

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia**

**ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL NA MORTE
CELULAR DA ÁREA CA1 DO HIPOCAMPO APÓS
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITÓRIA EM
RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado

ELIANE ROSELI WINKELMANN

Porto Alegre

2003

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

**ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL NA MORTE CELULAR DA ÁREA CA1 DO
HIPOCAMPO APÓS ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITÓRIA EM RATOS
WISTAR**

ELIANE ROSELI WINKELMANN

Orientador: Prof Dr Carlos Alexandre Netto

Co-orientadora: Profª Drª Matilde Achaval Elena

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.**

Porto Alegre, 2003

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Hugo e Lili,
meus irmãos Elisa e
Evandro e
ao meu noivo Sandro,
minha gratidão por tudo**

AGRADECIMENTOS

À professora Matilde Achaval Helena, pela sua dedicação, orientação e generosidade em compartilhar seu conhecimento e sua inestimável experiência como pesquisadora e professora.

Ao professor Carlos Alexandre Netto, pela oportunidade de ingressar como pesquisadora e pelo seu exemplo como professor, cientista, orientador e acima de tudo ser humano capaz de entender nossas inseguranças.

À professora Maria Cristina Faccioni-Heuser, pela sua paciência, seu companheirismo e sua dedicação em ensinar as complexas técnicas da microscopia eletrônica.

A todos os integrantes do Laboratório de Isquemia, especialmente a Sâmia e ao Adriano que compartilharam com a pesquisa através da cirurgia de isquemia.

A todos os integrantes do Laboratório de Histologia Comparada, que de uma forma ou outra contribuíram para a realização desta pesquisa e em especial, ao acadêmico Alexandre Charcansky pela sua dedicação e empenho.

À minha irmã Elisa C. Winkelmann, pela sua espontaneidade em sempre me auxiliar nas dificuldades.

Ao meu noivo que sempre soube de todos os meus passos e das dificuldades que enfrentei, compreendendo e incentivando a realização deste trabalho e acima de tudo acreditando nas minhas potencialidades.

Aos meus pais, por me ensinaram que a humildade é o maior tesouro que o ser humano deverá sempre possuir e que sem ela, não há conquistas, não há vitória.

Ao apoio financeiro das Agências: CNPq, FINEP, FAPERGS, PRONEX

A Deus, que sempre está comigo.

RESUMO

A isquemia cerebral global transitória ocorre durante a parada cardíaca, cirurgia cardiopulmonar e outras situações que deprivam o encéfalo de oxigênio e glicose por um curto período de tempo. Em ambos, humanos e animais, a isquemia deste tipo, leva a morte de neurônios em regiões vulneráveis do encéfalo incluindo o hipocampo. O mecanismo pelo qual os neurônios CA1 hipocampal morrem após um insulto isquêmico, ainda permanece controverso. A perda seletiva de neurônios CA1 hipocampal, que tipicamente morrem dentro das 24-72 horas, é um curso de tempo que pode ser consistente com a apoptose. Entretanto dados ultra-estruturais mostram a desagregação de poliribossomos e edema de organelas, achados que são indicativos de oncose.

Foi realizado um estudo ultra-estrutural na morte celular de neurônios piramidais CA1 hipocampal após de 10 e 20 min de isquemia cerebral global transitória em ratos machos adultos com 2, 4 e 10 dias de reperfusão. Em todos os experimentos, a temperatura foi mantida à 37°C durante a isquemia. Após a reperfusão de 2, 4 ou 10 dias, os animais foram anestesiados e fixados em solução de glutaraldeído e paraformaldeído tamponado. Após a decaptação, o encéfalo foi pós-fixado por 24 horas e foram obtidas, as secções coronais do hipocampo a (100 µm de espessura) no vibrátomo e a seguir refixadas, desidratados e embebidos de araldite. Posteriormente, foi selecionada a região CA1 e colada em bloco de resina para ser realizada as secções semifinas e corados com azul de toluidina 1%, para identificar os neurônios piramidais CA1. Da mesma forma as secções ultrafinas de (80 nm) foram seccionadas, coradas com citrato de chumbo 2% e examinadas no microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1200 EXII, CME-UFRGS).

Para a análise de neurônios piramidais CA1 hipocampal após a isquemia, classificamos os neurônios em diferentes fases do processo degenerativo, fase inicial, intermediária e final. Os grupos de 10 e 20 minutos de isquemia diferenciavam-se somente pelo fato que nos grupos de 20 minutos as alterações eram mais grotescas comparadas com os grupos de 10 minutos e por isto foram analisadas conjuntamente. Em todos os grupos foram encontrados neurônios nas diferentes fases, mas o que diferenciou foi a predominância de uma fase sobre a outra. No grupo de 2 dias de reperfusão, a fase inicial predominava sobre as demais fases e ainda encontrava-se uma grande quantidade de neurônios normais. Nestes grupos encontramos padrões morfológicos típicos da necrose oncocítica representado por alterações citoplasmáticas através do edema de organelas e formação de vacúolos. No grupo de 4 dias de reperfusão, observamos que a maioria dos neurônios já encontravam-se num processo mais avançado da degeneração. As alterações iniciavam-se no citoplasma através de edema de organelas, formação de vacúolos, porém a maioria dos neurônios já possuía rupturas de membranas nuclear e citoplasmática e grande quantidade de neurônios eletron-lúcidos, características da oncose necrótica. No grupo de 10 dias de reperfusão, também foram observadas alterações correspondentes da fase intermediária e final do processo, porém visualizavam-se poucos neurônios e o neuropilo encontrava-se mais organizado com uma grande quantidade de células gliais. Foram encontrados neurônios em fase inicial com alterações características da apoptose representados pelo início de condensação de cromatina em grumos organizados, porém estas eram raramente encontradas e nunca foram encontrados indicativos da apoptose em fase adiantada como a formação de corpos apoptóticos.

Conclui-se que os neurônios piramidais CA1 do hipocampo são vulneráveis seletivamente e seguem um padrão morfológico inicial da necrose oncocítica, e às vezes com alguma característica do processo apoptótico, porém nas fases mais adiantadas não foi visualizada nenhuma característica apoptótica, e sim da oncose; e portanto, classificando a morte celular como necrose oncocítica.

Palavras chaves: morte celular, isquemia cerebral, hipocampo.

ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3hidroxil-5metilsoxanol-propianato

CO₂ : gás carbônico

CG: complexo de Golgi

DGG: gama D-glutamilglicina

DNA: ácido dextrorribonucleico

EcoG: registros eletrocorticográficos

FSE: fluxo sanguíneo encefálico

GD: giro denteado

GFAP: proteína fibrilar ácida glial

iNOS : óxido nítrico sintetase

ME: microscopia eletrônica

M: mitocôndria

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato

NMDA: receptor n-metil-d-aspartato

O₂: oxigênio molecular

RE: retículo endoplasmático

RER: retículo endoplasmático rugoso

REL: retículo endoplasmático liso

RNA: ácido ribonucleico

SNC: sistema nervoso central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Isquemia Encefálica.....	14
1.2 Formação Hipocampal.....	19
1.2.1 Hipocampo.....	19
1.2.1.1 Regiões Hipocampais.....	19
1.2.1.2 Camadas das Áreas do Hipocampo.....	21
1.2.1.3 Células predominantes nas diversas áreas do hipocampo.....	22
1.2.1.4 Conexões Hipocampais.....	23
1.2.1.4.1 Vias aferentes.....	23
1.2.1.4.2 Vias intrínsecas.....	23
1.2.1.4.3 Vias longitudinais.....	24
1.2.1.4.4 Circuito local.....	24
1.2.1.4.5 Outras vias.....	25
1.2.1.4.6 Vias eferentes.....	26
1.2.2 Giro Denteado.....	26
1.2.3 Subiculum.....	27
1.3 Modelos Experimentais.....	28
1.4 A Morte Celular causada pela Isquemia.....	29
1.4.1 Vulnerabilidade Seletiva.....	29
1.4.1.1 Mecanismos clássicos implicados na Vulnerabilidade Seletiva.....	30

1.4.2 Morte Celular Tardia.....	33
1.4.3 Mecanismos de Morte Celular	33
1.4.3.1 Morte Celular por Apoptose.....	34
1.4.3.2 Morte Celular por Necrose.....	39
1.4.3.3 Co-existência de Necrose e Apoptose.....	44
1.4.3.4 Classificação da morte celular segundo o Comitê da Sociedade de Patologistas Toxicológicos.....	45
1.5 Justificativa.....	48
2. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	50
3. OBJETIVO.....	51
3.1 Objetivo Geral.....	51
3.2 Objetivos Específicos.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Animais.....	52
4.2 Tratamento.....	52
4.3 Procedimentos da Cirurgia Isquêmica.....	53
4.4 Sacrifício e Perfusão Transcardíaca.....	57
4.5 Preparação Histológica para Microscopia Eletrônica.....	58
5. RESULTADOS.....	61
5.1 Grupo Controle.....	62
5.1.1 Neurônios piramidais.....	62
5.1.2 Células gliais.....	64
5.2 Grupo de 10 min de isquemia e 2 dias de reperusão.....	67
5.2.1 Fase inicial do processo degenerativo.....	67
5.2.2 Fase intermediária do processo degenerativo.....	68
5.2.3 Fase final do processo degenerativo.....	69
5.3 Grupo de 10 min de isquemia e 4 dias de reperusão.....	77
5.3.1 Fase inicial do processo degenerativo.....	78
5.3.2 Fase intermediária do processo degenerativo.....	78
5.3.3 Fase final do processo degenerativo.....	79
5.4 Grupo de 10 min de isquemia e 10 dias de reperusão.....	86

5.4.1 Fase inicial do processo degenerativo.....	87
5.4.2 Fase intermediária do processo degenerativo.....	87
5.4.3 Fase final do processo degenerativo.....	88
5.5 Grupo de 20 min de isquemia e 2 dias de reperfusão.....	95
5.5.1 Fase inicial do processo degenerativo.....	95
5.5.2 Fase intermediária do processo degenerativo.....	96
5.6 Grupo de 20 min de isquemia e 4 dias de reperfusão.....	104
5.6.1 Fase inicial do processo degenerativo.....	105
5.6.2 Fase intermediária do processo degenerativo.....	106
5.6.3 Fase final do processo degenerativo.....	107
5.7 Grupo de 20 min de isquemia e 10 dias de reperfusão.....	113
5.7.1 Fase inicial do processo degenerativo.....	113
5.7.2 Fase intermediária do processo degenerativo.....	114
5.7.3 Fase final do processo degenerativo.....	114
6. DISCUSSÃO.....	120
6.1 Episódios de 10 e 20 min de isquemia seguidos de 2 dias de reperfusão.....	125
6.2 Episódios de 10 e 20 min de isquemia seguidos de 4 dias de reperfusão.....	132
6.3 Episódios de 10 e 20 min de isquemia seguidos de 10 dias de reperfusão.....	136
7. CONCLUSÕES.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Regiões do Hipocampo.....	20
Figura 2. Diagrama esquemático das sub-regiões e estratificação laminar do hipocampo esquerdo em relação aos elementos da via trissináptica.....	25
Figura 3. Diagrama mostrando as relações entre oncose e apoptose e que ambos levam a necrose.....	47
Figura 4. Representação esquemática de uma célula normal e as alterações estruturais da lesão celular reversível.....	48
Figura 5. Procedimento cirúrgico utilizado para a obtenção de isquemia prosencefálica por oclusão de 4 vasos em ratos.....	54
Figura 6. Diagrama da vascularização do encéfalo de ratos no plano sagital.....	55
Figura 7. Posição de rigidez de descerebração.....	56
Figura 8. Procedimentos de perfusão por via intracardiaca.....	57
Figura 9. Diagrama da preparação do material para a microscopia eletrônica.....	59
Figura 10. Ultra-micrótomo RMC-MT 6000-XL (Departamento de Ciências Morfológicas –ICBS- UFRGS).....	60
Figura 11. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos do grupo controle.....	65
Figura 12. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos do grupo controle.....	66
Figura 13. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória	

após 2 dias de reperfusão.....	70
Figura 14. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	71
Figura 15. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	72
Figura 16. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	73
Figura 17. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	74
Figura 18. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	75
Figura 19. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	76
Figura 20. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	80
Figura 21. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	81
Figura 22. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	82
Figura 23. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	83

após 4 dias de reperfusão.....	83
Figura 24. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	84
Figura 25. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	85
Figura 26. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	89
Figura 27. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	90
Figura 28. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	91
Figura 29. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	92
Figura 30. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	93
Figura 31. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	94
Figura 32. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	98
Figura 33. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	99

Figura 34. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 A1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	100
Figura 35. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão	101
Figura 36. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	102
Figura 37. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão.....	103
Figura 38. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	108
Figura 39. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	109
Figura 40. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	110
Figura 41. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	111
Figura 42. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão.....	112
Figura 43. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	116
Figura 44. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de	

ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	117
Figura 45. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	118
Figura 46. Micrografias eletrônicas ca camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 20 minutos de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão.....	119
Tabela 1: Características principais das diferentes alterações neuronais encontradas nas diferentes fases do processo de morte celular na área CA1 do hipocampo de rato após 10 e 20 min de isquemia cerebral global transitória em 2, 4 e 20 dias de reperfusão.....	121

1. INTRODUÇÃO

1.1 ISQUEMIA ENCEFÁLICA

A etimologia da palavra isquemia provém da associação dos vocábulos gregos *ischein* (ἴσχω) que significa conter ou reter e *haima* (αἷμα) que significa sangue (DIXON, 1965). Em 1827, William Stokes e Robert foram os primeiros a descrever clinicamente as alterações decorrente do bloqueio agudo da circulação na atividade encefálica, em pacientes com doenças cardíacas e vasculares portadoras de episódios de perda súbita de consciência (DIXON, 1965).

Segundo Schmidt-Kastner e Freund (1991), a isquemia é uma redução severa ou um completo bloqueio do fluxo sangüíneo. A hipóxia denota a redução no conteúdo de oxigênio no sangue, que ainda circula e pode remover metabólitos. A isquemia (DIXON, 1965) tem caráter transitório, o que é de fundamental importância para diferenciá-la do infarto que é caracterizado pelo bloqueio definitivo do fluxo sangüíneo encefálico. Reperfusão é o termo utilizado para identificar o intervalo de tempo que sucede uma isquemia encefálica.

A isquemia cerebral global transitória ocorre durante a parada cardíaca, cirurgia de transplante cardiopulmonar e outras situações que privam o encéfalo de oxigênio e glicose por curtos períodos de tempo. Tanto em animais e humanos este tipo de isquemia leva a morte de neurônios em regiões vulneráveis do encéfalo, incluindo o hipocampo, o estriado, o córtex cerebral e o cerebelo (CRAIN et al., 1988; KIRINO, 1982; PETITO et al., 1987; PULSINELLI et al., 1982).

A parada cardíaca, dependendo de sua duração, leva a danos encefálicos de extensão variável. Aproximadamente 10 a 20% destes pacientes recuperam-se, os outros morrem ou persistem em um estado vegetativo (BASSETI et al., 1996). Foi observado nos pacientes que se recuperam, a manifestação de déficits neuropsicológicos como amnésia anterógrada ou déficits na memória semântica (ALEXANDER 1997; REMPEL CLOWER et al., 1996). Eventos embólicos ou marcada hipotensão durante cirurgias cardiopulmonares podem causar isquemia encefálica, levando a déficits neuropsicológicos que persistem em 35% dos pacientes (SHAW et al., 1987).

A ressuscitação cardiopulmonar em vítimas de parada cardíaca, dentro do hospital, promove a restauração espontânea da circulação em aproximadamente 70.000 pacientes a cada ano nos Estados Unidos. No mínimo 60% destes pacientes morrem no hospital como resultado de dano encefálico extenso, e somente 3-10% dos pacientes que sobrevivem são finalmente capazes de retornar a sua vida normal (KRAUSE et al.,1987). Desta forma, a injúria encefálica por isquemia encefálica global transitória completa (parada cardíaca) e isquemia encefálica incompleta regional (ataque isquêmico) afeta um grande número de pacientes com morte ou incapacidade permanente.

O encéfalo é muito sensível à hipoxia-isquemia por causa de seu alto consumo de oxigênio, combinado com seus baixos estoques de carboidratos. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, muitos fatores durante a volta da circulação sangüínea (reperfusão) podem aumentar ainda mais o dano neuronal, especificamente em áreas vulneráveis do encéfalo. Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, isolados ou combinados, levam ao dano neuronal: aumento de Ca^{++} intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, formação de radicais livres e acidose láctica (TAYLOR et al.,1996).

Quatro aspectos têm sido de grande relevância para as investigações da injúria encefálica por isquemia e reperfusão (KRAUSE et al., 1988). 1º) A rápida perda de compostos de fosfatos de alta energia durante a isquemia seguido pelo seu restabelecimento dentro dos primeiros 15 minutos de reperfusão. O composto energético do encéfalo é o ATP e este está dependente da perfusão sangüínea adequada, chegando a zero dentro de aproximadamente 4 min de isquemia. A depleção energética está associada a despolarização e ao aumento de Ca^{++} intracelular, o que culmina com uma cadeia de eventos, incluindo a lipólise durante a

isquemia seguida pelo metabolismo de ácidos graxos livres e geração de um radical superóxido (O_2^-) durante a reperfusão. 2º) As evidências morfológicas mostram que a maioria dos danos estruturais ocorrem durante a reperfusão, especialmente em zonas seletivamente vulneráveis: a extensão da injúria do tecido, seguido de isquemia pode refletir danos durante a reperfusão (Negovskii 1962), dando vários estudos morfológicos suporte para esta hipótese e também identificaram neurônios seletivamente vulneráveis, hilo hipocampal, neurônios piramidais de CA1 do hipocampo e neurônios piramidais corticais da camada 3 e 4 (JENKINS et al.,1981; KUMAR et al.,1987). 3º) A hipoperfusão encefálica progressiva durante a reperfusão pós-isquemia: a hipoperfusão capilar foi primeiramente mostrado qualitativamente (AMES et al., 1968) e subseqüentemente estudos quantitativos demonstraram que a perfusão capilar do córtex cerebral atingiu somente 30% do normal após 90 min de reperfusão seguido de 10 e 20 min de isquemia global (KRAUSE et al., 1988). Entretanto, isto leva a uma falência do metabolismo de alta energia e a morte neuronal durante a reperfusão. A carga de alta energia tecidual, a qual se aproxima de zero dentro de 4 min de isquemia completa (KRAUSE et al., 1988), restabeleceu-se rapidamente durante a isquemia seguida de reperfusão, e este restabelecimento é aparentemente afetado pela hipoperfusão pós-isquemia (HOSSMAN et al., 1976; MEIS et al., 1990; WHITE et al., 1991). A hipoperfusão pós-isquemia é um evento bioquímico de grande importância e não é provável ser ele mesmo envolvido na morte neuronal que ocorre durante a reperfusão (WHITE et al., 2000). 4º) A supressão prolongada de síntese proteica em neurônios seletivamente vulneráveis. A síntese de proteínas em neurônios vulneráveis é substancialmente suprimida durante a reperfusão pós-isquemia (KRAUSE et al., 1988). A supressão pós-isquêmica de síntese proteica foi primeiro descrito por Kleihues e Hossmann (1971), os quais observaram 30% de decréscimo na incorporação dos aminoácidos após 4 horas de reperfusão seguido de 30 min de isquemia. Em neurônios seletivamente vulneráveis, a supressão pós-isquêmica da síntese da proteínas encefálicas é rápida, severa e prolongada. Estudos como os de Cooper e colaboradores (1977) e de Nowak e colaboradores (1985) mostraram que a isquemia de 3 min já atinge supressão da síntese de proteínas durante a reperfusão. O grau de supressão era dependente da duração da isquemia por períodos isquêmicos de menos de 5 minutos. Os períodos mais longos de isquemia não resultaram em nenhuma supressão adicional, mas retardaram o retorno da síntese de proteínas nas áreas que sobreviveram .

A síntese protéica, nas áreas encefálicas pós-isquêmicas, não é regionalmente homogênea, sendo que o córtex cerebral, a área CA1 do hipocampo e do hilo e do núcleo caudado mostraram uma supressão prolongada e severa da síntese de proteínas, enquanto que o giro denteado e as estruturas do tronco encefálico foram afetadas em menor proporção (BODSCH et al., 1985; THILMANN et al., 1986; YOSHIDOMI et al., 1989; ARAKI et al., 1990; WIDMANN et al., 1991). Em vários destes estudos a área CA1, que é a mais suscetível à morte neuronal causada pelo evento isquêmico, (PULSINELLI et al., 1982) nunca recuperou a síntese de proteínas, indicando que o déficit prolongado está correlacionado com a vulnerabilidade seletiva. Futura e colaboradores (1993) mostraram que a melhor sobrevivência neuronal seguido de um insulto isquêmico pode ser induzida por breves períodos de isquemia prévia e que esta tolerância estava associada com a recuperação precoce da síntese de proteínas em neurônios da CA1 do hipocampo.

A integridade do DNA (O'NEIL et al., 1991; WHITE et al., 1991; WHITE et al., 2000), a maquinaria de transcrição (LINDVALL et al., 1992; XIE et al., 1989; NOWAK et al., 1990; ONODERA et al., 1991; KINDY et al., 1991; MATSUMOTO et al., 1990), o transporte e o processamento do mRNA (TIFFANY et al., 1995; KRAUSE et al., 1993; ROBERTS et al., 1976), e a competência de transdução nos ribossomos (DEGRACIA et al., 1993) estão preservados na reperfusão precoce e há uma adequada recuperação de fosfatos de alta energia para suportar a síntese de peptídeos (NOWAK, 1985). De acordo com estes estudos, constata-se que estes componentes não são responsáveis pela inibição da síntese de proteínas, e que também, não se tem um estudo sistemático dos efeitos da isquemia e reperfusão nos níveis intracelulares de todos os aminoácidos (WHITE et al., 2000). Níveis de tRNAs- aminoacil reduzem em torno de 60 – 70 % dos valores controles durante a reperfusão precoce (BODSCH et al., 1985) e tRNAs não carregados podem estar envolvidos na ativação de quinases direcionadas à inibição da transdução inicial através da modificação de fatores eucarióticos iniciais (WHITE et al., 2000).

A importância do retorno da síntese de proteínas durante a reperfusão precoce deve-se ao fato de que, na reperfusão tardia, outros mecanismos fundamentais podem servir para perpetuar a supressão de síntese de proteínas. Por 8 h de reperfusão seguido de 15 min de parada cardíaca em cães, o potencial de repouso das membranas é perdido, associado com um concomitante decréscimo de 30% do conteúdo lipídios e as evidências ultra-estruturais mostram que ocorrem grandes rupturas no plasmalema de neurônios seletivamente

vulneráveis (KUMAR et al., 1987). Desta forma, a proposta terapêutica terá de permitir a síntese de proteínas antes de 4-8 horas de reperfusão a fim de possibilitar que os neurônios vulneráveis respondam, prevenindo sua deteriorização (WHITE et al., 2000).

Há evidências de que uma supressão irreversível da síntese de proteínas representa uma lesão celular letal, e a incapacidade para expressar proteínas leva a morte celular (WHITE et al., 2000). Futura e colaboradores (1993) têm demonstrado que a recuperação da síntese de proteínas é provavelmente o pré-requisito para prevenir a morte neuronal. Hata e colaboradores (2000) demonstraram recentemente, que nos modelos de isquemia focal a falha precoce da síntese de proteínas (1h após isquemia) ocorre na zona de penumbra antes da depleção de ATP e precisamente demarca o último grau da expansão da lesão. Pesquisas têm mostrado uma redução na morte neuronal retardada com a administração de inibidores conhecidos da síntese de proteínas, tais como a ciclohexamida (MARTIN et al., 1998; SHIGENO et al., 1990).

Sabe-se que o metabolismo do SNC depende do constante aporte de O₂, ocorrendo a morte das células nervosas simplesmente pela “falência energética”, ou seja, que quando as reservas energéticas não fossem mais suficientes para manter os processos celulares básicos, como a manutenção do gradiente iônico (KOGURE e KATO, 1993). Entretanto, esta teoria sobre falência energética tomou outro rumo em 1982, quando Pulsinelli e colaboradores (1982) e Kirino (1982) descreveram simultaneamente o fenômeno de morte neuronal tardia, no qual a morte celular dava-se horas após um insulto isquêmico ter ocorrido, quando o estado energético e a homeostase já estariam restauradas.

Nos primeiros 15 a 20 segundos de isquemia há uma redução de 1/3 do ATP celular basal, o que funcionalmente está relacionado com a perda da atividade elétrica espontânea. Os níveis de ATP teciduais são mantidos ainda por 2 a 4 minutos de isquemia às custas das reservas de glicogênio e fosfocreatina (Farooqui et al., 1995). Após 2 minutos e meio de isquemia, permanece 40% do ATP aferido em condições basais, enquanto aos 10 minutos estes níveis encontram-se entre 10 e 20% (KOGURE e KATO, 1993).

Durante a isquemia praticamente todo o oxigênio residual é utilizado. Este consumo é temporariamente desacelerado após a supressão da atividade elétrica espontânea do neurônio, aumentando novamente durante o período de despolarização anóxica (RAFFIN et al., 1991).

Durante a isquemia há uma intensa atividade glicolítica e conseqüente formação de lactato. Em ratos, após 30 minutos de isquemia a glicose cai para 10% dos níveis cerebrais basais, enquanto o lactato aumenta cerca de 10 vezes. Observou-se um aumento do consumo de glicose na primeira hora de reperfusão seguido por redução da mesma 48 horas após (PULSINELLI et al., 1982) e no 5º dia ocorre novamente no hipocampo um progressivo aumento no consumo da glicose, especialmente na região CA1. No 7º dia, o consumo de glicose duplica-se e permanece elevado até o 14º dia. Este fenômeno é atribuído à proliferação de células gliais (RISCHKE et al., 1992; KOZUKA et al., 1993)

1.2 FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

A formação hipocampal está localizada adjacente ao córtex entorinal, sendo esta umas das maiores vias de entrada para a formação hipocampal. A formação hipocampal inclui hipocampo, giro denteado e o subiculum. Estas estruturas têm uma estrutura cortical simplificada de alocórtex. (KNOWLES, 1992). Estruturas perialocorticais (presubiculum, parasubiculum e córtex entorinal) são incluídos por alguns autores (CHRONISTER e WHITE, 1975; AMARAL e WITTER, 1989).

1.2.1 HIPOCAMPO

1.2.1.1 REGIÕES HIPOCAMPAS

Ramón y Cajal (1911) dividiu o hipocampo em duas regiões: inferior (região proximal denominada grande) e região superior (região distal denominada pequena). Entretanto, a classificação mais usada é a de Lorente de Nó (1934), o qual subdividiu em três campos: CA1, CA2 e CA3. O campo CA1 corresponde a região superior de Ramón y Cajal e os campos CA2 e CA3 equivale à região inferior. Além dessas diferenças no tamanho de células entre os campos, há também, diferenças de conexões: as células piramidais de CA3 recebem

fibras musgosas do giro denteado e das regiões CA1 e CA2 não; CA2 definido como a zona de células interposta entre CA3 e CA1 (AMARAL e WITTER, 1995).

Em humanos, a região CA1 é uma zona de pequenos e dispersos neurônios piramidais triangulares adjacente ao subiculum. Em roedores os neurônios piramidais são densamente aglomerados. A região CA2 está localizada entre CA1 e CA3 e na espécie humana consiste de células piramidais grandes, ovóides e densamente aglomeradas. Em roedores é mais pequena e muito menos diferente. A região CA3 está localizada na curva do hipocampo e possui neurônios semelhantes a região CA2, porém menos densamente aglomerada. A região com a concavidade do giro denteado foi descrita por Lorente de Nó como CA4, mas atualmente é denominada de hilo do giro denteado, apresentando poucos neurônios grandes (KNOWLES, 1992).

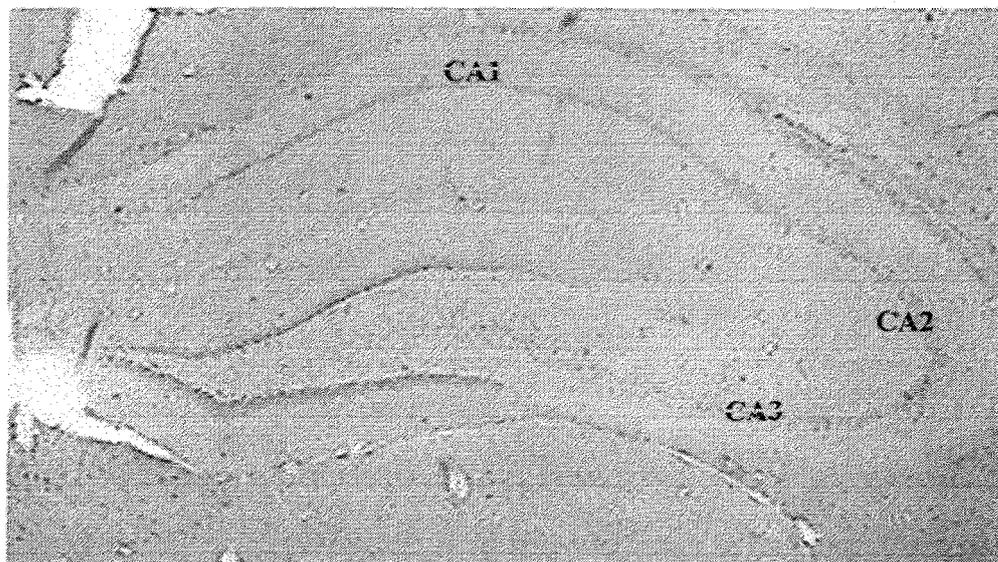


Figura 1. Fotomicrografia das regiões do corno de Ammón do hipocampo de rato. Regiões CA1, CA2 e CA3. Técnica hematoxilina e eosina. Aumento 2x.

1.2.1.2 CAMADAS DAS ÁREAS DO HIPOCAMPO

O corno de Ammón do hipocampo é organizado em camadas com diferentes tipos celulares. Esta organização é similar nas três áreas hipocampais (CA1, CA2, CA3), com exceção da camada lúcida que é específica para CA3. A camada celular principal é denominada de piramidal. Dorsalmente a ela, encontra-se o estrato oriens e dorsal a ela o estrato alveus. Ventral à camada piramidal encontra-se o estrato radiatum em CA1 e CA2 e especificamente em CA3 observa-se o estrato lucidum, que é constituído por fibras musgosas originadas do giro denteado, e ventral a este encontramos o estrato radiatum. Ventral do estrato radiatum encontra-se o estrato lacunoso-molecular (AMARAL e WITTER, 1995).

Shlander e Frotscher (1986) estudando as células não piramidais (interneurônios) das regiões CA1 e CA3 do hipocampo de porcos observaram um padrão heterogêneo de neurônios, considerando a localização do corpo e o padrão dendrítico. Seus pericários eram encontrados em todas as camadas e seus dendritos tinham uma orientação regular menor quando comparado com os neurônios piramidais. Muitas células possuíam um padrão intermediário com extensos dendritos em todas suas direções. Os dendritos não mostravam espinhos, mas exibiam numerosas varicosidades. Os axônios das células não piramidais podiam, algumas vezes, serem vistas estendendo-se para a camada de células piramidais. Ambos o corpo celular e os dendritos eram densamente cobertos com botões sinápticos que principalmente formavam contatos sinápticos assimétricos e somente, ocasionalmente, eram observados contatos sinápticos simétricos.

No estrato lacunoso-molecular da área CA1 hipocampal, de porcos, os neurônios não piramidais (interneurônios) de cortes hipocampais, possuem respostas especiais que se diferenciam das células piramidais e outros tipos de interneurônios. Possuem potencial de ação com picos após a despolarização, alta resistência de entrada e baixo pico de adaptação. Os somas destas células possuem forma fusiforme (15 x 25 μm) e tem processos múltiplos e estão localizados na borda entre o estrato lacunoso-molecular e o estrato radiatum. Seus dendritos atravessavam o estrato lacunoso-molecular e projetavam-se para dentro do estrato radiatum. Seus axônios fazem contatos sinápticos axodendríticos primeiramente no estrato

lacunoso-molecular e no estrato radiatum, mas também no estrato molecular do giro dentado (KUNKEL et al., 1988).

Gulyas e colaboradores (1998) realizaram um estudo em células gigantes do estrato radiatum da região CA1 do hipocampo de ratos. Elas expressam uma forma direta de potencial de longa duração de tempo (LTP) mas a sua identidade funcional quanto interneurônio ou célula principal ainda permanece desconhecida. Ao realizar-se as reconstruções axonal e da árvore dendrítica revelaram propriedades morfológicas similares de células piramidais de CA1 com algumas características diferentes. Eles tipicamente tem dendritos apicais de diâmetro grande, ou quando somente um dendrito aparece, ele ainda se bifurca. Dendritos apicais formavam um ramo dendrítico no estrato lacuno-molecular e os dendritos, mas não o soma, eram densamente cobertos com espinhos. O axônio descende para o estrato oriens e emite vários ramos colaterais que se dirigem horizontalmente, permanecendo no estrato oriens.

1.2.1.3 CÉLULAS PREDOMINANTES NAS DIVERSAS ÁREAS DO HIPOCAMPO

A camada piramidal é formada em sua maioria pelas células piramidais e uma pequena parte por células em cesto. As células piramidais tem uma árvore dendrítica basal, que se estende para dentro do estrato oriens e uma árvore apical, que se estende à fissura hipocampal. Lorente de Nó (1934) subdividiu CA1 e CA3 em três subáreas (CA1a, CA1b, CA1c; CA3a, CA3b, CA3c), baseado nas diferenças da organização dendrítica das células piramidais. As células piramidais CA3 têm comprimento dendrítico em torno de 16 μm e em CA1 em torno de 13 μm . A grande maioria das árvores dendríticas é encontrada no estrato oriens e em de torno 20% está no estrato lacunoso-molecular. As células em cesto são de vários tamanhos e formas. Também formam árvores dendríticas apical e basal como as células piramidais, mas possuem poucos espinhos dendríticos; seus axônios estendem-se transversalmente a partir do corpo e formam o plexo em cesto que inerva o corpo celular das células piramidais (AMARAL e WITTER, 1995).

1.2.1.4 CONEXÕES DO HIPOCAMPO

1.2.1.4.1 VIAS AFERENTES

As aferências para o hipocampo consistem de vias corticais e subcorticais. O hipocampo recebe aferências do hipocampo contralateral, fibras de associação de outras regiões hipocámpais do mesmo lado, do giro denteado, do subiculum e do córtex entorinal. Estas fibras geralmente liberam aminoácidos excitatórios e algumas podem co-liberar vários peptídeos. A maior via de chegada é a partir do córtex entorinal para o subiculum e deste para as células granulares do giro denteado, através da via perforante. Do giro denteado vão para as células piramidais, via fibras musgosas, das células piramidais de CA3 para as células piramidais de CA1, via colaterais de Schaffer, e retornam para o subiculum e o córtex entorinal. Paralelamente, outras vias existem a partir do córtex entorinal e subiculum diretamente para CA3 e CA1. Colaterais de células piramidais de CA1 e CA3 vão para o septo. CA1 também envia fibras para o hipotálamo, amígdala e bulbo olfatório e núcleo accumbens (KNOWLES, 1992). O subiculum recebe aferências do córtex pré-frontal dorsolateral, enquanto que o córtex entorinal recebe aferências de regiões, tais como, dos córtices parahipocámpal e temporal, orbitofrontal, bulbo olfatório, amígdala, septo medial, núcleo da rafe, locus ceruleus, tálamo e CA3 do hipocampo (CHRONISTER e WHITE, 1975; BRODAL, 1981; TRAUB e MILES, 1991). Outras aferências para o hipocampo incluem: septo (que contém acetilcolina e GABA), núcleo da rafe (que contém serotonina) e locus ceruleus (que contém norepinefrina) (CHRONISTER e WHITE, 1975; TRAUB e MILES, 1991).

1.2.1.4.2 VIAS INTRÍNSECAS

As três maiores vias sinápticas intrínsecas do hipocampo são: o circuito lamelar, a via longitudinal e o circuito local (KNOWLES, 1992).

O circuito trissináptico lamelar é a maior via dentro da formação hipocampal entra a partir do córtex entorinal pela via perforante através da fissura hipocampal para as células granulares do giro denteado. As células granulares enviam seus axônios, fibras musgosas para as células piramidais de CA3. As colaterais das células piramidais de CA3 e as colaterais de Schaffer fazem sinapses com as células piramidais de CA1. As células piramidais de CA1 enviam um ramo de seus axônios de volta para o córtex entorinal (KNOWLES, 1992).

1.2.1.4.3 VIAS LONGITUDINAIS

As vias longitudinais ipsilaterais dentro do hipocampo, a via perforante das células granulares do córtex entorinal se difundem ao mínimo alguns milímetros ao longo do eixo septal-temporal do hipocampo. Alguns neurônios do hilo enviam fibras para as células granulares (HJORTH-SIMONSEN e LAURBERG, 1977; LAURBERG e SORENSEN, 1981).

1.2.1.4.4 CIRCUITO LOCAL

Dentro das sub-regiões do hipocampo e giro denteado, interneurônios e células principais formam circuitos sinápticos locais que influenciam a função hipocampal. Células granulares enviam extensivas colaterais para muitos interneurônios particularmente as células musgosas e no hilo fazem sinapse com outros interneurônios hilares e células granulares (HJORTH-SIMONSEN e LAUBERG, 1977; SCHARFMAN et al., 1990). As células piramidais de CA3 têm extensiva colateralização axônica local e excitam células piramidais CA3 vizinhas e interneurônios inibitórios (MILES e WONG, 1986; ISHIZUKA et al., 1990; MILES, 1990). Interneurônios em CA3 inibem células piramidais e outros interneurônios (MILES e WONG, 1984). Dentro de CA1, neurônios piramidais enviam colaterais axônicos excitatórios para várias classes de interneurônios (KNOWLES e SCHWARTZKRAIN, 1981a,b; LACAILLE et al., 1987).

OUTRAS VIAS

Cada hipocampo envia fibras para o hipocampo contralateral através das comissuras ventral e dorsal. Além disso, uma porção da projeção a partir do córtex entorinal inerva as regiões CA1 e CA3 do hipocampo, diretamente (LORENTE DE NÓ, 1934; WITTER e GROENEWEGEN, 1984).

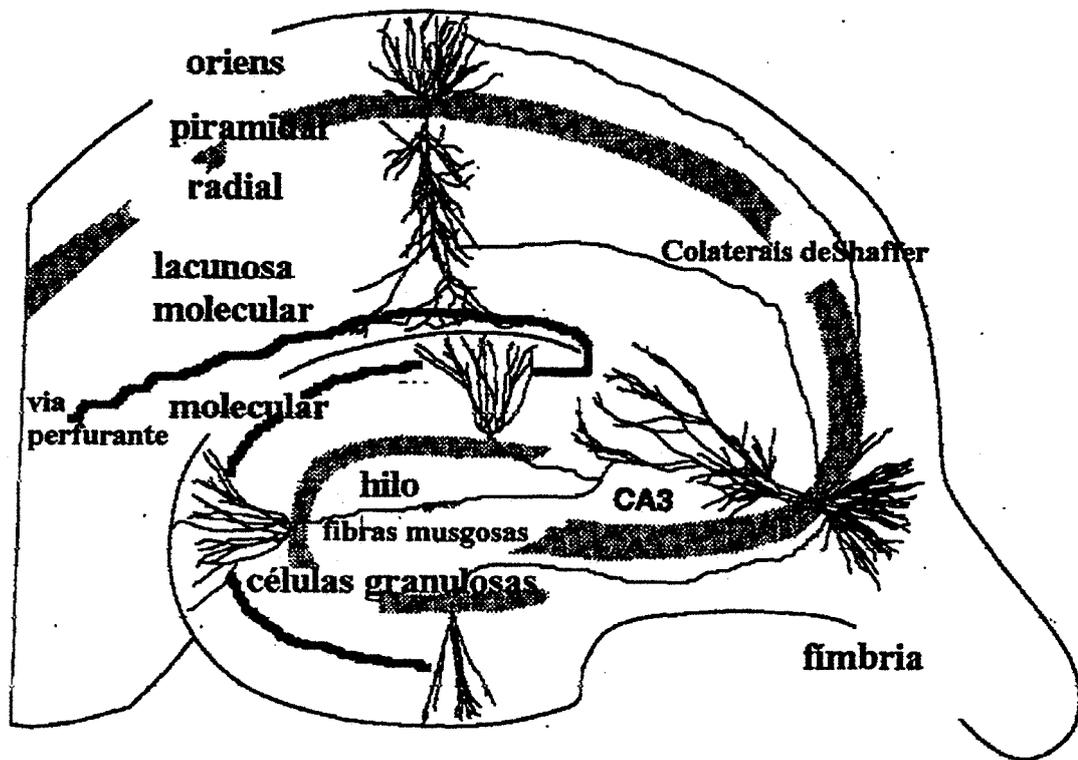


Figura 2. Diagrama esquemático das sub-regiões e estratificação laminar do hipocampo esquerdo em relação aos elementos da via trissináptica. A linha mais grossa representa a via perfurante. Esta inicia no córtex entorrinal, segue pelo estrato lacunoso-molecular até a camada molecular do giro dentado onde faz sinapse com as células granulosas. Os axônios das células granulosas são chamados de fibras musgosas e chegam aos dendritos de CA3 pelo hilo do giro dentado. Os neurônios piramidais de CA3 emitem axônios para os dendritos das células CA1, na camada oriens e no estrato radial, limítrofe com o estrato lacunoso-molecular (adaptado de AMARAL e WITTER, 1995).

1.2.1.4.5 VIAS EFERENTES

A maior eferência do hipocampo é através dos axônios das células piramidais de CA1. Estes projetam para o subiculum, córtex entorinal, núcleo septal lateral, bulbo olfatório, núcleo accumbens, amígdala e hipotálamo.(KNOWLES, 1992).

