aspecto ovalado (Fig.6a).

### **Grupo 3h de Anoxia**

Em relação ao grupo controle, estes neurônios apresentam núcleos edematosos, com uma visível condensação da cromatina, tornando o núcleo mais claro. Entretanto a membrana nuclear mostra-se íntegra, ocorrendo invaginações em algumas amostras, como visualizado no grupo controle. Entretanto, estas invaginações são mais alongadas que no grupo controle, como prolongamentos do núcleo em direção ao citoplasma. O citoplasma apresenta aspecto homogêneo e claro, com as organelas dispersas em seu interior. Presença de vesículas lipídicas próximas à MP.

O RER encontra-se menos visível, com cisternas mais discretas e poucos ribossomos livres no citoplasma (Fig. 2a).

O CG também possui cisternas mais estreitas e sem vesículas em seu interior (Fig. 2c). Poucas vesículas secretoras são visualizadas em sua extremidade, entretanto nas proximidades da MP, a quantidade de vesículas é muito grande.

As mitocôndrias neste grupo são pouco visualizadas, e quando detectadas, possuem formato circular, cor escura e sem identificação de cristas.

A MP mostra formação de vacúolos na sua extremidade (Fig.1a, seta). Apresenta também interação com a glia semelhante ao controle.

Em relação à célula glial, a membrana nuclear aparece menos densa que no grupo controle, ou seja, há uma maior condensação da cromatina. Próximo ao núcleo observa-se lisossomos com pouco conteúdo.

### **Grupo 3h de anoxia + 15h de recuperação**

Os neurônios deste grupo, após 15h de reoxigenação, apresentam núcleo com cromatina condensada e membrana nuclear íntegra; entretanto, o processo de edema parece diminuído. O citoplasma começa retornar ao aspecto controle, com RER dilatados e ribossomos entre suas cisternas e também grande número de ribossomos dispersos (Fig.5d). Mais próximo a MP, observa-se grandes vacúolos com muitos grânulos ao redor dos mesmos, possivelmente grânulos de glicogênio.

O CG mostra cisternas dilatadas, com vesículas entre as mesmas e nas suas proximidades (Fig.5e), enquanto no grupo controle estas vesículas não aparecem entre as cisternas.

As mitocôndrias continuam com aspecto escuro e arredondado, e em alguns neurônios pode-se identificar o conteúdo de sua matriz.

Presença de corpos lamelares em maior quantidade que o grupo controle, em alguns neurônios.

A MP mostra-se intensamente vacuolizada e com interações gliais semelhante aos outros grupos.

A célula glial apresenta o mesmo aspecto daquele observado no grupo de 3h de anoxia, com condensação da cromatina nuclear e presença de lisossomos com conteúdo eletrodenso nas proximidades do núcleo.

### **Grupo 3h de anoxia + 14 dias de recuperação**

Tanto o núcleo como o citoplasma não diferem do aspecto dos neurônios gigantes controles e parece ocorrer uma dispersão da cromatina, tornando o núcleo claro e granuloso. A membrana nuclear está íntegra. O citoplasma também é mais claro, com filamentos finos presentes.

O RER está presente em grande quantidade, desde próximo da membrana nuclear até a MP. Existem ribossomos em suas cisternas, assim como livres no citoplasma (Fig. 2b).

O CG apresenta o mesmo aspecto do grupo controle, presente em grande quantidade, com cisternas dilatadas, porém sem vesículas entre as mesmas (Fig.2d). As vesículas são visualizadas ao seu redor, em grande quantidade.

Presença de corpos lamelares também neste grupo, e vesículas lipídicas.

As mitocôndrias permanecem escuras, com conteúdo pouco identificável. Em algumas amostras, observam-se estruturas em forma de meia lua, em meio ao conteúdo eletrodenso.

Na MP observa-se interação com a glia, formando vesículas amorfas com grande quantidade de grânulos (Fig.1b, setas). A célula glial retorna ao aspecto geral do controle, porém o lisossomo que aparece próximo ao núcleo tem seu tamanho extremamente aumentado em relação aos grupos 3h de anoxia e o grupo 3h de anoxia + 15h de recuperação (Fig.6b). O núcleo volta a ocupar a maior parte da célula glial.

### **Grupo 12h de anoxia**

Os neurônios deste grupo apresentam núcleos edematosos, com condensação da cromatina e de aspecto claro. A membrana nuclear permanece íntegra como o grupo controle. O citoplasma apresenta aspecto granuloso, pela grande quantidade de ribossomos livres presentes.

O RER pode ser observado em grande quantidade, desde regiões próximas à membrana nuclear até as proximidades da MP. Suas cisternas apresentam-se dilatadas, como no grupo controle, e muitos ribossomos livres no citoplasma (Fig.4c).

O CG apresenta cisternas estreitas, sem vesículas entre elas, e pouca quantidade também na sua proximidade (Fig.4e).

As mitocôndrias, quando observadas, têm formato arredondado e conteúdo escuro, sem identificação das cristas em seu interior.

A MP demonstra interação com células gliais semelhante ao controle, e podem ser observados nas suas proximidades organelas e ribossomos livres.

Na célula glial observa-se que o citoplasma está edematoso, granuloso e com número maior de mitocôndrias que o grupo controle. Próximo a MP desta célula, podem ser visualizados vacúolos e próximo ao núcleo um lisossomo com conteúdo eletrodense se destaca em tamanho maior do que observado no grupo de 3h de anoxia, característica que se repete em todos os animais do grupo 12h de anoxia.

### **Grupo 12h de anoxia + 15h de recuperação**

Neste grupo, o aspecto do núcleo parece retornar ao granuloso, mas ainda existe alguma cromatina condensada. A membrana nuclear é íntegra, e em alguns neurônios

observam-se discretas indentações da mesma em direção ao citoplasma, formando prolongamentos maiores do que os observados em alguns animais do grupo controle. O citoplasma tem aspecto granuloso, com maior evidência de organelas e filamentos finos, em relação ao grupo de 12h de anoxia.

O RER presente possui cisternas estreitas, com poucos ribossomos entre elas, mas grande quantidade dispersa pelo citoplasma (Fig. 3c).

O CG apresenta cisternas estreitas, sem vesículas entre elas e com pouca quantidade na extremidade e ao redor das cisternas (Fig.3d). CG presente em menor quantidade que RER.

As mitocôndrias estão presentes em todo o citoplasma, sendo perfeitamente detectáveis a membrana dupla e as cristas internas, além do formato arredondado e algumas ovais (Fig.5a). Seu aspecto é bem mais claro do que as encontradas nos grupos controle e 12h de anoxia. Encontram-se próximas à membrana nuclear, e principalmente ao redor do RER e CG.

A MP apresenta invaginações da glia, mostrando interação semelhante aos demais grupos (Fig.3b). Observa-se intensa quantidade de RER, alongados com grande extensão e preenchidos com ribossomos (Fig. 3e), além de vacúolos dispersos e com conteúdo.

A cromatina do núcleo da célula glial ainda encontra-se condensada. O núcleo ocupa a maior parte da célula, contendo pouco citoplasma. Presença de ribossomos livres, mas organelas pouco visíveis. Lisossomo próximo ao núcleo com tamanho menor do que o observado no grupo 12h de anoxia.

### **Grupo 12h de anoxia + 14 dias de recuperação**

Os neurônios deste grupo apresentam aspecto semelhante ao controle, com descompactação e dispersão da cromatina, nucléolos visíveis, núcleo com aspecto claro e

membrana nuclear íntegra (Fig.4b). O citoplasma apresenta-se granuloso, com muitas organelas visíveis. Presença de lisossomos.

Observa-se grande quantidade de RER, com ribossomos entre suas cisternas e livres no citoplasma (Fig.4d).

No CG observam-se cisternas dilatadas semelhantes ao controle, porém com aumento de vesículas associadas (Fig.4f).

As mitocôndrias podem ser observadas em grande quantidade, com aspecto semelhante às encontradas no grupo 12h de anoxia + 15h de recuperação. Elas aparecem próximas ao RER, CG e MP, com cor clara, cristas e membrana dupla visíveis (Fig.5b).

A MP é semelhante ao grupo controle, exceto pela presença de vários vacúolos com conteúdo, maiores que os encontrados no grupo controle. Interação com a glia semelhante aos demais grupos (Fig.4a).

A célula glial tem aspecto semelhante ao controle, com cromatina localizada na periferia do núcleo, dando ao mesmo aspecto espesso. Apresenta o núcleo ocupando a maior parte da célula. No citoplasma observa-se RER com alguns ribossomos. O lisossomo próximo ao núcleo não está presente nesta célula.

Este estudo avaliou as condições morfológicas ultraestruturais do mesocérebro de *Megalobulimus abbreviatus*. O neurônio gigante e as células gliais circundantes presentes nesta região do gânglio cerebral foram observadas de forma comparativa nos diferentes períodos de anoxia. As análises foram priorizadas sobre o neurônio gigante pela facilidade de identificação deste nos gânglios cerebrais dos diferentes animais, mesmo em diferentes planos de secção. Sob microscópio óptico já eram visíveis alterações nestes neurônios cerebrais durante os períodos de anoxia, como edema celular, tanto de núcleo quanto do citoplasma. Após período de recuperação aeróbia, o aspecto edematoso era totalmente revertido, e os neurônios retornavam ao seu aspecto morfológico da normóxia.

As mudanças morfológicas neuronais descritas para ratos submetidos à hipóxia-isquemia foram classificadas em três categorias (WEBSTER & AMES, 1965). (a) Lesões sinápticas que se desenvolvem rapidamente e que são facilmente reversíveis. É possível que estas mudanças estão associadas a déficits químicos e funcionais da síntese e liberação de neurotransmissores. (b) Edema ou inchaço reversível das organelas com membranas, iniciando pelas mitocôndrias, seguido pela alteração do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi e, finalmente, pela célula como um todo. (c) Estabelecimento de múltiplas discontinuidades da membrana das organelas e da superfície celular já são visíveis após 30 minutos de privação sanguínea e não são reversíveis, levando a prejuízo funcional irreversível. Postula-se que a ruptura da membrana leva à alteração da composição química das organelas e compartimentos citoplasmáticos que eliminam as capacidades restauradoras da célula. As alterações fisiológicas nos mamíferos são muito rápidas e complexas, tornando difícil de identificar quais são os mecanismos danosos que permitem ou não uma reversão (BICKLER et al., 2005; LUTZ et al., 2003).

Devido à escassez de trabalhos envolvendo microscopia eletrônica do sistema nervoso em moluscos ou outros invertebrados tolerantes à hipóxia ou anoxia, os resultados obtidos

neste estudo sob anoxia são, na maior parte, comparados àqueles de mamíferos em condições semelhantes de estresse.

O neurônio gigante do mesocérebro de *M. abbreviatus* em normóxia apresenta características citológicas similares à já descrita aos neurônios cerebrais de moluscos (DORSETT 1986), núcleo com cromatina homogênea, presença de organelas celulares usualmente presentes, como muitas mitocôndrias e cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi e um certo número lisossomas. Os ribossomas livres e RER predominavam junto ao núcleo. A membrana plasmática mostra muita interação com células gliais, formando o trofospôncio, o qual é muito mais desenvolvido nos neurônios grandes e gigantes que nos neurônios menores (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DORSETT, 1986; CHASE 2002). Um aspecto frequentemente observado no neurônio gigante cerebral (NGC) são as indentações da membrana nuclear, que ficam mais acentuadas nos períodos de anoxia. Estas indentações da membrana nuclear também foram descritas em neurônios hipocâmpais CA1 de ratos submetidos à isquemia e reperfusão (Winkelmann, 2003). O mesmo foi encontrado por NITATORI *et al* (1995), após período de 3 dias de reperfusão.

A disposição do conteúdo nuclear durante o processo de anoxia, tanto em 3h como em 12h, com presença de heterocromatina, indica inativação funcional (WYLLIE *et al*, 1980). Após período de reoxigenação, por 15h até 14 dias, a cromatina vai se tornando descompactada, semelhante ao grupo controle, mostrando retorno funcional. A integridade da membrana nuclear, observada em todos os grupos experimentais, exclui a ocorrência de necrose oncótica, a qual tem como uma, dentre várias características, a ruptura da membrana nuclear (Siegel, 2006). O processo de necrose é caracterizado por inchaço celular e rompimento da membrana nuclear; neste caso, o estresse causado fez com que ocorresse edema, mas mesmo sob 12 h de anoxia com ou sem os períodos de reoxigenação não foram

observados locais de descontinuidade de membranas, tanto de organelas como de superfície celular ou nuclear. A manutenção da integridade celular como um todo indica uma resistência deste neurônio, assim como das células gliais do mesocérebro, a condições anóxicas e à reoxigenação subsequente.

Com alguns minutos de hipóxia/isquemia, a morte neuronal é observada em mamíferos, enquanto o modelo de nosso estudo, submetido à 12h de anoxia, permanece viável. Em outro vertebrado resistente à hipóxia, a carpa cruciana (*Carassius carassius*), o processo de edema celular não foi observado quando submetido à 24h de anoxia, e uma habilidade em manter as cargas energéticas celulares neste período (VAN DER LINDEN, 2001).

Após período de 3h e 12h de anoxia, o RER está menos visível, poucas cisternas e ribossomos. Este aspecto somado ao fato da cromatina mostrar-se mais condensada nestas condições indica que a síntese protéica foi diminuída. Analisando os grupos de 15h de reoxigenação, nota-se grande quantidade de ribossomos livres, RER com cisternas aparentemente mais dilatados e grande quantidade de ribossomos associados a estas, o que indica uma retomada da síntese protéica após o restabelecimento da oxigenação. FURUTA e colaboradores (1993) afirmam que a recuperação da síntese protéica durante a fase pós-isquemia é essencial para a sobrevivência dos neurônios da área CA1 do hipocampo, após dano causado por isquemia. Com 14 dias de recuperação, o aspecto dos RER se assemelham aos controles. Neste períodos os complexos de Golgi também retornam a um aparente aumento do número de tamanho de cisternas e com mais vesículas associadas.

Mitocôndrias nos neurônios sob 3h e 12h de anoxia, eram pequenas, arredondadas, com considerável eltrodensidade que dificultava, algumas vezes a identificação das cristas. Nos grupos de recuperação de 14 dias, as mitocôndrias aparecem visivelmente em maior

quantidade e mais claras. Este aspecto das mitocôndrias em condições pós-anoxia pode indicar um reestabelecimento do metabolismo energético deste neurônio.

As células gliais estão envolvidas com suporte e proteção neuronal, inativação de neurotransmissores e interações metabólicas com os neurônios (TSACOPOULUS & MAGISTRETTI, 1996). DOS SANTOS (2002) e DOS SANTOS (2005) identificaram células gliais por marcação de GFAP no sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, como ocorre nos vertebrados. KESARAJU e colaboradores em 2009 observaram um aumento na marcação de GFAP em tartarugas (*Trachemys scripta elegans*) submetidas à 24h de anoxia.