1.2.2 GIRO DENTEADO

O giro denteado tem forma de um U ou V e é formado por três camadas: molecular, granular e polimórfica ou hilo. A camada molecular é ocupada principalmente por dendritos de várias células polimórficas granulares e em cesto, bem como a árvore axonal terminal a partir de várias fontes. No mínimo dois tipos celulares estão presentes, as células estreladas que seu axônio parece contribuir para o plexo em cesto dentro da camada celular granular e as células axo-axônicas, assim denominadas, pois seus axônios descendem a partir da camada molecular para a camada granular, colateriza profusamente e então terminam exclusivamente no segmento inicial do axônio das células granulares com contato sináptico simétricos, são imunoreativas ao GABA provendo um significado secundário de um controle inibitório da saída das células granulares (AMARAL e WITTER, 1995).

Na camada granular do giro denteado, o tipo celular mais comum é a célula granular. Esta célula tem um corpo celular elíptico com diâmetro médio de 10 μm e 18 μm de comprimento. Possui uma área em forma de cone característica de espinhos dendríticos com todos os ramos direcionados para a porção da camada molecular e a maioria das extremidades distais da árvore dendrítica terminam na fissura hipocampal ou superfície ventricular. Outro tipo celular desta camada é a célula em cesto localizada mais profundamente entre a camada granular e a camada polimórfica. É chamada célula em cesto porque seu axônio forma um plexo pericelular que envolve o soma das células granulares. Este tipo celular tem um corpo com 25-35 μm de diâmetro. A maioria delas são GABAérgicas. Existem várias outras células com configurações dendríticas e formato de somas diferentes. Algumas destas, com vários espinhos dendríticos entram nas camadas polimórfica e molecular, enquanto outras tendem a

ser mais fusiformes, com distribuição dendrítica similar. Parece que todas estas células possuem axônios que contribuem para a formação do plexo em cesto na camada granular. A maioria destes neurônios são imunoreativos para GABA e atuando, em grande parte, como interneurônios inibitórios (AMARAL e WITTER, 1995).

A camada polimórfica ou hilo possui vários tipos celulares diferentes, sendo que o mais comum é a célula musgosa. Seu corpo celular é grande, em torno de 25-35 μm de diâmetro. Três ou mais processos dendríticos espessos estendem-se por longas distâncias na camada polimórfica e ocasionalmente um dendrito também poderá estender-se diretamente até a camada molecular. Todos os dendritos proximais são cobertos por espinhos complexos e grandes. Há também o tipo celular fusiforme, sendo a principal diferença o número e a densidade de espinhos dendríticos e seus dendritos estão distribuídas paralelamente à camada celular granular e podem estender por uma lâmina desta camada. Há também grupos de células pequenas, redondas multipolares que contribuem para o aumento do plexo estrelado (AMARAL e WITTER, 1995).

1.2.3 SUBICULUM

A borda subicular/CA1 está marcada principalmente por um padrão amplamente diferenciado da camada de células piramidais. O estrato radiatum não está presente nesta borda e está substituído por uma ampla camada molecular. A camada molecular pode ser subdividida em uma porção mais profunda que é contínua com o estrato radiatum de CA1 e uma porção superficial que é contínua com a camada molecular do presubiculum e CA1 (BLACKSTAD, 1956; HAUG, 1976; SWANSON et al., 1987) O estrato Oriens de CA1 não está mais presente no subiculum (AMARAL e WITTER, 1995).

A camada celular principal do subiculum possui grandes neurônios piramidais. Estas células são relativamente uniformes na forma e no tamanho e estendem seus dendritos apicais para dentro da camada molecular e seus dendritos basais para dentro da porção profunda da camada piramidal. Entre as células piramidais encontram-se muitos neurônios menores, representando os interneurônios do subiculum (AMARAL e WITTER, 1995).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

Os modelos de isquemia podem ser classificados segundo Ginsberg e Busto (1989) obedecendo determinados critérios topográficos, tempo de duração da isquemia e grau de redução do fluxo sanguíneo.

A isquemia de acordo com a **classificação topográfica** pode ser:

- * Isquemia Global: quando afetam todo o encéfalo;
- * Isquemia Focal: quando afetam uma pequena região do encéfalo.

Levando-se em consideração o **tempo de duração** da isquemia pode ser classificada em:

- * Isquemia Permanente: não tem reperfusão;
- * Isquemia Transitória: seguido de reperfusão.

Quanto ao **grau de redução do fluxo sanguíneo** podem ser classificada em:

- * Isquemia Total: quando se tem redução completa do fluxo sanguíneo;
- * Isquemia Parcial: quando esta redução não é completa.

Kogure e Kato (1993) descreveram a isquemia quanto a **severidade do insulto** em:

- * Isquemia Subletal: é aquela na qual se observa, após o episódio isquêmico, uma pronta e completa restauração das funções metabólicas e fisiológicas, sem causar morte neuronal.
- * Isquemia Letal: é aquela que causa morte de células vulneráveis. Na isquemia letal a relação FSE/duração da isquemia é tal que causa dano no potencial de membrana chamado despolarização anóxica persistente. A despolarização anóxica ocorre quando o fluxo sanguíneo cai 34% do fluxo normal em ratos, e abaixo de 25-30% em animais maiores.

Nos modelos experimentais para a isquemia cerebral global o fluxo sanguíneo dos grandes vasos extra-cranianos são interrompidos simulando distúrbios circulatórios globais que acontecem durante um ataque cardíaco ou uma hipotensão severa (SCHMIDT-KASTNER e FREUND,1991). O modelo experimental mais usado nesse caso é o da oclusão dos quatro vasos (4VO), que inclui a cauterização das artérias vertebrais seguida de oclusão temporária das artérias carótidas comuns (FAROOQUI,1994). Do ponto de vista hemodinâmico este modelo impõe uma redução global do fluxo sanguíneo encefálico ao prosencéfalo chegando a

menos de 3% no neocórtex, 3-7% no hipocampo e 10-15% no cerebelo. Em contrapartida, 25-30% do fluxo é mantido no tronco encefálico garantindo a manutenção das funções vitais (GINSBERG e BUSTO, 1989).

Na isquemia encefálica focal são interrompidas artérias cerebrais específicas, afetando somente uma pequena parte do cérebro. A isquemia focal prolongada leva a um infarto cerebral, que é caracterizado pela perda de elementos do tecido (FAROOQUI, 1994).

1.4 A MORTE CELULAR CAUSADA PELA ISQUEMIA

1.4.1 VULNERABILIDADE SELETIVA

A vulnerabilidade seletiva refere-se ao fato de que populações neuronais são diferentemente vulneráveis a reduções iguais de fluxo sanguíneo e estresse isquêmico quando a isquemia encefálica é transitória. Portanto, algumas regiões do encéfalo são mais suscetíveis ao dano neuronal do que outras, sendo o hipocampo uma das regiões mais vulneráveis e mesmo dentro das diferentes áreas do hipocampo a morte celular não é uniforme. Existem também diferenças quanto a vulnerabilidade sugerindo a presença de fatores intrínsecos que modulam a extensão da lesão sofrida por uma dada população neuronal (SCHREIBER e BAUDRY, 1995).

A vulnerabilidade seletiva de neurônios em determinadas regiões encefálicas decorrente da isquemia foi determinada ainda nos anos 20 e 30. Várias teorias foram postuladas para entender e explicar tal fato. Alguns autores defendiam a tese de que a vulnerabilidade seletiva ocorria em áreas pouco vascularizadas, já outros autores, explicaram que existe uma susceptibilidade intrínseca de grupos de neurônios (SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991).

A redução do fluxo sanguíneo encefálico para menos de 15 ml/min/100g de tecido causa a perda do gradiente iônico transmembrana (FAROOQUI, 1994). Mais de 90% dos neurônios piramidais de CA1 morrem uma semana após isquemia encefálica transitória enquanto

neurônios piramidais de CA3 sobrevivem ao mesmo insulto isquêmico (KIRINO, 1982; PULSINELLI et al., 1982; PETITO et al., 1987).

A isquemia global transitória em roedores (KIRINO, 1982; PULSINELLI et al., 1982) e em humanos (PETITO et al., 1987; HORN e SCHLOTE, 1992) resultou na perda seletiva de neurônios de CA1 hipocampal que tipicamente morrem 24 – 72 horas. No hipocampo, as células piramidais da região CA1 são sensíveis enquanto as células piramidais da região vizinha CA3 são resistentes. No giro denteado (DG) as células granulares são resistentes, enquanto no hilo somente uma sub-população de células parece ser vulnerável (HSU et al., 1994). Depois de 20-30 min de isquemia, as áreas CA1, CA2 e o hilo são afetadas, enquanto as células das regiões CA3 e giro denteado (camada granular e molecular) permanecem intactas. Os neurônios da região CA1 e do hilo são, talvez, os mais vulneráveis de todo o encéfalo. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue esta seqüência: CA1, hilo > CA2 > CA3 > giro denteado (camada granular e molecular). É importante ressaltar que, apesar de os neurônios morrerem do insulto, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do encéfalo (SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991).

Um estudo feito por Netto e colaboradores (1993) demonstraram que animais adultos isquêmicos com perda de células da região CA1 exibiram deficiência de memória e aprendizado espacial em tarefas no labirinto aquático e labirinto radial.

1.4.1.1 MECANISMOS CLÁSSICOS IMPLICADOS NA VULNERABILIDADE SELETIVA

Duas hipóteses surgiram durante meados dos anos 80. Uma se refere a hipótese da neurotransmissão excitotóxica relacionada a eventos que ocorrem durante a isquemia e a outra a hipótese de radicais livres relacionada a eventos que ocorrem durante a reperfusão (WHITE et al., 2000). Siesjo (1992) sugeriu que o corpo celular e os dendritos de neurônios vulneráveis recebem projeções que liberam uma grande quantidade de neurotransmissores induzida pela despolarização, dentre eles o glutamato.

Há duas classes de receptores de glutamato, o receptor ionotrópico que é um canal de íon dependente de voltagem e o receptor glutamato metabotrópico (mGluR), que são acoplados a efetores celulares via a proteína ligadas a proteína GTP. Em neurônios vulneráveis há dois subtipos de receptores ionotrópicos de glutamato, NMDA e AMPA, que são distintamente ativados. A ativação de NMDA abre os canais de Ca^{++} , seguido pelo influxo de Ca^{++} e a ativação do receptor AMPA abre os canais de Na^+ , seguido pelo influxo de Na^+ (WHITE et al., 2000).

A liberação de glutamato e o aumento massivo de Ca^{++} ocorrem durante a isquemia global e o influxo de Ca^{++} é um dos fatores que estimula a liberação de glutamato (KRAUSE et al., 1988). Ocorre um aumento súbito de glutamato na fenda sináptica, sendo cerca de 6-8 vezes maior do que os níveis basais. Estes níveis normalizam-se durante os 30-60 minutos de reperfusão (BENVENISTE et al., 1989; OOBOSHI et al., 1995). Este aumento de glutamato durante a isquemia pode ser devido também a reversão do co-transporte de glutamato e Na^+ (ROETTGER e LIPTON, 1996). Este co-transporte readquire a funcionalidade após 5 minutos de reperfusão, permanecendo ativo até 48 horas após uma isquemia letal (ANDERSON et al., 1993).

Portanto, durante a isquemia e a fase inicial da reperfusão tem-se a fase excitotóxica caracterizada pela massiva liberação de aminoácidos excitatórios, aumento do Ca^{++} intracelular e aumento de radicais livres (BLOCK, 1999). O aumento de Ca^{++} ativa várias enzimas, tais como, proteases, fosfolipases, endonucleases e óxido nítrico sintase o que leva a danos da membrana plasmática, núcleos e/ou outras organelas (KRISTIAN e SIESJO, 1988).

A hipótese excitotóxica foi sugerida por Olney e colaboradores (1978) para explicar a vulnerabilidade seletiva das células piramidais de CA1, e três evidências tratam de explicá-la: o aumento de glutamato extracelular durante a isquemia, aumento da frequência de disparos que as células CA1 apresentam de 7-10 horas após a isquemia e a inibição dos fenômenos decorrentes da descarga glutamatérgica através do bloqueio dos receptores NMDA (SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991).

A liberação de glutamato, que ocorre imediatamente após a isquemia, provoca o aumento intracelular de Ca^{++} através da ativação dos canais de Ca^{++} dos receptores NMDA e pela abertura dos canais de Ca^{++} dependentes de voltagem via receptor AMPA (FAROOQUI et

al., 1995). O Ca^{++} é um importante mensageiro nos neurônios, desempenhando um importante papel na regulação de muitas enzimas como as proteases, fosfolipases, quinases e fosfatases ativadas por Ca^{++} (SIESJO e KRISTIAN, 1997). A sobrecarga de Ca^{++} causa dano mitocondrial devido à ativação das fosfolipases mitocondriais que destroem as membranas da mitocôndria, além disso, é responsável pelos danos causados ao citoesqueleto e à membrana plasmática atuando na formação de radicais livres e óxido nítrico (ERECINSKA e SILVER, 1997).

Existe uma grande inervação glutamatérgica em CA1 (NORENBERG, 1979; STORM-MATHISEN, 1981; MONAGHAN et al., 1983; JOHANSEN et al., 1984). A concepção excitotóxica é que o glutamato exerce um efeito excitatório e um efeito tóxico (OLNEY, 1978). Um caminho para mostrar o envolvimento de neurotransmissores excitatórios na morte celular de células piramidais de CA1 é a administração de antagonistas, tais como o Gamma D-glutamilglicina (DGG) que é seletivo para o receptor NMDA e oferece proteção à morte neuronal hipóxica em cultura de células (ROTHMAN, 1984). O MK-801 (antagonista do NMDA) tem mostrado proteger contra a isquemia retardada administrada antes ou sob 24 horas após isquemia (WIELOCH et al., 1989). O bloqueio do receptor de AMPA opera em um canal iônico monovalente seletivo e também protege contra a morte neuronal em ratos (DIEMER et al., 1990) e em gerbilos (SHEARDOWN et al., 1990).

A recaptação de glutamato é inibida pelo ácido araquidônico (CHAIN et al., 1983) ou produtos da peroxidação lipídica (BRAUGHLER, 1985). Entretanto o magnésio, que inibe a liberação do neurotransmissor e é um antagonista de Ca^{++} natural, que inibe a morte celular *in vitro* (AMES, 1983; DREJER et al., 1985), e o antagonista do receptor NMDA tem falhado para salvar os neurônios seguidos de isquemia global completa.

O H^+ , acumulado durante a isquemia, inibe o receptor NMDA (TRAYNELIS e CULL-CANDY, 1990). Tendo-se poucas evidências que explicam o aumento do glutamato extracelular durante a reperfusão, os fatos levam a refletir sobre quando a excitotoxicidade através dos receptores NMDA estão relacionados com as evidências morfológicas da progressão de danos durante a reperfusão (BLAINE et al., 2000).

1.4.2 MORTE CELULAR TARDIA

A morte de neurônios após um insulto isquêmico pode ser imediata ou tardia, portanto as células vulneráveis não degeneram de maneira semelhante. As do hilo do giro denteado degeneram dentro de 24 horas, enquanto as células piramidais da região CA1 não morrem até 3-4 dias depois do insulto. Este fenômeno é chamado de “morte neuronal tardia” (HSU et al., 1994). A vulnerabilidade seletiva e o atraso no início da degeneração das células da região CA1 sugerem a presença de alguns neurônios ainda viáveis que podem estar isquemicamente comprometidos, mas ainda deixam uma janela de oportunidade para intervenção farmacológica vários dias depois da isquemia (ORDY et al., 1993).

Análises fisiológicas e bioquímicas, usando modelos de animais mostraram que os neurônios piramidais de CA1 são normais 24 h após a isquemia encefálica transitória (SUSUKI et al., 1983). Os neurônios piramidais de CA1 do hipocampo de gerbilo degeneram dentro de 2 a 4 dias após a isquemia transitória e somente 5,8% dos neurônios sobrevivem 3 semanas mais tarde (BONNEKOH et al., 1990).

1.4.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

A morte celular é um processo importante para estabelecer a formação normal dos tecidos, mantendo os tecidos adultos saudáveis além disso atua durante a patogênese dos tecidos danificados ou doentes, portanto a morte celular ocorre tanto em situações fisiológicas, normais ou patológicas (GLUCKSMANN, 1951; HAMBURGER e LEVI-MONTALCINI, 1949; KERR, 1969; MERGNER et al., 1997; SAUNDERS, 1966).

A partir da década de 60 surgiu uma abordagem sobre a morte celular de forma experimental que foi denominando de “morte celular programada” (SAUNDERS, 1966; LOCKSHIN e ZAKERI, 1991). É neste período, através dos estudos histoquímicos sobre alterações lisossômicas no fígado isquêmico realizados por Kerr (1965), que foi evidenciado dois tipos morfologicamente distintos de morte celular, sendo identificadas como apoptótico e necrótico (GERCHENSON e ROTELLO, 1992; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980b).

Recentemente descreveram-se outro tipo de morte celular de apoptose-necrose-contínua, baseando-se no fato que existe fenótipos morfológicos que apresentam característica entre a necrose e a apoptose (PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a;b).

Outras classificações na literatura dadas à morte celular foram de nuclear e citoplasmática (PILAR e LANDMESSER,1976), levando em consideração onde as mudanças morfológicas se iniciavam. Clarke (1990) classificou-as de apoptótica, endocítica-autofágica e vesiculada não-lisossomal e por fim a classificação de Majno e Joris (1995) em necrose apoptótica e necrose oncolítica.

Os neurônios de CA1 hipocampal são seletivamente vulneráveis a isquemia global e esta ocorre de forma retardada. O tempo de duração que induz a morte neuronal tem sido estudado, mas as relações entre duração de isquemia e a morte glial na área CA1 não está totalmente entendida. Niu colaboradores (2002) realizaram uma análise após 3, 5 e 10 min de isquemia global transitória e observaram que do 1º ao 56º dias após a isquemia as modificações morfológicas de neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia possuíram uma evolução imuno-histoquimicamente característica. A maioria dos neurônios piramidais de CA1 hipocampais morreram após 3 dias após 5 e 10 min de isquemia, mas não após 3 min de isquemia. O número de astrócitos gradualmente diminuiu após 5 e 10 min de isquemia. Oligodendrócitos também mostraram mudanças morfológicas em seus processos após 5 e 10 min de isquemia. A transformação da microglia em uma forma reativa após 5 dias, somente ocorreu após 5 e 10 min de isquemia. Portanto, estes dados sugerem que algumas mudanças morfológicas nas células gliais não eram dependentes da morte celular neuronal, mas suas próprias reações dependiam da diferença da severidade da isquemia (NIU et al., 2002).

1.4.3.1 MORTE CELULAR POR APOPTOSE

A palavra apoptose é de origem grega e refere-se ao processo de queda das folhas das árvores ou pétalas de flores (KERR et al., 1972). É um processo de auto destruição celular que envolve a ativação de mecanismos encontrados em genomas de todos os eucariontes superiores. A morte celular programada é um processo pela qual a célula morre em resposta à

ativação de um programa genético específico, enquanto a necrose parece ser a resposta das células à perda de ATP, acompanhada pelo influxo massivo de Ca^{+2} (BREDESEN, 1996).

A apreciação da importância da apoptose no sistema nervoso de mamíferos tem sido somente desenvolvida durante os últimos anos (HALE et al., 1995). Tornou-se claro que o processo da apoptose está intimamente envolvido em várias estágios de doenças agudas, incluindo os mecanismos de injúria envolvidos na isquemia e reperfusão de órgãos (WHITE, 2000).

Em trabalhos recentes, a fragmentação de DNA dentro de um padrão em escada, observado após a eletroforese, foi proposta como um marcador da apoptose. Este “padrão em escada” acontece porque a atividade DNase produz um padrão de corte na dupla fita nas regiões internucleosomais. O aumento de Ca^{++} intracelular parece estar envolvido na ativação destas DNases (ARENDS et al., 1990). Subseqüentemente, foi reconhecido que havia alterações morfológicas adicionais características de apoptose, e estas incluem a condensação de cromatina, alterações extensas nos microtúbulos, fragmentação da célula dentro de corpos apoptóticos (BREDESEN, 1996; HALE et al., 1995). As alterações, no exemplo específico da apoptose, são um pouco variáveis, e tem-se tornado claro, recentemente, que as alterações citoplasmáticas da apoptose podem ocorrer sem o aparecimento da fragmentação de DNA (JACOBSON et al., 1994).

A apoptose é um importante processo do desenvolvimento embriogênico. Muito mais células nascem do que finalmente são necessárias, particularmente em órgãos altamente diferenciados tais como o rim, o coração e o encéfalo (HALE et al., 1995). Como estas células migram para dentro de suas posições específicas, seu excesso será eliminado por apoptose. Este processo geneticamente programado durante o desenvolvimento tem fornecido um fenômeno reproduzível, e a funcionalidade da apoptose tem sido extensivamente estudada em *Caenorhabditis elegans*. O desenvolvimento embriológico deste nematódeo produz exatamente 1090 células dos quais 131 sofrem apoptose (ELLIS et al., 1991). Estudos de apoptose nestes modelos revelam cinco grupos de genes envolvidos neste processo: aqueles que são cruciais para o início da morte celular, aqueles envolvidos no próprio processo de morte celular (incluindo *ced-3* e *ced-4*, que é, gene de morte da *C. elegans*), aqueles requeridos para a fagocitose das células mortas, aqueles implicados na classificação da morte celular, e um gene único (*ced-9*) envolvido na supressão da morte celular. Em genes de mamíferos tem sido

identificado uma seqüência homóloga de três daqueles presentes no sistema *C. elegans*; há genes homólogos a *ced-3* [ICE-protease (enzima de conversão interleucina 1 β e a maior parte da família em geral das proteases caspases)], *ced-4* (fator 1 de ativação da apoptose, APAF-1), e *ced-9* (a família *Bcl-2*) (HALE et al., 1995).

Em seus estágios iniciais mudanças definitivas ocorrem dentro do núcleo: condensação da cromatina que aparecem em número reduzido como massas redondas, lisas, uniformemente densas, desintegração nucleolar (KERR e HARMON, 1991; KERR e WYLLIE, 1972; WYLLIE et al., 1980b) e redução no tamanho do núcleo (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990). As alterações citoplasmáticas podem ser observadas através da condensação do citoplasma devido a compactação das organelas e estas alterações são freqüentemente associadas com a formação de numerosos vacúolos citoplasmáticos translúcidos; a membrana plasmática permanece intacta (KERR et al., 1995; LASHLEY, 1941). A origem destes vacúolos citoplasmáticos é incerta, e pode formar-se a partir do retículo endoplasmático (KERR, 1969; PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a), ou do complexo de Golgi (PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a,b). Já a mitocôndria é normal (KERR et al., 1995; KERR e HARMON, 1991; WYLLIE et al., 1980b; ARENDS et al., 1990) e é necessária para o processo apoptótico (KROEMER et al., 1995; NEWMAYER et al., 1994; ZAMZAMI et al., 1996). Subseqüentemente, o núcleo e a célula sofrem um processo de brotamento. Neste processo o núcleo contendo as massas uniformes e lisas de cromatina condensada se fragmenta em associação com o citoplasma condensado formam os fragmentos celulares denominados de corpos apoptóticos. Estes corpos estão limitados por membranas e contêm os fragmentos nucleares envolvidos ou não uma membrana, além de possuírem o citoplasma e as organelas aparentemente intactas. Posteriormente, são fagocitados por células vizinhas como células gliais ou macrófagos (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990). Na apoptose não encontra-se a presença de células polimorfonucleares e, portanto, não se gera uma resposta inflamatória aguda (KERR et al., 1995; WYLLIE et al., 1980a).

A apoptose ocorre em estados normais e patológicos, incluindo a morte de células epiteliais intestinais normais (WYLLIE et al., 1980a), timócitos expostos a glicocorticóides células da próstata após perda da testosterona circulante (BUTTYAN, 1991), células adrenocorticais após remoção de ACTH (WYLLIE et al., 1980) e, possivelmente, no desenvolvimento do encéfalo normal (GLUCKSMANN, 1951; CHU-WANG e

OPPENHEIM, 1978; SENGELAUB e FINLAY, 1982; CUNNINGHAM et al., 1982a; CLARKE, 1990).

O processo foi primeiramente descrito nos hepatócitos (KERR, 1965,1971). Esta forma de morte celular, que foi chamada de apoptose (KERR et al.,1972; MULLER,1994), é caracterizada pela coalescência de cromatina nuclear antes da compactação citoplasmática, com posterior encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos e rápida digestão dos fragmentos por macrófagos (KERR et al., 1972, WYLLIE et al., 1980) ou células gliais (SLOVITER et al., 1993b).

Uma das razões, da apoptose ser o processo de morte neuronal na isquemia (HOI, 1996) é o fenômeno de morte neuronal retardada seguida de isquemia global transitória, por exemplo, os neurônios hipocâmpais CA1 sobrevivem ao insulto isquêmico agudo, mas morrem sob as próximas 48-72 horas (PULSINELLI,1985). Adicionalmente, o primeiro suporte para a existência da apoptose isquêmica venha talvez a partir deste paradigma, com demonstrações de que a inibição da síntese de proteína reduz a morte neuronal em CA1 (GOTO et al., 1990, SHIGENO et al., 1990).

A existência de apoptose tem sido demonstrada através de dados obtidos em culturas de células. Quando as culturas de células corticais são privadas transitoriamente de glicose e oxigênio, neurônios morrem por necrose excitotóxica. Entretanto, se a excitocidade é bloqueada pela aplicação de antagonistas NMDA e AMPA/Cainato durante a exposição, então resulta em apoptose, e está associado com a fragmentação de DNA internucleossomal (GWAG et al., 1995).

Nitatori e colaboradores (1995) realizaram um estudo sobre a morte neuronal retardada na camada de células piramidais do hipocampo de gerbilo, seguido de isquemia cerebral transitória por 5 min e observaram um processo de morte celular apoptótica. Foi observado após 3 dias do evento isquêmico, que o pericário continha numerosos corpos densos e vacúolos envolvidos por membrana contendo numerosas estruturas e partes do citoplasma que parecem ser vacúolos autofágicos. O perfil da mitocôndria e complexo de Golgi apareceram intactos neste período. Os núcleos eram geralmente grandes, redondos com densidade eletrônica homogênea e o contorno nuclear era freqüentemente indentado. Com 4 dias o núcleo apresentava contorno irregular, massas de cromatina densa e os corpos apoptóticos

contendo condensação de cromatina eram freqüentemente encontrados próximos as células microgliais. As mudanças nucleares ocorriam concomitantemente com a condensação do pericário que apresentava numerosos vacúolos autofágicos.

Furuta e colaboradores (1999), ao realizarem um estudo com hipóxia-isquemia observaram um processo de morte celular apoptótico. Quatro dias após o evento, neurônios em degeneração foram caracterizados por um núcleo com condensação de cromatina e desintegração do citoplasma. A maioria das organelas desapareceram do citoplasma com exceção das mitocôndrias, e a membrana citoplasmática estava conservada. Corpos apoptóticos não foram observados. Portanto, a preservação mitocondrial, e a ausência da lise celular eram inconsistentes com as alterações necróticas.

Sloviter e colaboradores (1993) realizaram um estudo através da análise ultra-estrutural das células granulares do giro denteado após adrenalectomia e observaram que a degeneração das células granulares hipocâmpais de ratos eram consistentes com o processo de apoptose. No estágio precoce da degeneração a célula exibia uma massa condensada de cromatina usualmente na periferia nuclear, pequena alteração citoplasmática (RE e mitocôndria relativamente normais), e pequeno edema de elementos gliais associados. Com o avançar do tempo, a célula apresentava uma extensiva condensação de cromatina dentro de grandes corpos nucleares esféricamente desiguais e início de vacuolização ou ruptura do retículo endoplasmático e neste ponto as mitocôndrias ainda permanecem normais. Posteriormente, em células alteradas, o núcleo tornava-se menor e com uma densidade eletrônica mais alta, desenvolvimento de vacuolização do citoplasma e edema de mitocôndrias, organelas citoplasmáticas difíceis de discerní-las e surgimento de corpos citoplasmáticos. Dentro de astrócitos freqüentemente eram encontrados estes fragmentos celulares provavelmente derivados de células granulares degeneradas (SLOVITER et al, 1993).

A síntese de endonucleases em algumas células que sofrem de apoptose resulta na quebra de DNA dentro de grandes fragmentos de par de bases que são freqüentemente considerados como um marcador de apoptose (WYLLIE, 1980; ARENDS et al., 1990). Entretanto, nem todas as células apoptóticas exibem o padrão característico de quebra de DNA (COLLINS et al., 1992). Em adição, estudos recentes indicam que grandes fragmentos de pares de bases de DNA ocorrem tanto na necrose, bem como na apoptose (BICKNELL e COHEN, 1995). Entretanto, devido a fragmentação não específica de DNA ser comum para ambos apoptose e

necrose, a demonstração dos produtos da divisão de DNA através do método de Tunnel não se evidencia que as células mortas tenham sofrido um processo de apoptose (GAVRIELI et al., 1992).

Há uma tendência para usar a morte celular programada como sinônimo de apoptose devido, em ambos os casos, ao programa genético estar envolvido. Mas, isto está errado, pois o programa genético da morte celular programada é um relógio especificando o tempo do suicídio, enquanto o programa genético da apoptose é uma arma para produzir o suicídio (MAJNO e JORIS, 1995).

1.4.3.2 MORTE CELULAR POR NECROSE

Durante o processo de necrose celular, os eventos causais de morte celular estão provavelmente ocorrendo antes que os fatores morfológicos da injúria celular sejam detectáveis (FARBER et al., 1981). Na necrose celular foram observadas inicialmente alterações na homeostasia do volume celular e na função mitocondrial (DEAN, 1987; LAIHO et al., 1971; LAIKO et al., 1975; MERGNER et al., 1990). Defeitos na permeabilidade da membrana das proteínas de transporte de íons, bem como prejuízos na fosforilação oxidativa e depleção dos fosfatos de alta energia são mecanismos causais precoces de necrose celular (FARBER et al., 1981). A necrose é definida morfológicamente como processo de desintegração citoplasmática rápida na ausência de grumos organizados de cromatina (PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a;b). Ocorre picnose nuclear com condensação da cromatina que aparece com contorno irregular (KERR et al., 1995; TRUMP et al., 1965). Durante o processo necrótico as organelas citoplasmáticas sofrem mudanças ultra-estruturais: as mitocôndrias sofrem contração ou condensação da membrana interna e dissipação de grânulos da matriz, a membrana interna aumenta e ocorre lise das cristas, formação de agregações floculentas e desintegração da mitocôndria (TRUMP et al., 1965). Ribossomos dissociam-se do retículo endoplasmático e dos poliribossomos, ficando livres no citoplasma, dando à matriz citoplasmática uma aparência da densa e granular. As cisternas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi podem dilatar-se, fragmentar-se ou vesicular-se e a membrana plasmática sofrer um processo de formação de bolhas (blebbling) (KERR et al., 1995; LAIHO et al., 1971). Devido à liberação de fragmentos intracelulares, ocorre uma

aproximação de células polimorfonucleares e produção de edema tecidual, caracterizando isto a resposta inflamatória (MARTIN et al., 1998).

Há tempos a injúria neuronal induzida por isquemia global transitória tem sido considerada como morte celular necrótica baseado nas observações ultra-estruturais. Após a isquemia global transitória em gerbilo ou em ratos foram descritos o edema celular precoce, o edema de mitocôndrias e do retículo endoplasmático, a dispersão de poliribossomos e a ruptura do núcleo e da membrana plasmática (KIRINO, 1982; KIRINO e SANO; 1984b, PETITO e PULSINELLI, 1984; DESHPANDE et al., 1992; COLBOURNE et al., 1999).

Hipótese de que a fragmentação do DNA é característica da apoptose foi contestado, pois isto também ocorre no evento de necrose celular (COLLINS et al., 1992, BICKNELL e COHEN, 1995). Assim como a técnica de Tunel, que era utilizada para marcar células apoptóticas, também marca neurônios necróticos (GOLD et al., 1994; GRASL-KRAUPP et al., 1995).

Em um estudo ultra-estrutural em gerbilos após isquemia cerebral global transitória de 5 min com ou sem hipotermia, foram encontrados neurônios isquemiados com características de necrose e não de apoptose na morte neuronal. Organelas dilatadas e vacúolos intranucleares precedem a necrose. Observaram-se organelas dilatadas, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, vacúolos intranucleares massivos; grande agregação de lisossomos eram ocasionalmente encontrados (lisossomas primários e secundários). Quatro dias após a isquemia havia desintegração das membranas nuclear e citoplasmática, o citoplasma apresentava-se amorfo e em sua vizinhança havia a presença de macrófagos e microglias fagocíticas. Enquanto que outras células que tinham recentemente morrido apresentavam sinais de necrose, densidade floclulenta da mitocôndria foi também observada envolvendo o tecido, assim como numerosos vacúolos membranosos dentro do neurônio e no neuropilo. Sinais morfológicos de apoptose (corpos apoptóticos contendo cromatina) nunca foram encontrados nos processos neuronais (COLBOURNE et al., 1999).

O trabalho de Zeng e Xu (2000) realizado com isquemia cerebral transitória de 14 minutos, em ratos, mostrou características mais condizentes com a necrose na região CA1 hipocampal, não exibindo alterações apoptóticas. Seguido de um período de reperfusão de 24 horas as organelas eram similares às normais, espaços vazios envolvidos por membrana eram

encontrados no neuropilo das camadas piramidal e radiatum que a grande magnificação mostraram ser dendritos, não exibindo, portanto nesta fase, grandes alterações. Maiores alterações já ocorreram com 2 dias, em que mitocôndrias e retículo endoplasmático estavam dilatadas com diminuição da densidade eletrônica, desagregação dos poliribossomos, espaços vazios no estrato radiatum sendo maiores que o tamanho e mais numerosos que os encontrados às 24 horas, por isto sugerem ser dendritos mais apicais afetados. Um grupo de células apresentavam uma pequena porção de neurônios com condensação de cromatina de forma mais arredondada e algumas vezes alguns neurônios mostravam invaginação da membrana nuclear, sugerindo um enrugamento do núcleo. Após 60 horas do evento isquêmico encontraram no citoplasma vacúolos de vários tamanhos, grandes vesículas e espaços vazios no citoplasma assim como astrócitos em contato com neurônios edemaciados. Neurônios com agregações de cromatina com contorno redondo ou oval e a invaginação da membrana plasmática e do soma sugerem enrugamento do citoplasma. Encontraram-se materiais fagocitados por grandes processos e corpos celulares de glias. Com 72 horas visualizavam-se células gliais envolvendo estes vacúolos estando em fagocitose ativa. Foram vistas muitas organelas e espaços vazios no citoplasma e ribossomos livres. A ultra-estrutura de neurônios com 96 horas após a isquemia era similar à de 72 horas após isquemia com numerosos vacúolos e células gliais. Com 7 dias de reperfusão, o estrato piramidal é compacto com vacúolos colapsados e tecido degenerado, muitas células gliais e poucos neurônios com agregados de cromatina foram encontradas nesta região (ZENG e XU, 2000).

Existe uma proliferação do retículo endoplasmático precoce (KIRINO, 1982; KIRINO e SANO, 1984b; YAMAMOTO et al., 1990), uma desagregação de poliribossomos (KIRINO e SANO, 1984b; DESHPANDE et al., 1992) e edema de dendritos seletivamente (JOHANSEN et al., 1984; YAMAMOTO et al., 1990), ou seja, são achados que não indicam apoptose como o mecanismo de morte celular.

Contestabile e colaboradores (1990) identificaram um processo de morte celular característico de necrose em células granulares do giro denteado 4 dias após a injeção intra-hipocampal da neurotoxina volkensin. Observaram que as células granulares exibiram uma estrutura nuclear relativamente normal, enquanto que a morfologia de organelas citoplasmáticas estava claramente anormal. Nestes neurônios necróticos, as mitocôndrias estavam edemaciadas, o retículo endoplasmático estava rompido e múltiplos vacúolos

freqüentemente estavam envolvidos por processos astrogliais grandemente edemaciados (OLNEY, 1984).

Pesquisas utilizando a microscopia eletrônica evidenciaram dados contrários ao fenômeno apoptótico como um mecanismo pós-isquêmico de morte celular (COLBOURNE et al., 1999). Isto ocorre devido a ter-se várias evidências morfológicas (desagregação de poliribossomos, edema do citoplasma antes da fragmentação celular) de neurônios de CA1 seguido de isquemia encefálica, indicando morte celular necrótica (KIRINO, 1982; PETITO e PULSINELLI 1984 a;b).

Estudos evidenciaram apoptose através da microscopia óptica, seguido de isquemia cerebral transitória: nas células granulares do giro denteado hipocampal (após 7 dias do episódio, em cães), e em células granulares cerebelares (após 3 dias do episódio, em gatos). Também, a indução de hipóxia-isquemia em leitão, após dois dias do episódio evidenciou-se apoptose no núcleo talâmico reticular e nos oligodendrócitos da substância branca subcortical. Estudos tem tentado demonstrar que a morte neuronal tardia em neurônios piramidais de CA1 após a isquemia é apoptótica (NITATORI et al., 1995). Outros estudos evidenciaram apoptose no neocórtex de suínos neonatos após isquemia-hipóxia global (MEHMET et al., 1994), assim como no estriado de ratos adultos após isquemia focal (LI et al., 1995). Resultados contraditórios foram obtidos através do estudo ultra-estrutural, evidenciando necrose. Mudanças ultra-estruturais de necrose neuronal após hipóxia-isquemia foram encontrados na região estriatal de leitão (Martin et al., 1998). Entretanto, existem poucos dados ultra-estruturais para embasar estas conclusões, confirmando que a neurodegeneração nas regiões vulneráveis seletivamente não têm fenótipo morfológico consistente com a apoptose, apresentando características típicas de necrose (BROWN e BRIERLEY, 1972; DESHPANDE et al., 1992; KIRINO, 1982; PETITO e PULSINELLI, 1984).

Já a degeneração das células de Purkinje do cerebelo (após 3 dias do episódio, em gatos), analisada através da microscopia óptica, não mostrou ser morfológicamente apoptótica. Também não evidenciaram ser morfológicamente apoptótica a degeneração de neurônios em CA1, 3 dias após o episódio de 10 minutos de isquemia cerebral global (MARTIN et al., 1998).

A célula pode entrar em processo de morte celular, via apoptose ou via necrose e isto pode ser influenciado pela diferença entre as espécies (ratos, gerbil), pela severidade do insulto isquêmico. Foi sugerido que a isquemia pode originar o processo apoptótico ou necrótico, dependendo da severidade do insulto, a concentração intracelular de Ca^{+2} , e a available dos fatores de crescimento (CHOI, 1996; PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a).

Gao e colaboradores (1998, 1999) demonstraram duas diferentes mudanças eletrofisiológicas em neurônios de CA1 do hipocampo, após a isquemia cerebral transitória. Aproximadamente 60% dos neurônios mostraram potencialização sináptica com progressivo decréscimo da excitabilidade enquanto em torno de 20% dos neurônios exibiam uma diminuição da transmissão sináptica com redução transitória da excitabilidade, pois mais que 90% dos neurônios de CA1 morrem seguido de isquemia (XU et al., 1999). É possível que um grupo de neurônios estariam sofrendo apoptose e o outro está sofrendo necrose. Necrose e apoptose podem co-existir durante o processo de morte neuronal seguido de isquemia cerebral transitória (ZENG e XU, 2000).

Um estímulo da injúria pode ativar um processo de apoptose e de necrose simultaneamente, ou diferentes processos degenerativos podem ser iniciados por diferentes graus do mesmo estímulo que produz a injúria (CHOI, 1996). Os astrócitos são células resistentes ao insulto isquêmico, entretanto, parecem participar das respostas teciduais à isquemia. A proteína fibrilar ácida dos astrócitos (GFAP), que responde à lesão tecidual, apresenta um aumento significativo da expressão já às 24 horas de reperfusão nos estratos oriens, radial e especialmente no e molecular de CA1 do hipocampo (LATOV et al., 1979). A co-localização de GFAP e de NADPH diaforase em astrócitos do hipocampo de ratos submetidos a 10 minutos de isquemia sugere que o óxido nítrico possa estar envolvido neste processo. A camada piramidal só apresenta astrócitos reativos após o sexto dia de reperfusão e somente após 14 dias observa-se uma intensa proliferação astrocitária (ORDY et al., 1993).

O número de células da microglia encontram-se entre 5 – 20% de toda a população glial no SNC. Assumindo que seja de 10% do total de células gliais e sabendo-se que se estima 10 células gliais para cada neurônio no SNC, não é falso relatar de que existem tantas microglias quanto neurônios (STREIT, 1995).

Os astrócitos se caracterizam como células estufadas com numerosos processos pequenos que se irradiam em todas as direções. Estes processos contrastam com os fibrosos da substância branca, que são altamente ramificados e seu calibre variável (PETERS et al., 1991).

1.4.3.3 CO-EXISTÊNCIA DE APOPTOSE E NECROSE

Em um estudo realizado por Portera-Calliau e colaboradores (1997) observaram que a excitocidade de cérebro de ratos neonatos levava a morte neuronal com uma morfologia neurodegenerativa contínua, mostrando padrão de apoptose seguido do padrão da necrose. Na camada VI do córtex cerebral, os neurônios entravam no processo de morte celular, os quais exibiam grandes grumos de cromatina esféricos, que são características da apoptose e as organelas estavam relativamente normais. Na camada superficial da II a IV, neurônios em degeneração exibiram morfologias necróticas, com grumos de cromatina de formato irregular, ruptura de organelas citoplasmáticas e da membrana plasmática. Uma forma vacuolizada foi encontrada na camada V, os neurônios tinham uma morfologia distinta com numerosos vacúolos através do pericário e dendritos apicais, pequenos grumos de cromatina e ocasionais inclusões autofagocíticas. O fenotipo de morte celular pode depender da maturidade encefálica, pois em um insulto similar, neurônios no cérebro adulto sofrem necrose, enquanto que neurônios no cérebro em desenvolvimento sofrem apoptose.