Todas as características observadas no presente estudo sugerem um mecanismo de proteção ainda não identificado para que mesmo após um período de 12h de anoxia, o neurônio retorne ao seu estado de atividade normal, sem dano celular aparente, não tendo sido verificado processos apoptóticos ou de necrose. Um índice de sobrevivência de 100% após 18 h de anoxia, seguido de reoxigenação foi observado por DE FRAGA (2007), demonstrando que a espécie é muito bem adaptada para sobreviver sob condições anóxicas por muitas horas.

Através da análise ultraestrutural do gânglio cerebral do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, submetido à diferentes tempo de anoxia e reoxigenação, pode-se concluir que:

1. O caracol *M. abbreviatus* possui características celulares semelhantes às encontradas em outros organismos pulmonados;
2. O processo de anoxia causou alterações nitidamente visíveis, como edema celular e nas organelas, entretanto nenhuma modificação foi dada como irreversível;
3. Não foram encontradas evidências de processo de necrose, nem apoptose, que causariam danos ao neurônio, podendo levar o animal à óbito;
4. O caracol *M. abbreviatus* apresenta tolerância ao processo de anoxia e reoxigenação, como pôde ser observado pela retomada do funcionamento celular após o evento, assim como taxa zero de mortalidade.

## Legendas de Figuras

Figura 01 – Eletromicrografias do neurônio gigante dos grupos 3h de anoxia e grupos 3h de anoxia com 14 dias de recuperação. (A) Aspectos da membrana plasmática com 3h de anoxia, mostrando a presença de vacúolos próximos à membrana plasmática (seta). (B) Aspectos da membrana plasmática com 3h de anoxia e 14 dias de recuperação, mostrando a presença de vários vacúolos com grânulos (setas). (C) Aspectos da membrana nuclear com cromatina e citoplasma do grupo 3h de anoxia: as setas indicam a cromatina condensada e o citoplasma aparece com organelas dispersas, com aspecto homogêneo. (D) Aspectos da membrana nuclear com cromatina e citoplasma do grupo 3h de anoxia com 14 dias de recuperação: observar a dispersão da cromatina semelhante ao controle, assim como o citoplasma.

Figura 02 – Eletromicrografias do neurônio gigante dos grupos 3h de anoxia e grupos 3h de anoxia com 14 dias de recuperação, comparando Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER) e Complexo de Golgi (CG). (A) Aspectos do RER com 3h de anoxia, menos visível e com discretas cisternas (asterisco). Poucos ribossomos dispersos. (B) Aspectos do RER com 3h de anoxia e 14 dias de recuperação (setas), mostrando um aumento na densidade de RER e ribossomos. (C) Aspectos do CG com 3h de anoxia (seta): Observar cisternas pouco dilatadas e ribossomos na extremidade da organela. (D) Aspectos do CG com 3h de anoxia e 14 dias de recuperação (seta): cisternas dilatadas, evidentes e com grande quantidade de vesículas ao seu redor.

Figura 03 – Eletromicrografias do neurônio gigante dos grupos 12h de anoxia e grupos 12h de anoxia com 15h de recuperação (A) Aspectos da membrana plasmática do grupo

controle: formação de trofospôngio (asterisco), CG com vesículas de secreção (setas). (B) Aspectos da membrana plasmática do 3h de anoxia com 15h recuperado: membrana íntegra, trofospôngio, CG em funcionamento com muitas vesículas secretoras. (C) Aspectos do RER com 12h de anoxia e 15h de recuperação: cisternas delgadas (setas), poucos ribossomos dispersos. (D) Aspectos do CG do grupo 12h de anoxia e 15h de recuperação: cisternas delgadas (seta), poucas vesículas formadas. (E) Aspectos da periferia de neurônio de grupo 12h de anoxia e 15h de recuperação: formação de cisternas em grande quantidade, próximas à membrana plasmática. (F) Aspectos do CG no grupo controle: cisternas dilatadas, com grande quantidade de vesículas secretoras.

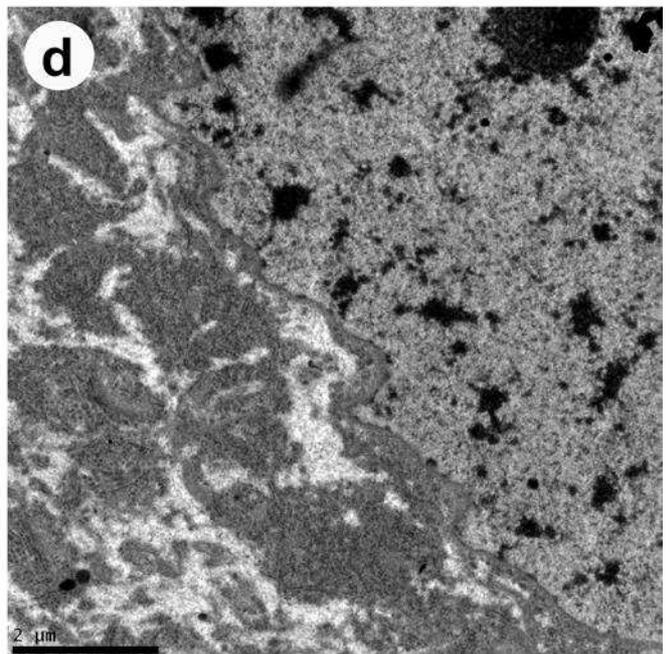
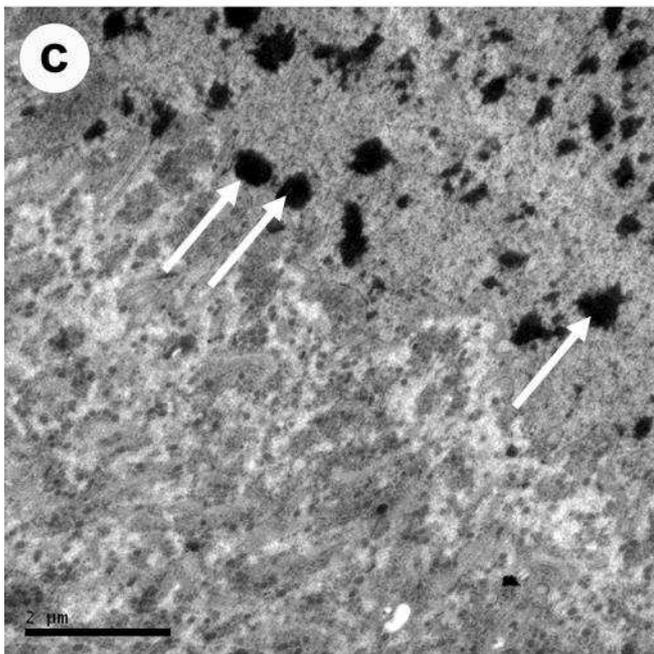
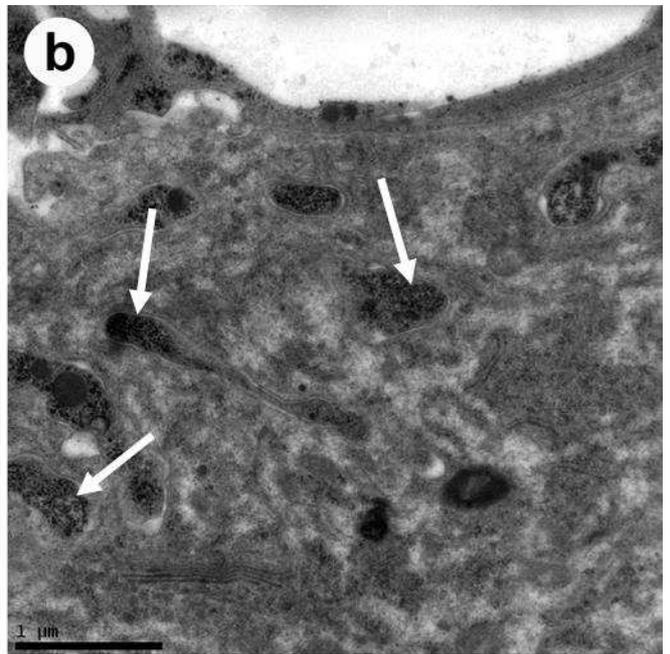
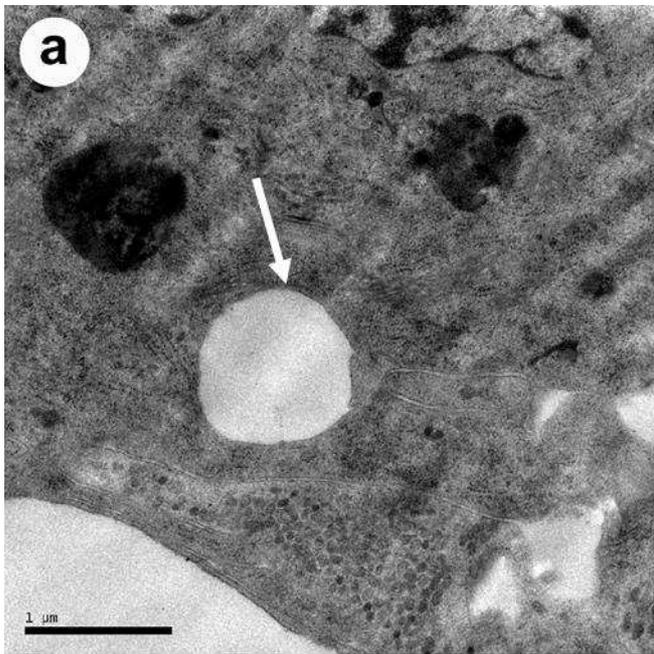
Figura 04 – Eletromicrografias do neurônio gigante dos grupos 12h de anoxia e grupos 12h de anoxia com 14 dias de recuperação (A) Aspectos da membrana plasmática do grupo 12h de anoxia e 14 dias recuperado: semelhança com o controle, presença de vacúolos maiores que no controle. (B) Aspectos do núcleo de grupo 12h de anoxia com 14 dias recuperado: observar cromatina dispersa (asteriscos) como no controle, aspecto claro e membrana íntegra (setas). (C) Aspectos do RER com 12h de anoxia: observar a grande densidade, assim como ribossomos em grande quantidade dispersos por todo o citoplasma. Cisternas dilatadas, como no grupo controle (setas). (D) Aspectos do RER do grupo 12h de anoxia e 14 dias de recuperação: observa-se também dilatação, com ribossomos livres no citoplasma. (E) Aspectos do CG com 12h de anoxia: cisternas delgadas (asterisco), poucas vesículas presentes. (F) Aspectos do CG no grupo 12h de anoxia com 14 dias de recuperação: cisternas dilatadas, com grande quantidade de vesículas secretoras nas suas proximidades.

Figura 05 – Eletromicrografias de diferentes organelas do neurônio gigante do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. (A) Aspectos de mitocôndrias do grupo 12h de anoxia e 15h

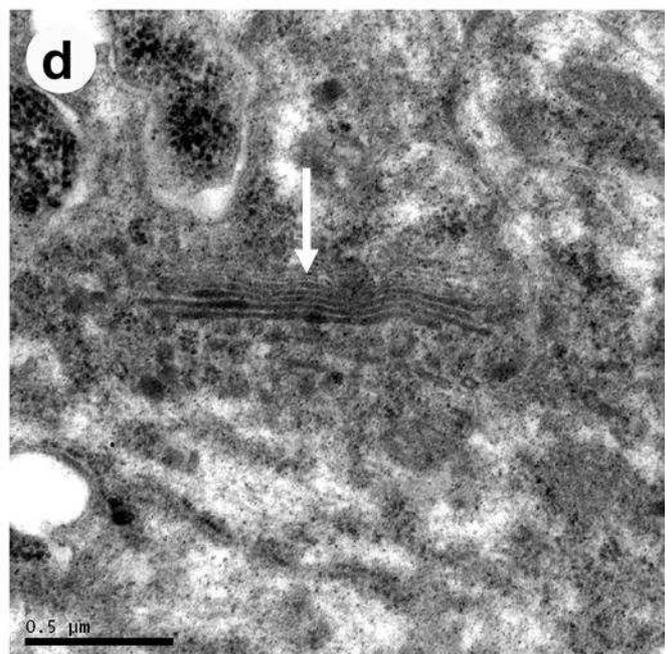
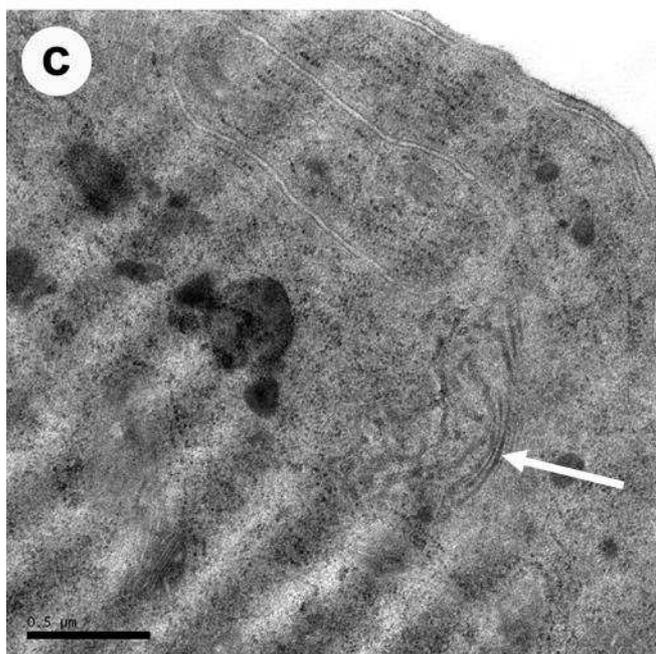
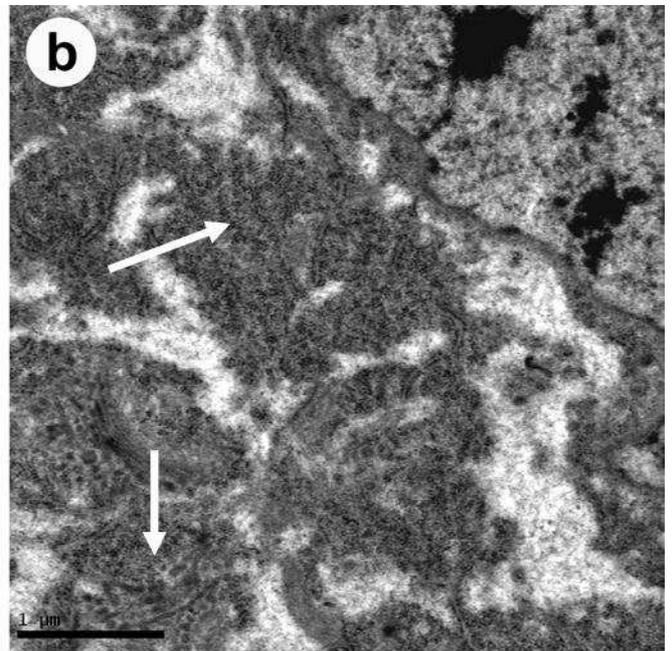
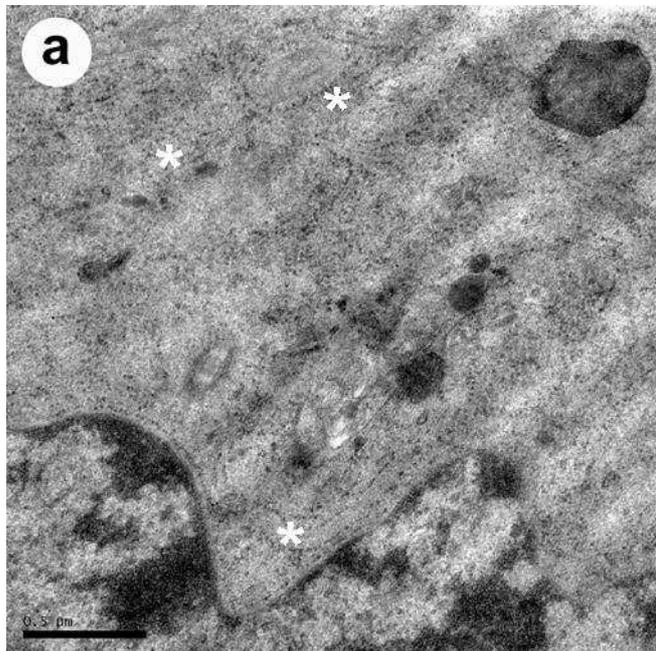
recuperado: observar membrana dupla e cristas, mais claras que as do grupo controle (setas). (B) Aspectos de mitocôndrias do grupo 12h de anoxia e 14 dias recuperado: apresentam aspecto semelhante às daquelas do grupo recuperado com 15h, membrana dupla e cristas identificáveis (setas pretas). (C) Aspectos de mitocôndrias do grupo controle: observar membrana dupla, porém as cristas são pouco visualizadas e têm cor escura (setas). São menores que os grupos com recuperação. (D) Aspectos do RER do grupo 3h de anoxia e 15h de recuperação: observar dilatação (setas), com ribossomos livres no citoplasma. (E) Aspectos do CG com 3h de anoxia e 15h de recuperação: cisternas dilatadas (seta), muitas vesículas nas proximidades. (F) Aspectos de organelas do grupo controle: RER (asterisco), CG (seta branca) e mitocôndrias (seta preta).