Zeng e Xu (2000) encontraram co-existência de necrose e apoptose no hipocampo seguido de isquemia cerebral transitória por 14 min de oclusão, usando o procedimento de oclusão de 4 vasos e verificaram que havia características de necrose como o edema de dendritos observado desde 24 horas após a reperfusão; edema da célula com descontinuidade da membrana plasmática foram encontrados com 60 h de reperfusão e com 72 h já havia sido visto que o conteúdo do soma neuronal rompido eram fagocitados por células glias. Assim como características de apoptose, com 48 h após a reperfusão havia agregação de cromatina e enrugamento nuclear em alguns neurônios; com 60 h, o núcleo e o corpo destas células forneciam enrugamento e grumos grandes, densos de agregação de cromatina com contorno oval ou redondo. A agregação de cromatina fragmentou-se em pequenos pedaços, e pequenas vesículas e espaços vazios foram encontrados no citoplasma a 72 h após a isquemia. Neste

trabalho não foram encontrados corpos apoptóticos característicos. Uma possível explicação da ausência destes corpos apoptóticos na região CA1 é que eles podem somente existir por um curto tempo no cérebro seguido de isquemia cerebral e são totalmente fagocitados por células microgliais. Também foram observados neurônios escuros na área CA3 piramidal. Estas células escuras podem modificarem-se a partir do insulto isquêmico (ZENG e XU, 2000) Entretanto, estudos prévios indicaram que uma pequena porção de neurônios CA3 morrem após isquemia global transitória (KIRINO e SANO, 1984 a,b; PETITO e PULSINELLI, 1984).

Sloviter e colaboradores (1996), estimulando a via perforante repetidamente em ratos observaram um processo degenerativo tipicamente necrótico nas células piramidais de CA3 e CA1 e nos neurônios hilares, enquanto que, nas células granulares do giro denteado as características morfológicas exibiram mais um processo degenerativo de morte celular apoptótica. Os neurônios hilares e piramidais de CA1 e de CA3, exibiam agudamente um encolhimento, formando indentações nucleares além da hiperdensidade. Já as células granulares do giro denteado exibiam uma degeneração claramente diferente, as quais eram caracterizadas por uma condensação de cromatina dentro de múltiplos corpos nucleares esféricos antes de ocorrer o encolhimento celular. Estes achados implicam que o tipo de morte celular induzido por excitação excessiva pode ser determinado pós-sinápticamente por meio de uma via em que diferentes células alvo interpretam este insulto excitatório.

1.4.3.4 CLASSIFICAÇÃO DA MORTE CELULAR SEGUNDO O COMITÊ DE PATOLOGISTAS TOXICOLÓGICOS

A partir do final de 1980 a concepção que a apoptose é um tipo de morte celular morfológicamente distinta da necrose tem sido amplamente difundida (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990). Esta freqüente repetição da supersimplificação considerando a apoptose e necrose tem levado a consideráveis confusões nos últimos anos sobre o uso apropriado dos termos (COLUMBANO, 1995; FABER, 1994; LEVIN, 1995; MAJNO e JORIS, 1995; TRUMP, 1995) e tem levado a particulares problemas para patologistas toxicológicos. Estas situações levaram a Sociedade de patologistas toxicológicos a elaborar um capítulo sobre a nomenclatura da morte celular (LEVIN et al., 1999).

No dicionário médico por volta de 1972, quando a apoptose foi primeiro descrita, define a necrose como uma “morte patológica de célula ou grupo de células em contato com células vivas” (OSOL, 1972). Majno e Joris (1995) sugerem que esta definição é importante e não há necessidade de abandoná-la. Eles apontam que as células injuriadas podem passar através de processos pré-letais no qual elas encolhem-se ou edemaciam-se.

A apoptose é o processo que as células enrugam-se enquanto morrem. De acordo com Magno e Joris (1995) o problema central na patologia que leva esta confusão estava na ausência do termo correspondente para o processo onde as células edemaciam-se enquanto morrem. Por isto eles propõem que a palavra “oncose” seja adaptada para este processo, como o grupo que significa edema.

Segundo a figura 3, a injúria que é destinada a levar a morte celular permite que as células primeiro sofrem uma fase pré-letal (apoptose ou oncose), passam para um ponto de não retorno (morte celular) e então sofrem a necrose. Tanto na oncose como na apoptose, as células permanecem viáveis por períodos variáveis de tempo após a injúria, dependendo do tipo de célula, tecido ou órgão e dependendo do tipo de injúria (LEVIN et al., 1999).

Segundo o paradigma de Majno e Joris (1995), o termo necrose aplica-se igualmente para as células tendo morrido via apoptose ou oncose, ou por outros processos, tal como autofagocitose (ZAKERI et al., 1995). Neste contexto, a palavra necrose tem sido usada de forma inapropriada como sendo o oposto de apoptose sob as últimas décadas. Após este período de confusão os patologistas reapropriaram o termo necrose como um termo geral para a morte celular na lesão histológica (LEVIN et al., 1999).

O Comitê da Sociedade de Patologistas Toxicológicos (LEVIN et al., 1999) recomenda, ao se observar na lesão histológica as células ou tecidos mortos, o uso de “necrose” como diagnóstico apropriado considerando a via pela qual a célula ou tecido morrem. Pode ser adicionado o tipo morfológico de morte celular como por exemplo, se as células têm características apoptóticas no citoplasma, a morte celular pode ser classificada de necrose apoptótica. O mesmo é verdadeiro para lesões com morte celular oncótica. Em outras palavras, necrose apoptótica e necrose oncótica são diagnósticos apropriados (LEVIN et al., 1999; MAJNO e JORIS, 1995). E o mesmo padrão pode ser seguido por outros tipos de morte

celular (tal como autofagocitose) como tornou-se reconhecido. Lesões que contém mais que um tipo de morte celular pode ser indicado por necrose apoptótica e oncose misturada. Portanto, segundo a adequação dos termos apropriados de classificação da morte celular, entende-se que as características morfológicas designadas para a classificação de apoptose, continuam como estavam sendo descritos, ou seja, a apoptose inicia-se como uma forma de suicídio intencional baseados em mecanismos genéticos e morfológicamente a célula se encolhe, a cromatina torna-se picnótica e condensada em massas grandes, e lisas contra a membrana nuclear; o núcleo fragmenta-se e a célula emite processos como brotamento (*budding*) formando corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas ou permanecem livres ou se encolhem como um corpo apoptótico único; há pouco ou não há edema de mitocôndrias ou outras organelas.

Por outro lado, as características morfológicas que vinham sendo classificadas como necrose, descritas no capítulo anterior, são na verdade, características do processo pré-letal da morte celular da oncose, ou seja, edema da célula e organelas, vacuolização, aumento da permeabilidade da membrana, fragmentação da membrana nuclear (*karyolysis*). Somente após a drástica mudança tecidual visível a “olho nú”, com alterações irreversíveis do citoplasma e núcleo, será classificada como um processo final denominado necrose.

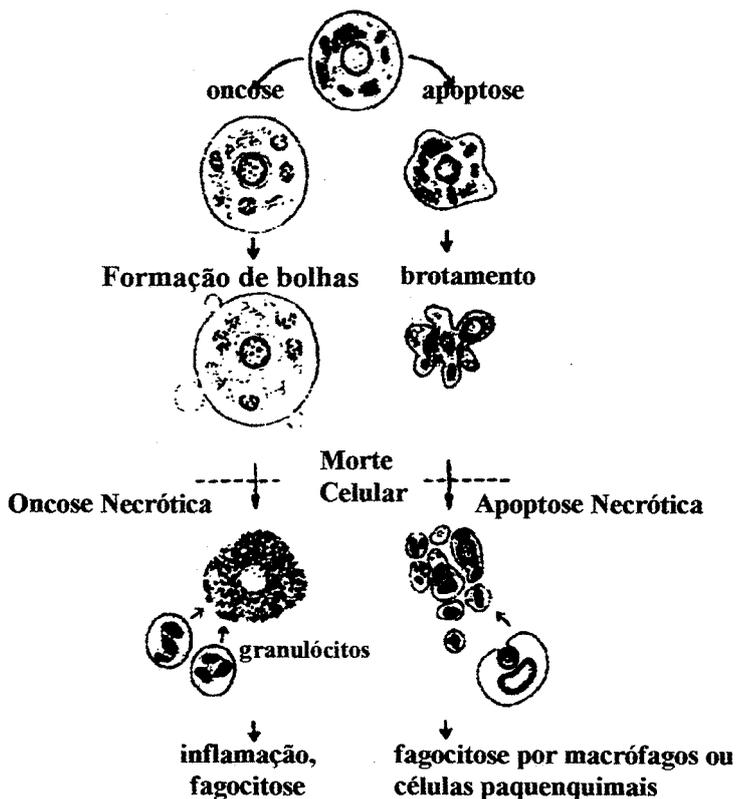


Fig. 3: Diagrama mostrando as relações entre oncose e apoptose e que ambos os processos levam a necrose. O ponto exato que a morte da célula ocorre e o fenômeno *pós-mortem* reconhecido como necrose é algumas vezes arbitrário (LEVIN et al., 1999).

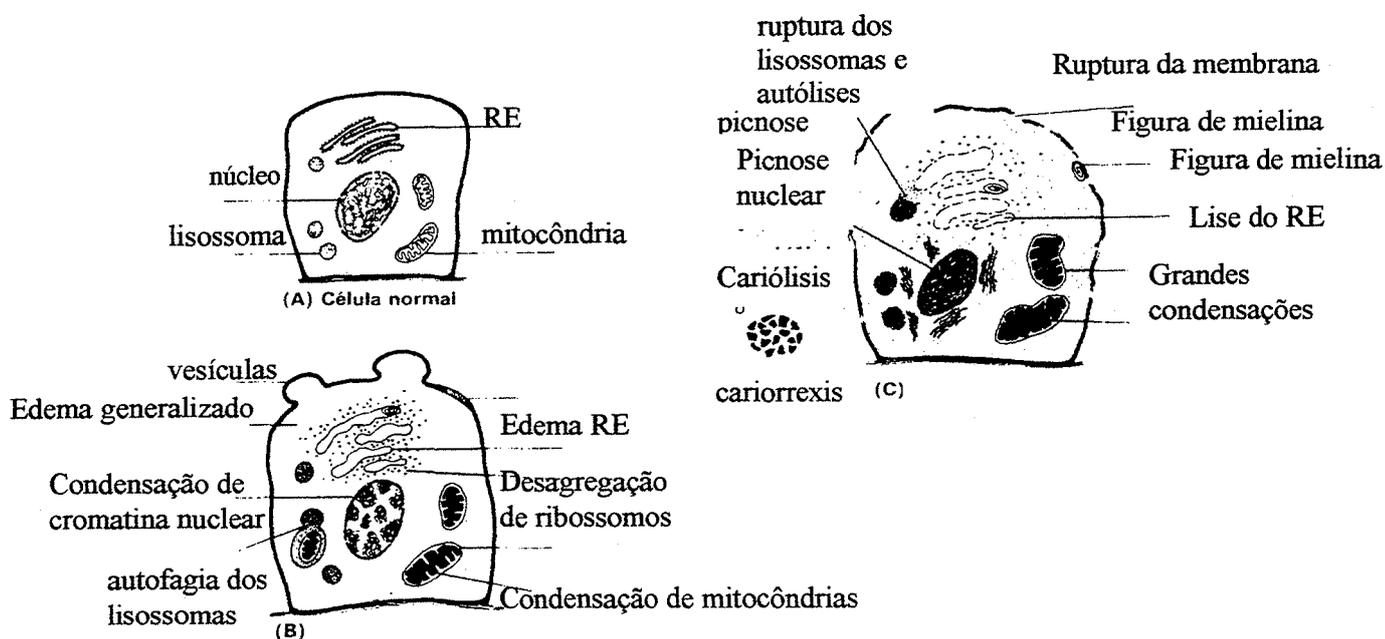


Fig 4. Representação esquemática de uma célula normal (A) e as alterações estruturais da lesão celular reversível (B) e irreversível (C). Retículo endoplasmático (RE). Representa as alterações da oncose (ROBBINS, 1990).

1.5 JUSTIFICATIVA

Apoptose é uma via do processo de morte celular que resulta a partir de uma expressão endógena ou ativação pos-translacional de um grupo de proteínas que estão envolvidos em uma cascata de sinalização intracelular (SAUDERS, 1996; ELLIS et al., 1991; FREEMAN et al., 1993, RAFF et al., 1993; HAECKER e VAUX, 1994). Ao contrário, a necrose oncolítica resulta a partir de um mecanismo passivo provocado por um insulto extrínseco (trauma, toxina) ou manipulação artificial tal como um choque térmico (KERR e HARMON, 1991, BUJA et al., 1993).

A classificação de apoptose tem sido usado para categorizar a morte celular em numerosos pontos, mas no sistema nervoso as relações entre mecanismo de morte celular (passivo ou ativo) e a morfologia resultante de neurônios mortos (necrose ou apoptose) é controverso

(SCHWARTZ et al.,1993; BREDESEN,1996; MAJNO e JORIS,1995; PORTERA-CAILLIAU et al.,1995).

O processo apoptótico havia sido classificado baseado em vários estudos por combinação de vários métodos, dentre eles, a observação pela microscopia óptica, clivagem de DNA internucleossomal revelado pelo gel eletroforese e terminal dUTP nick-end-labeling (Tunnel). Mas, estes processos bioquímicos são atualmente reconhecidos não mais definir especificamente a morte celular por apoptose (BICKNELL e COHEN,1995; GRASL-KRAUPP et al.,1995; VAN LOOKEREN COMPAGNE et al.,1995).

A síntese de endonuclease em algumas células que sofreram apoptose resultava na clivagem de DNA dentro de grandes fragmentos de par de bases que eram frequentemente considerados como uma marcação de apoptose (WYLLIE et al., 1980a; ARENDS et al., 1990). Entretanto, nem todas as células apoptóticas exibiam um padrão de DNA produzido pela clivagem de endonuclease quando o DNA é separado por eletroforese em gel (COLLINS et al., 1992). Recentes achados indicam que grandes fragmentos de pares de bases de DNA também ocorrem na necrose, bem como na apoptose (BICKNELL e COHEN, 1995). Portanto, devido a fragmentação não específica de DNA ser comum em ambos processos, a demonstração dos produtos da clivagem de DNA pelo método de TUNEL (GAVRIELI et al., 1992) não indicou mais, que a células morrem sofrendo um processo de apoptose.

A microscopia óptica não necessariamente discrimina as mudanças celulares apoptóticas a partir de outros processos degenerativos. Por outro lado, a microscopia eletrônica devido sua alta resolução é capaz de definir as alterações ultra-estruturais da célula, sendo o meio, atualmente, confiável para avaliar e caraterizar o processo da morte celular.

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

A aplicabilidade do conhecimento sobre o processo da morte celular é importante para o desenvolvimento de estratégias capazes de induzir a neurodegeneração. Vários estudos foram realizados tentando identificar o tipo de morte celular pós-isquemia baseado nas alterações morfológicas celulares, inicialmente com a microscopia óptica e posteriormente com a microscopia eletrônica, entretanto não existe uma clara tipificação das alterações morfológicas celulares nas diferentes áreas encefálicas. Isto leva a necessidade de realizar estudos adicionais a fim de que se possa chegar a um consenso se a morte celular induzida pela isquemia segue um padrão de apoptose necrótica ou de oncose necrótica, ou de ambos.

Neste estudo, realizamos uma análise morfológica ultra-estrutural da região CA1 do hipocampo de ratos machos adultos após um evento isquêmico global transitório para descrever a progressão das alterações pré-letais, assumindo a hipótese de que o padrão é de necrose oncótica.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise ultra-estrutural da morte celular na área CA1 do hipocampo após a isquemia cerebral global transitória experimental em ratos machos adultos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as alterações ultra-estruturais da camada piramidal da área CA1 do hipocampo após 10 e 20 minutos de isquemia global transitória, com períodos de reperfusão de 2, 4 e 10 dias;

- Comparar as diferenças das alterações ultra-estruturais da camada piramidal da área CA1 do hipocampo após 10 e 20 minutos de isquemia global transitória, com períodos de reperfusão de 2, 4 e 10 dias;

- Baseado nas alterações ultra-estruturais, definir o tipo de morte celular após isquemia global transitória, na área CA1 hipocampal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados 35 ratos Wistar (machos), adultos provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em caixas de plexiglass com 27 x 26 x 31 cm com assoalho recoberto de maravalha (4 animais por caixa). Eles receberam água e ração Nutripal à vontade e tiveram um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro.

4.2 TRATAMENTO

Os animais foram divididos em 7 grupos com 5 animais cada:

Grupo 1 (G_1): grupo controle, que não sofreu qualquer tipo de intervenção;

Grupo 2 (G_2): submetido à isquemia global transitória por 10 minutos e sacrificados após 2 dias de reperfusão;

Grupo 3 (G_3): submetido à isquemia global transitória por 10 minutos e sacrificados após 4 dias de reperfusão;

Grupo 4 (G₄): submetido à isquemia global transitória por 10 minutos e sacrificados após 10 dias de reperfusão;

Grupo 5 (G₅): submetido à isquemia global transitória por 20 minutos e sacrificados após 2 dias de reperfusão;

Grupo 6 (G₆): submetido à isquemia global transitória por 20 minutos e sacrificados após 4 dias de reperfusão;

Grupo 7 (G₇): submetido à isquemia global transitória por 20 minutos e sacrificados após 10 dias de reperfusão.

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram submetidos ao método de oclusão dos quatro vasos com modificações segundo Netto e colaboradores (1993). Este método foi desenvolvido para o uso em ratos Wistar por Pulsinelli e Brierley (1979), e revisado por Pulsinelli e Bucham (1988), e causa redução do fluxo encefálico para menos de 3% (PULSINELLI et al., 1982) em ratos Wistar.

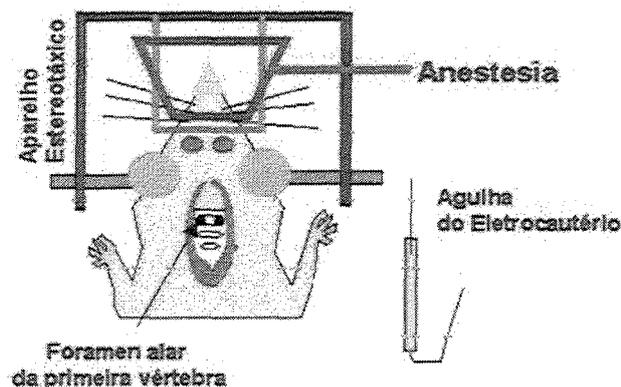
Os animais foram submetidos a dois procedimentos cirúrgicos visando a obliteração das artérias vertebrais e o preparo das artérias carótidas para a isquemia transitória. Cada procedimento foi realizado com um intervalo de 24 horas.

No primeiro dia, os animais foram anestesiados com halotano 2-4% (em ar ambiente) e posicionado em aparelho estereotáxico, fazendo-se uma incisão na linha média da nuca, para se ter acesso ao forame alar, na primeira vértebra cervical. Através do forame alar foi introduzida uma agulha de um eletrocautério e aplicada uma corrente para eletrocoagular a artéria. Assim, o fluxo pelas artérias vertebrais ficou obstruído. Este processo é denominado eletrocoagulação. A seguir foi realizada uma incisão na linha média da face anterior do pescoço e as artérias carótidas foram isoladas. Este procedimento foi realizado através da colocação, ao redor das carótidas comuns, de um fio de silicone acoplado a um botão de

mesmo material, no qual foi dado um nó. Este sistema formava um laço que permitia a obstrução reversível e completa da luz do vaso quando o mesmo era tracionado pelo nó, tendo como base o botão (Fig. 5).

Método de Oclusão dos 4 Vasos

1ª fase: Eletrocoagulação das Artérias Vertebrais



2ª fase: Isolamento das Artérias Carótidas

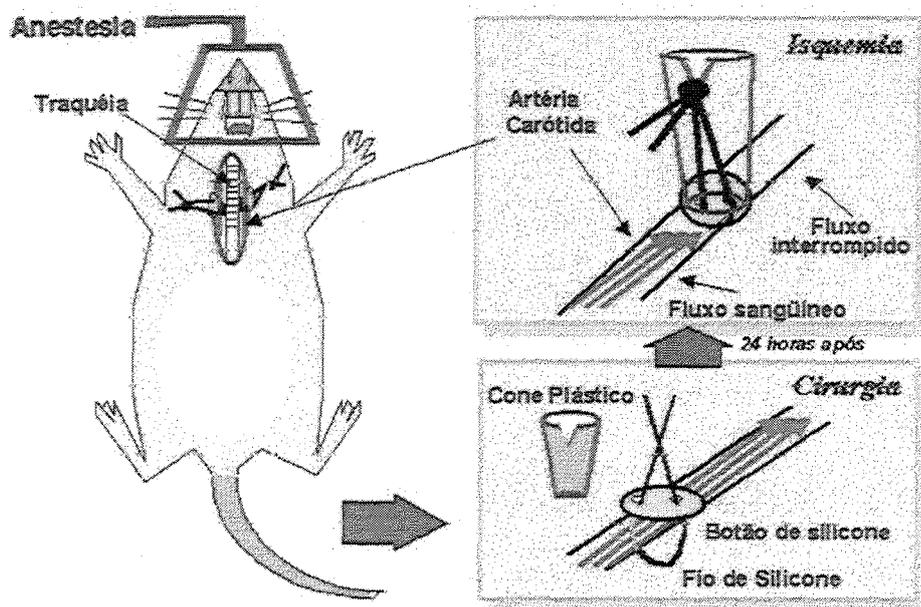


Fig. 5. Procedimento cirúrgico utilizado para a obtenção de isquemia prosencefálica por oclusão de 4 vasos em ratos. Na primeira fase procede-se a eletrocoagulação das artérias vertebrais ao nível do forame alar. Na Segunda fase um fio e um botão de silicone foram acoplados em volta das artérias carótidas comuns de modo a formar um lacete. A isquemia ocorre quando o lacete é acionado através da introdução de um cone plástico entre o botão e o nó de silicone (ARTENJ).

Na figura 6 apresentamos um diagrama da irrigação encefálica do rato, onde podem ser visualizados os pontos de interrupção do fluxo sanguíneo ao encéfalo, sem afetar o tronco cerebral (SCREMIN, 1997).

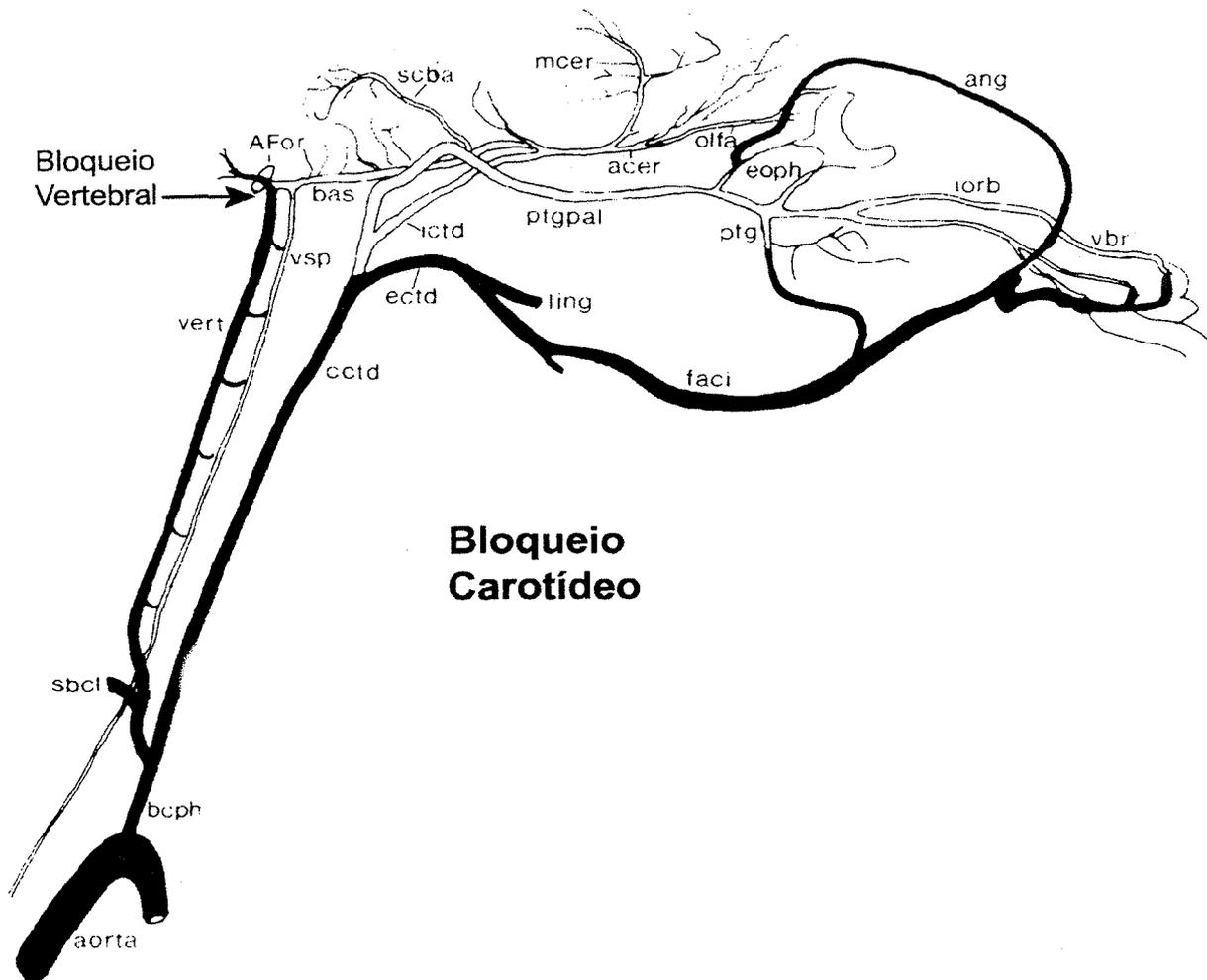


Fig. 6. Diagrama da vascularização do encéfalo de ratos no plano sagital. A cauterização das artérias vertebrais ao nível do forame alar bloqueia o fluxo para a região posterior do prosencéfalo. A subsequente obliteração da circulação carotídea bloqueia por completo o fluxo sanguíneo ao prosencéfalo. bcph, tronco braquiocefálico; sbcl artéria subclávia; cctd, a. carótida comum; vert, a. vertebral; vsp, a. espinhal posterior, Afor, forame alar; bas, a. basilar; ectd, a. carótida externa; ictd, a. carótida interna; scba, a. artéria cerebelar superior; ptgpal, a. pterigo-palatina; mcer, a. cerebral média; acer, a. cerebral anterior; olfa, a. olfatória; eoph, a. oftálmica; ptg, a. pterigonal; ling, a. lingual; faci, a. facial; ang a. angular; iorb, a. infraorbitária; vbr, a. vibrissal (SCREMIN, 1995).

No dia seguinte, os animais foram contidos manualmente, sem uso de fármacos, e realizou-se a manobra de oclusão das carótidas. Para tanto, foi utilizado um cone plástico, com uma ranhura na extremidade de maior diâmetro, que era implantado entre o botão e o nó do fio de silicone. Ao tracionar o nó sobre esta ranhura, comprimiam-se durante 10 ou 20 minutos, o botão de silicone contra as artérias carótidas, interrompendo seu fluxo sanguíneo. Durante o período de isquemia o rato apresenta, ao exame neurológico, perda do reflexo de endireitamento, e rigidez em descerebração dentro de 2 minutos, com manutenção da respiração espontânea, dos batimentos cardíacos e do reflexo córneo-palpebral (Figura 7). Aqueles que não cumpriram este critério, ou que apresentaram convulsões durante o período da isquemia, ou da reperfusão, foram descartados.

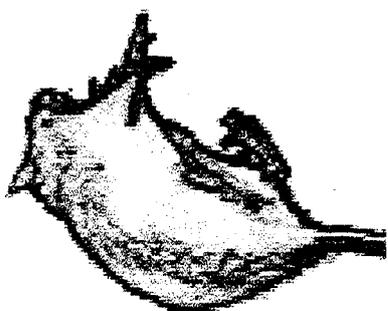


Fig. 7. Posição da rigidez em descerebração. Ocorre a extensão das patas dianteiras e traseiras, e da cauda, durante o episódio isquêmico no qual ocorreu redução do fluxo sanguíneo ao presencéfalo (ROSA NETO, 1998).

Terminado o episódio isquêmico, os fios de silicone foram liberados. Os grupos 2 e 5 foram sacrificados após dois dias de reperfusão, os grupos 3 e 6 após 4 dias e os grupos 4 e 7 após 10 dias de reperfusão. A temperatura corporal dos animais foi controlada por um termômetro anorectal à temperatura corporal média de 36,6°C durante todo o procedimento de isquemia.

Registros eletrocorticográficos (EcoG), em modelos de oclusão dos 4 vasos na região CA1 do hipocampo, de animais em vigília, revelaram que imediatamente após a oclusão das carótidas ocorre a atenuação difusa dos ritmos de base. Com 15 a 25 segundos de isquemia as células deixam de exibir atividade espontânea. Após 1 minuto não apresentam sequer potenciais evocados, atingindo um padrão isoeétrico em torno de 2-3 minutos após o início da isquemia global. O padrão isoeétrico persiste até que seja desfeita a oclusão carotídea (PULSINELLI e BRIERLEY, 1979; BUZSAKI et al., 1989).

4.4 SACRIFÍCIO E PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Após terem sido atingidos os tempos de reperfusão, acima especificados, os animais foram anestesiados com tiopental (criastalia) na dose de 0,1 ml/100gr de peso corporal, aplicado via intra-peritonial. Em seguida foi realizado a perfusão por via transcárdica e para isto, foi feita uma abertura na altura do diafragma, as costelas foram afastadas e o saco pericárdio foi dissecado para expor o coração, em seguida foi injetado através de uma seringa 0,1mg de heparina no ventrículo esquerdo e bloqueado a aorta descendente. Posterior a este procedimento, foi colocada uma cânula no ventrículo esquerdo do coração e injetado, através de uma bomba de perfusão, uma solução salina (200 ml) para lavagem da árvore vascular encefálica, seguido de uma solução fixadora (100 ml) composta de glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2% diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (TP).

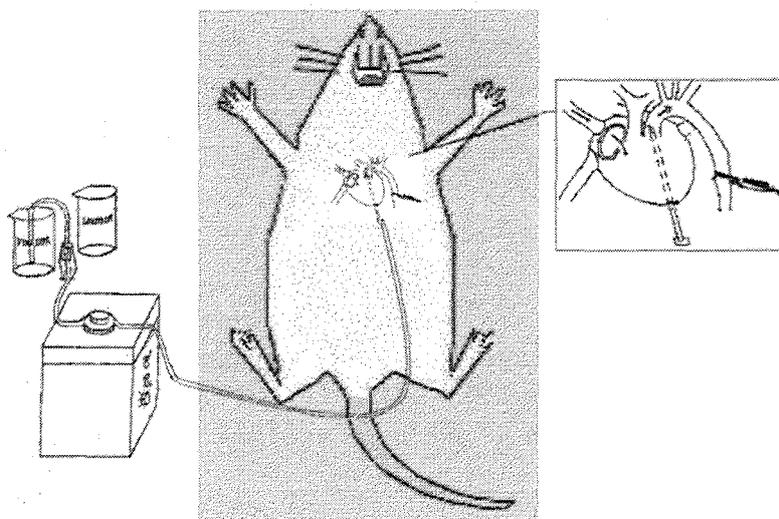


Fig. 8. Procedimento de perfusão por via intracardíaca. Foi colocada uma cânula no ventrículo esquerdo do coração e clampeado a aorta descendente. Assim a solução salina e posteriormente a solução fixadora, perfundem todo o encéfalo, retirando todo o sangue dos vasos sanguíneos.

4.5 PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Concluídos os procedimentos de perfusão, o encéfalo foi retirado através da abertura da calota craniana. Posteriormente, o mesmo foi deixado na solução fixadora no máximo por 24 horas e realizado os cortes coronais do cérebro de 100 μ m de espessura em vibrátomo (Leica) para obter a porção posterior da região CA₁ do hipocampo. Feita esta dissecação inicial, o material foi pós-fixado no mesmo fixador utilizado na perfusão por um tempo mínimo de 1 hora. Após, as amostras foram tratadas como segue (RODRIGO et al., 1996):

- 1) 3 lavagens em tampão fosfato salino a 0,1M pH 7,3 de 30 minutos cada;
- 2) tetróxido de ósmio 1% diluído em TP durante 1 hora;
- 3) 3 lavagens em tampão fosfato salino em 0,1M de 15 minutos cada;
- 4) 2 trocas de álcool a 50% de 5 minutos cada;
- 5) 2 trocas de álcool a 70% de 10 minutos cada;
- 6) 2 trocas de álcool a 96% de 20 minutos cada;
- 7) 2 trocas de álcool a 100% de 20 minutos cada;
- 8) 1 troca de óxido de propileno de 5 minutos;
- 9) misturar 1:1 de resina Ducurpan ACM (F'uka) e óxido de propileno durante 10 minutos;
- 10) colocadas em resina Ducurpan ACM (F'uka) a 100%
- 11) colocadas em Ducurpan e insuflado vácuo por 10 min e deixadas durante 24 horas, no mesmo.

Os cortes foram colocados em lâminas histológicas e cobertos com resina pura e lamínulas de acrílico, a fim de que os mesmos ficassem retilíneos, e colocadas em estufa a 60°C. Após 24 horas, as lamínulas de acrílico foram retiradas e as lâminas de vidro, contendo os cortes ficaram por mais 24 horas na estufa para completar a polimerização.

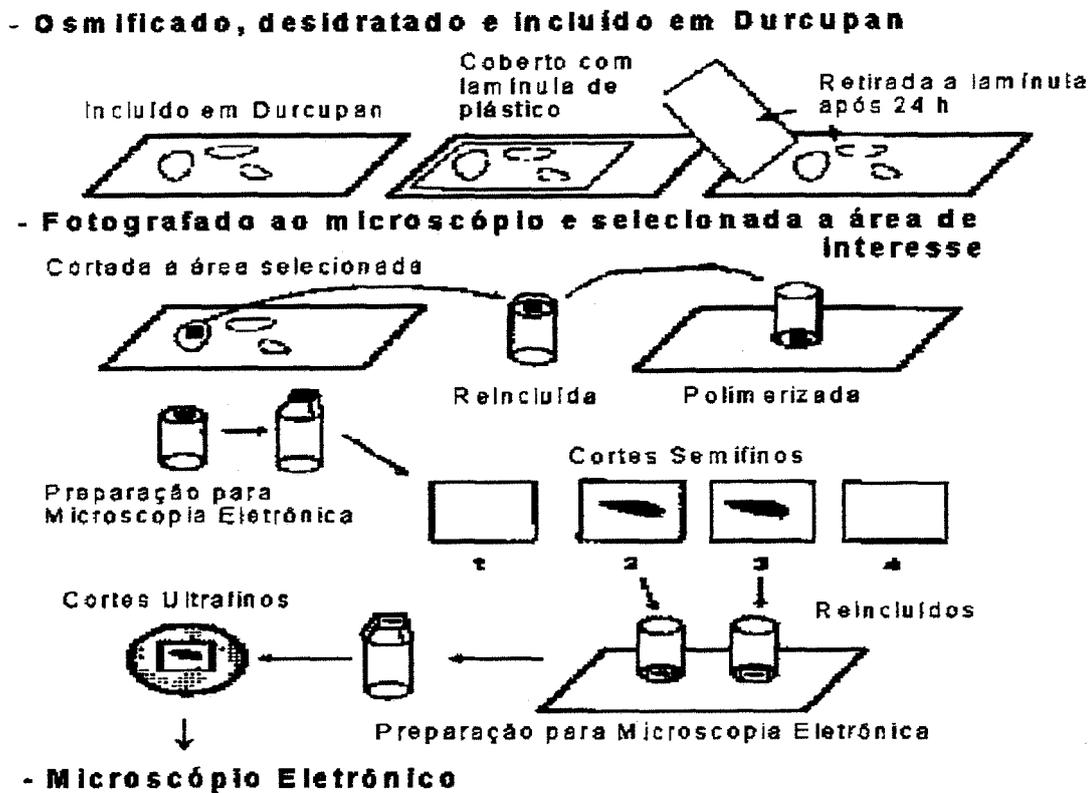


Fig. 9: Diagrama da preparação do material para a microscopia eletrônica (RODRIGO et al., 1996).

Após a retirada das lâminas da estufa, iniciou-se o processo de seleção da área CA1 do hipocampo. Através do microscópio óptico reconhecia-se a área CA1 e demarcava-se a mesma. Em seguida, a lâmina com a área selecionada era colocada sob uma lupa e efetuava-se o corte manualmente com o emprego de um material cortante. Posteriormente, a área CA1 do hipocampo era colada em blocos de resina, obtidos previamente.

Os blocos de resina com a área CA1 do hipocampo eram trimados a fim de se retirar o excesso de resina, de forma a ficar na ponta do bloco somente o material a ser observado. Posteriormente, foram realizados cortes semifinos de 995 nm em um ultra-micrótomo RMC-MT 6000 - XL (Departamento de Ciências Morfológicas-ICBS-UFRGS) (Fig.10).

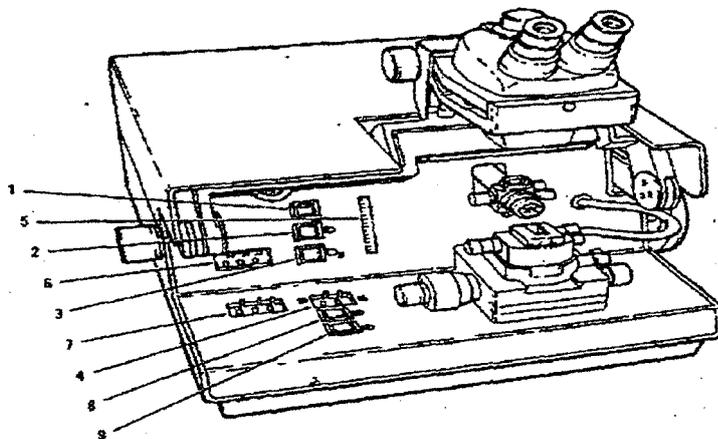


Fig. 10. Ultra-micrótomo RMC- MT 6000 – XL (Departamento de Ciências Morfológicas - ICBS-UFRGS).

Os cortes semifinos obtidos eram colocados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina. Este processo de coloração das lâminas permitia a análise da área CA1 do hipocampo e a seleção das células piramidais. Após realizada a seleção, o bloco foi novamente trimado, a fim de que na ponta do mesmo, ficasse somente a área a ser analisada no microscópio eletrônico.

Em seguida foram efetuados os cortes ultrafinos de 80 nm de espessura no mesmo ultra-micrótomo e montado em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963), sendo posteriormente analisados num microscópio eletrônico de transmissão LEOL JEM 1200 EXII no Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS.

Durante a análise no microscópio eletrônico, as áreas de interesse eram fotografadas. Após a revelação, os filmes eram escaneados, sendo as fotos, posteriormente, gravadas em CD-ROM.

5. RESULTADOS

Inicialmente serão relatadas algumas características correspondentes ao grupo controle e posteriormente aos grupos que sofreram o insulto isquêmicos de 10 ou 20 minutos após os tempos de reperfusão de 2, 4 ou 10 dias.

Foram encontrados em todos os grupos de ratos que sofreram o insulto isquêmico, neurônios com diferentes alterações morfológicas, ou seja, alterações discretas, como por exemplo, o edema de organelas citoplasmáticas, assim como neurônios com alterações importantes, por exemplo, neurônios que possuíam edema de organelas acrescidos de ruptura das membranas citoplasmática ou nuclear; e também neurônios com alterações muito avançadas do processo de morte celular, como é o caso da presença de restos celulares. A frequência de neurônios com uma ou outra característica diferenciava-se entre os grupos. Como este estudo é uma análise qualitativa, isto nos levou a formular uma classificação do processo de morte celular em três fases distintas: inicial, intermediária e final do processo neurodegenerativo.

A **fase inicial** é aquela na qual se encontram as alterações iniciais do processo neurodegenerativo. Os neurônios com alterações citoplasmáticas representadas pelo edema de organelas, como por exemplo, edema de mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ou desagregação dos ribossomos a partir dos poliribossomos ou do retículo endoplasmático rugoso, assim como o início da formação de vacúolos. Não estão enquadrados nesta fase as rupturas de membranas nuclear e citoplasmática, nem a alteração de densidade, ou seja, neurônios eletrôn-lúcidos ou neurônios eletrôn-densos. Em relação às alterações nucleares estão incluídas as condensações de cromatina, tanto pequenas como irregulares,

características da necrose oncótica, assim como as grandes e arredondadas que tendem a posicionar-se contra a membrana nuclear, característica da necrose apoptótica. Também estão incluídas nesta fase as alterações do contorno da membrana nuclear como as indentações nucleares.

A **fase intermediária** caracteriza-se por neurônios que possuem alterações morfológicas já encontradas na fase anterior acrescidas de outras alterações que representam um processo mais avançado da neurodegeneração. Os neurônios que apresentavam alterações de densidade, ou seja, neurônios eletron-lúcidos ou eletron-densos, também estavam incluídos neste grupo neurônios que já possuíam rupturas de membranas plasmática ou nuclear, bem como neurônios apresentando a formação de bolhas, característica da necrose oncótica.

A **fase final** caracteriza-se por incluir neurônios em fase muito avançada do processo neurodegenerativo, ou seja, quando a célula está praticamente desintegrada. Os restos celulares hiperdensos que representam o processo final da necrose oncótica e a fagocitose dos restos celulares pelas células gliais caracterizam esta fase.