Figura 06 – Eletromicrografias de células gliais. (A) Aspectos de célula glial do grupo controle: observar proximidade com a membrana, cromatina dispersa e próxima ao limite da toda a membrana nuclear. (B) Aspectos de célula glial com 3h de anoxia e 14 dias recuperado: cromatina dispersa, ocupa as proximidades da membrana nuclear, porém menos que o controle. Presença de grande lisossomo próximo ao núcleo, o que não ocorre na célula glial controle (nesta, não visível na foto).

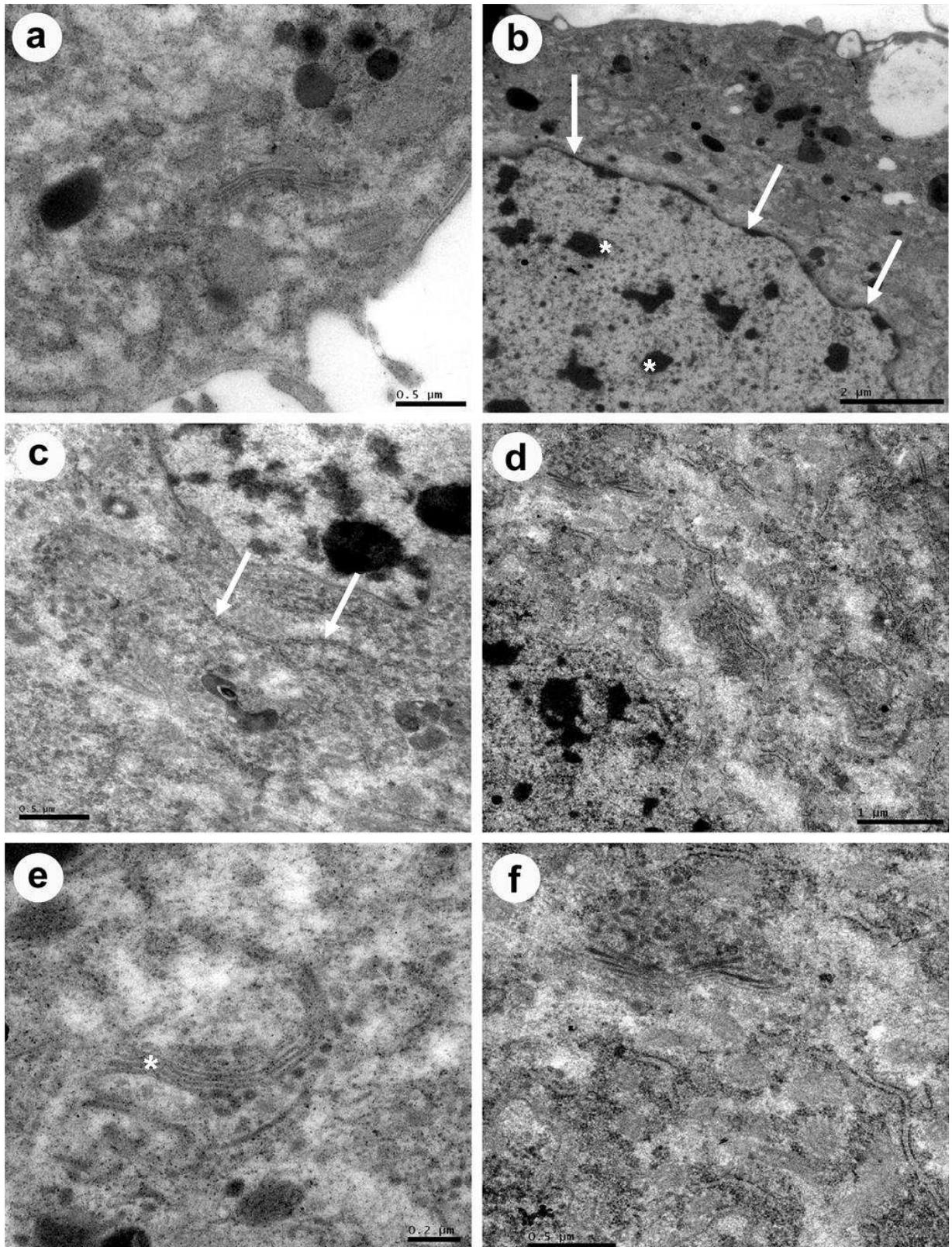
ANEXO 1 – Figura 01



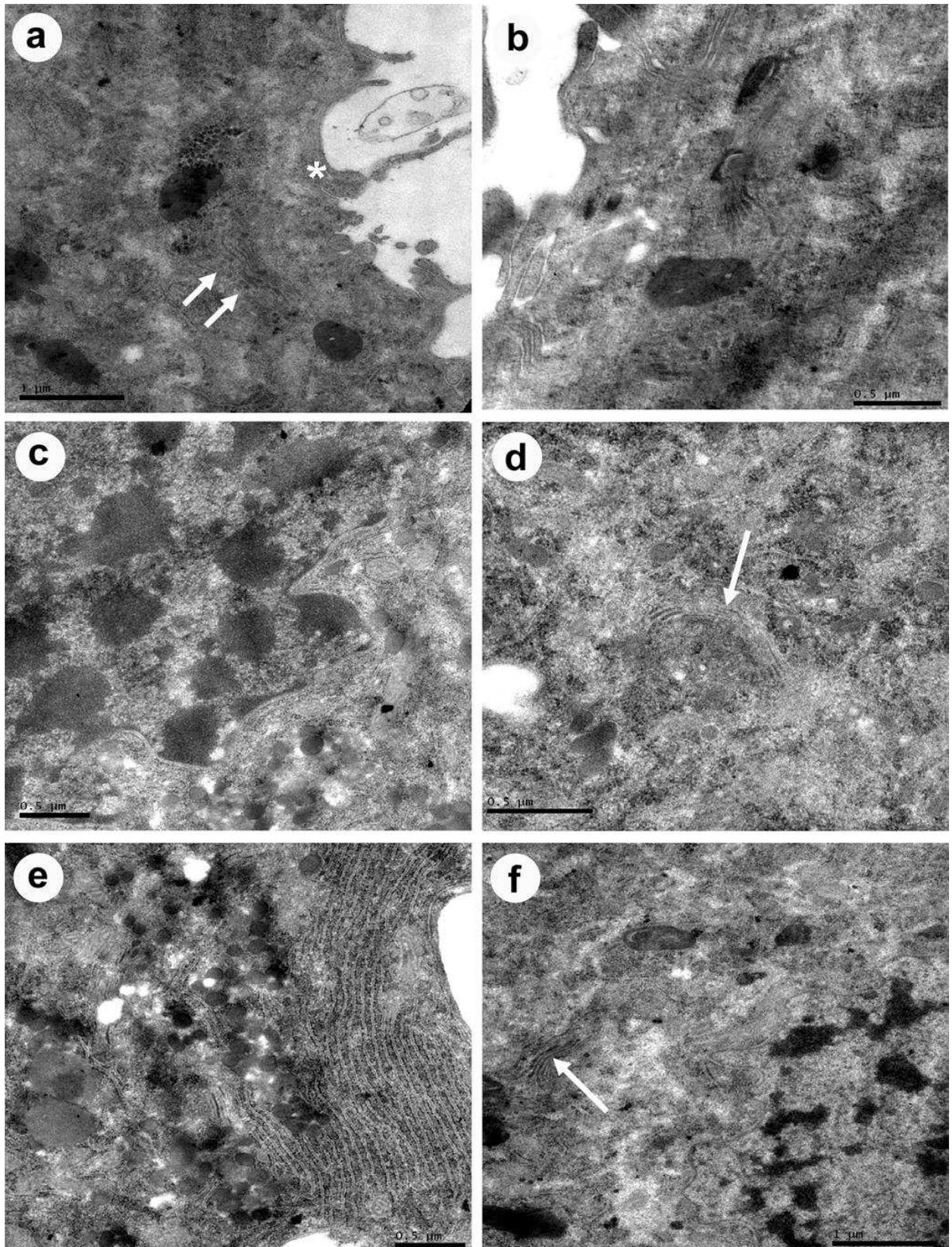
ANEXO 2 – Figura 02



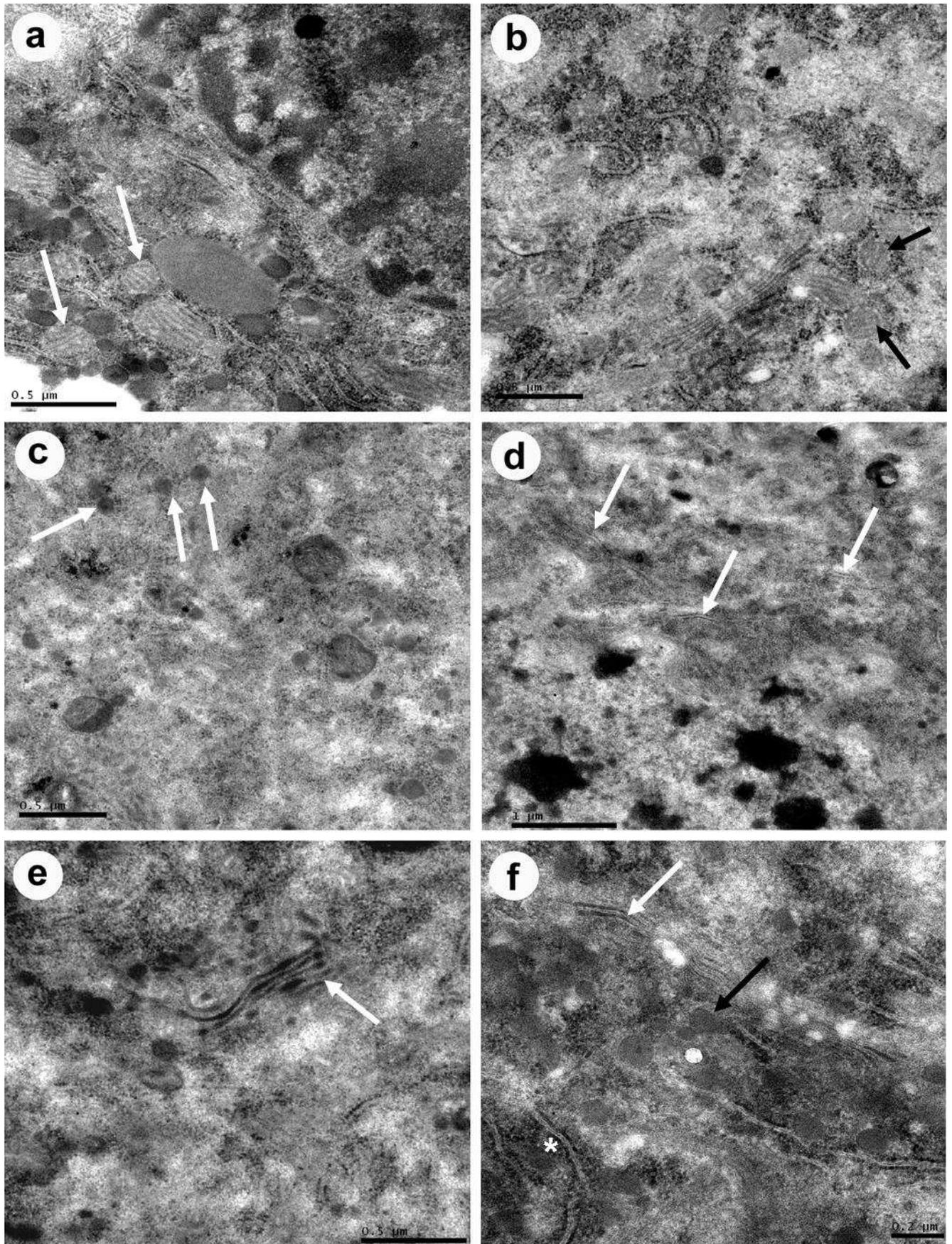
ANEXO 3 – Figura 03



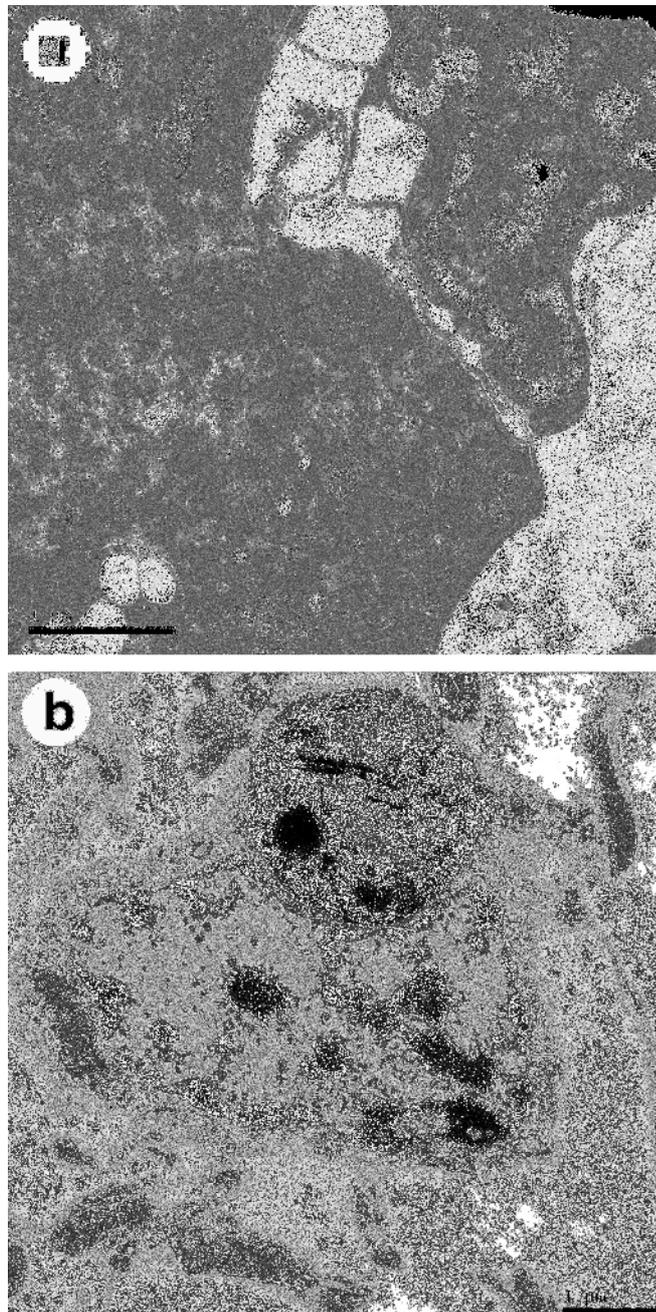
ANEXO 4 – Figura 04



ANEXO 5 – Figura 05



ANEXO 6 – Figura 06



## Referências

- ACHAVAL, M.; PENHA, M.A.P.; SWAROWSKY, A.; RIGON, P.; XAVIER, L.L.; VIOLA, G.G.; ZANCAN, D.M. 2005. **The terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments. Effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior.** *Braz J Med Biol Res* 38: 73-80.
- BARCO A, Bailey CH., Kandel ER. 2006. **Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory.** *Journal of Neurochemistry*, 97: 1520-1533.
- BEILHARZ EJ, BASSETT NS, SIRIMANNE ES, WILLIAMS CE, GLUCKMAN PD. 1995. **Insulin-like growth factor II is induced during wound repair following hypoxic-ischemic injury in the developing rat brain.** *Brain Res Mol Brain Res.* 29(1):81-91.
- BICKLER PE, DONOHOE PH, BUCK LT. 2005. **The hypoxic brain: suppressing energy-expensive membrane functions by regulation of receptors and ion channels.** In: STOREY KB (ed.), *Molecular Mechanisms of Metabolic Arrest. Life in Limbo*. BIOS, Oxford.
- BLOMGREN, K.; ZHU, C.; HALLIN, U.; HAGBERG, H. 2003. **Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain.** *Biochem Biophys Res Commun* 304: 551-559.