5.1 GRUPO CONTROLE

5.1.1 NEURÔNIOS PIRAMIDAIIS

O neurônio é constituído por dois componentes principais: o corpo neuronal e seus prolongamentos, axônio e dendritos (Figs 11A, 12A,B) O corpo neuronal inclui o citoplasma, também denominado pericário e o núcleo. No pericário foram visualizados vários componentes, dentre eles: a substância de Nissl, o aparelho de Golgi, os retículos endoplasmáticos rugoso e liso, os corpos multivesiculares, os lisossomos e as mitocôndrias. Estas organelas possuíam um aspecto normal, sem evidência de edema ou formação de vacúolos (Fig.12 C e D).

A substância de Nissl estava presente no pericário assim como nos dendritos e ausente no axônio. Caracterizou-se pelo arranjo de cisternas de retículos endoplasmáticos rugosos e polissomos que são pequenos grupos ou rosetas de 5 a 6 grânulos de ribossomos (Fig. 12C).

O complexo de Golgi estava organizado em um complexo de cisternas achatadas e paralelas envolvidas por um aglomerado de várias pequenas vesículas. As cisternas de Golgi estavam freqüentemente dispostas na zona média do pericário, entre o envelope nuclear e o plasmalema. O empacotamento fechado da cisterna e a ausência de ribossomos distinguiam o complexo de Golgi do retículo endoplasmático liso (REL) e do retículo endoplasmático rugoso (RER). Cada cisterna de Golgi era freqüentemente pouco volumosa, mas algumas encontravam-se dilatadas, especialmente nas extremidades, e sua geometria distinguiu duas superfícies em cada empilhamento da cisterna: uma convexa, face externa ou face *cis* e a face interna, côncava, também chamada face *trans*. Os corpos multivesiculares eram encontrados com um formato esférico e limitados por uma única membrana, contendo componentes que poderiam ser vesículas pequenas e um agrupamento de outras inclusões entre os quais filamentos, grânulos, massas densas irregulares ou membranas e a matriz destas inclusões eram claras ou escuras. Os lisossomos eram organelas elétron-densas, pouco numerosas (Figs. 12 C e D)

As mitocôndrias apresentam-se envolvidas por uma membrana interna e outra externa. A membrana interna circunda um espaço interno que é ocupado por uma matriz densa, enquanto que, entre as membranas interna e externa existe um espaço denominado compartimento mitocondrial externo. Geralmente as mitocôndrias eram alongadas e possuíam cristas orientadas longitudinalmente (Figs. 12 C e D).

Dentre os componentes nucleares observamos a cromatina nuclear que estava espalhada pela cariolinfa, geralmente não apresentando grumos condensados de heterocromatina. Visualizava-se o nucléolo, com formato arredondado na cariolinfa. A membrana nuclear era dupla e extremamente homogênea e podia ser visualizada a cisterna perinuclear (Figs. 12 C e D).

5.1.2 CÉLULAS GLIAIS

O astrócito foi uma das células gliais freqüentemente encontrado nos grupos de animais submetidos ao insulto isquêmico e por isto faremos uma breve descrição dos astrócitos encontrados no grupo controle. Este tipo celular caracterizava-se pela hipodensidade citoplasmática e nuclear. O núcleo não possuía nucléolo, poucos e pequenos grumos de heterocromatina podem ser visualizados contra a membrana nuclear e esta encontrava-se íntegra. No citoplasma podiam ser visualizados as organelas intactas, como o retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias, lisossomos. Os poliribossomos eram raramente encontrados e os filamentos intermediários podiam ser visualizados no citoplasma, porém em menor quantidade comparado com os astrócitos encontrados nos animais experimentais submetidos ao insulto isquêmico. A membrana plasmática encontrava-se íntegra (Fig. 11B).

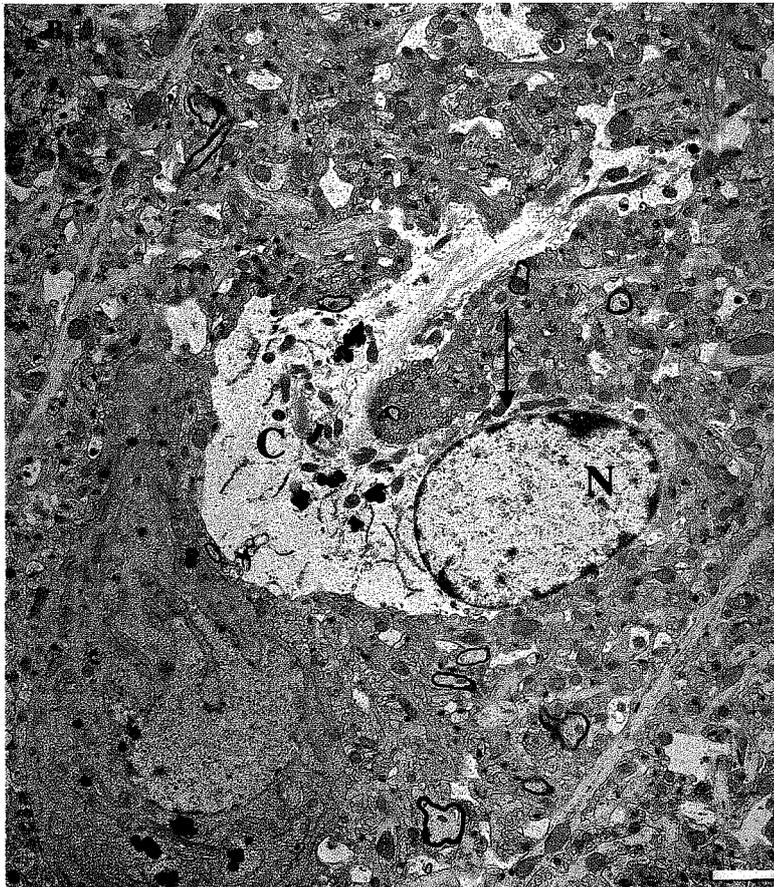
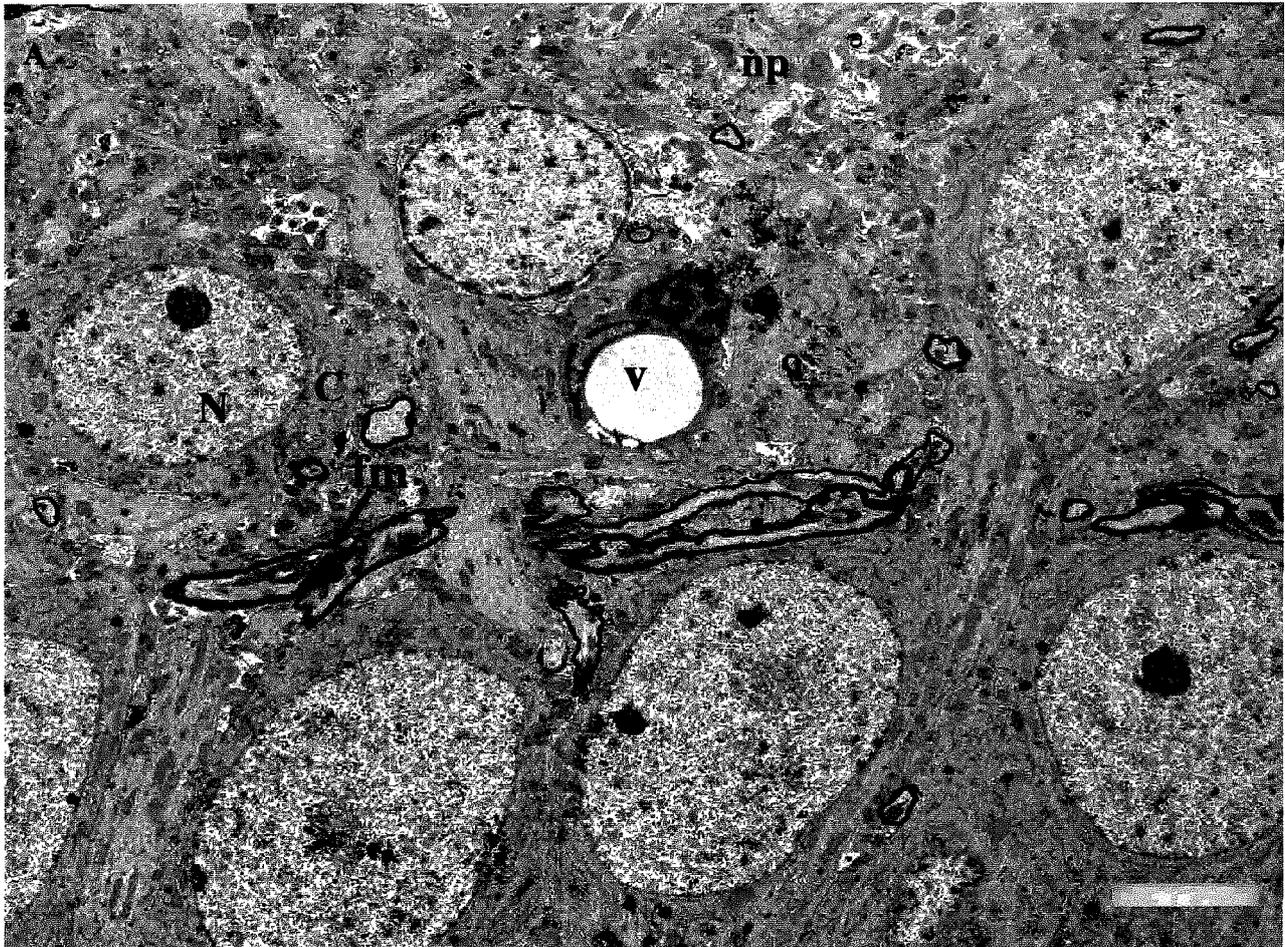


Fig. 11. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos do grupo controle. **A:** Neurônios piramidais intactos, os quais mantêm uma conformação arredondada. Núcleo (N) e citoplasma (C) sem alterações. O neuropilo (np), vaso sanguíneo (V), fibras mielínicas (fm) apresentam-se organizados. **B:** Micrografia de um astrócito (seta), mostrando características normais; núcleo (N) e citoplasma (C). Barras A = 5 μ m; B = 2 μ m

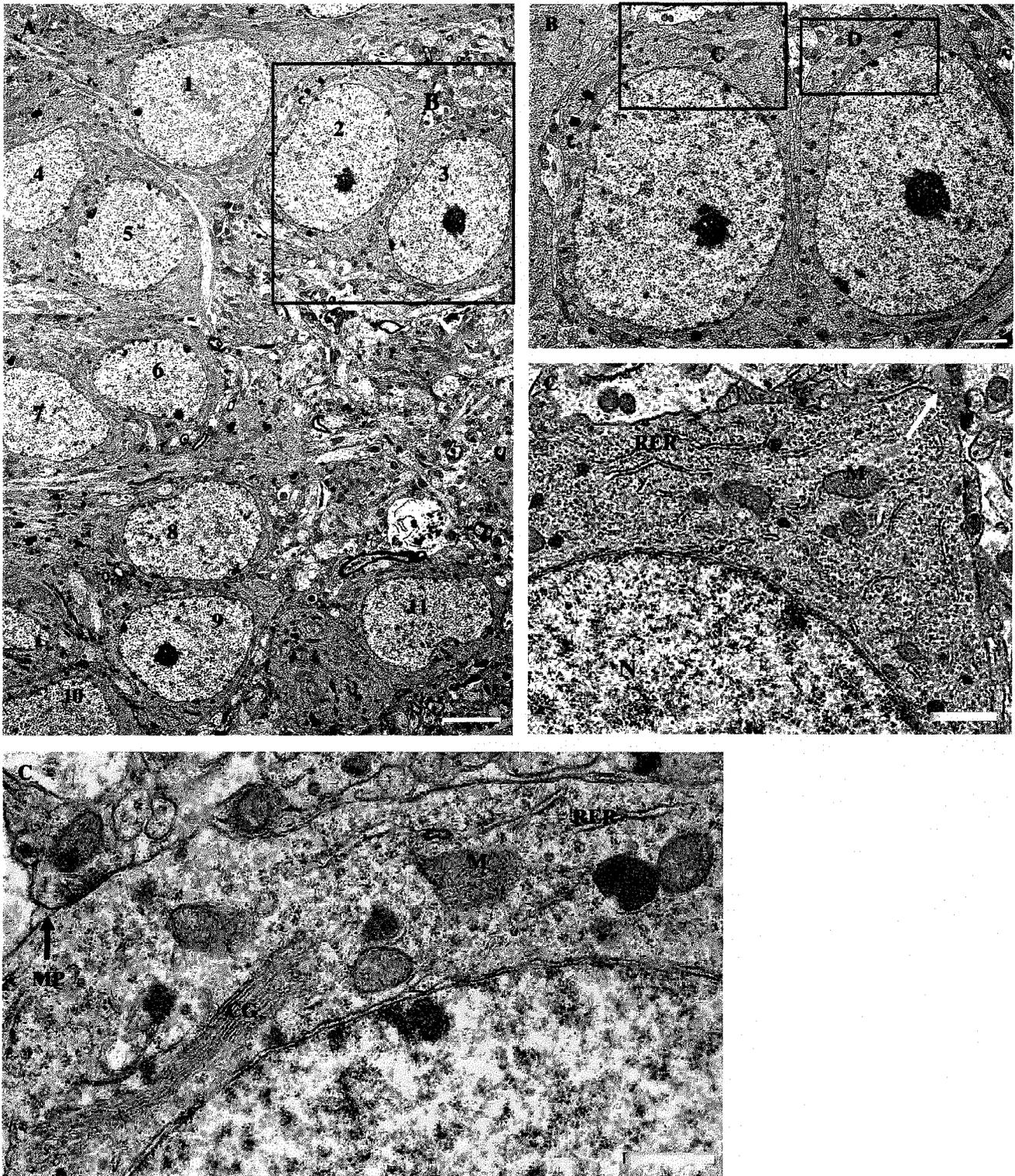


Fig. 12: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos do grupo controle. **A:** Região mostrando neurônios piramidais. **B:** Detalhe dos neurônios 2 e 3 da micrografia A, mostrando as características ultra-estruturais preservadas. **C:** Detalhe do neurônio da micrografia B, mostrando o retículo endoplasmático rugoso (RER) e as mitocôndrias (M) inalteradas; a carioteca (seta preta) e a membrana plasmática (seta branca) intactas. **D:** Detalhe da micrografia B, notar o citoplasma com organelas intactas, mitocôndrias (M) com as cristas visíveis, complexo de Golgi (CG), as membranas plasmática (MP) e nuclear (seta preta) intactas, com a cisterna perinuclear visível. Barras A= 7 μ m; B = 2 μ m; C,D = 1 μ m.

5.2 GRUPO 10 MINUTOS DE ISQUEMIA COM 2 DIAS DE REPERFUSÃO

Foram encontrados neurônios em diferentes etapas do processo degenerativo, após 10 minutos de isquemia cerebral global transitória com 2 dias de reperfusão. Como havíamos descrito anteriormente, para a melhor compreensão da análise qualitativa formulamos uma classificação do processo neurodegenerativo, incluindo tanto características do processo de necrose oncótica bem como do processo de necrose apoptótica. Entretanto, a análise dos dados deste grupo experimental permitiu verificar que a maioria dos neurônios encontrados possuíam características de um processo neurodegenerativo inicial e poucos neurônios possuíam características morfológicas da fase intermediária e final de degeneração.

O neuropilo encontrava-se organizado, porém havia algumas regiões com vacúolos de tamanhos variáveis, predominando os de pequeno tamanho (Figs 13A,C e 18E), e alguns destes apresentavam material floculento em seu interior (Fig. 16C). Observavam-se dendritos com organelas alteadas como as mitocôndrias com perdas de suas cristas e edemaciaas (Fig.17 C). Raramente, observaram-se áreas do neuropilo com grande alterações (Fig. 16D).

Entre os neurônios encontravam-se células gliais. Os astrócitos mostravam uma forma mais alongada, enrugamento do núcleo com condensação em grumos de heterocromatina e no citoplasma uma grande quantidade de feixes de filamentos intermediários e lisossomos (Fig 19). Neste grupo, observou-se grande quantidade de neurônios mantendo sua integridade, o que se diferencia dos grupos com os períodos mais prolongados de reperfusão, ou seja de 4 e 10 dias.

5.2.1 FASE INICIAL DO PROCESSO NEURODEGENERATIVO

Foram encontradas neurônios dentro dos padrões iniciais da neurodegeneração através das alterações citoplasmáticas identificadas pelo edema de mitocôndrias (diâmetro médio de 365 nm), do RER e do complexo de Golgi, bem como da presença de vacúolos de tamanho

considerável (diâmetro médio de 4 μm). O núcleo não apresentava ainda alterações e possuía um diâmetro médio de 7,4 μm . Também foram encontradas células com estas características citoplasmáticas, porém elas mostravam alterações nucleares, tais como, grânulos de heterocromatina contra a membrana nuclear, assim como dispersos no carioplasma (Figs 13 A, B).

Outros tipos neuronais apresentavam grandes grumos de cromatina condensados contra a membrana nuclear. O citoplasma possuía porções com organelas intactas como RER e REL e outras porções totalmente desorganizadas representadas pelo edema e fragmentação de organelas e não se visualizavam as mitocôndrias. A membrana plasmática estava intacta.

Alguns neurônios mostravam alterações iniciais no núcleo, indicadas pela condensação de heterocromatina em pequenos grumos contra a membrana nuclear. O citoplasma possuía organelas ainda intactas, como o RER e as mitocôndrias. As membranas plasmática e nuclear também encontravam-se intactas (Figs 13 C,D; 18C).

5.2.2 NEURÔNIOS NA FASE INTERMEDIÁRIA DA NEURODEGENERAÇÃO

Outras células mostravam características nucleares como condensação de heterocromatina que estava organizada em grumos arredondados, ausência de algumas zonas da membrana nuclear (Fig. 14A, B,C). No citoplasma, algumas mitocôndrias estavam intactas (Fig 14D), já outras, mostravam perda das cristas mitocondriais. O REL estava dilatado e também havia a presença de numerosos lisossomos, microtúbulos e neurofilamentos; a membrana plasmática encontrava-se íntegra. Ainda foram encontrados neurônios, nos quais não se visualizava a dupla membrana nuclear, porém o contorno nuclear arredondado ainda permanecia.

Foram encontrados neurônios com eletron-densidade tanto no núcleo quanto no citoplasma. O núcleo apresentava a membrana nuclear enrugada, com grânulos de heterocromatina contra ela, e o carioplasma com escassos componentes. No citoplasma havia dissolução dos poliribossomos,

não se conseguindo distinguir a maioria das organelas devido a sua hiperdensidade, à exceção de algumas mitocôndrias que podiam ser visualizadas com escassas alterações, bem como outras, que possuíam alterações como o edema e a perda das cristas mitocondriais. Também foram visualizados muitos lisossomos, bem como a membrana plasmática inalterada (Fig. 15A,B,C,D).

Havia também neurônios eletrólucidos caracterizados pela hipodensidade tanto no núcleo quanto no citoplasma. No núcleo, pequenos grumos de heterocromatina apareciam espalhados pela cariolinfa, assim como contra a membrana nuclear. No citoplasma visualizavam-se poucas organelas e as que estavam presentes apresentavam-se alteradas, tais como as mitocôndrias e os RE, estando preenchido o resto do citoplasma por vacúolos de diferentes tamanhos e com um conteúdo de finos grânulos. As membranas plasmática e nuclear não estavam presentes em todas as regiões. Outros neurônios diferenciavam-se destes, por apresentarem estas membranas intactas, um maior número de mitocôndrias, RE, comparando-se com as outras organelas, porém também alteradas. Não foram visualizados neurofilamentos nem microtúbulos (Fig. 16A,B,C,D,F).

5.2.3 NEURÔNIOS NA FASE FINAL DA NEURODEGENERAÇÃO

Foram visualizados restos celulares com eletrondensidade, sem nenhuma organela em seu interior e os mesmos não estavam envolvidos por membrana plasmática (Figs 17A, B; 18A,B)

Outros restos celulares apresentavam uma menor densidade ao serem comparados com os restos celulares descritos acima, os quais continham material amorfo, vacúolos e algumas organelas distinguíveis como o REL e ribossomos livres. Em alguns campos, tais restos estavam, geralmente, envolvidos por membrana plasmática (Fig. 17D, E, F).

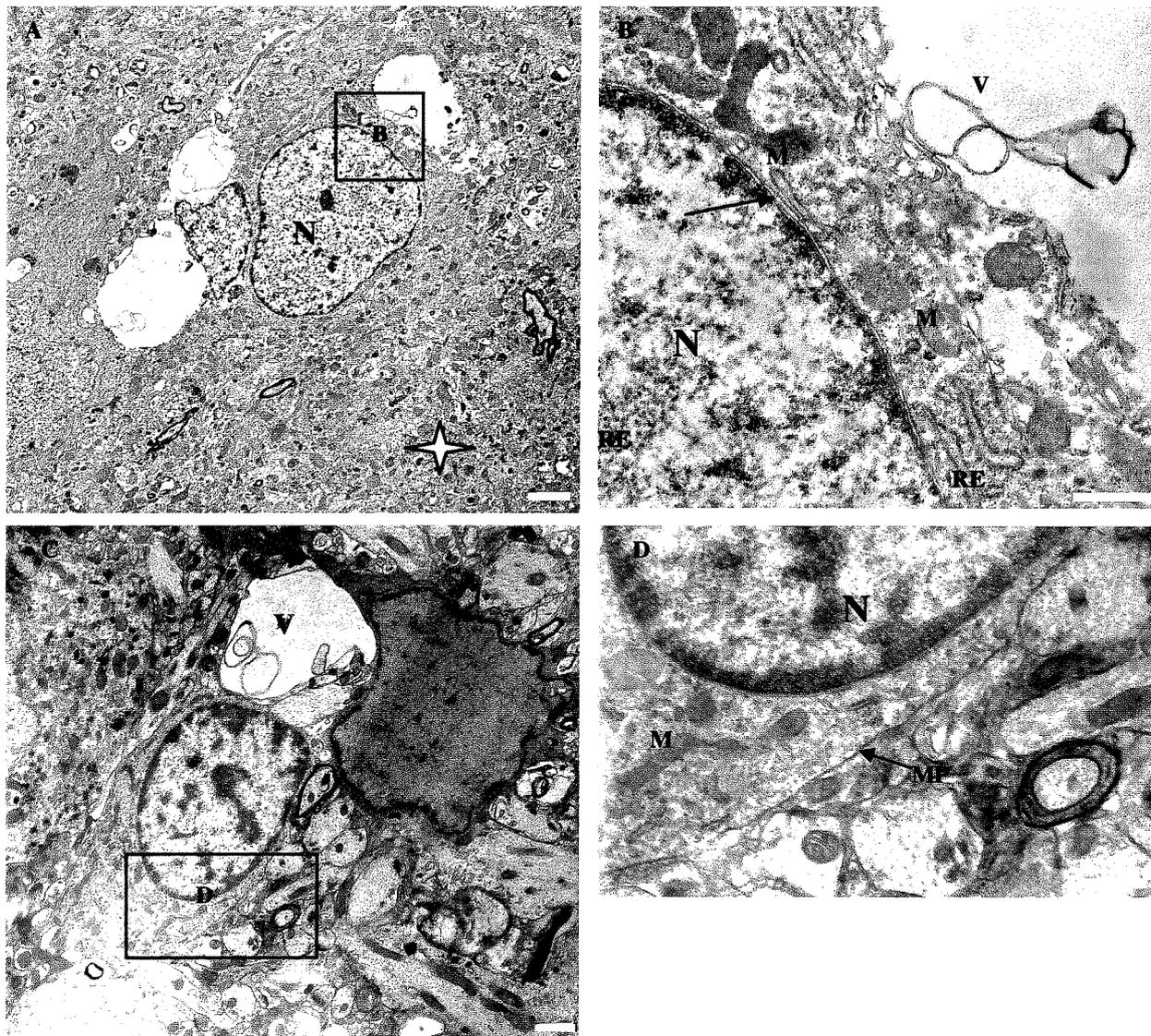


Figura 13: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônio piramidal em fase inicial de degeneração mostrando alterações precoces no citoplasma através do edema de organelas, neuropilo organizado (estrela). **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando o núcleo normal com diâmetro médio de 7,4 μm , nucléolo com diâmetro médio de 0,8 μm e a membrana nuclear dupla (seta). As alterações citoplasmáticas encontradas foram edema de mitocôndrias (diâmetro médio de 365 nm) e retículo endoplasmático e a formação dos vacúolos de tamanho médio (diâmetro médio de 4 μm). **C:** Neurônio piramidal com alterações iniciais no núcleo, indicadas pela condensação de heterocromatina e o citoplasma não apresentava alterações. **D:** Detalhe da micrografia C, mostrando a condensação de heterocromatina em grumos contra a membrana nuclear. M: mitocôndria RE: retículo endoplasmático, MP: membrana plasmática íntegra, N: núcleo, V: vacúolo. Barras A = 2 μm ; B = 500 nm; C = 1 μm ; D = 2 μm .

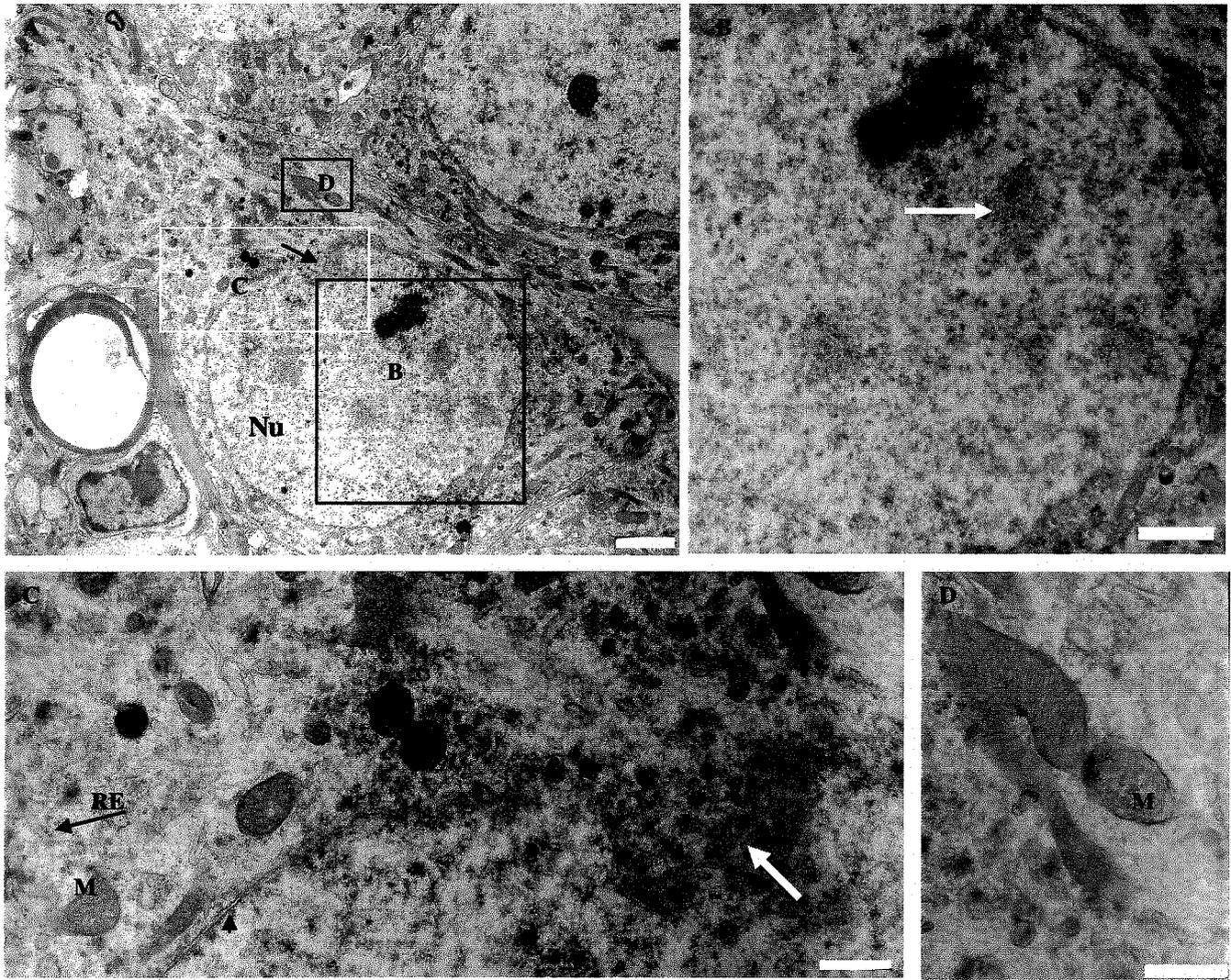


Figura 14. Micrografias eletrônicas de neurônios piramidais de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônio piramidal em fase intermediária de degeneração mostrando alterações precoces no núcleo (Nu), através da condensação da heterocromatina em grumos arredondados e início de ruptura da membrana nuclear (seta). **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando a condensação em grumos arredondados de heterocromatina (seta). **C:** Detalhe da micrografia A, mostrando a mitocôndria intacta (M), e início da perda de conformação da substância de Nissl, retículo endoplasmático (RE) e porções da membrana nuclear rompidas (seta) e demais porções intactas (cabeça de seta). **D:** Detalhe da micrografia A, mostrando a mitocôndria alterada (M) e em sua vizinhança uma mitocôndria sem alterações. Barras A = 2 μ m; B = 1 μ m. C,D = 500 nm.

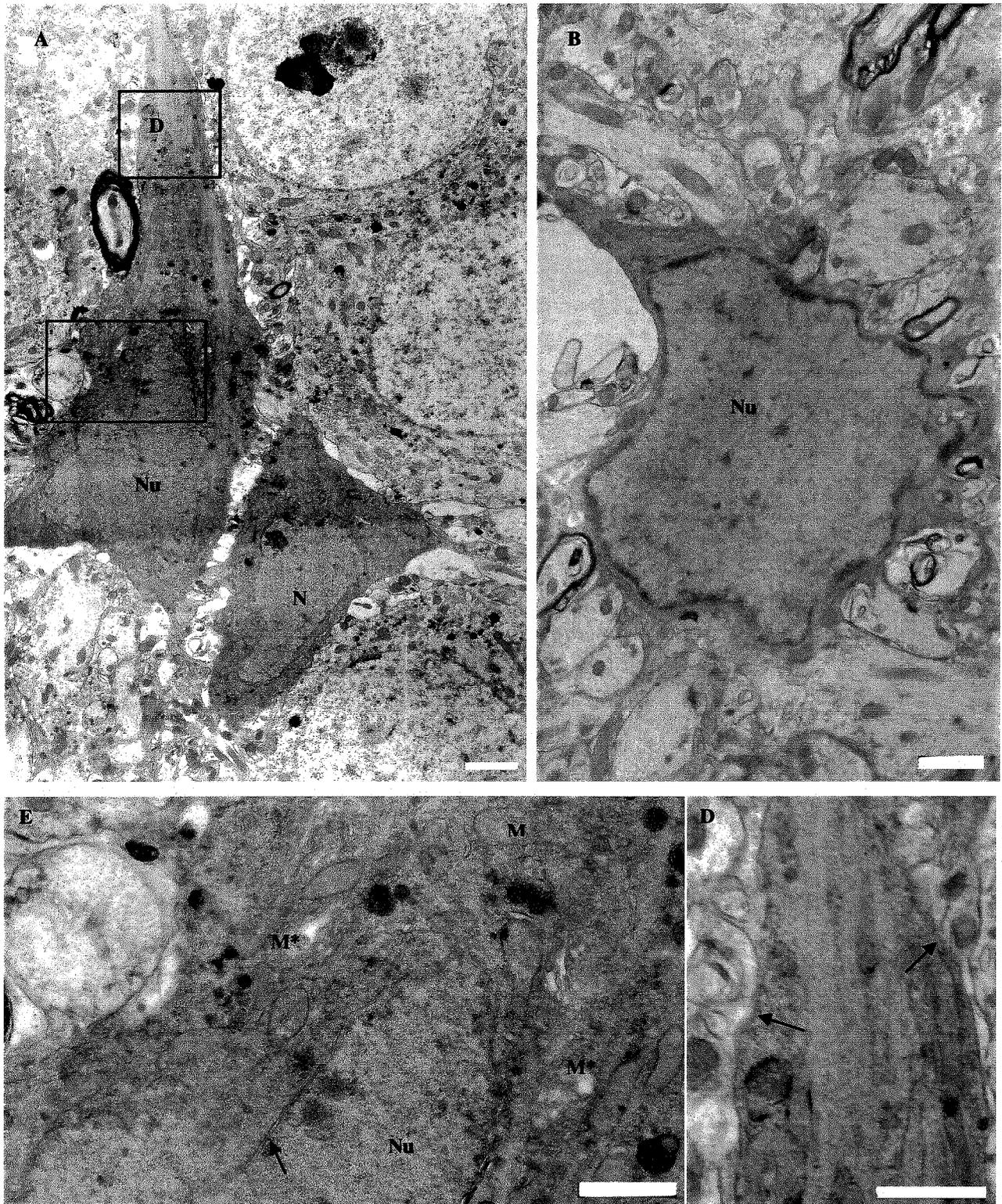


Figura 15: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônios piramidais hiperdensos com núcleo apresentando indentações, presença de membranas nuclear e plasmática, Núcleo (Nu). **B:** Neurônio hiperdenso com ausência de nucléolo. **C:** Detalhe do neurônio da micrografia A, mostrando em detalhes a membrana nuclear (seta) e componentes citoplasmáticos de difícil visualização, devido à hiperdensidade. Algumas organelas como as mitocôndrias (M) são visíveis e algumas delas (M*) apresentam perdas de suas cristas. **D:** Detalhe da micrografia A, notar dendrito com a membrana plasmática intacta (seta). Barras A = 2 μ m; B e C,D = 1 μ m

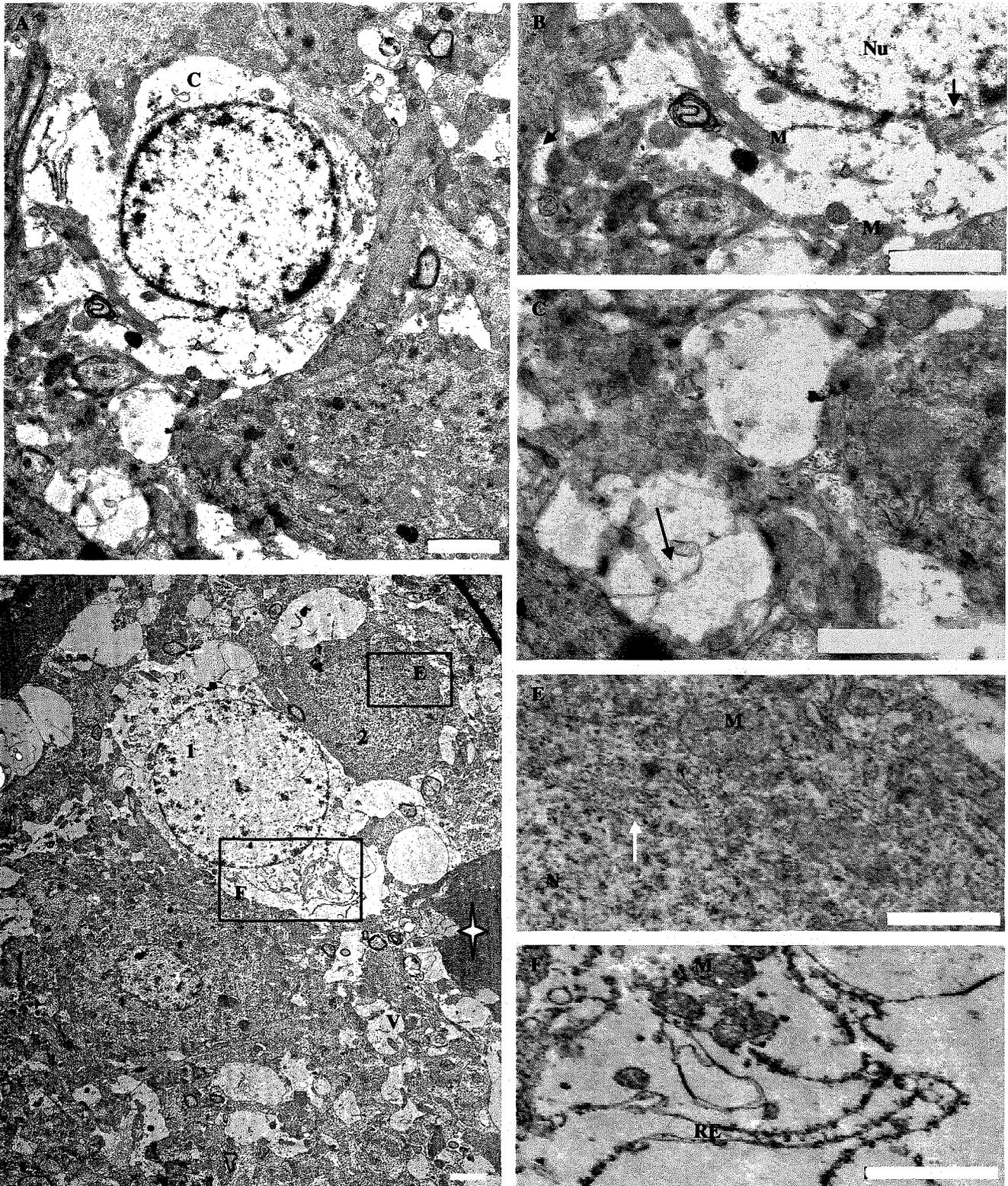


Figura 16: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperusão. **A:** Célula eletrólúcida apresentando poucas organelas no citoplasma e ausência de citoesqueleto. **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando ruptura em determinadas porções da membrana nuclear (seta) e da membrana plasmática (cabeça de seta). No citoplasma poucas organelas e dentre elas visualizam-se mitocôndrias com perda das cristas mitocondriais (M). **C:** Detalhe do neuropilo da micrografia A, mostrando, vacúolos com material floculento em seu interior (seta). **D:** Neurônio com hipodensidades nuclear e citoplasmática (1), restos celulares eletrólucidos da fase final de degeneração (estrela) e neuropilo contendo vários vacúolos (V) com material amorfo no seu interior, neurônios hiperdensos (2,3). **E:** Detalhe da micrografia D, neurônio hiperdenso, núcleo (N), mitocôndria (M), membrana nuclear (seta). **F:** Detalhe da micrografia D, mostrando retículo endoplasmático (RE) e mitocôndrias (M) alteradas. Barras A, B, C, D, E, F = 2 μ m.

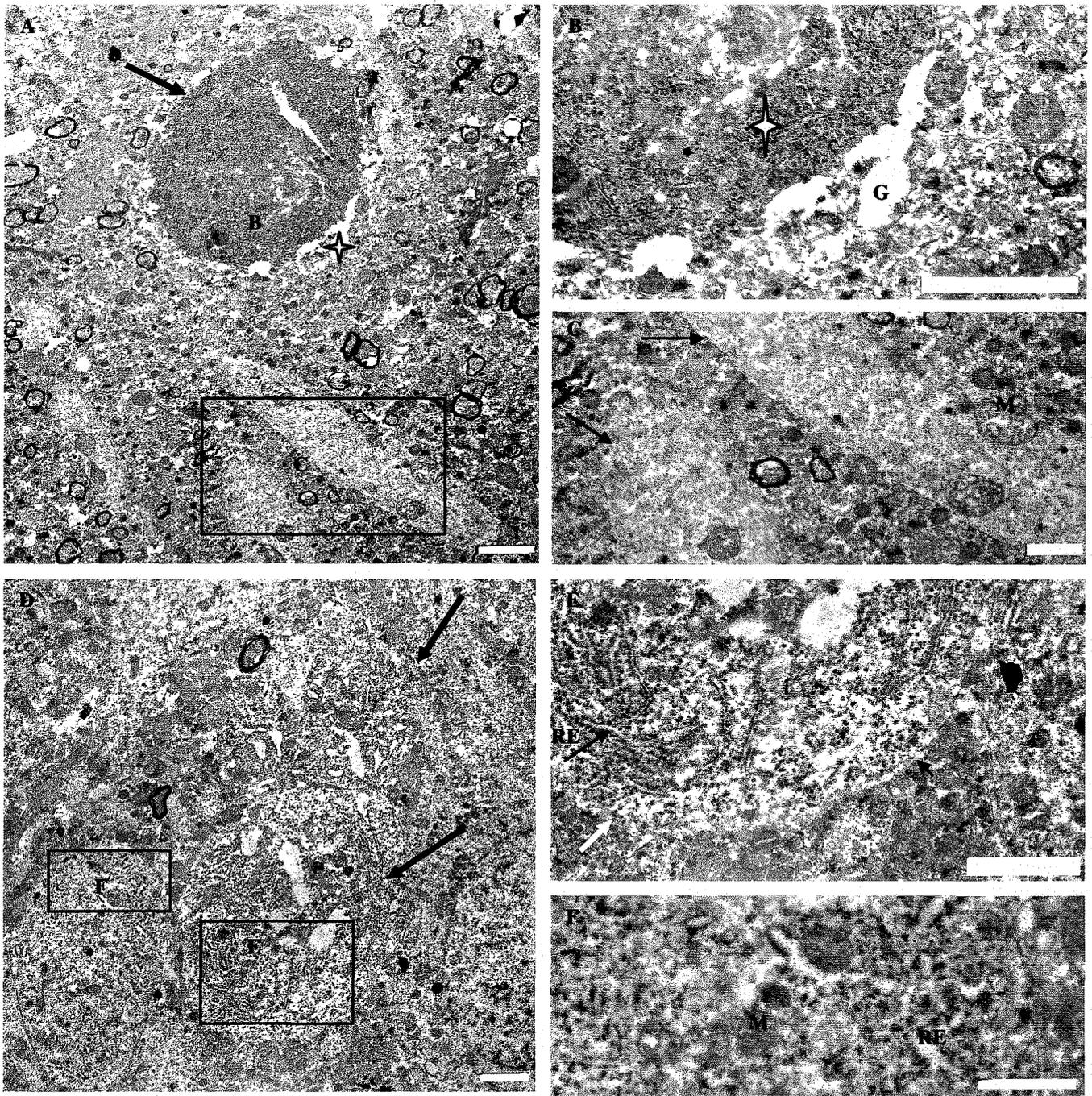


Figura 17: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Massa de degeneração final, organelas não são mais distinguíveis (seta); prolongamentos gliais estão envolvendo-o (estrela). **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando em detalhes a massa degenerada (estrela) e processos gliais a sua volta (G). **C:** Detalhe do neuropilo da micrografia A, mostrando dendritos (seta) contendo mitocôndrias (M) alteradas. **D:** Massas degeneradas hipodensas (seta). **E:** Detalhe da massa degenerada da micrografia D, mostrando retículo endoplasmático (RE), porções envolvidas por membrana (cabeça de seta) e porções com ausência de um envoltório membranoso (seta branca). **F:** Detalhe da micrografia D, mostrando neurônio com edema de retículo endoplasmático (RE), mitocôndria (M). Barras A = 2 μm .; B, C, D, E, F = 1 μm .

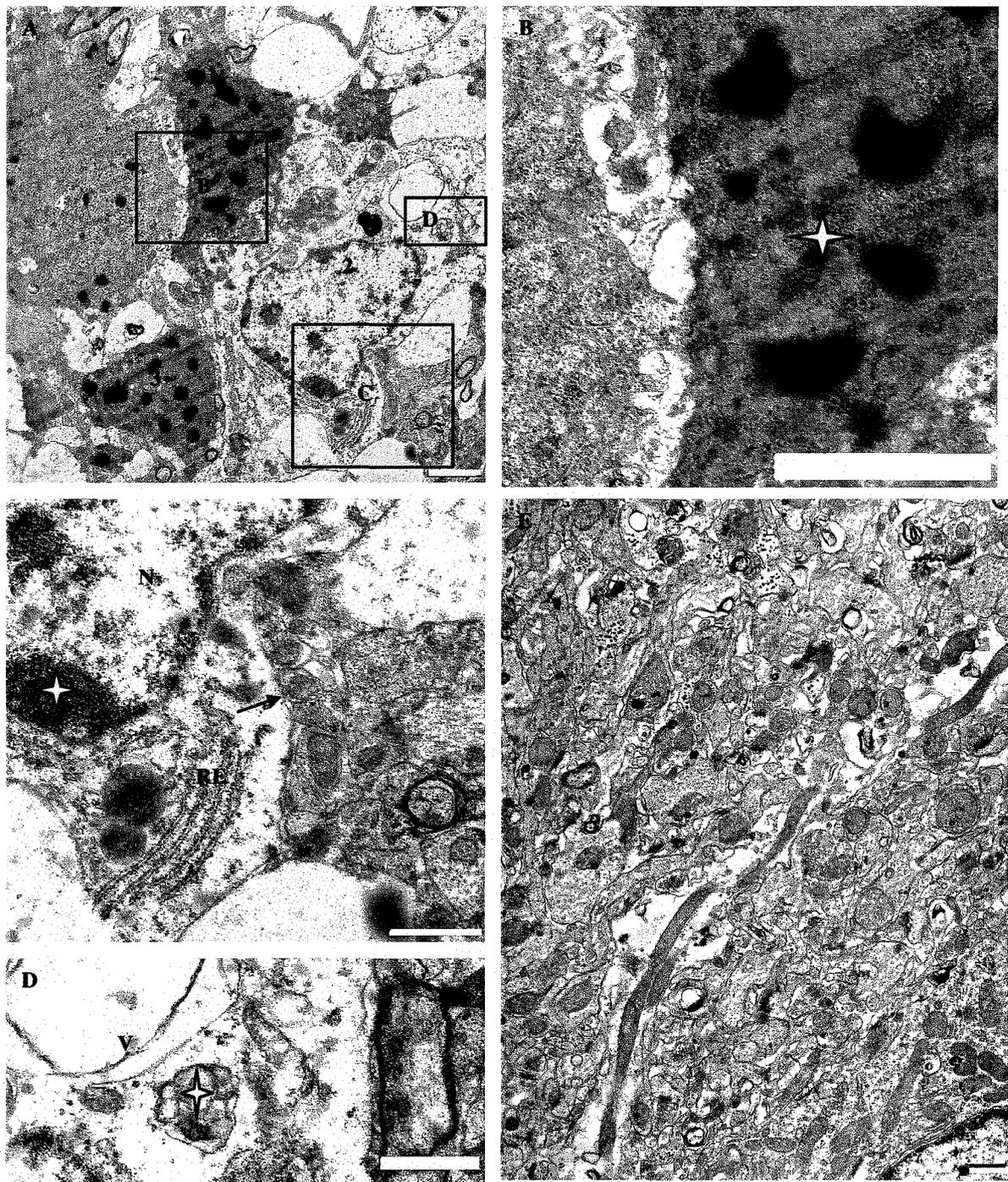


Figura 18: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônio em fase final de degeneração (1,3,4). **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando a ausência de organelas (estrela). **C:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando uma região do citoplasma o retículo endoplasmático intacto (RE), assim como grandes lipídios (L). O núcleo com grandes grumos de cromatina contra a membrana nuclear (estrela), e a presença da membrana plasmática (seta preta), núcleo (N). **D:** Detalhe de outra porção do citoplasma do neurônio 2 da micrografia A, mostrando organelas alteradas (estrela) e grandes vacúolos (V). **E:** Área do neuropilo mostrando sua organização. Barra A, = 200 nm; B = 2 μ m; C, D = 1 μ m; E = 500 nm.

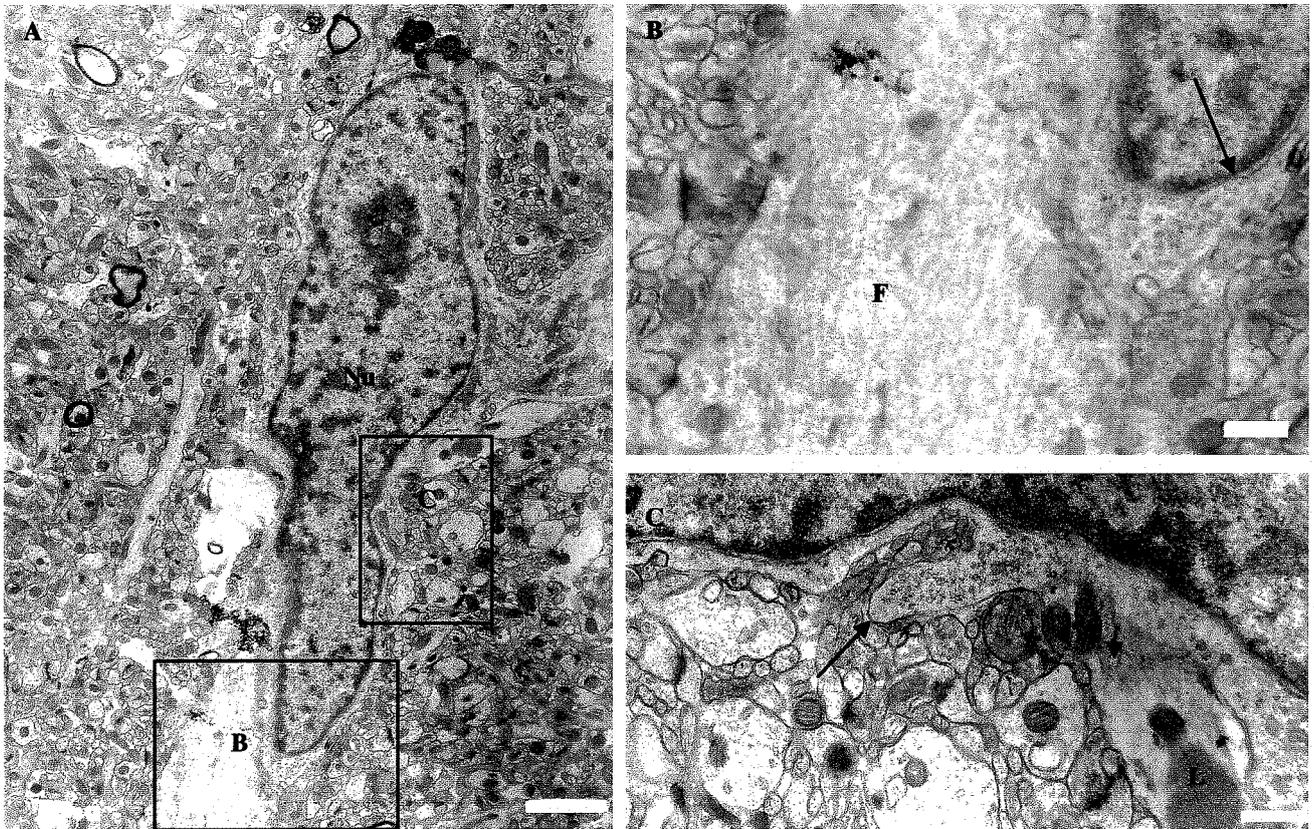


Figura 19: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Astrócitos, apresentando uma conformação alongada, irregular. **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando a dupla membrana nuclear (seta) e filamentos no citoplasma (F). **C:** Detalhe da micrografia, mostrando a membrana plasmática intacta (seta), lisossomos (L) e filamentos (cabeça de seta) no citoplasma. Barras A = 2 µm; B,C = 500 nm.

5.3 GRUPO 10 MINUTOS DE ISQUEMIA COM 4 DIAS DE REPERFUSÃO

Neste período de reperfusão, também foram observados neurônios em diferentes fases de degeneração, porém as fases mais avançadas predominavam sobre a fase inicial. A maioria dos neurônios apresentavam características morfológicas da fase intermediária e final e poderíamos descrever esta fase como uma “explosão celular”, pois a maioria dos neurônios já estavam praticamente degenerados, ou apresentavam alterações muito severas. Portanto, este grupo experimental diferenciou-se do grupo de 2 dias de reperfusão, pois naquele a maioria dos neurônios estavam na fase inicial, embora em ambos os grupos encontramos neurônios em diferentes fases de degeneração.

Não foram encontrados áreas do neuropilo organizado. Em toda a extensão da área CA1 do hipocampo encontramos o neuropilo com aspecto muito comprometido e desorganizado, sendo observados dendritos dilatados e muitos vacúolos de diferentes tamanhos, na maioria claros e alguns contendo material amorfo. Grandes vacúolos eram freqüentemente encontrados no neuropilo assim como também podiam ser visualizados no citoplasma, contribuindo com a aparência eletrônica-lúcida. Havia a presença de uma grande quantidade de células gliais em suas vizinhanças, com processos edemaciados, claros com material denso no seu interior (Fig. 23 D).

Foram visualizadas numerosas células gliais, tanto astrócitos como microglia. Os astrócitos, possuíam pequenos grumos de heterocromatina condensada contra a membrana nuclear, e esta sendo de difícil visualização, porém havia contorno nuclear nítido. No citoplasma, muitas organelas perderam sua conformação, tais como, os retículos endoplasmáticos rugoso e liso e as mitocôndrias e a membrana plasmática estava intacta. Em outras, era observado grande quantidade de filamentos intermediários e lisossomos, e organelas como RER e REL e mitocôndrias alteradas (Figura 25 A,C). Também, as células da microglia destacaram-se pelo seu núcleo condensado, alguns organelas apresentavam-se alteradas como os retículos endoplasmáticos rugoso e liso e as membranas nuclear e plasmática estavam intactas (Fig. 25 A, B).

Foram identificadas neste grupo de animais experimentais algumas células intactas, possuindo um núcleo arredondado com presença de nucléolo e ausência de grumos de heterocromatina condensados. No citoplasma podíamos identificar organelas intactas como os retículos endoplasmáticos rugoso e liso, mitocôndrias e complexo de Golgi e seus prolongamentos originando-se a partir do corpo celular. Entretanto, este tipo de neurônios não eram muito freqüentes (Figura 25 D).

5.3.1 NEURÔNIOS EM FASE INICIAL DE DEGENERAÇÃO

Havia alterações no citoplasma, encontrando-se edema de organelas como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias; os poliribossomos estavam dispersos. Na maioria das vezes, as alterações do núcleo restringiam-se às condensações de heterocromatina contra a membrana nuclear. Tanto a membrana nuclear quanto a plasmática permaneciam intactas. Além destas alterações, em alguns neurônios, observaram-se pregueamento da membrana nuclear (Fig. 20A, B, C, D) e em outros neurônios, as membranas plasmática e nuclear eram de difícil visualização, embora estivesse mantido o contorno nuclear.

5.3.2 NEURÔNIOS EM FASE INTERMEDIÁRIA DE DEGENERAÇÃO

Outros tipos de neurônios nesta fase inicial mostravam enrugamento da membrana nuclear um aumento da densidade celular. Apesar do enrugamento da membrana nuclear, o núcleo possuía nucléolo intacto, com pequenos grânulos de heterocromatina contra a membrana nuclear ou dispersos no cariolinfa. O citoplasma apresentava edema do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Às vezes, este encontrava-se totalmente edemaciado (Fig. 22 B), e as mitocôndrias mostravam perda de suas cristas e início de formação de vacúolos com material floculento em seu interior (Fig. 22 B,C,D). As demais, mostravam grande quantidade de poliribossomos em forma de rosetas, e a membrana plasmática era de difícil visualização. Em outros neurônios, podiam ser identificadas a membrana plasmática, e a membrana nuclear (Fig. 22 D).

Foram observados neurônios que apresentavam alterações citoplasmáticas através do edema de organelas, como o RER e o REL, mitocôndrias com perdas das cristas mitocondriais e a membrana plasmática permanecia íntegra (Fig. 21 A,B,C,D,F). O núcleo era picnótico e possuía nucléolo íntegro, porém podia-se observar rupturas em determinadas porções da membrana nuclear (Fig. 21 A,B,E).

Também foram visualizados neurônios escuros, eletron-densos. Os núcleos continham condensação de heterocromatina em pequenos grumos, a membrana nuclear já apresentava ruptura em determinadas porções e o nucléolo persistia. Os componentes citoplasmáticos destas células eram de difícil visualização devido a alta densidade eletrônica, não se visualizavam vacúolos no interior da mesma e a membrana plasmática permanecia íntegra.

Outras células apresentavam-se totalmente eletron-lúcidas e continham em seu interior pouco material, sendo este de aparência amorfa, dando o aspecto claro, edemaciado. A membrana plasmática podia ser visualizada, estando conservada, porém com expansões, tais como bolhas. O núcleo mantinha conformação arredondada com nucléolo evidente e a heterocromatina estava organizada contra a membrana nuclear, porém a membrana nuclear apresentava-se rompida em algumas porções. Este tipo de degeneração celular foi encontrado freqüentemente neste grupo (Fig. 23 A, B, C).

5.3.3 NEURÔNIOS EM FASE FINAL DE DEGENERAÇÃO

Foram observados massas celulares com eletron-densidade, nas quais a membrana nuclear mostrava descontinuidade, misturando os componentes nucleares com os citoplasmáticos, sendo que muitos deles não podem ser mais distinguíveis, com exceção de algumas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Estes restos celulares não parecem estar envolvidos por membrana e o limite se estabeleceu pela diferença da densidade (Fig. 24 A, B,C,D). Os restos celulares possuíam em suas vizinhanças células gliais e não foram encontrados corpos apoptóticos.

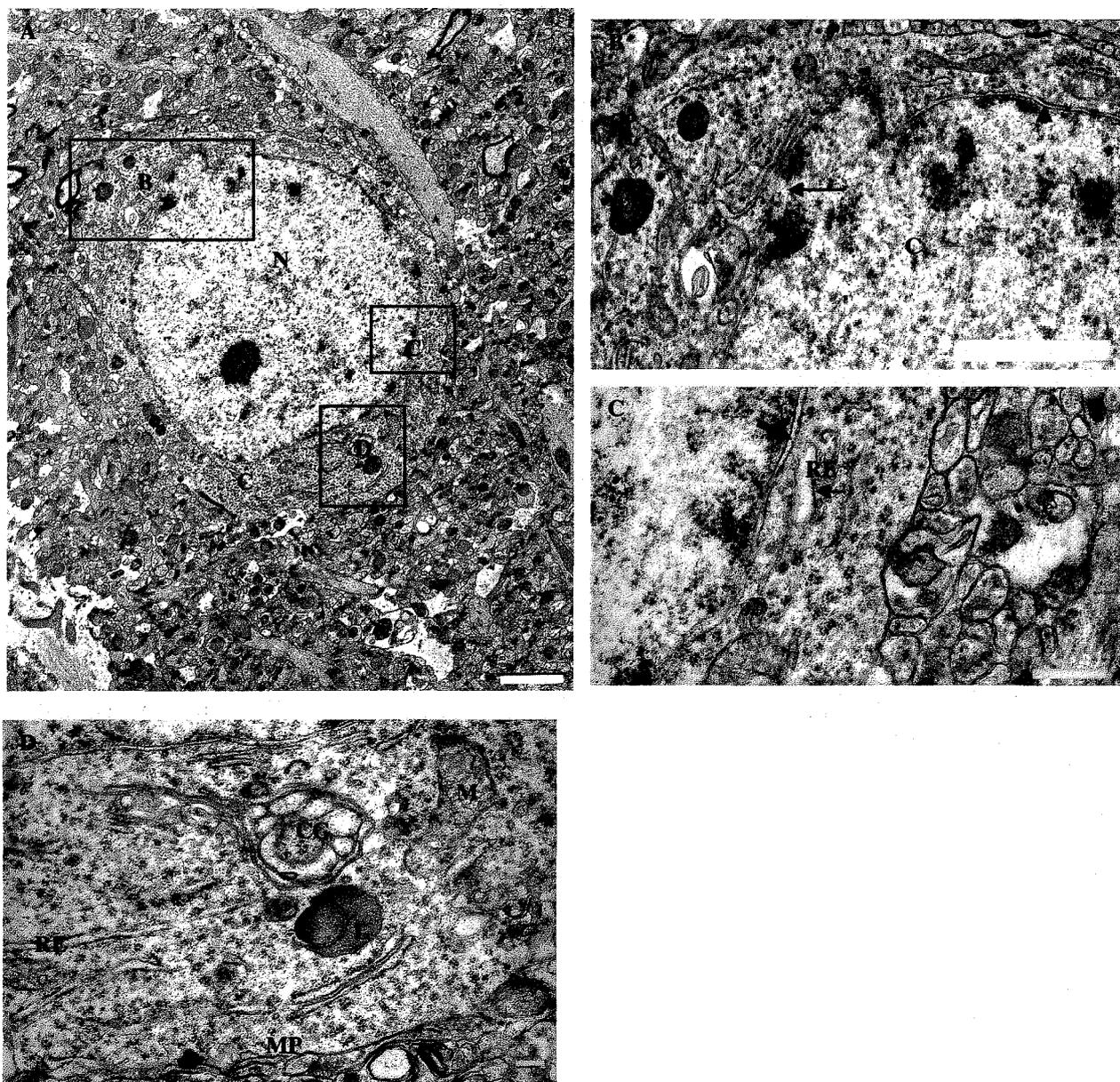


Figura 20. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos à 10 min de isquemia cerebral global transitória, após 4 dias de reperfusão. **A:** Neurônio mostrando alterações iniciais no citoplasma através de edema das organelas. **B:** Detalhes da micrografia eletrônica A, notar o pregueamento da membrana nuclear (seta), e outras porções salientando sua integridade (cabeça de seta). **C:** Detalhes da micrografia A, mostrando o retículo endoplasmático (RE) edemaciado e a dupla membrana nuclear (cabeça de seta). **D:** Detalhe da micrografia A, mostrando as dilatações nas cisternas do complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático (RE), mitocôndria (M), lisossoma (L) e integridade da membrana plasmática (MP). Barras A, B = 2 μ m ; C = 500 nm; D = 200 nm

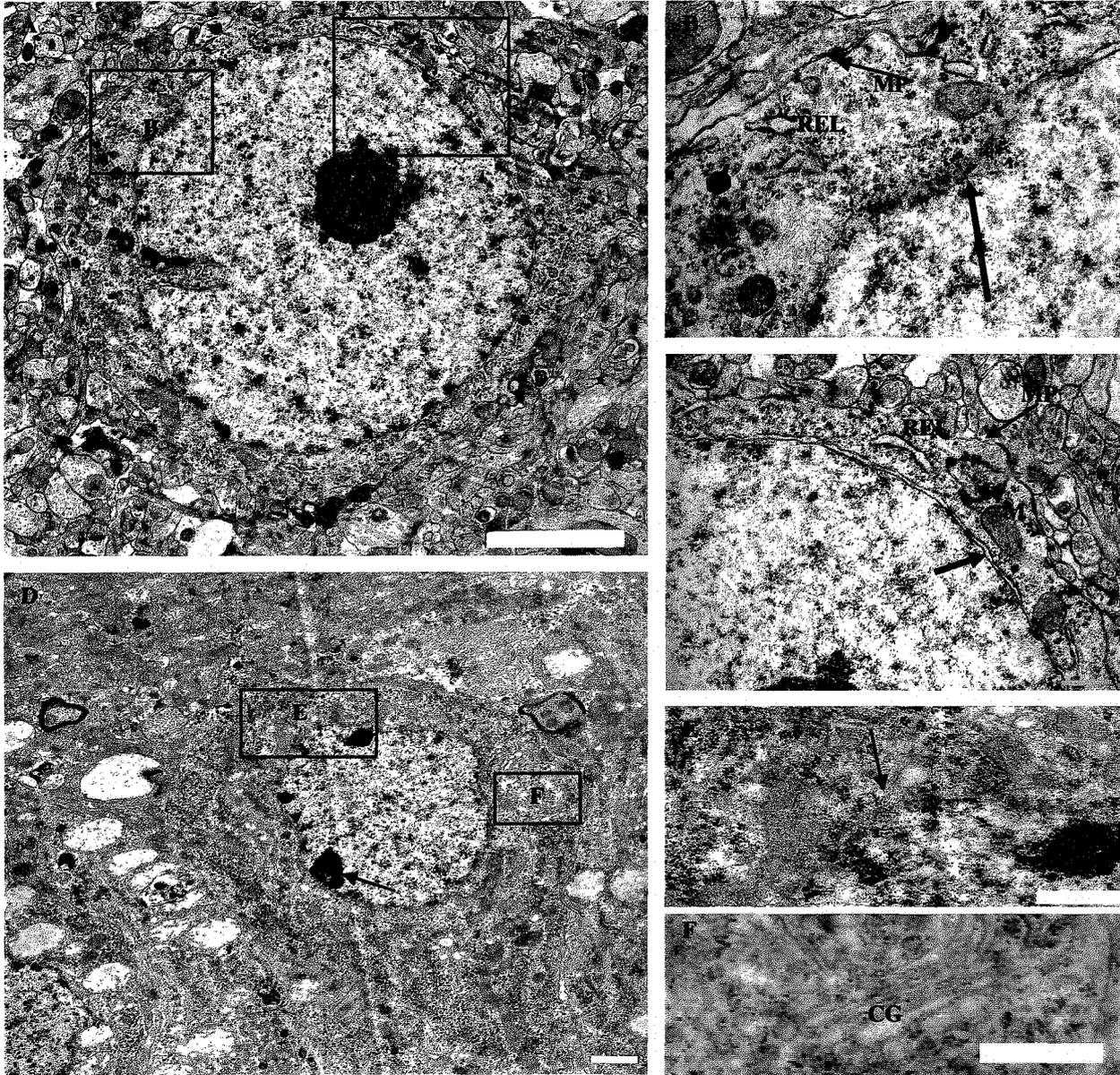


Figura 21: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos machos adultos submetidos à 10 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Neurônio com descontinuidade da membrana nuclear em algumas porções, notar indentações nucleares. **B:** Detalhe do neurônio da micrografia A, mostrando ruptura da membrana nuclear (seta), edema de retículo endoplasmático liso (REL) e membrana plasmática intacta (MP). **C:** Detalhe do neurônio da micrografia eletrônica A, mostrando a cisterna perinuclear (seta), retículo endoplasmático liso (REL) edemaciado, mitocôndria (M) com perda de suas cristas e a membrana plasmática (MP) intacta. **D:** Neurônio em processo de degeneração com o enrugamento nuclear e grânulos de heterocromatina (seta) contra a membrana nuclear. **E:** Detalhe do neurônio da micrografia D, mostrando ausência de membrana nuclear (seta) e no citoplasma as organelas são de difícil visualização. **F:** Detalhe da micrografia eletrônica D, observar o complexo de Golgi edemaciado. Barras A, D = 1 μ m; B = 200 nm; C, E, F = 500 nm.

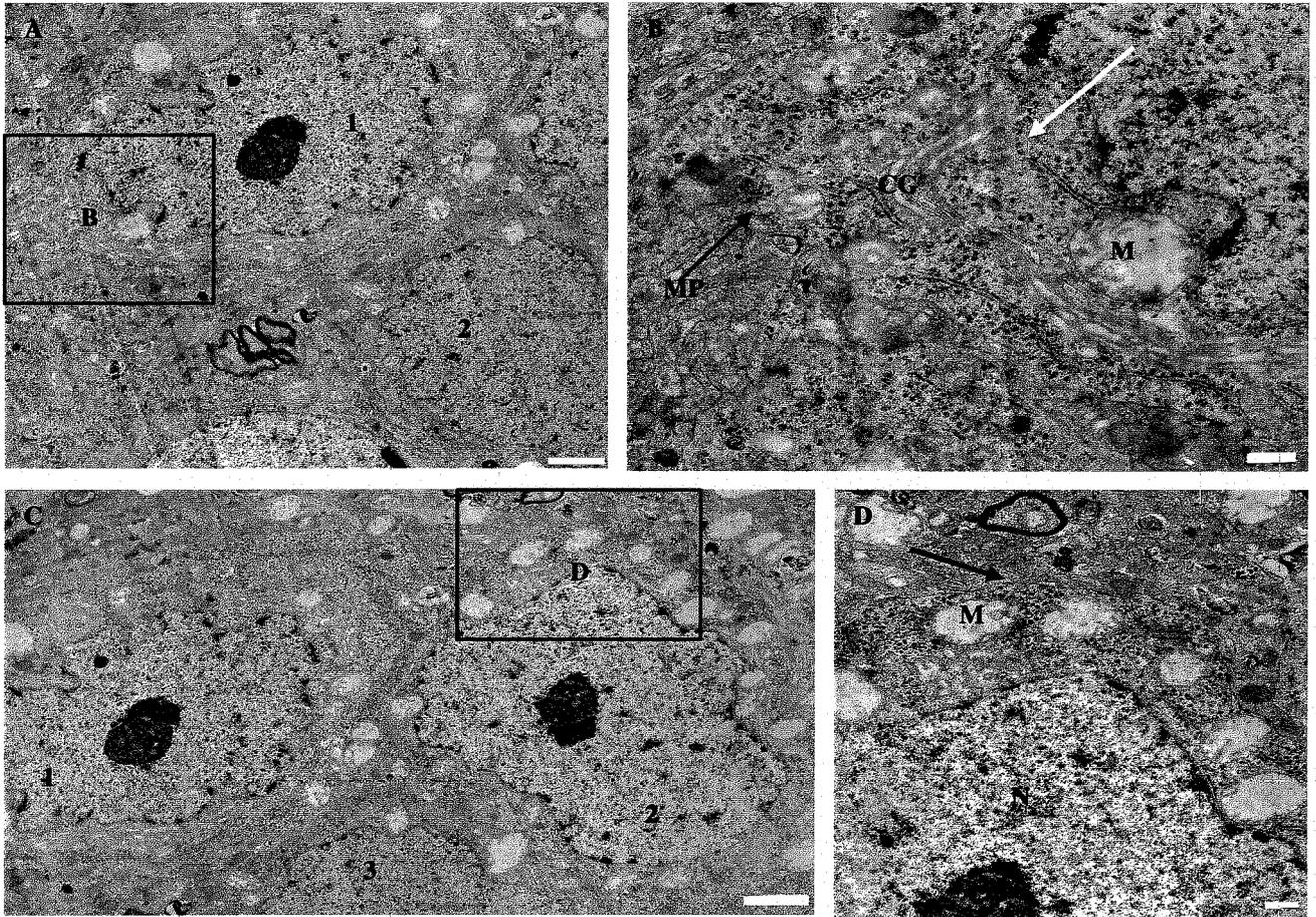


Figura 22: Micrografias eletrônicas da camada piramidal CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Neurônio hiperdensos apresentando indentações nucleares (1,2). **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, evidenciando regiões de ruptura da membrana nuclear (seta branca), edema e perdas das cristas mitocondriais (M), edema do complexo de Golgi (CG), presença da membrana plasmática (MP) íntegra. **C:** Região de neurônios apresentando alterações citoplasmáticas com edema de organelas e nucleares através do enrugamento nuclear. **D:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia C, mostrando edema e perda de cristas mitocondriais (M), formando vacúolos intracelulares, com membrana plasmática íntegra (seta). Barras A, C = 1 μ m; B, D = 500 nm.

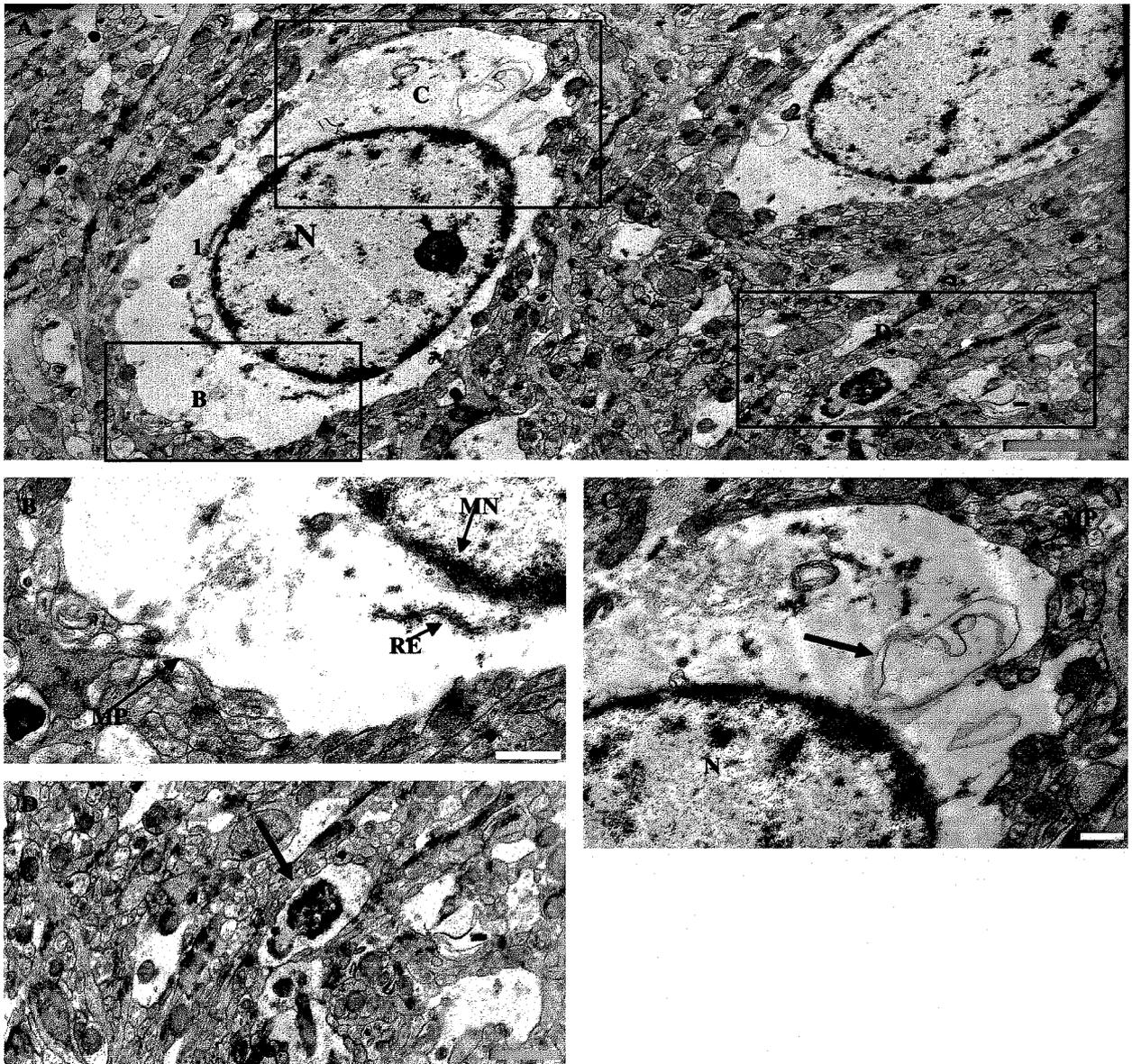


Figura 23 : Micrografias eletrônicas da camada piramidal CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Notar neurônios claros arredondados, núcleo (N). **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, não se observa a membrana nuclear (MN), membrana plasmática (MP) íntegra e retículo endoplasmático (RE) alterado. **C:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, observar a membrana plasmática (MP) íntegra com restos de componentes citoplasmáticos (seta). **D:** Detalhe do neuropilo da micrografia A, observar processos edemaciados, claros e com material floculento em seu interior (seta). Barras A, C = 2 μ m; B, D = 1 μ m

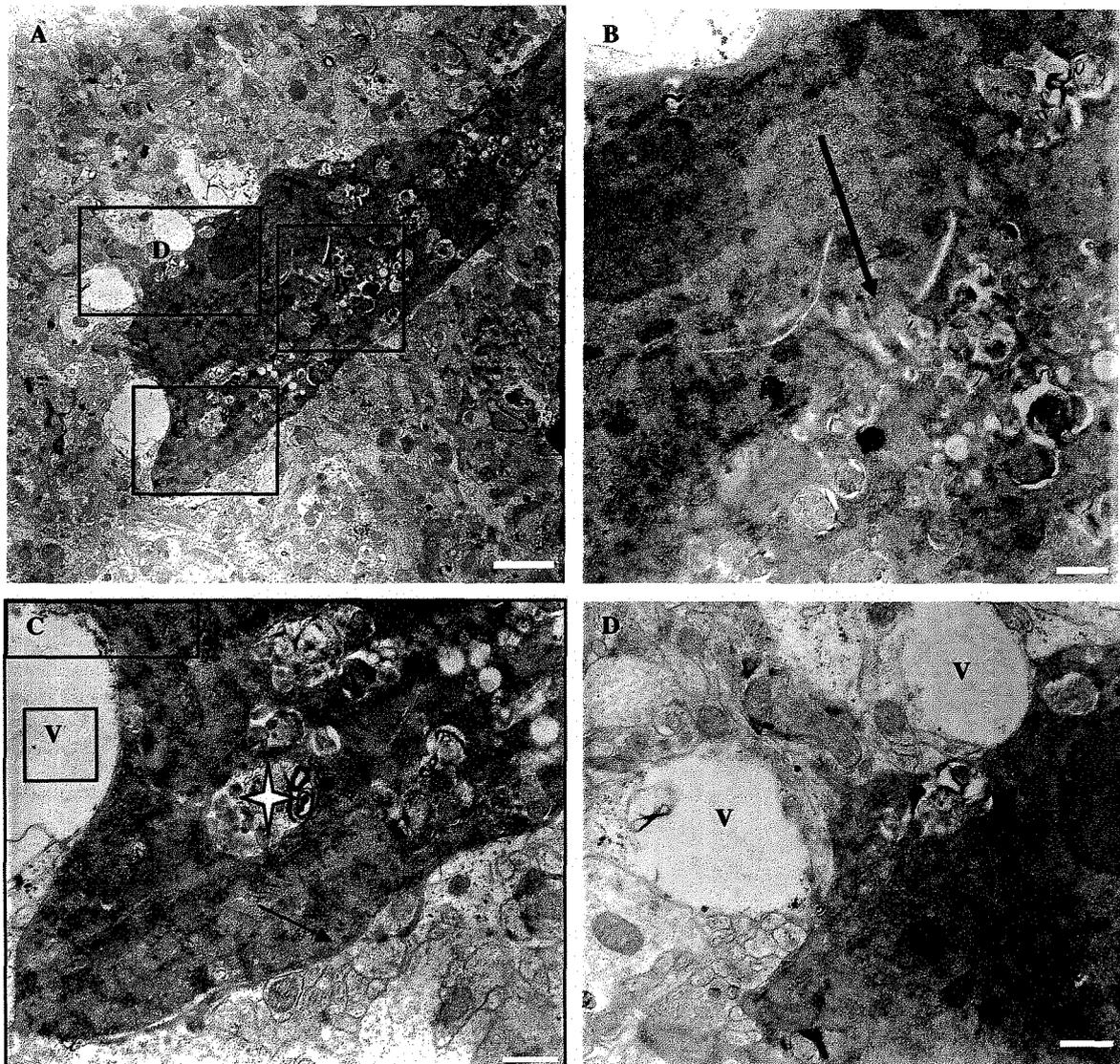


Figura 24 : Micrografias eletrônicas da camada piramidal CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Neurônio em fase final de degeneração. **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando restos celulares (seta). **C:** Detalhe da micrografia A, evidenciando vacúolos (V) ao redor do neurônio degenerado, restos de membrana plasmática (seta) e vacúolos intracelulares (estrela) com material amorfo em seu interior. **D:** Detalhe da micrografia A, mostrando os vacúolos ao redor do neurônio degenerado. Barras A = 2 μ m; B = 500 nm; C, D = 500 nm;

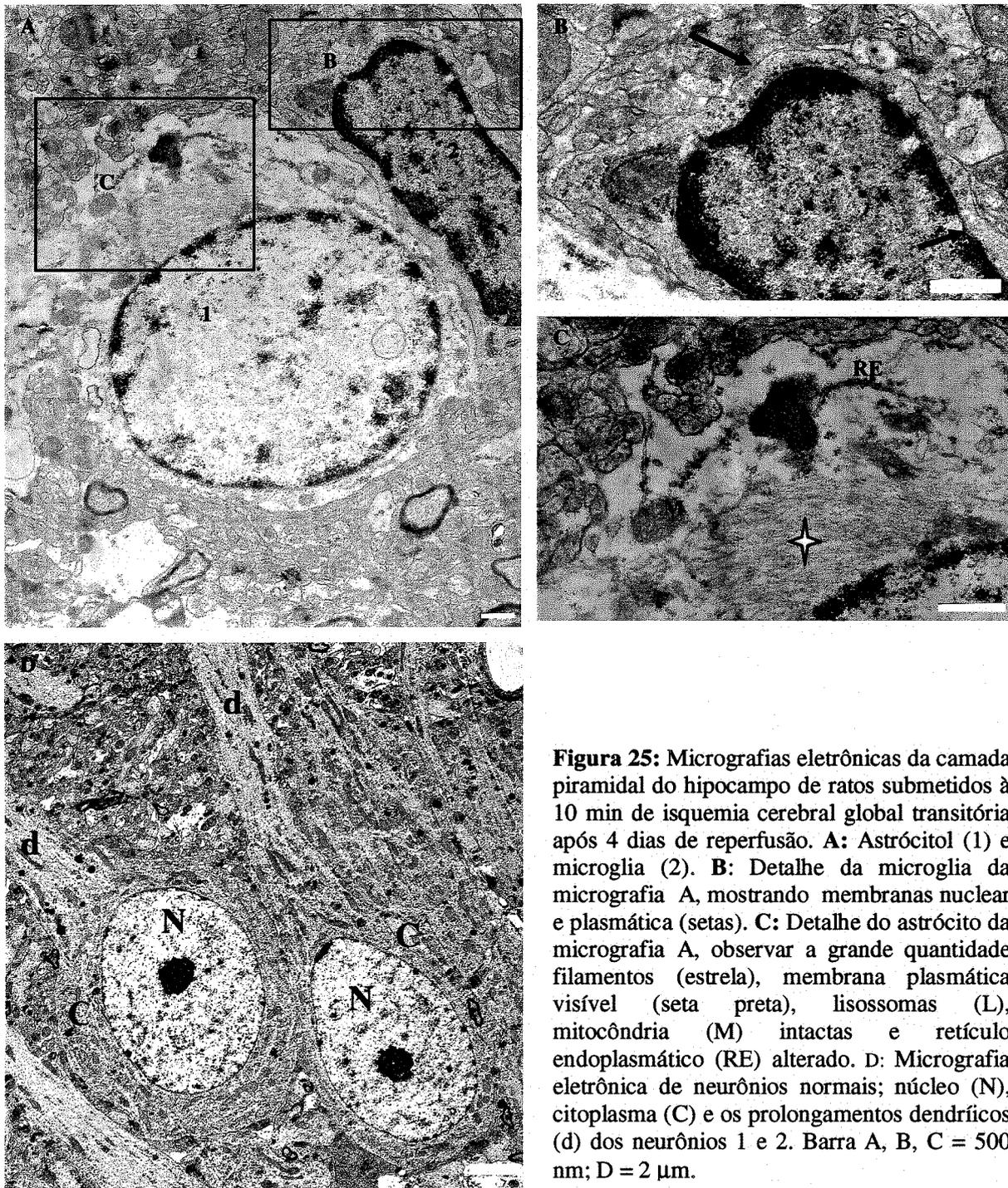


Figura 25: Micrografias eletrônicas da camada piramidal do hipocampo de ratos submetidos à 10 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Astrócito (1) e microglia (2). **B:** Detalhe da microglia da micrografia A, mostrando membranas nuclear e plasmática (setas). **C:** Detalhe do astrócito da micrografia A, observar a grande quantidade filamentos (estrela), membrana plasmática visível (seta preta), lisossomas (L), mitocôndria (M) intactas e retículo endoplasmático (RE) alterado. **D:** Micrografia eletrônica de neurônios normais; núcleo (N), citoplasma (C) e os prolongamentos dendríficos (d) dos neurônios 1 e 2. Barra A, B, C = 500 nm; D = 2 μ m.

5.4 GRUPO 10 MINUTOS DE ISQUEMIA COM 10 DIAS DE REPERFUSÃO

Encontravam-se neurônios em diferentes fases de degeneração, porém a maioria deles estava nas fases intermediária e final do processo degenerativo. Restavam poucos neurônios com aspecto normal.