- BOUTILIER, R.G. 2001. **Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia.** *J Exp Biol* 204: 3171-3181.

## Referências

- BROOKS, S.P.J; STOREY, K.B. 1997. **Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs.** *Comp Biochem Physiol*, 118A (4): 1103-1114.
- BROWN, A. W., BRIERLEY, J. B. 1973. **The earliest alterations in rat neurones and astrocytes after anoxia-ischemia.** *Acta Neuropathol.* 23: 9-22.
- BULLOCK, T.H.; HORRIDGE, G.A. 1965. **Structure and function in the Nervous System of invertebrates.** San Francisco: Freeman and co.
- CHASE, R. 2002. **Behavior & its neural control in gastropod mollusks.** New York: Oxford University Press.
- CHO, Y.S.; PARK, S.Y. ; SHIN, H.S.; CHAN, F.K.M. 2010. **Physiological Consequences of Programmed Necrosis, an Alternative form of Cell Demise.** *Mol Cells* 29:327-332.
- CLEGG, J.S.; JACKSON, S.A.; POPOV, V.I. 2000. **Long-term anoxia in encysted embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*: viability, ultrastructure, and stress proteins.** *Cell Tissue Res* 301 (3): 433-446.
- DAL PIVA, M.M. 2004. **Organização das estruturas sensoriais cefálicas: ultraestrutura dos palpos labiais e tentáculos do caracol *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata).** [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

## Referências

- DE FRAGA, L.S. 2002. **Efeito da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus* (Pulmonata, Gastropoda).** [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- DE FRAGA, L.S. 2007. **Efeito da anoxia e da reoxigenação sobre o metabolismo do sistema nervoso central do caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus*.** [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS]
- DE FRAGA, L.S. ; DA SILVA, R.S.M.; ZANCAN, D.M. 2010. **Control of Carbohydrate Metabolism in an Anoxia-Tolerant Nervous System.** *J Exp Zool*, Part A 313: 539-547.
- DE FRAGA, L.S.; DA SILVA, R.S.M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D.M. 2004. **Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery.** *J Exp Zool*, 301 (12): 968-978.
- DORSETT, D.A. 1986. **Brains to cells: The neuroanatomy of selected gastropod species.** In: Willows, A.O.D. (ed). *The Mollusca. Neurobiology and Behavior*. New York: Academic Press;:101-187.
- DOS SANTOS, P.C.; GEHLEN, G.; FACCIÓNI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M. 2005a. **Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) by immunoelectron microscopy of the glial cells in the central nervous system of the snail *Megalobulimus abbreviatus*.** *Acta Zool (Stockholm)* 86: 135-144.

## Referências

- DOS SANTOS, P.C.; GEHLEN, G.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2002. **Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker.** *Acta Zool (Stockholm)* 83: 345-351.
- DOS SANTOS, P.C.; GOTTFRIED, C.; GEHLEN, G.; GONÇALVES, C.A.; ACHAVAL, M. 2005b. **Distribution and ontogeny of glial fibrillary acidic protein in the snail *Megalobulimus abbreviatus*.** *Comp Biochem Physiol*, Part A 141: 140-145.
- EASTMAN, A. 1993. **Apoptosis – a product of programmed and unprogrammed cell death.** *Toxicol Applied Pharmacol.* 121: 160-164.
- ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. 1994. **Ions and energy in mammalian brain.** *Prog Neurobiol* 43:37–71.
- FACCIONI-HEUSER, M.C. ; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2004. **Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata).** *Brazil J Med Biol Res* 37: 1043-1054.
- FACCIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C.; ACHAVAL, M. 1999. **The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructure approach.** *Acta Zool* , 80, 325-357.
- FARINA, M.; ANDRADE, L.R. 2003. **Structural Characterization of the Shell of the Land Snail *Megalobulimus* sp.** *Microsc Microanal* 9 (Suppl 2).