O neuropilo, na maioria das vezes, já se encontrava com uma aparência mais organizada, com poucos vacúolos e de pequeno tamanho. Porém, em algumas regiões visualizava-se ainda um neuropilo bem alterado com a presença de vacúolos, edema de dendritos, assim como alterações da bainha de mielina através das lamelas separadas (Fig. 31 A,B)

Foram encontradas quantidades consideráveis de astrócitos, nos quais observou-se a condensação de heterocromatina em pequenos grumos mais arredondados voltando-se contra a membrana nuclear. O citoplasma possuía numerosos filamentos intermediários, poucas organelas e as mitocôndrias que persistiam estavam alteradas. A membrana plasmática encontrava-se intacta. Algumas das células também possuíam vacúolos com material amorfo em seu interior. Entre outras células deste tipo não foi visualizada a membrana plasmática e havia grande quantidade de lisossomos (Fig. 30 A-E). Também foram identificadas as células da microglia, com núcleo apresentando grânulos de heterocromatina contra a membrana nuclear e dispersos no carioplasma. O citoplasma, na maioria das vezes, também apresentava alterações das organelas, como o edema de retículo endoplasmático e das mitocôndrias e grande quantidade de lisossomos (Figs 27 E e 28 D,E)

Observaram-se pequena quantidade de neurônios apresentando o núcleo arredondado, com as membranas nuclear e citoplasmática intactas, e as organelas com aspecto normal (Fig. 31 C,D).

5.4.1 FASE INICIAL DO PROCESSO NEURODEGENERATIVO

Os neurônios mostravam alterações iniciais no citoplasma, tais como edema do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias. As demais características celulares estavam preservadas (Fig.26A,B e 27 D).

5.4.2 FASE INTERMEDIÁRIA DO PROCESSO NEURODEGENERATIVO

As alterações citoplasmáticas encontradas estavam em uma fase mais avançada do processo degenerativo. As organelas mostraram-se alteradas com edema de retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, as mitocôndrias com perda de suas cristas, a presença de vacúolos de diferentes tamanhos e algumas possuindo material amorfo em seu interior (Figura 26 C,D). E em alguns neurônios, já se podia visualizar as membranas plasmática e a nuclear rompidas (Fig. 29 A,C).

Também foram visualizados neurônios eletrondensos apresentando enrugamento nuclear. Alguns neurônios mostravam uma alta densidade tanto no núcleo quanto no citoplasma e também um núcleo enrugado. A membrana nuclear em várias porções era de difícil identificação devido a alta densidade de toda a célula, o nucléolo era visível. No citoplasma as organelas estavam edemaciadas como o retículo endoplasmático, e algumas eram de difícil reconhecimento. A membrana plasmática também era difícil de ser encontrada, porém com a diferença de densidade conseguia-se definir seus limites (Fig.28 A,B,D,F; 29 A,B), já outros neurônios apresentavam porções bem distintas da membrana plasmática. Havia também neurônios que possuíam em suas vizinhanças grandes vacúolos (Figs. 27 A,B,C, e 28 A,B) e outros ainda se conseguia visualizar algumas organelas como o complexo de Golgi, as mitocôndrias, os retículos endoplasmático liso e rugoso, porém edemaciadas, bem como podia visualizarem-se grandes lisossomos (Fig. 28 D, F).

Neste grupo experimental, também foram visualizados, assim como em todos os grupos, os neurônios eletron-lúcidos que apresentavam núcleo com condensação de heterocromatina organizada em pequenos grumos irregulares, e a membrana nuclear intacta. O citoplasma continha poucas organelas e as que restavam, exibiam poucas alterações, observando mitocôndrias com cristas escassas, presença de poucos neurofilamentos e a membrana plasmática íntegra. Alguns vacúolos estavam presentes no citoplasma .

5.4.3 FASE FINAL DO PROCESSO NEURODEGENERATIVO

Foram visualizados restos celulares eletron-densos, exibindo conteúdo pouco reconhecível, porém algumas organelas com alterações como retículo endoplasmático ainda eram visíveis. Não se observava a membrana plasmática, porém este resto neuronal apresentava limites através da diferença de densidade. Identificamos um manto glial com grande quantidade de filamentos intermediários no citoplasma de suas células e estas estavam envolvendo os restos neuronais. Também destacavam-se vacúolos de diferentes tamanhos em sua vizinhança (Fig. 29 D, E).

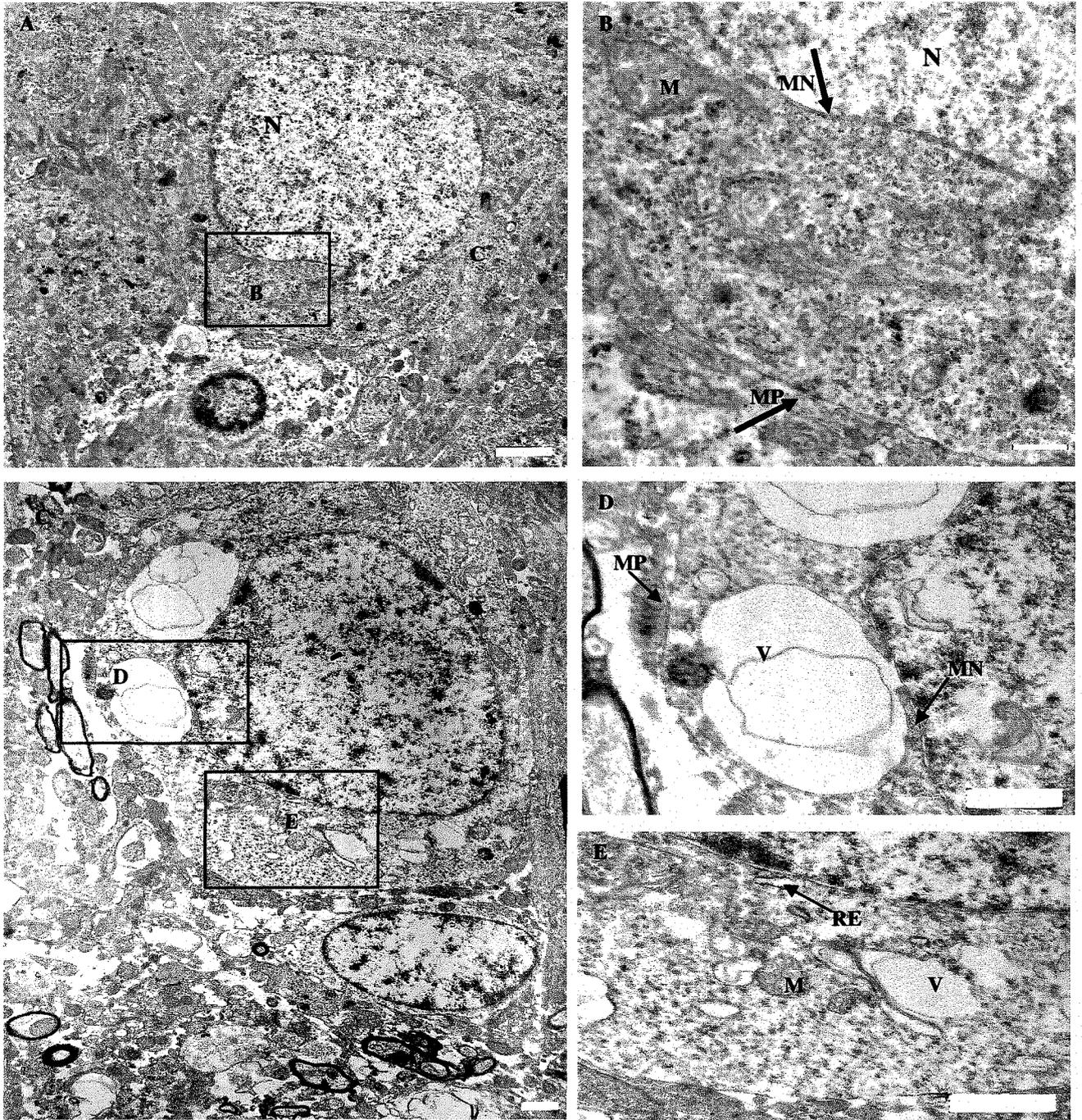


Figura 26. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Neurônio piramidal em fase inicial de degeneração mostrando alterações no núcleo (N) e no citoplasma (C). **B:** Detalhe do neurônio da micrografia A, notar a perda das cristas mitocondriais (M), presença das membranas nuclear (MN) e a plasmática (MP). **C:** Neurônio piramidal mostrando alterações precoces no citoplasma através do edema e formação de vacúolos. **D:** Detalhe do neurônio da micrografia C, evidenciando grandes vacúolos intracelulares (V), membranas plasmática (MP) e nuclear (MN). **E:** Detalhe do neurônio da micrografia D, mostrando edema do retículo endoplasmático (RE) e das mitocôndrias (M), vacúolos intracelulares (V). Barras: A = 2 μ m; B = 500 nm; C, D, E = 1 μ m

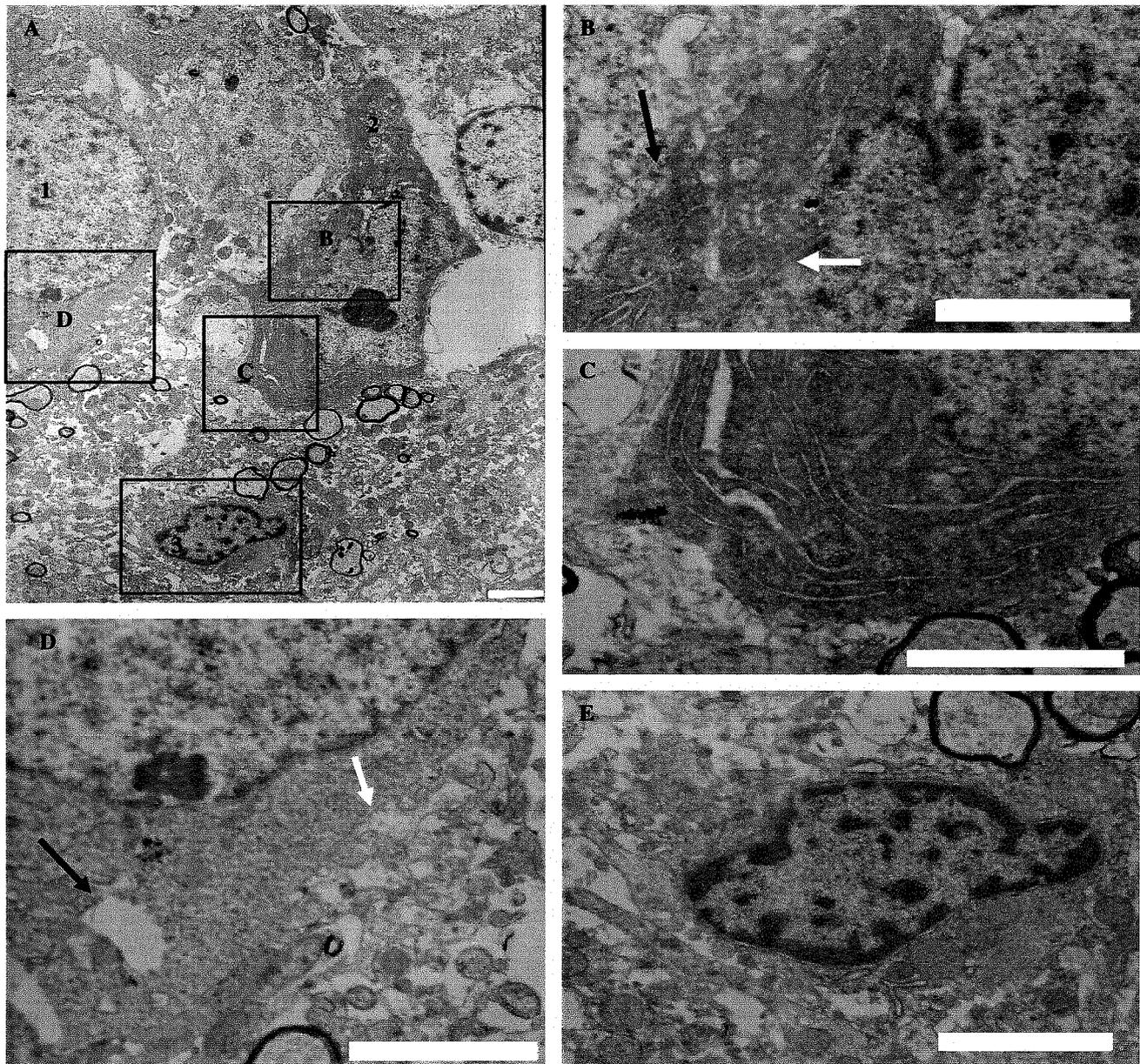


Figura 27. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Neurônios em processo de degeneração. **B:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando porções da membrana nuclear (seta branca) e membrana plasmática (seta preta) que são de difícil visualização, o limite do neurônio pode ser distinguido pela diferença de densidade. **C:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando retículo endoplasmático (RE) alterado. **D:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, evidenciando alterações citoplasmáticas iniciais através de edema de organelas e formação de vacúolos (seta), notar a membrana plasmática (seta branca) intacta. **E:** Microglia na vizinhança dos neurônios degenerados. Barras: A - E = 2 μ m;

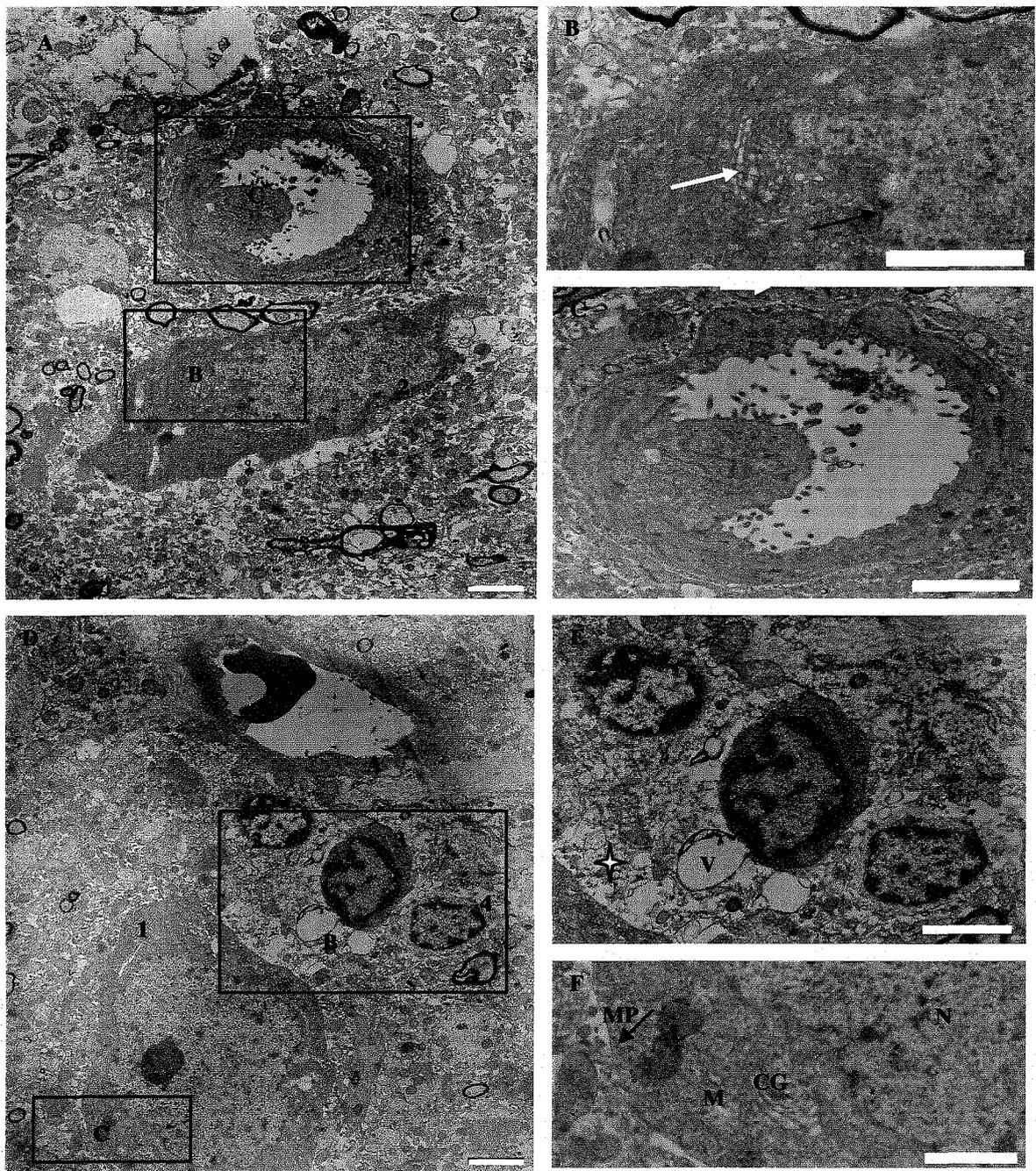


Figura 28. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Vaso (1) e neurônio (2). **B:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando enrugamento nuclear e aumento de densidade do núcleo assim como do citoplasma, edema de organelas com formação de pequenos vacúolos (seta branca) no citoplasma, membrana nuclear (seta preta) de difícil visualização. **C:** Detalhe de um vaso sanguíneo da micrografia A, mostrando enrugamento nuclear e aumento de densidade do núcleo assim como do citoplasma. **D:** Neurônio eletrôn-denso e com enrugamento nuclear (1) e microglias (2,3,4) na sua vizinhança. **E:** Observar as microglias da micrografia A, ao redor de vacúolos (V) e neuropilo edemaciado (estrela). **F:** Detalhe da micrografia D, observar a integridade da membrana plasmática (MP); complexo de Golgi (AG) edemaciado, mitocôndrias (M) com perdas de suas cristas, grandes lisossomos (L) no citoplasma eletrôn-denso, núcleo (N). Barra A, B, C, D = 2 μ m; E, F = 1 μ m

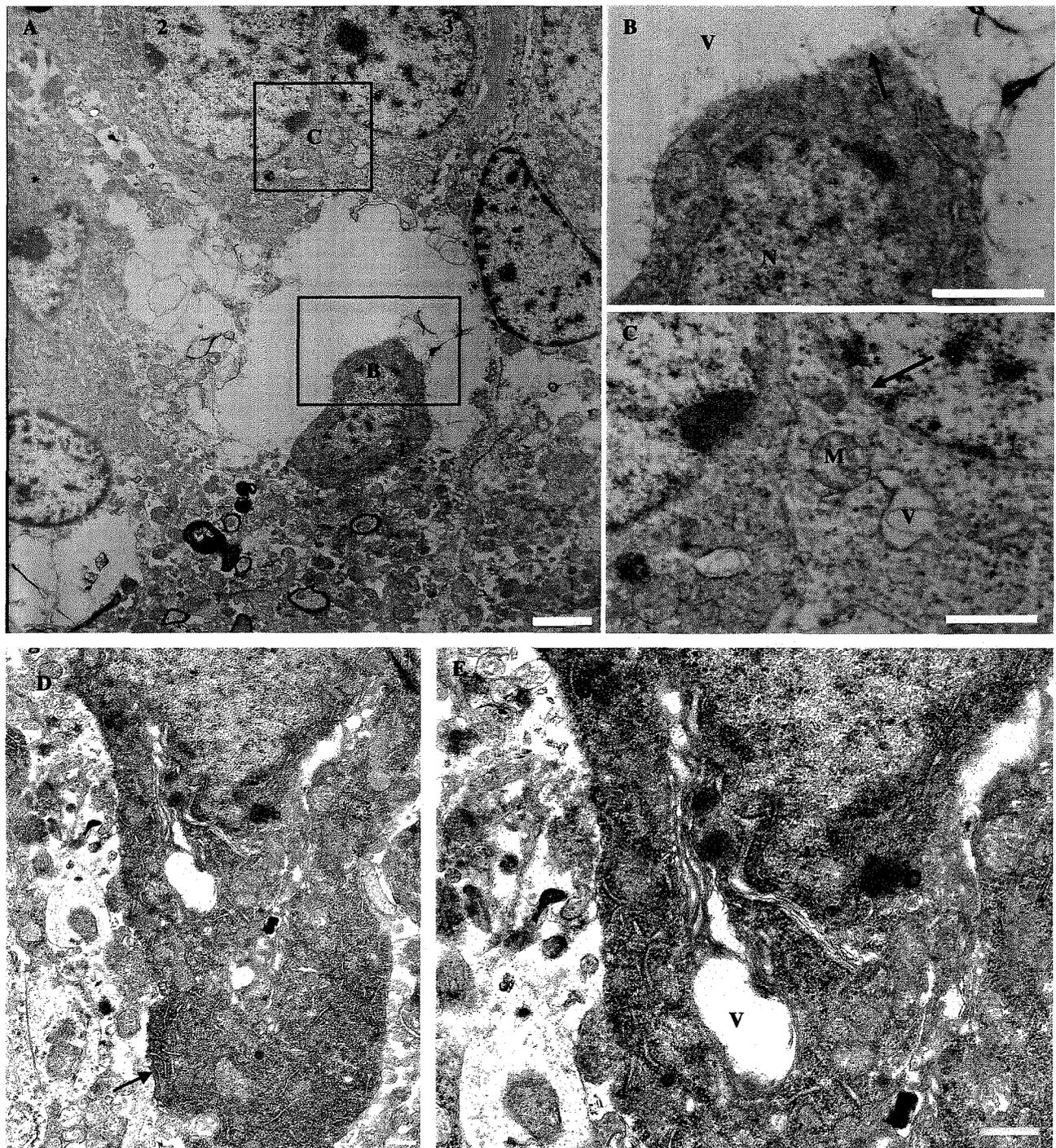


Figura 29. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperusão. **A:** Neurônios (1,2,3) em processo de degeneração. **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia eletrônica A, observar o enrugamento nuclear e alta densidade nuclear e citoplasmática, estando envolvido por grandes vacúolos (V), e a membrana plasmática (seta) encontra-se rompida. **C:** Detalhe dos neurônios 2 e 3, mostrando mitocôndrias (M) com perdas de suas cristas, vacúolos (V) intra-citoplasmáticos, porções que não se distingue a membrana nuclear (seta). **D:** Resto celular degenerado, representando a fase final do processo de morte celular (seta). **E:** Detalhe da micrografia D, componentes nucleares se misturando com os componentes citoplasmáticos, organelas não mais identificáveis, observar os vacúolos (V). Barra A = 2 μ m; B - D = 1 μ m

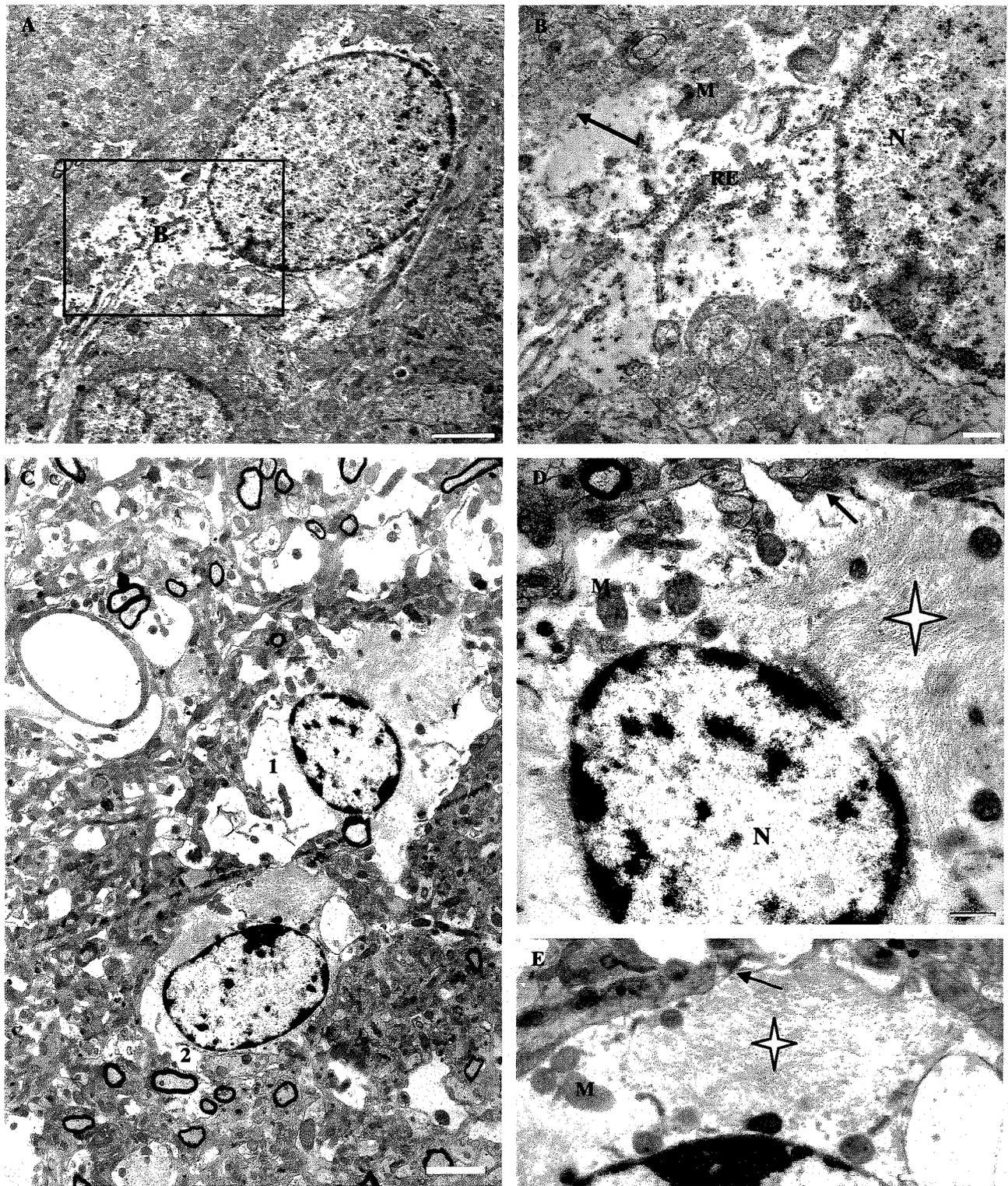


Figura 30. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Astrócito. **B:** Detalhe da micrografia A, observar a mitocôndria (M), ruptura da membrana plasmática (seta), retículo endoplasmático (RE) edemaciado. **C:** Astrócito (1 e 2). **D:** Detalhe da micrografia C, observar a grande quantidade de filamentos intermediários (estrela), mitocôndria (M), membrana plasmática (seta) intacta, núcleo (N). **E:** Detalhe da micrografia C, notar a grande quantidade de filamentos intermediários (estrela), mitocôndrias (M) e membrana plasmática intacta (seta). Barras: A, B, C = 2 µm; D = 500 nm; E = 1 µm

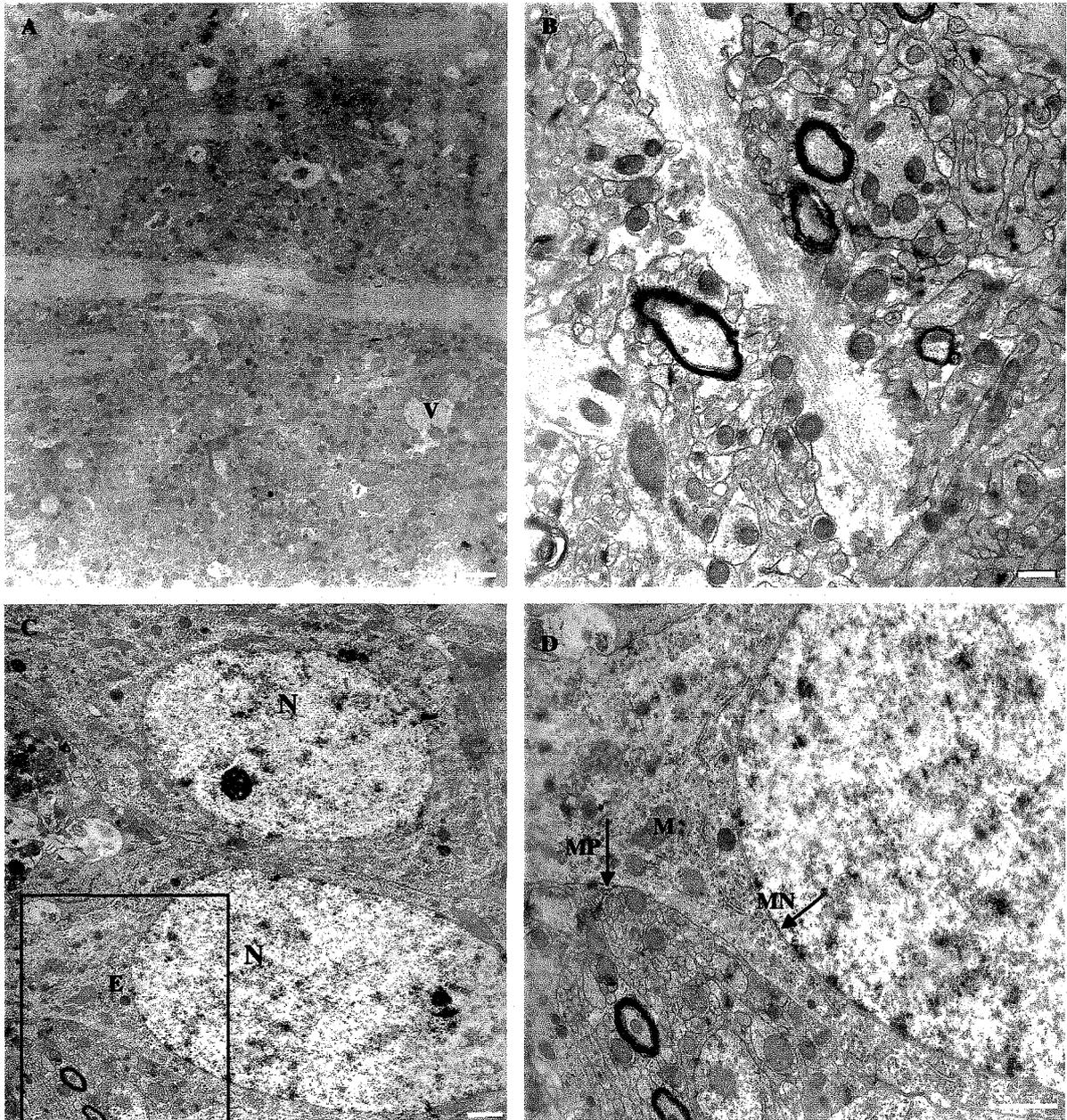


Figura 31. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 10 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Uma região do neuropilo, observar a organização do mesmo com poucos e pequenos vacúolos (V). **B:** Outra região do neuropilo, mostrando sua organização. **C:** Neurônio não apresentando alterações. **D:** Detalhe da micrografia C, mostrando a integridade da membrana plasmática (MP) e da membrana nuclear (MN), mitocôndrias íntegras (M). Barras: A, B = 2 μ m; C, D = 1 μ m.

5.5 GRUPO 20 MINUTOS DE ISQUEMIA COM 2 DIAS DE REPERFUSÃO

Foram encontrados neurônios em diferentes fases do processo degenerativo, porém a maioria dos neurônios possuíam alterações em fase inicial, alguns em fase intermediária. Isto os diferencia das alterações encontradas no grupo experimental de 10 minutos de isquemia após 2 dias de reperfusão, no qual a maior quantidade de neurônios encontravam-se com alterações em fase inicial do processo degenerativo.

O neuropilo estava mais ou menos organizado. Foram visualizados uma menor quantidade de vacúolos, porém com alterações um pouco mais grotescas quando comparadas com o grupo de 10 minutos de isquemia seguido de 2 dias de reperfusão (Figs. 32C; 33B; 34D). As células gliais foram encontradas, freqüentemente, nas proximidades dos mesmos (Fig. 37 A,D,E).

Não foram identificados células em estágio avançado de degeneração, ou seja, na fase em que a célula perde totalmente sua integridade, sem condições de retorno às suas funções. Também foram encontradas quantidades consideráveis de células que não apresentavam nenhuma alteração decorrente da isquemia cerebral global transitória.

5.5.1 FASE INICIAL DO PROCESSO DEGENERATIVO

Foram encontrados neurônios com alterações iniciando pelo citoplasma através do edema das organelas. O núcleo continha membrana nuclear intacta e início de condensação de cromatina organizada em grumos pequenos de forma irregular, voltados contra a membrana nuclear. O citoplasma possuía membrana plasmática intacta, porém detectaram-se alterações iniciais nas organelas através da perda de sua conformação normal, sendo visível o edema do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi; as mitocôndrias apresentavam perda de suas cristas, a substância de Nissl estava desorganizada e havia presença de material amorfo, onde não se observaram vacúolos.

Outro tipo de neurônio apresentava alterações identificadas principalmente pelo contorno nuclear indentado, com pequena condensação de cromatina nuclear dispersa pela cariolinfa de forma irregular e a membrana nuclear estava íntegra. O citoplasma estava mais elétron-lúcido e as organelas mostravam algumas alterações, tais como o edema de retículo endoplasmático, mitocôndrias e complexo de Golgi (Figs 32 A, B, D; 33 A, C).

Outro tipo de neurônio, embora não muito freqüente, mostrava condensação nuclear em grandes grumos arredondados de cromatina e em outros neurônios, também encontravam-se dois pequenos vacúolos, a membrana nuclear encontrava-se intacta, podendo ser observada a cisterna perinuclear. No citoplasma observavam-se organelas edemaciadas como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, muitas mitocôndrias possuíam perda de suas cristas e não havia ainda vacúolos dispersos no citoplasma e na membrana plasmática não havia alterações (Fig. 35 A,B,C). Em outros neurônios deste tipo, o citoplasma diferenciava-se por ser mais eletron-denso (Fig. 36 A, B).

Outros neurônios, mostravam a condensação de cromatina em grandes grumos contra a membrana nuclear. As membranas plasmática e nuclear estavam intactas. O citoplasma possuía poucas organelas, porém as que restavam encontravam-se alteradas como os retículos endoplasmáticos e as mitocôndrias, os quais apresentavam-se edemaciados, também havia algumas formações membranosas em seu interior, bem como havia a perda da substância de Nissl.

5.5.2 FASE INTERMEDIÁRIA DO PROCESSO DEGENERATIVO

Alguns neurônios possuíam o citoplasma eletron-denso, os ribossomos haviam se dispersado do RER e poliribossomos, sendo difícil a visualização das organelas. A membrana plasmática encontrava-se íntegra. O núcleo possuía nucléolo íntegro e havia condensação de cromatina em pequenos grumos contra a membrana nuclear (Fig. 34 C, D).

Foram visualizados neurônios com alterações nucleares tais como, as indentações nucleares, a condensação da cromatina contra a margem nuclear, ausência de nucléolo e a membrana nuclear era de difícil visualização, sendo que os limites entre o núcleo e o citoplasma eram distinguidos pela diferença de densidade. O citoplasma estava condensado, eletron-denso e não se conseguia mais visualizar as organelas. A membrana plasmática não se distinguia (Fig. 34 A,B).

Outros neurônios apresentavam indentações da membrana nuclear, mostrando condensação de cromatina em pequenos grânulos espalhados pela cariolinfa ou voltando-se contra a margem nuclear. Os limites entre o núcleo e o citoplasma eram estabelecidos pela diferença de densidade, pois não se observava a dupla membrana. O citoplasma encontrava-se mais eletron-lúcido e possuía organelas edemaciadas como mitocôndrias, presença de vacúolos, e ribossomos dispersando-se do retículo endoplasmático (Fig. 36 D,E).

Outros neurônios eram mais eletron-lúcidos, nos quais o núcleo possuía pouca cromatina e a que restava estava concentrada em pequenos grumos contra a membrana nuclear, a qual não se visualizava, com exceção de algumas células em que se verificaram regiões da membrana nuclear rompida e o material nuclear se misturando com os componentes do citoplasma; nesta o nucléolo às vezes não estava presente. A membrana plasmática encontrava-se intacta, e o citoplasma possuía poucas organelas e estas na maioria das vezes estavam alteradas, tais como, edema de retículo endoplasmático e complexo de Golgi, mitocôndrias com perda de suas cristas; ribossomos e poliribossomos não eram mais visualizados. Algumas destas células possuíam vacúolos, com ou sem material amorfo em seu interior e outras células não possuíam mais organelas intactas. Este tipo celular foi o mais freqüentemente encontrado neste grupo (Fig. 37 A,B,C).

Outros neurônios mostravam indentações nucleares e o limite nuclear era bem visível, porém não se identificava a cisterna perinuclear. O citoplasma possuía vacúolos pequenos (1,6 μm) e de médio tamanho (2,8 μm), edema mitocondrial e a membrana plasmática havia se rompido.

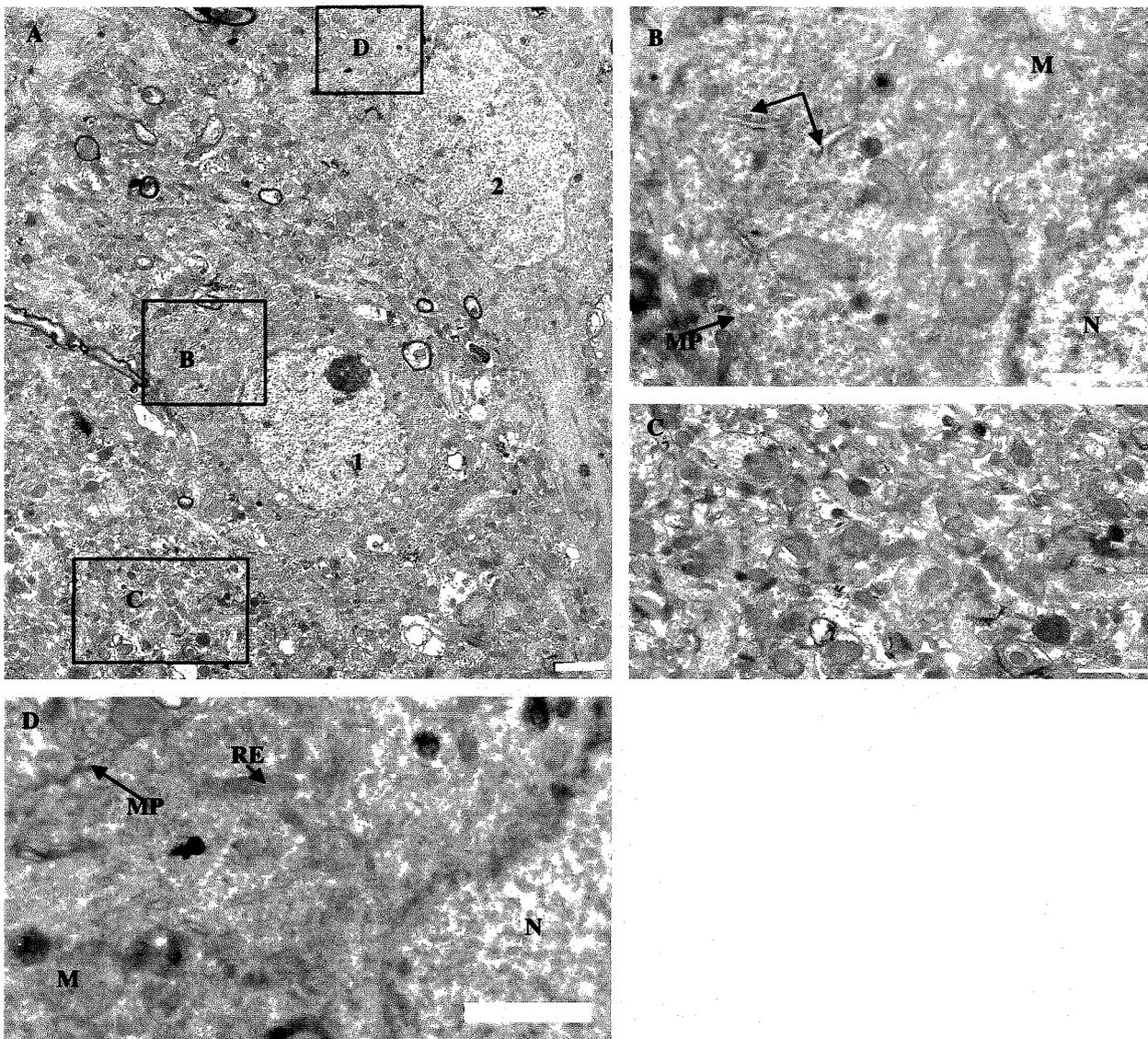


Figura 32: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônio piramidal em fase inicial de degeneração, mostrando núcleo indentado com alterações precoces no citoplasma. **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, observar o retículo endoplasmático edemaciado (RE), mitocôndrias (M) com perda de suas cristas, integridade da membrana plasmática (MP), núcleo (N). **C:** Detalhe do neuropilo da micrografia A, mostrando sua organização. **D:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando as alterações citoplasmáticas através do edema de retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias (M), lisossomos (L), e integridade da membrana plasmática (MP). Barras A = 2 μ m; B, C, D = 1 μ m

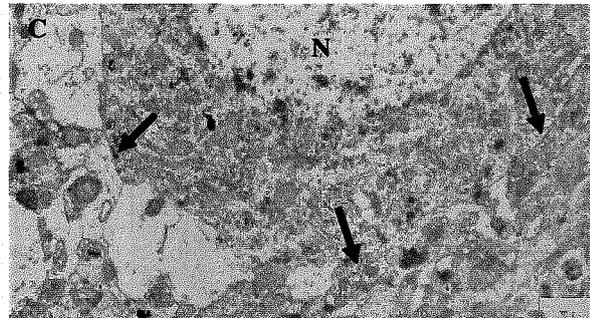
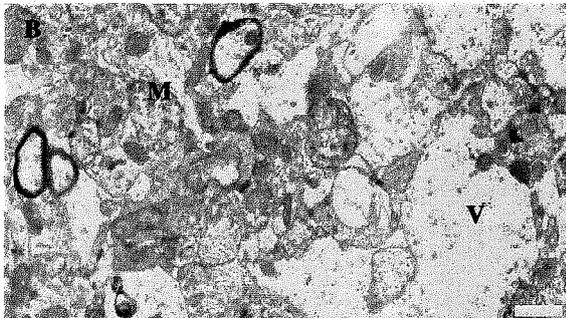
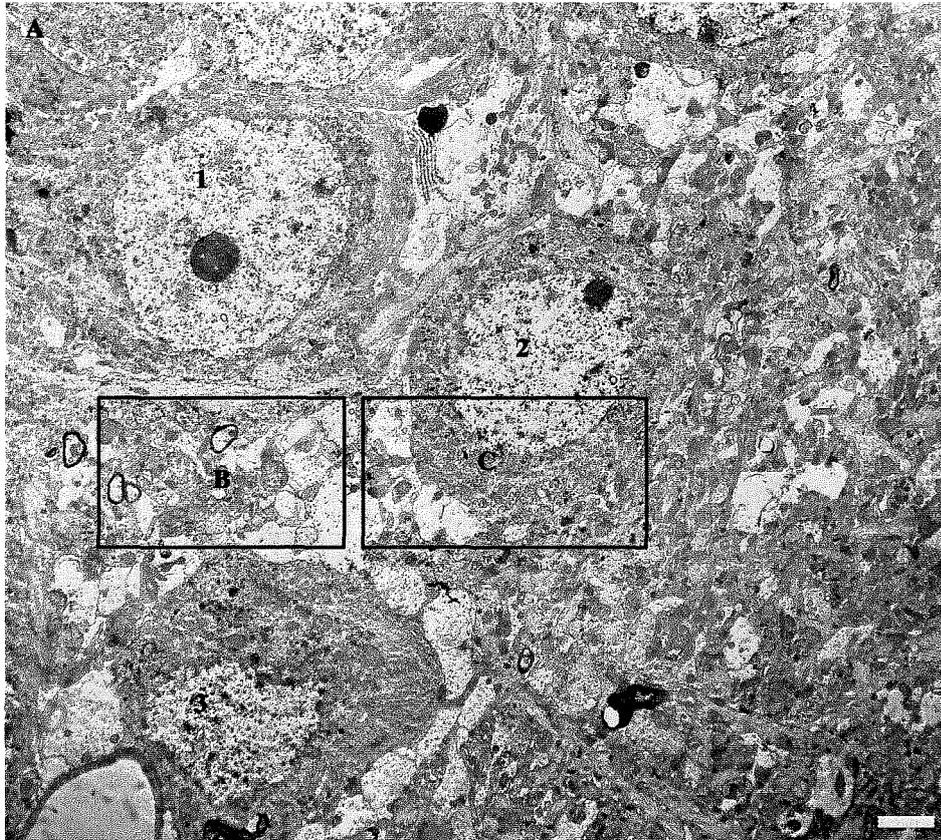


Figura 33: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônios piramidais em fase inicial de degeneração, mostrando núcleo indentado (1,2,3), com alterações citoplasmáticas. **B:** Detalhe do neuropilo entre os neurônios 1 e 3 da micrografia A, observar mitocôndrias (M) com perdas de suas cristas e início da formação de vacúolos de pequeno e médio tamanho. **C:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando a integridade da membrana plasmática (seta), núcleo (N). Barras A = 2 μ m; B, C = 1 μ m.