## Referências

- FURUTA, S.; OHTA, S.; HATAKEYAMA, T.; NAKAMURA, K.; SAKAKI, S. 1993. **Recovery of protein synthesis in tolerance-induced hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia.** *Acta Neuropathol* 86(4):329-36.
- HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. 2002. **Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress.** *Comp Biochem Physiol*, Part C 133: 537-556.
- HOCHACHKA, P.W.; BUCK, L.T.; DOLL, C.J.; LAND, S.C. 1986. **Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack.** *Proc Natl Acad Sci* 93: 9493-9498.
- HORN, A. C. M.; ACHAVAL, M.; ZANCAN, D. M. 2005. **The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* (bequaert, 1948) (Gastropoda, Pulmonata).** *Braz. J. Biol*, 65(3): 459-467.
- JAEGER, C.P. 1965. **Giant snail is used for muscles studies.** *Nat. Hist.*, 74 (9): 26-27.
- KALIL-GASPAR, P.; MARCUZZO, S.; RIGON, P.; MOLINA, C.G.; ACHAVAL, M. 2007. **Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: Evidence for TRPV-1 signaling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli.** *Comp Biochem Physiol*, Part A 148 (2007) 286–291.
- KAMINSKI, M.; MASAOKA, M.; KARBOWSKI, M.; KEDZIOR, J.; NISHIZAWA, Y.; USUKURA, J.; WAKABAYASHI, T. 2003. **Ultrastructural basis for the transition of cell**

**death mode from apoptosis to necrosis in menadione-treated osteosarcoma 143B cells.**

*Journal of Electron Microscopy* 52 (3): 313–325.

KANDEL, E.R., 2001. **The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses.** *Science*, 294 (5544):1030-1038.

KESARAJU, S.; SCHMIDT-KASTNER, R.; PRETINCE, H.M.; MLTON, S.L. 2009. **Modulation of stress proteins and apoptotics regulators in the anoxia tolerant turtle brain.** *J Neurochem* 109: 1413-1426.

KRIVORUCHKO, A.; STOREY, K.B. 2010. **Forever young. Mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity.** *Oxid Med Cell Longev* 3:3 : 186-198.

LARADE, k.; STOREY, K.B. 2007. **Arrest of transcription following anoxic exposure in a marine mollusc.** *Mol Cell Biochem* 303 (1-2): 243-249.

LIGHTON, J.R.B.; SCHILMAN, P.E. 2007. **Oxygen Reperfusion Damage in an Insect.** *PLoS ONE* 2 (12): e1267.

LUTZ P.L. ; NILSSON, G.E. ; PRENTICE, H. 2003. **The Brain Without Oxygen. Causes of Failure-Physiological and Molecular Mechanisms for Survival.** Kluwer Academic Publishers, NY.

LUTZ, P.L. 1992. **Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain.** *Annu Rev Physiol* 54: 601-618.

## Referências

- LUTZ, P.L.; McMAHON, P. ; ROSENTHAL, M. ; SICK, T.J. 1984. **Relation ships between aerobic and anaerobic energy production in turtle brain *in situ***. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 247: 740-744.
- MARTIN, L.J., AL-ABDULLA, N.A., BRAMBRINK, A.M., KIRSCH, J.R., SIEBER, F.E. AND PORTERA-CAILLIAU, C., 1998. **Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis**. *Brain Res Bull.*, 46: 281–309.
- MEHRANI, H.; STOREY, K.B. 1995. **Enzymatic control of glycogenolysis during anoxic submergence in the freshwater turtle *Trachemys scripta***. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(8): 821-30.
- MELDRUM, B. 1985 . **Excitatory amino acids and anoxic-ichemic brain damage**. *Trends Neurosci.* 8:47-48.
- MORAES, G.D.; ACHAVAL, M. ; DAL PIVA, M.M.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; WASSERMANN, G.F.; ZANCAN, D.M. 2010. **Ultrastructural analysis of the dorsal body gland of the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948)**. *Braz J Biol* 70 (2)
- NILSSON, G.E.; LUTZ, P.L. 2004. **Anoxia tolerant brains**. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:475-486.

NITATORI, T; SATO, N.; WAGURI, S.; KARASAWA, Y. ARAKI, H. ; SHIBANAI, K.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Y.; 1995. **Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis.** *J. Neurosci* 15, 1001-1011.

NÓBLEGA, H.G. ; RIGON, F. ; STENERT, C.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; ACHAVAL, M. 2006. **Permeability of the haemolymph–neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata): An ultrastructural approach.** *Comp Biochem Physiol*, Part A 144: 119-124.

NORTHINGTON, F.J., FERRIERO, D.M., FLOCK, D.L. AND MARTIN, L.J., 2001. **Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis.** *J Neurosci*, 21: 1931–1938.

PAGNUSSAT, A.S. 2005. **Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1 do hipocampo de ratos submetidos à isquemia global transitória e reperfusão.** [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, UFRGS].

RAMNANAN, C.J.; McMULLEN, D.C.; BIELECKI, A.; STOREY, K.B. **Regulation of sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) in turtle muscle and liver during acute exposure to anoxia.** *J Exp Biol* 213: 17-25.

RIGON, P.; CASTILHOS, J.; SAUR, L.; RODRIGUES, M.F.; ACHAVAL, M.; XAVIER, L.L. 2009. **NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus abbreviatus*: the involvement of pedal ganglia.** *Invert Neurosci*. 9: 155-165.

## Referências

- RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia de invertebrados**. São Paulo: Rocca, 2005.
- SCOTT, B.A.; AVIDAN, M.S.; CROWDER, C.M. 2002. **Regulation of hypoxic death in *C. elegans* by the insulin/IGF receptor homolog DAF-2**. *Science* 296 (5577): 2388-91.
- SIEGEL, G.; ALBERS, R.W.; BRADY, S.; PRICE, D. 2006. **Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects**. 7<sup>a</sup>ed. Elsevier, 2006.
- SWAROWSKY, A.; MONTEIRO, A.F. ; XAVIER, L.L.; ZANCAN, D.M.; ACHAVAL, M. 2005. **Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis**. *Comp Biochem Physiol, Part A* 141 (2005) 230–238.
- TSACOPOULUS, M.; MAGISTRETTI, P.J. 1996. **Metabolic coupling between glia and neurons**. *Journal of Neuroscience*, 16: 877-885
- VAN DER LINDEN, A.; VERHOYE, M.; NILSSON, G.E. 2001. **Does anoxia induce cell swelling in carp brains? Dynamic in vivo MRI measurements in crucian carp and common carp**. *J Neurophysiol* 85: 125-133.
- WEBSTER, H. DE F.; AMES, A. III. 1965. **Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation**. *J Cell Biol* 26: 885-909.

- WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. 1997. **Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle *Trachemys scripta elegans***. *Mol Cell Biochem* 170: 177-185.
- WINKELMANN, E.R. 2003. **Análise ultra-estrutural da morte cerebral na área CA1 do hipocampo após isquemia cerebral global transitória em ratos wistar**. [Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].
- WINKELMANN, E.R.; CHARCANSKY, A.; FACCIONI-HEUSER, M.C.; NETTO, C.A.; ACHAVAL, M. 2006. **An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion**. *Anat Embryol* 211: 423-434.
- WYLLIE, A. H. et al. **Cell death: the significance of apoptosis**. *Int Rev Cytol*, v. 68, p. 251-306, 1980
- ZANCAN, D.M. ; BRAUER, M.; ACHAVAL, M. 1997. **Monoamine-Containing neuron in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata)**. *Comp Biochem Physiol*, 118A (3): 765-772.
- ZANCAN, D.M.; 1996. **Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosas centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre, 179p. [Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS].

## *Referências*

- ZANCAN, D.M.; NÓBLEGA, H.G.; SEVERINO, A.G.; ACHAVAL, M. 1994. **Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata).** *Arch Anat Hist Embr Norm Exp* (75): 75-86.
- ZENG, Y.S., XU, Z.C. 2000. **Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forbrain ischemia.** *Neurosci. Res.* 37: 113-125.