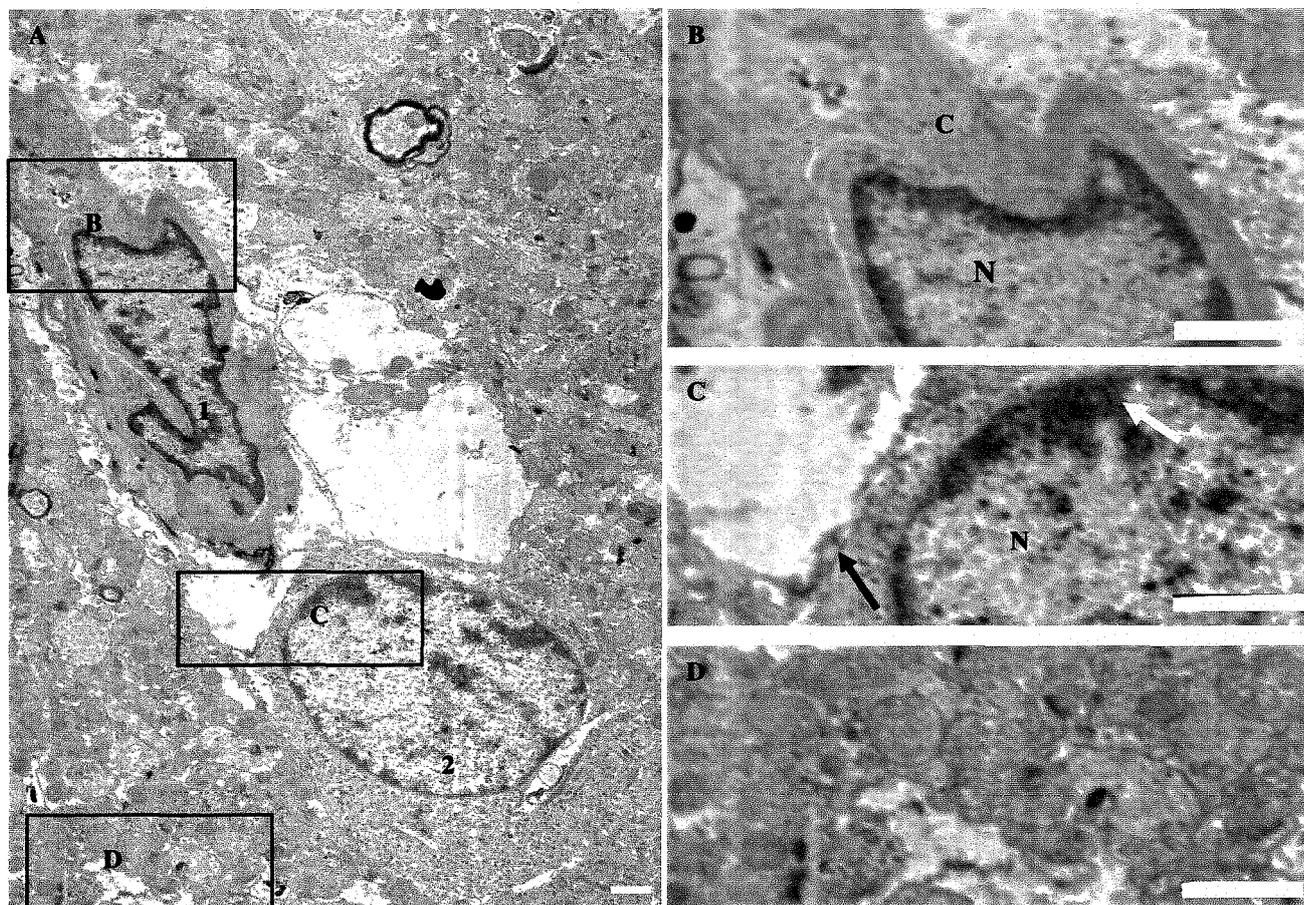


Figura 34: Micrografias eletrônicas da camada piramidal do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônios piramidais na fase intermediária da degeneração. Neurônio 1 com hiperdensidade citoplasmática e nuclear, núcleo com indentações e condensação da cromatina em grandes grumos voltando-se contra a membrana nuclear (seta branca). O neurônio 2 o núcleo com condensação da cromatina em grumos organizados contra a membrana nuclear, ausência de nucléolo, citoplasma hiperdenso. **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, mostrando o núcleo apresentando indentações e a cromatina condensada contra o limite nuclear, o citoplasma eletrôn-denso, não se visualizando organelas, nem a membrana plasmática. **C:** Detalhe do neurônio 2 da micrografia A, mostrando o núcleo (N) com condensação da cromatina contra a margem nuclear (seta branca), o citoplasma hiperdenso não se visualizando organelas e a presença de membrana plasmática intacta (seta preta). **D:** Detalhe do neuropilo da micrografia eletrônica A, mostrando ainda sua organização, com formação inicial de pequenos vacúolos (V). Barras A, B, C, D = 1 μ m.

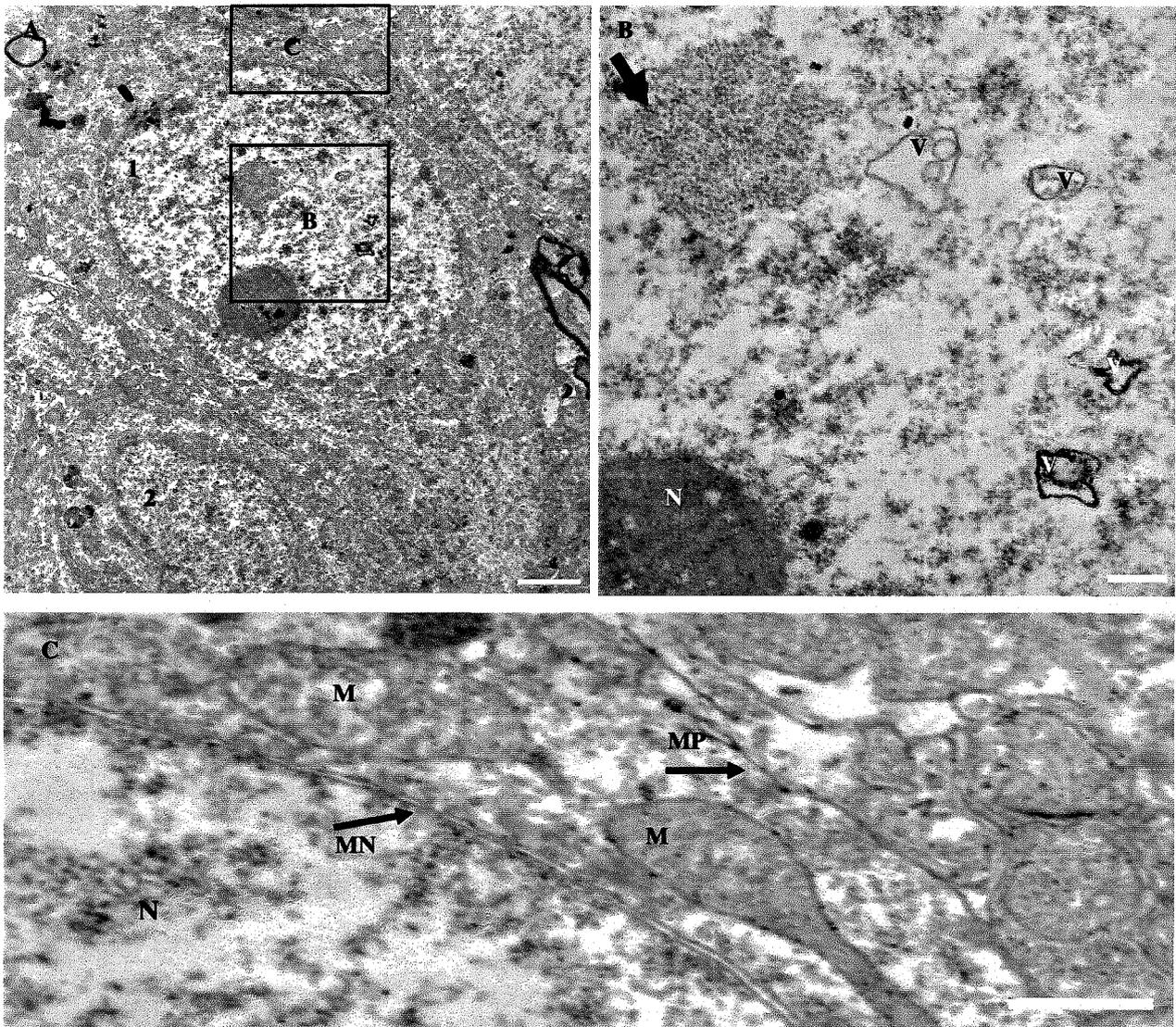


Figura 35: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônios piramidais em fase inicial de degeneração. **B:** Detalhe do núcleo do neurônio 1 da micrografia A, mostrando vacúolos (V), agregações de cromatina (seta preta), nucléolo (N). **C:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, evidenciando a integridade das membranas nuclear (MN) e plasmática (MP, núcleo (N), mitocôndrias (M) alteradas, mostrando perda de suas cristas e edema. Barras A = 2 μ m; B, C = 500 nm.

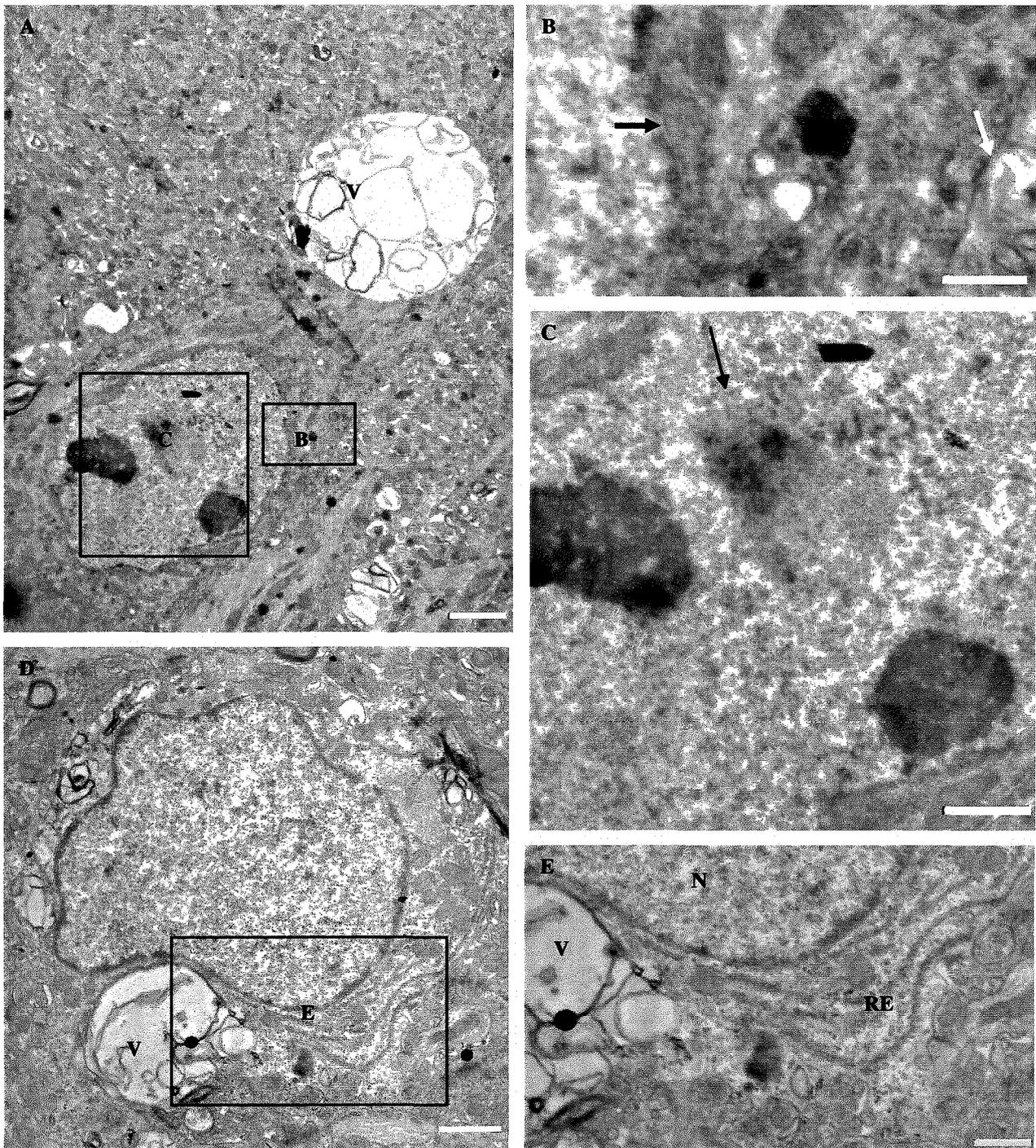


Figura 36: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônio piramidal na fase inicial da degeneração, com indentação da membrana nuclear e agregação arredondada de cromatina, e um grande vacúolo (V) no neuropilo. **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando as membranas plasmática (seta branca) e nuclear (seta preta) intactas e o citoplasma eletrodense e lisossomos (L). **C:** Detalhe da micrografia eletrônica A, observar grânulos arredondados de heterocromatina no núcleo. **D:** Neurônio piramidal na fase intermediária da degeneração, mostrando início de indentações, porém já com a membrana plasmática rompida, grandes vacúolos (V) no neuropilo. **E:** Detalhe do neurônio da micrografia C, evidenciando a membrana plasmática rompida (seta preta), retículo endoplasmático RE, núcleo, grandes vacúolos (V). Barras A= 2 μ m; B, E = 500 nm; C, D = 1 μ m.

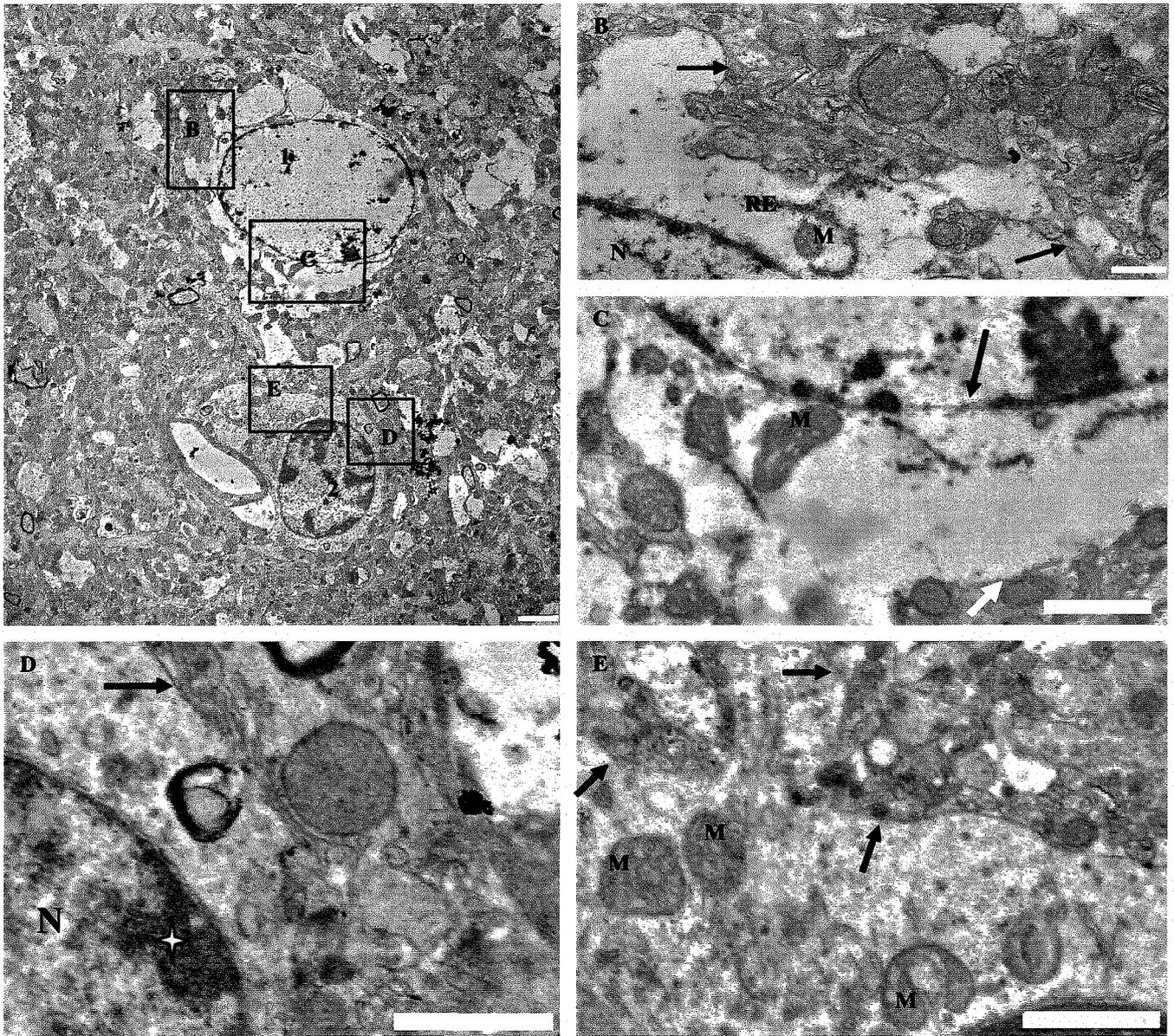


Figura 37: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 2 dias de reperfusão. **A:** Neurônio piramidal na fase intermediária da degeneração (1) com hipodensidade citoplasmática e nuclear. Microglia (2), com grandes grumos de heterocromatina contra a membrana nuclear. **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, mostrando citoplasma eletron-lúcido com poucas organelas, mostrando o retículo endoplasmático (RE) alterado e a membrana plasmática (seta preta) intacta. **C:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, mostrando uma porção do citoplasma, hipodensidade, com poucas organelas, e dentre as que restaram salienta-se as mitocôndrias (1) de aspecto normal, integridade da membrana plasmática (seta branca) e membrana nuclear, apesar nesta não ser mais visível a cisterna perinuclear. **D:** Detalhe da microglia da micrografia A, observar condensação de cromatina contra a membrana nuclear (estrela), porção intacta da membrana plasmática (seta preta), núcleo (N). **E:** Detalhe da microglia da micrografia eletrônica A, membrana plasmática (setas preta), e o citoplasma contendo mitocôndrias (M) intactas. Barra A = 2 μ m; B = 500 nm; C, D, E = 1 μ m.

5.6 GRUPO DE 20 MINUTOS DE ISQUEMIA E 4 DIAS DE REPERFUSÃO

Neste grupo experimental também foram encontrados neurônios em diferentes fases do processo degenerativo, porém a maioria deles apresentava características morfológicas de um processo mais avançado de degeneração. Estas características também foram encontradas no grupo de 4 dias de reperfusão e 10 minutos de isquemia, entretanto, nesse grupo as alterações eram mais marcadas.

O neuropilo apresentava uma grande quantidade de vacúolos de tamanhos variáveis desde pequenos até grandes, deixando um aspecto desorganizado e com baixa densidade (Fig. 39 B; 40C). Também encontraram-se prolongamentos de células gliais com numerosos filamentos intermediários. Foram visualizados zonas entre dois neurônios degenerados onde se observaram prolongamentos um pouco alterados, representado pelo edema de organelas (dendritos) dando um aspecto eletrólúcido, fibras mielínicas, com suas bainhas muito alteradas, representado pela dispersão de suas lamelas.

Também havia uma grande quantidade de células gliais após 4 dias de reperfusão. Elas estavam, freqüentemente, nas proximidades de vacúolos e neurônios em processo mais avançado de degeneração. Os astrócitos possuíam o núcleo com condensação de pequenos grumos de cromatina e algumas porções da membrana nuclear eram de difícil visualização. O citoplasma continha poucas e edemaciadas organelas e, dentre as restantes, estavam as mitocôndrias e o retículo endoplasmático. Em outras porções do citoplasma observaram-se, praticamente a inexistência de organelas, e uma grande quantidade de filamentos intermediários. Na vizinhança encontravam-se numerosos vacúolos. As microglias também podiam ser visualizadas nas vizinhanças dos neurônios em degeneração e com grande freqüência nas proximidades dos neurônios em fase final de degeneração (Fig. 42 A-E). Ainda, encontramos um reduzido número de neurônios que não mostravam alterações.

5.6.1 FASE INICIAL DE DEGENERAÇÃO

Encontraram-se neurônios em fase inicial de degeneração representados pelas alterações citoplasmáticas, tais como edema de organelas, incluindo as mitocôndrias, escasso retículo endoplasmático rugoso grandes dilatações do retículo endoplasmático liso e ribossomos dispersos no citoplasma. O núcleo mostrava pequenos grânulos de heterocromatina tanto contra a membrana nuclear como disperso na cariolinfa.

Visualizaram-se neurônios com o núcleo eletron-lúcido, a cromatina estava condensada em pequenos grumos dispersos na cariolinfa. No citoplasma distinguiam-se mitocôndrias dilatadas com escassas cristas, retículos endoplasmáticos rugosos desprovidos de ribossomos e edemaciados e vacúolos com material membranoso em seu interior. Nos dendritos, além de vacúolos e mitocôndrias em degeneração distinguiam-se neurotúbulos e neurofilamentos que corriam paralelos ao eixo maior do mesmo e dilatações do retículo endoplasmático liso. Estruturas de aspecto alterado na origem dos dendritos e a medida que o dendrito se distanciava do soma neuronal diminuíam o número de mitocôndrias dilatadas, assim como de vacúolos (Fig. 38 A-E).

Outros neurônios possuíam uma área nuclear de tamanho menor com material granuloso disperso na cariolinfa, às vezes distinguiu-se a membrana nuclear, porém não se observava a cisterna perinuclear. O citoplasma estava todo preenchido por vários restos mitocondriais, várias cisternas de RER e REL muito dilatados e numerosos vacúolos e muitos dos quais, contendo estruturas membranosas. A membrana plasmática ainda era visível.

Outras células apresentavam alterações iniciais no núcleo, tais como as indentações nucleares com condensação da heterocromatina organizada de forma arredondada livre na cariolinfa e em forma de meia lua contra a membrana nuclear. No citoplasma observavam-se estruturas vacuolares, assim como organelas edemaciadas como o RE e as outras, de difícil identificação. As membranas plasmática e nuclear podiam ser ainda visualizadas (Fig. 39 C,D).

5.6.2 FASE INTERMEDIÁRIA DE DEGENERAÇÃO

Foram observados também, neurônios com o núcleo indentado e acúmulos de grânulos de heterocromatina contra a membrana nuclear ou dispersos pela cariolinfa. No citoplasma observaram-se dilatações do complexo de Golgi, assim como das cisternas de REL. Outros mostravam mitocôndrias muito edemaciadas, nas quais não se reconheceram mais suas cristas, e também eram visualizados lisossomos secundários dispersos no citoplasma. A membrana plasmática era de difícil visualização e já observava-se porções rompidas da membrana nuclear (Fig. 40 A,B).

Foram visualizados neurônios apresentando uma maior eletron-densidade com enrugamento da membrana nuclear com grânulos de heterocromatina dispersos na cariolinfa e contra a membrana nuclear. No citoplasma as organelas eram de difícil visualização, mostrando mitocôndrias com perda de suas cristas, vacúolos, lisossomos elétron-densos e o edema do retículo endoplasmático, a membrana plasmática não era identificada em todas as porções (Fig. 39A).

Assim como nos outros grupos experimentais, foi visualizado uma grande quantidade de neurônios eletron-lúcidos. O núcleo continha grânulos de cromatina dispersos na cariolinfa, ou contra a margem nuclear e alguns deles mostravam a membrana nuclear descontínua. Nestes locais podia-se visualizar a passagem do material nuclear para o citoplasma. Já o citoplasma apresentava-se eletron-lúcido com poucos organelas e as que restavam também já estavam alteradas como o RE, mitocôndrias, CG e visualizava-se grandes lisossomos e a membrana plasmática, na maioria das vezes já apresentava descontinuidades.

5.6.3 FASE FINAL DO PROCESSO DEGENERATIVO

Encontrado restos celulares, com eletron-densidade, onde os componentes do citoplasma e do núcleo misturavam-se e não se distinguíam os componentes celulares. Em algumas porções parecia estar envolvido por membrana, já em outras não mostravam a membrana. Na maioria das vezes, estes restos celulares possuíam em suas vizinhanças vacúolos e células gliais (Fig. 41 A-D).

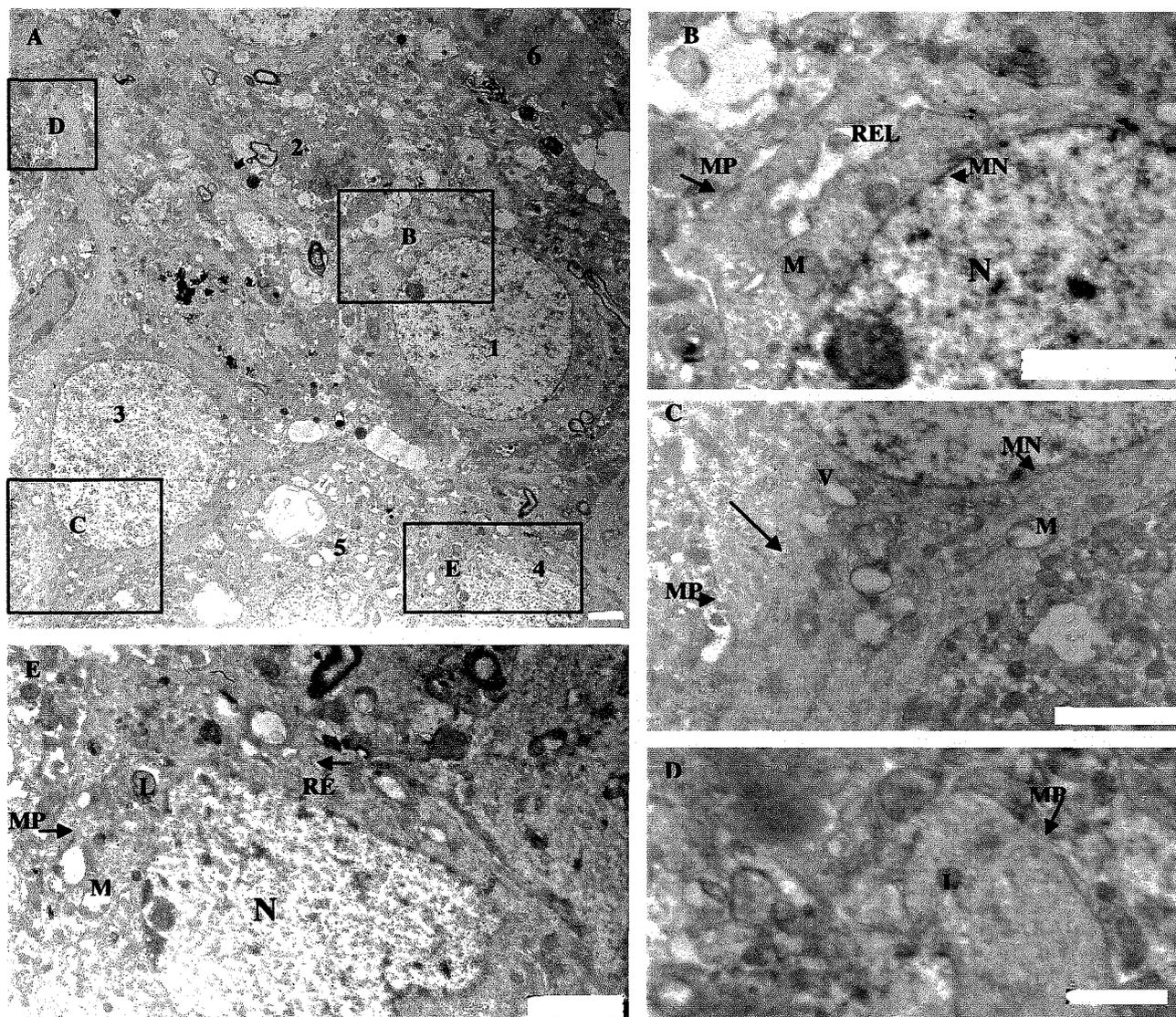


Figura 38. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Vários neurônios na fase inicial da degeneração. **B:** Detalhe do neurônio 1 da micrografia A, mostrando edema de mitocôndrias (M) grandes dilatações do retículo endoplasmático liso (REL), membranas plasmática (MP) e nuclear (MN) intactas. **C:** Detalhe da micrografia A, mostrando detalhes de um dendrito emergindo do soma neuronal 3, evidenciando vacúolos (V), mitocôndrias (M) em degeneração, microtúbulos e filamentos (seta), membrana plasmática (MP) e membrana nuclear (MN) intactas. **D:** Detalhe da micrografia A, evidenciando o prolongamento distal do neurônio com visualização de lisossomos (L) e membrana plasmática intacta (MP). **E:** Detalhe da micrografia A, mostrando detalhes do neurônio 4, evidenciando o edema de mitocôndrias (M), retículo endoplasmático liso (RE), lisossomos (L) e também observa-se a membrana plasmática intacta; núcleo (N). Barras A, B, C, E = 2 μ m; D = 1 μ m.

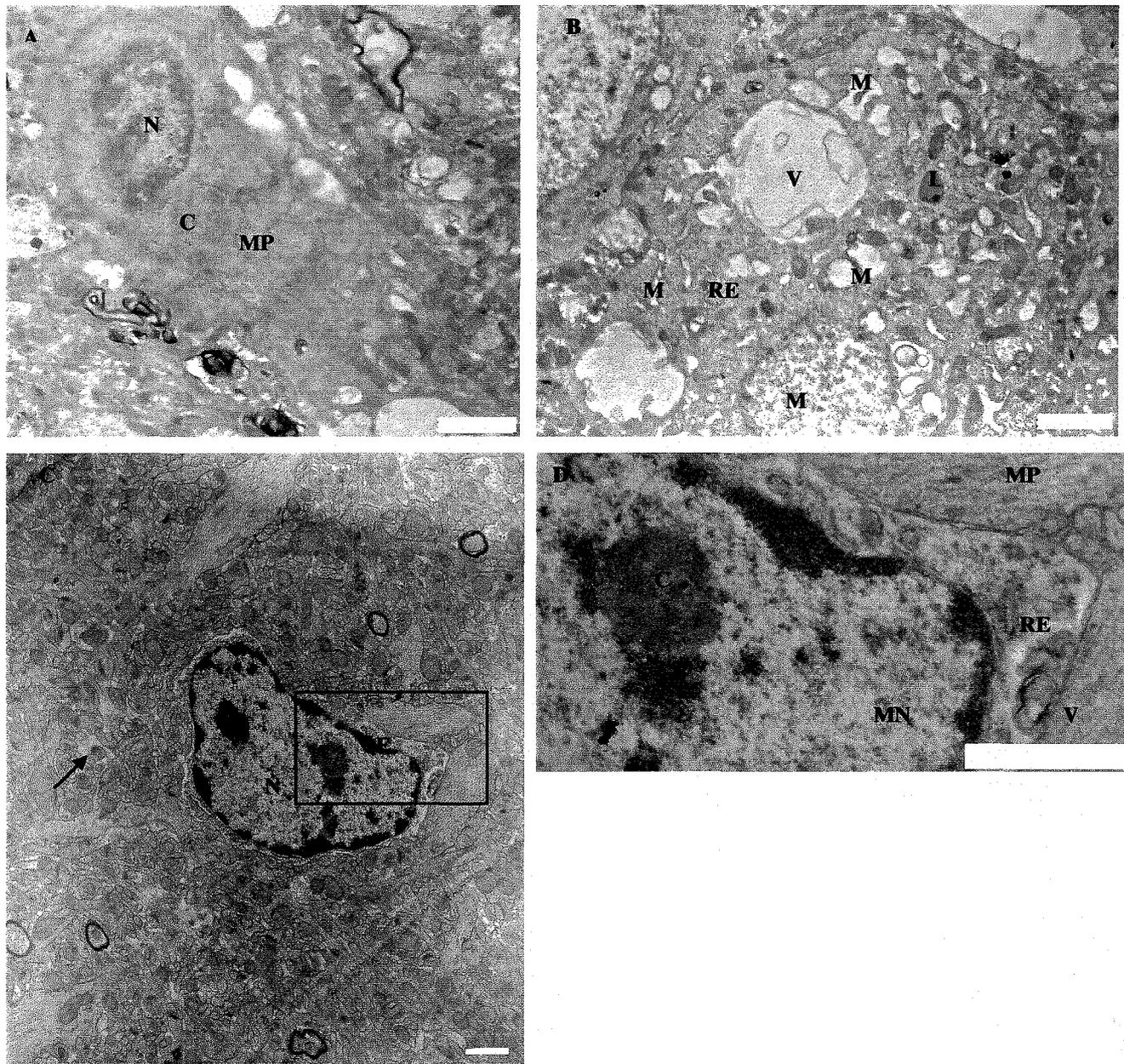


Figura 39. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Detalhe do neurônio 6 da figura 38 micrografia eletrônica A, na fase inicial da degeneração, mostrando o núcleo (N) com a heterocromatina contra a membrana nuclear, a membrana plasmática (MP) não é visualizada em todas as porções, o citoplasma (C) eletrôn-denso, sendo difícil a visualização de organelas. **B:** Detalhe uma área do neuropilo da figura 38 da micrografia eletrônica A próximo ao neurônio 5, mostrando vacúolos (V), dendritos (D). **C:** Neurônio na fase inicial da degeneração, mostrando o núcleo (N) com a heterocromatina organizada em grumos arredondados. A área vizinha ao neurônio mostra um neuropilo com escassas alterações (seta). **D:** Detalhe da micrografia C, evidenciando cromatina condensada organizada de forma redonda (C), membranas nuclear (MN) e plasmática (MP) íntegras, o citoplasma contém retículo endoplasmático edemaciado (RE) e outras organelas de difícil distinção, bem como vacúolos intra-citoplasmáticos (V). Barras A, B = 2 μ m; C, D = 1 μ m

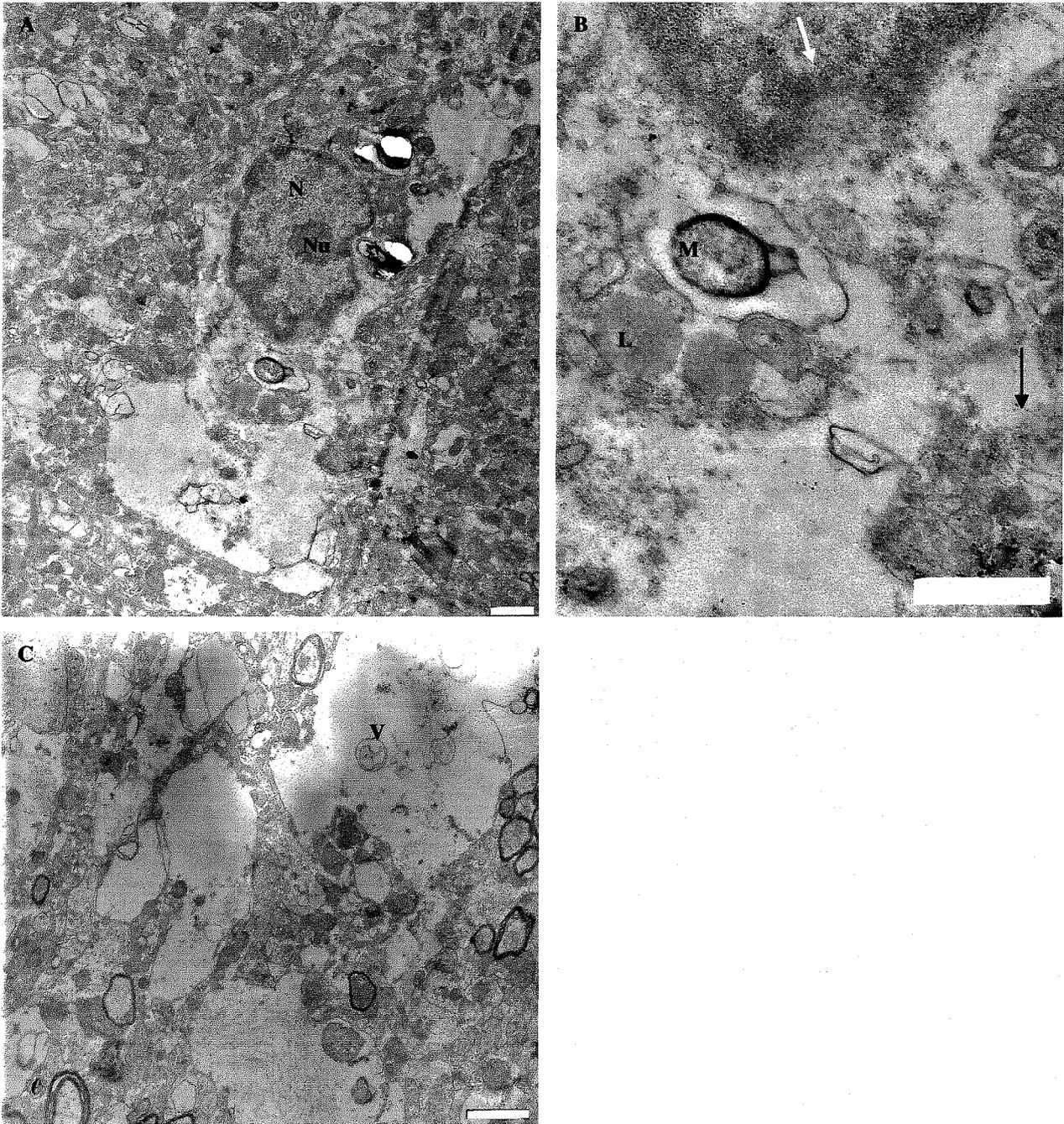


Figura 40. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Neurônio em uma etapa intermediária de degeneração, com núcleo (N) eletrôn-denso, com condensação da cromatina contra margem nuclear e citoplasma (C) eletrôn-lúcido; nucléolo (Nu) intacto. **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando uma porção da membrana nuclear apresentando descontinuidades (seta branca), citoplasma com poucas organelas, mitocôndrias (M) com perdas de suas cristas, grandes lisossomos (L) e ruptura da membrana plasmática (seta preta). **C:** Área do neuropilo mostrando grandes vacúolos (V). Barra A, B, C = 1 μ m

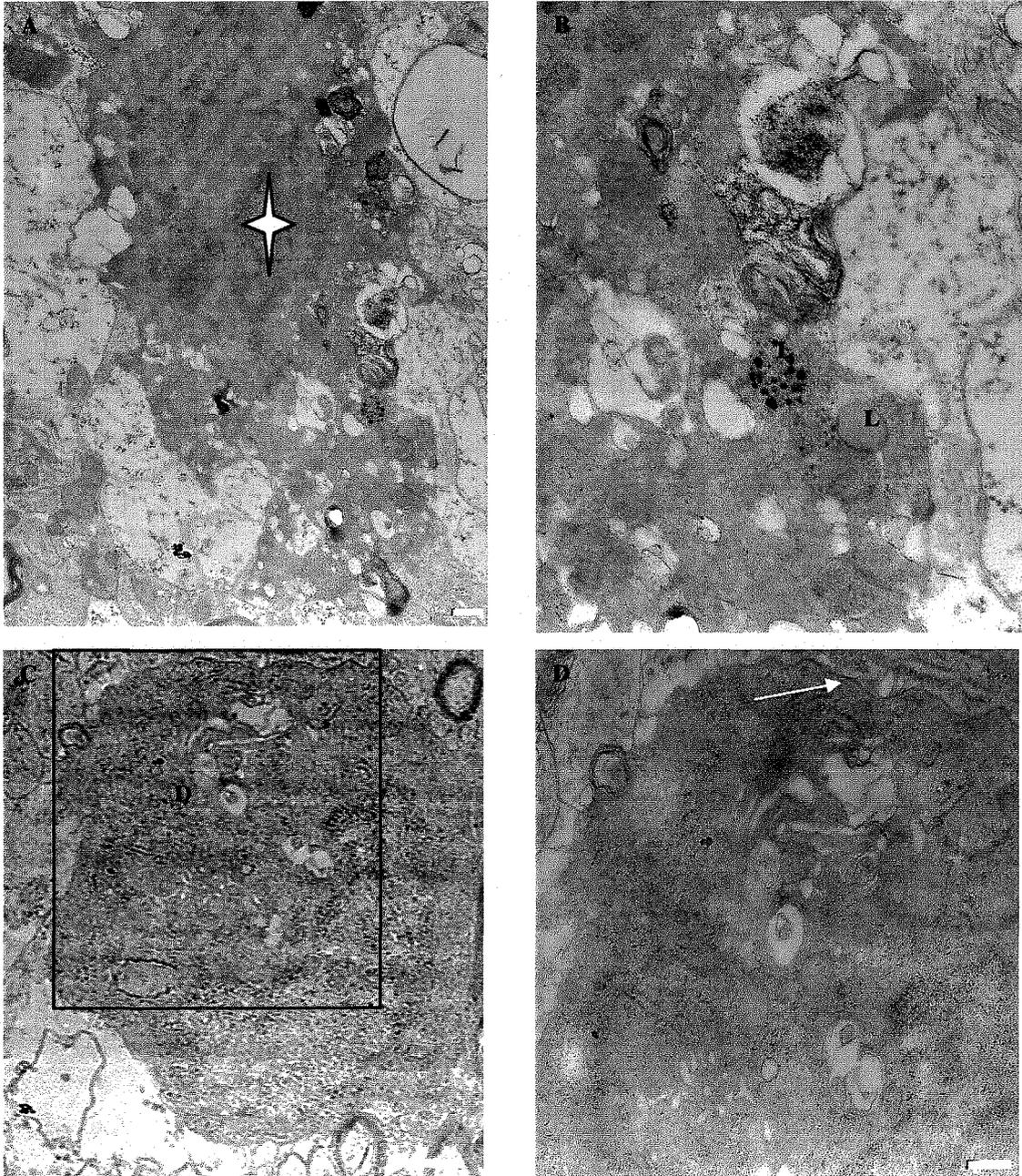


Figura 41. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Degeneração neuronal em sua fase final (estrela). **B:** Detalhe da degeneração da micrografia A, evidenciando ausência de limites e sem distinção de organelas, com exceção de lisossomos (L). **C:** Neurônio em fase final da degeneração. **D:** Detalhe da micrografia C, mostrando a membrana que está envolvendo-o (seta branca). Barras A = 500 nm; B = 1 μ m; C = 2 μ m; D = 200 nm.

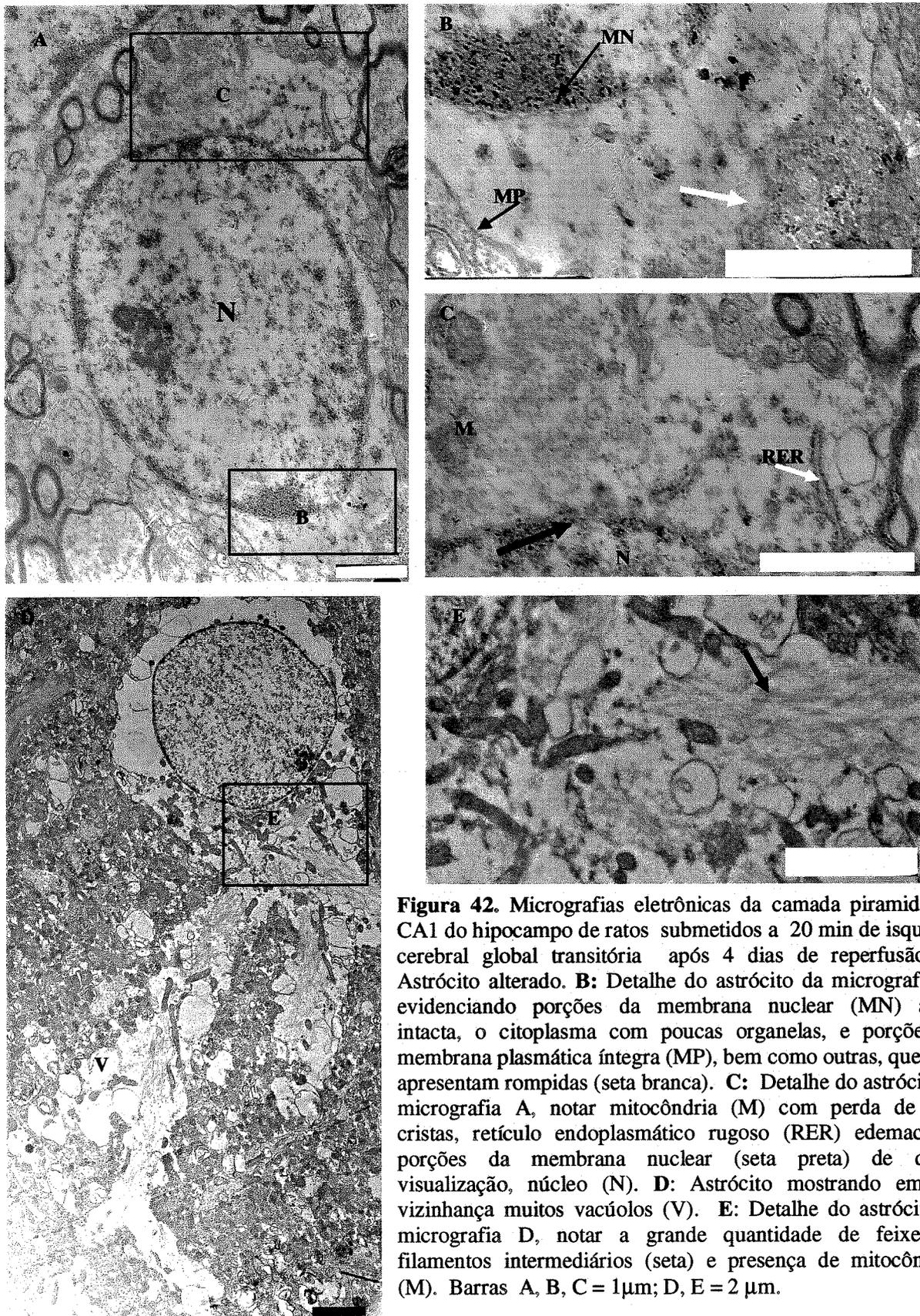


Figura 42. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 4 dias de reperfusão. **A:** Astrócito alterado. **B:** Detalhe do astrócito da micrografia A, evidenciando porções da membrana nuclear (MN) ainda intacta, o citoplasma com poucas organelas, e porções da membrana plasmática íntegra (MP), bem como outras, que já se apresentam rompidas (seta branca). **C:** Detalhe do astrócito da micrografia A, notar mitocôndria (M) com perda de suas cristas, retículo endoplasmático rugoso (RER) edemaciado, porções da membrana nuclear (seta preta) de difícil visualização, núcleo (N). **D:** Astrócito mostrando em sua vizinhança muitos vacúolos (V). **E:** Detalhe do astrócito da micrografia D, notar a grande quantidade de feixes de filamentos intermediários (seta) e presença de mitocôndrias (M). Barras A, B, C = 1µm; D, E = 2 µm.

5.7 GRUPO DE 20 MINUTOS DE ISQUEMIA E 10 DIAS DE REPERFUSÃO

A maioria dos neurônios deste grupo experimental possuía características das fases avançadas do processo degenerativo. Havia poucos neurônios com aspecto normal ou em fases iniciais de degeneração.

O neuropilo apresentava-se mais organizado, com aspecto eletrólúcido e poucos vacúolos, de pequeno e médio tamanho. Em algumas áreas, foram visualizados um maior número de vacúolos, e em sua grande maioria, estes possuíam material floculento em seu interior (Figuras 44C e 45C).

Foram encontrados uma grande quantidade de células gliais e poucos neurônios normais. Observaram-se numerosas células microgliais nas proximidades dos restos degenerados. A maioria destas células, possuíam o citoplasma alterado com vacúolos e edema de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi e a ausência da membrana plasmática. A membrana nuclear ainda estava presente (Fig. 46D). Também identificavam-se vários astrócitos com grande quantidade de filamentos intermediários em seu citoplasma.

Ademais, visualizaram-se neurônios sem alterações, embora em menor quantidade, quando comparada aos grupos de 2 e 4 dias de reperfusão submetidos a 10 minutos de isquemia cerebral global transitória.

5.7.1 FASE INICIAL DO PROCESSO DEGENERATIVO

Foram encontrados poucos neurônios nesta fase de degeneração. As alterações citoplasmáticas eram representadas pelo edema de organelas como o retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias, porém não haviam outras alterações como a formação de vacúolos intracelulares e o núcleo possuía poucos e pequenos grumos de heterocromatina.

5.7.2 FASE INTERMEDIÁRIA DO PROCESSO DEGENERATIVO

Foram encontrados neurônios escuros, eletron-densos, apresentando núcleos indentados, com nucléolo presente e havia condensação de cromatina em pequenos grumos irregulares dispersos no cariolímbio ou contra a membrana nuclear. No citoplasma não foram identificadas mais a presença de organelas, com exceção de alguns ribossomos livres, bem como, vacúolos de tamanho pequeno e médio.

Foram encontrados com grande frequência neurônios que mostravam tanto o núcleo quanto o citoplasma eletron-lúcidos. Visualizavam-se as membranas nuclear e a citoplasmática. O núcleo apresentava-se arredondado com esparsa condensação de cromatina em pequenos grumos irregulares. O citoplasma continha poucas organelas, e algumas das restantes tinham aspecto normal, também observaram-se lisossomos, sendo que, alguns estavam em processo ativo de fagocitose de vacúolos intracelulares (Fig. 43A,B). Em outras células deste tipo no citoplasma somente restaram organelas alteradas e com material amorfo.

Outros neurônios apresentavam o núcleo com condensação de cromatina em grumos voltados contra a membrana nuclear; nucléolo e a membrana nuclear ainda estavam intactos. O citoplasma mostrava-se alterado, possuindo poucas organelas e, as restantes, estavam alteradas na maioria das vezes, como o REL, mitocôndrias e não se observava a membrana plasmática (Figs. 43 C,D e 44 A,B,D).

5.7.3 NEURÔNIOS EM PROCESSO FINAL DO PROCESSO DEGENERATIVO

Neste grupo foram encontrados muitos restos de neurônios eletron-densos. Alguns restos neuronais mostravam-se mais claros que os demais. Os neurônios possuíam material amorfo em seu interior, não se reconhecia mais as organelas e não se conseguia visualizar a membrana plasmática (Fig. 45 A,B). Em outros restos neuronais visualizavam-se a fragmentação de

cromatina (Fig. 46 D, F). Outro resto neuronal caracterizava-se por sua eletron-densidade e ausência de membrana plasmática. Diferenciava-se dos demais por possuir em seu interior uma grande quantidade de lisossomas de tamanho grande, medindo em torno de 1 μm de diâmetro e uma grande quantidade de células gliais estavam em sua vizinhança (Fig. 46 A,B,C). Outro resto neuronal eletron-denso, mostravam dissolução da membrana plasmática, ausência de organelas e ribossomos livres (Fig. 46 D,E). Estes restos celulares foram o resultado da ruptura de ambas as membranas nuclear e citoplasmática e com saída ao meio extra-celular. Também muitas células gliais e vacúolos estavam na vizinhança dos mesmos.

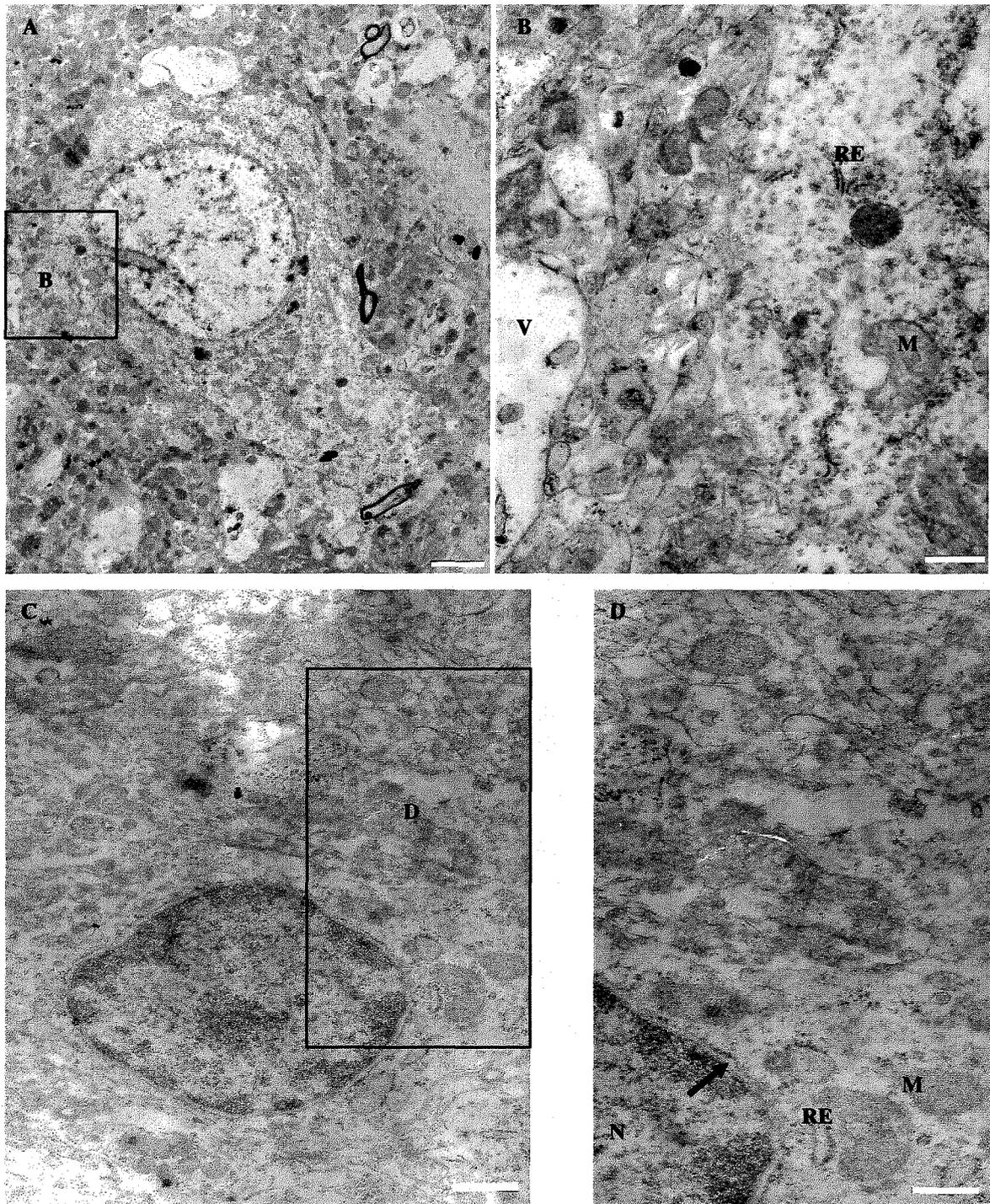


Figura 43. Micrografias eletrônicas de neurônios da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Neurônio eletrônico – lúcido, na fase intermediária da degeneração. **B:** Detalhe da micrografia A, mostrando a porção rompida da membrana plasmática, e organelas intactas no citoplasma como a mitocôndria (M) e o retículo endoplasmático (RE). **C:** Célula com condensação de cromatina contra o limite nuclear, envolvidas por um neuropilo mais organizado. **D:** Detalhe da micrografia C, mostrando citoplasma da célula com poucas organelas como as mitocôndrias (M), os retículo endoplasmáticos (RE), os quais encontram-se edemaciados, presença da dupla membrana nuclear (seta preta) e ausência de membrana plasmática. Barra A = 2 μ m; B, C = 500 nm; D = 250 nm.

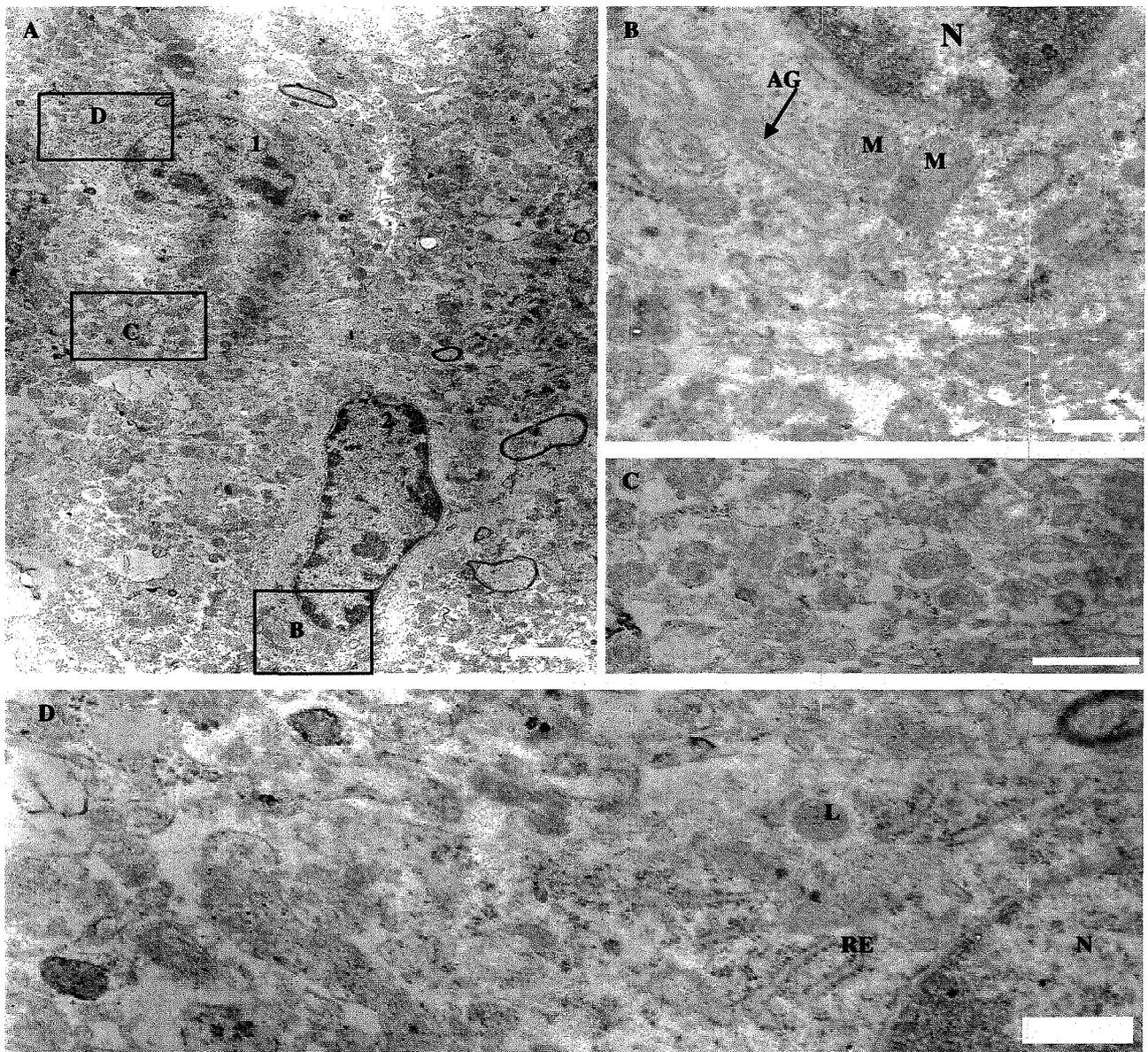


Figura 44: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Células 1 e 2, com condensação de cromatina contra o limite nuclear, envolvidas por um neuropilo mais organizado. **B:** Detalhe da célula 2, mostrando o núcleo (N) com condensação de cromatina contra a membrana nuclear, mitocôndrias (M) com perdas de suas cristas, e complexo de Golgi (AG) desorganizado. **C:** Detalhe de uma área do neuropilo da micrografia A, evidenciando pequenos vacúolos escassos. **D:** Detalhe da célula 1, mostrando um citoplasma desorganizado com retículo endoplasmático (RE) edemaciado, ausência da membrana plasmática e é visível a membrana nuclear (seta preta). Barra A = 2 μ m; B, D = 500 nm; C = 1 μ m.

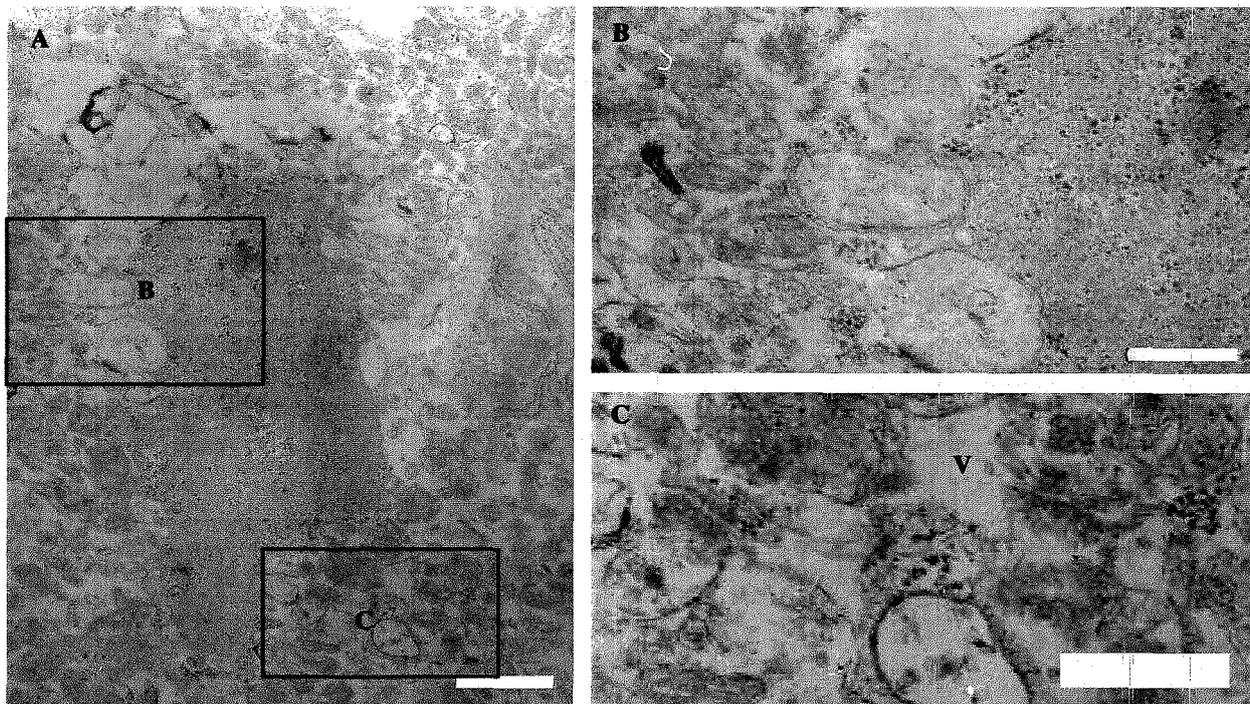


Figura 45: Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Resto neuronal degenerado com vacúolos em sua vizinhança. **B:** Detalhe do resto neuronal da micrografia A, mostrando a ausência de organelas e da membrana plasmática. **C:** Detalhe do neuropilo da micrografia A, evidenciando vacúolos de médio tamanho. Barra A = 1 μ m; B, C = 500 nm;

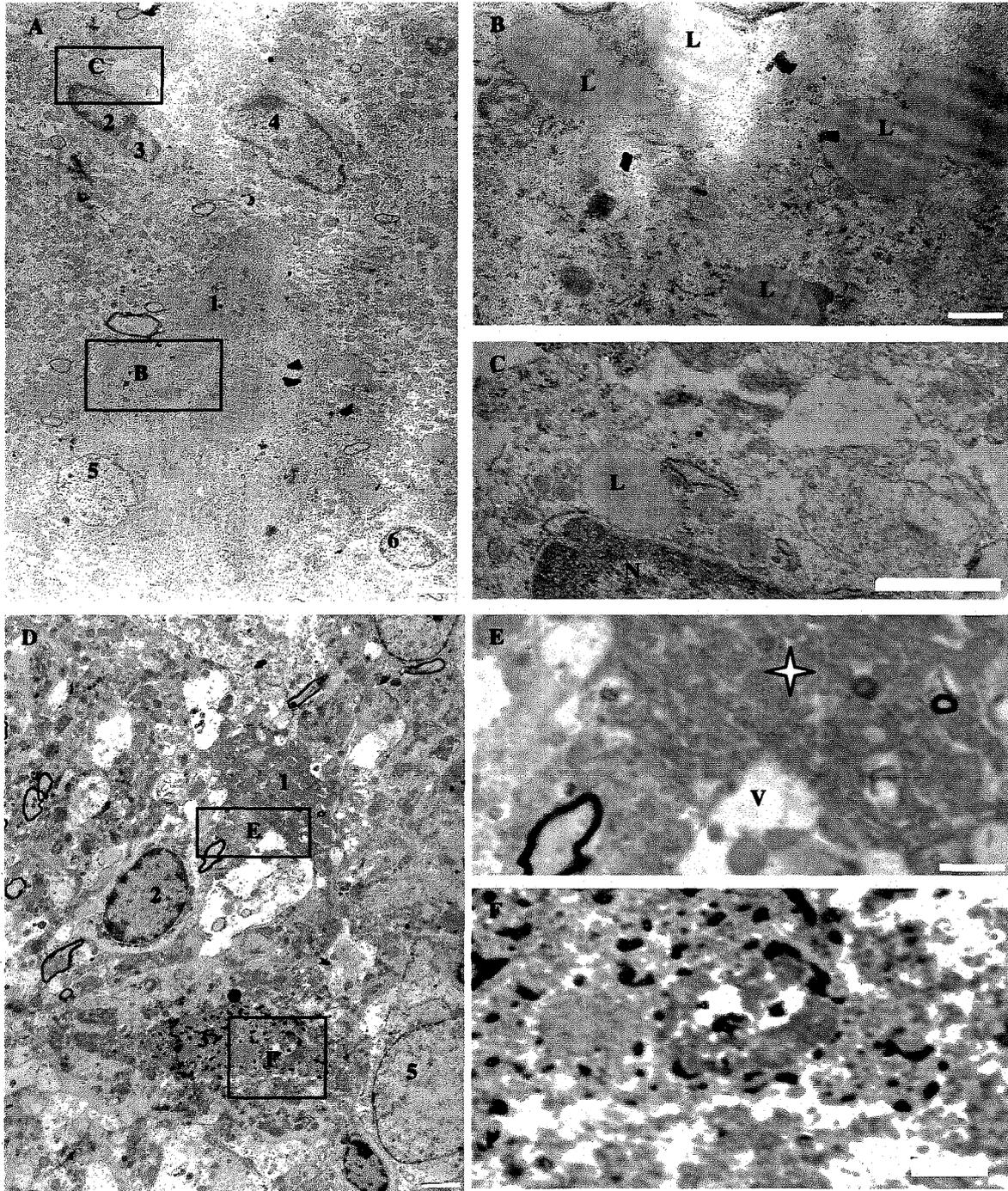


Figura 46. Micrografias eletrônicas da camada piramidal de CA1 do hipocampo de ratos submetidos a 20 min de isquemia cerebral global transitória após 10 dias de reperfusão. **A:** Resto celular degenerado e em sua vizinhança grande quantidade de células microgлияis (2,3,4,5,6). **B:** Detalhe da micrografia A resto neuronal 1, evidenciando grande quantidade de lisossomos (L) de tamanho grande. **C:** Detalhe da célula 2 da micrografia A, mostrando o citoplasma com poucas organelas, vacúolos (V) e lisossomos (L), com ausência de membrana plasmática envolvendo-a. **D:** Área de degeneração, mostrando as fases avançada (neurônio 1 e 3), e intermediária (5), microgлияs (2,4). **E:** Detalhe da micrografia D, mostrando o resto neuronal, não estando envolvido por membrana celular. **F:** Detalhe do neurônio em fase final de degeneração (3) da micrografia D, notar a fragmentação da cromatina. Barra A, E, F = 1µm; B, C = 500 nm; D = 2 µm.

6. DISCUSSÃO

As alterações dos neurônios piramidais da área CA1 do hipocampo de ratos adultos após a isquemia cerebral global transitória de 10 e 20 minutos submetidos a 2,4 e 10 dias de reperfusão, mostraram diferentes graus de alterações que nos levou a classificar o processo neurodegenerativo em três fases, ou seja, a fase inicial, a fase intermediária e a fase final.

Como havíamos anteriormente descrito, a **fase inicial** é aquela em que se encontram poucas alterações. As alterações citoplasmáticas são representadas pelo edema de organelas, como por exemplo, edema de mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ou desagregação dos ribossomos a partir dos poliribossomos ou do retículo endoplasmático rugoso, assim como o início da formação de vacúolos. Não estão enquadrados nesta fase as rupturas de membranas nuclear e citoplasmática, nem a alteração de densidade, ou seja, neurônios eletron-lúcidos ou neurônios eletron-densos. As alterações nucleares são representadas pelas condensações de cromatina com tamanho pequeno e formato irregular, características da necrose oncótica, assim como grandes condensações de cromatina com formato arredondado que tendem a posicionarem-se contra a membrana nuclear, característica da necrose apoptótica. Também, estão incluídas nesta fase, as alterações do contorno da membrana nuclear como as indentações nucleares. Já a **fase intermediária** caracteriza-se por incluírem aqueles neurônios que possuem alterações morfológicas já encontradas na fase anterior acrescidas de outras alterações que representam um processo mais avançado da neurodegeneração. Os neurônios que já apresentavam alterações de densidade, ou seja, neurônios eletron-lúcidos ou eletron-densos e também aqueles neurônios que já possuem rupturas de membranas, plasmática ou nuclear, neurônios com formação de bolhas, característico da necrose oncótica. E a **fase final** caracteriza-se por incluir neurônios em fase

muito avançada do processo neurodegenerativo, ou seja, quando a célula está praticamente desintegrada. Os restos celulares hiperdensos, representam o processo final da necrose oncótica, e a fagocitose dos restos celulares pelas células gliais caracterizam esta fase.

Este estudo tem como objetivo realizar uma análise ultra-estrutural da morte celular da área CA1 do hipocampo após a isquemia global transitória experimental em ratos machos adultos. Este estudo justifica-se pela necessidade de identificarmos o tipo de alterações morfológicas da morte celular na área CA1 do hipocampo, pois existe grandes contradições na literatura, bem como poucos dados especificamente neste local. A maioria dos estudos realizados antes do surgimento da microscopia eletrônica, utilizando como métodos para a análise como a microscopia óptica e a técnica de TUNEL, afirmavam que a morte celular segue um tipo morfológico de necrose apoptótica. Porém, a análise por meio da microscopia eletrônica revelou dados contraditórios, mostrando alterações típicas da necrose oncótica. Por este motivo, realizamos esta pesquisa com a hipótese que o tipo de alterações da morte celular pode seguir um padrão de necrose oncótica.

Utilizamos os termos para a classificação da morte celular recomendados pela pelo Comitê da Sociedade de Patologistas Toxicológicos (LEVIN et al., 1999) a qual recomenda o uso dos termos necrose apoptótica ou necrose oncótica de acordo com o tipo morfológico de morte celular. Algumas décadas atrás, descrevia-se apoptose ou necrose como formas totalmente diferenciadas de morte celular e por este motivo, a revisão de literatura deste trabalho, foi realizada obedecendo estes critérios de nomenclatura até chegarmos a nomenclatura atual recomendada por este Comitê. Na verdade, o Comitê denominou para o tipo morfológico de apoptose a denominação de necrose apoptótica e o termo anteriormente denominado de necrose para necrose oncótica.

Neste estudo, os animais experimentais foram divididos em sete grupos, sendo que um grupo permaneceu como controle, não sendo realizado nenhum procedimento cirúrgico. Primeiramente, foi realizado dois grandes grupos de acordo com o tempo de indução isquêmica, ou seja, 10 min e 20 min. Posteriormente, os animais submetidos a 10 min de isquemia foram subdivididos em 3

grupos, de acordo com o tempo de reperfusão, ou seja, 2, 4 e 10 dias e a mesma metodologia foi adotada com o grupo de animais experimentais submetidos a 20 min de insulto isquêmico.

De acordo com a intensidade das alterações celulares identificadas na isquemia global transitória de 10 e 20 minutos com reperfusão de 2, 4 e 10 dias, encontramos em todos os grupos as três fases do processo neurodegenerativo, ou seja, a inicial, a intermédia e a final. O que diferencia os grupos experimentais é a predominância de uma fase sobre a outra, o que será discutida adiante. Ao compararmos os grupos de 10 minutos com os grupos de 20 minutos de isquemia, no mesmo tempo de reperfusão, observamos praticamente as mesmas alterações e os mesmos possuem a maioria dos neurônios na mesma fase de degeneração, porém nos grupos de 20 minutos as alterações neuronais parecem ser mais exacebadas que dos grupos de 10 minutos.

Os neurônios encontram-se em diferentes fases da neurodegeneração, para o mesmo período de reperfusão, provavelmente devido ao fenômeno da vulnerabilidade seletiva. Assim como algumas regiões do encéfalo são mais suscetíveis ao dano neuronal do que outros, sendo o hipocampo uma das regiões mais vulneráveis, e mesmo dentro das diferentes áreas do hipocampo a morte celular não é uniforme, a área CA1 é mais vulnerável que a área CA3 do hipocampo (SCHREIBER e BAUDRY, 1995). Verificou-se que este fenômeno também ocorreu entre os neurônios da região CA1, possivelmente explicando o porquê, encontramos neurônios em diferentes fases de degeneração, ou seja, alguns apresentando alterações na fase inicial, outros na fase intermediária e outros na fase final em um mesmo período de reperfusão. Isto foi constatado tanto nos grupos de 10 e 20 minutos de isquemia nos diferentes tempos de reperfusão (2, 4 e 10 dias). Alguns mecanismos estão implicados na vulnerabilidade seletiva, sendo que na isquemia e na fase inicial da reperfusão tem-se a fase excitotóxica caracterizada pela massiva liberação de aminoácidos excitatórios, aumento de Ca^{++} intracelular e aumento de radicais livres. O aumento de Ca^{++} ativa várias enzimas, proteases, fosfolipases, endonucleases e óxido nítrico sintetase o que leva a danos a membrana plasmática, núcleos e ou outras organelas (BLOCK, 1999).

Há uma ampla discussão em relação aos mecanismos de morte celular após a isquemia. Muitos métodos foram utilizados para desvendar este problema e mais tarde muitas conclusões foram questionadas. Atualmente, a análise morfológica ultra-estrutural é um dos métodos mais

fidedignos, principalmente por mostrar as alterações celulares ultra-estruturais, razão pela qual realizamos o presente estudo. Também, existem poucos trabalhos na literatura, especificamente sobre a área CA1 do hipocampo em ratos, sobre o processo de morte celular diagnosticada por meio da microscopia eletrônica após isquemia cerebral global transitória de 10 e 20 minutos, por isto também, nosso estudo será relacionado com outros estudos ultra-estruturais realizados em diferentes espécies de animais, regiões e duração do processo isquêmico. Não esquecendo que existe controvérsias sobre o processo de morte celular entre as diferentes áreas, dependendo da natureza do insulto. As células granulares do hipocampo parecem sofrer apoptose em resposta a estimulação aferente ou adrenalectomia (SLOVITTER et al., 1993a,b). Entretanto, as células granulares sofrem oncose necrótica, em resposta à injeção intra-hipocampal da lectina tóxica volkensin (SLOVITTER et al., 1993b). Desta forma as células granulares podem sofrer tanto oncose como apoptose, presumivelmente dependendo da natureza do insulto. Sabe-se que as diferenças entre necrose apoptótica e necrose oncolítica podem variar segundo as espécies, a severidade do insulto e o método de classificação (CHOI, 1996; PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a).

Há algumas diferenças marcantes entre as vias apoptóticas e oncolíticas de morte celular. O processo segue um programa genético, ou seja, o processo apoptótico, é caracterizada por alterações morfológicas inicialmente marcantes no núcleo através da condensação em grandes grumos arredondados de cromatina que tende a posicionar-se contra a membrana nuclear (KERR et al., 1995). Já na oncose necrótica as alterações iniciais marcantes dão-se principalmente no citoplasma por meio do edema de organelas e o núcleo caracteriza-se pela picnose nuclear, ou seja, a condensação de pequenos grumos irregulares de cromatina livres por todo o nucleoplasma (KERR et al., 1995; TRUMP et al., 1965). Nos dois processos observam-se o rompimento da membrana nuclear e os componentes do núcleo se misturam aos componentes citoplasmáticos, porém a membrana plasmática é rompida somente na necrose oncolítica, pois na apoptose tem-se, em uma fase mais avançada, a formação de corpos apoptóticos originados do brotamento da célula. Em relação aos componentes citoplasmáticos, observa-se que na apoptose as mitocôndrias são normais (KERR et al., 1995; KERR E HARMON, 1991; ARENDS et al., 1990; WYLLIE et al., 1980 a), pois ela é necessária para a formação do ATP, utilizado para o desencadeamento organizado de todas as etapas do processo apoptótico.

Uma variedade de eventos que ocorrem na apoptose designam a mitocôndria, como eixo central, incluindo a liberação de ativadores das caspases, tal como o citocromo c, mudanças no transporte de elétrons, perda do potencial transmembrana mitocondrial, alteração celular da oxirredução e participação de proteínas da família pró e anti-apoptótico Bcl-2, e os diferentes sinais que convergem a partir da mitocôndria iniciam ou inibem estes eventos e seus efeitos traçam as alterações deste tipo de morte celular. Os genes *bcl2*, *bclx2* e *mcl-1* são anti-apoptóticos, enquanto *bax*, *bcl-x3*, *bad*, *bak* e *bik* são pro-apoptóticos (MERY e KORSMEYER, 1997).

Também as sinalizações efetivadas pelo Ca^{++} são essenciais para o controle da maioria dos processos fisiológicos, da injúria celular, bem como, da morte celular programada através da regulação de enzimas dependentes de Ca^{++} , tais como as fosfolipases, proteases e nucleases e, dentre as organelas que participam da regulação do conteúdo intracelular de Ca^{++} estão incluídos o RE e as mitocôndrias. As mitocôndrias possuem múltiplos mecanismos de transporte de Ca^{++} , pelos quais permitem a entrada e a saída de Ca^{++} através da membrana interna. Os membros da família da proteína Bcl-2 são diferentemente reguladas pelos níveis de Ca^{++} intracelular, e por isto dependem da mitocôndria, bem como esta organela, exerce papel primordial na sinalização apoptótica quando ocorre a translocação de Bax, a partir do citosol para a membrana mitocôndrial (SMAILI et al., 2003).

Já na necrose oncótica, observam-se alterações citoplasmáticas precoces através da modificação da morfologia normal de todas as organelas, ocorrendo o edema celular que evolui para a desintegração e a formação final de grandes vacúolos intra-citoplasmáticos. Portanto, na necrose oncótica a mitocôndria, na fase inicial, sofre edema, lise de suas cristas e desintegração (TRUMP et al., 1995). Este aspecto é de fundamental importância para a diferenciação do processo organizado da necrose apoptótica, em relação ao processo desorganizado da necrose oncótica. Entretanto, como demonstrou-se em nosso estudo, apesar de ter encontrado nas fases iniciais algumas características da apoptose, em todos estes neurônios as mitocôndrias apresentavam grandes alterações, o que provavelmente impossibilitou o prosseguimento da morte celular por esta via, pois não foram observados nas fases mais avançadas do processo neurodegenerativo, as características do processo apoptótico. Outro aspecto importante da necrose oncótica ocorre quando os ribossomos dissociam-se do RER, bem como dos

poliribossomos, ficando livres no citoplasma, dando uma aparência densa e granular à matriz citoplasmática, ou seja, aparência eletrônica-densa. Em nosso estudo foi observado este tipo de alteração neuronal.

Serão discutidos todos os períodos de reperfusão estudados e as particularidades que diferenciam os diversos grupos experimentais.

6.1 EPISÓDIOS DE 10 E 20 MIN DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITÓRIA SEGUIDOS DE 2 DIAS DE REPERFUSÃO

A isquemia cerebral global transitória, tanto em roedores (KIRINO, 1982; PULSINELLI et al., 1982) como em humanos (PETITO et al., 1987; HORN e SCHOLTE, 1992) resulta na perda seletiva de neurônios piramidais da área CA1 que tipicamente morrem 48-72 horas após a injúria. Nestes grupos, observaram-se neurônios em diferentes fases do processo pré-letal de morte celular, sendo que a fase inicial predominou sobre as demais fases. A maioria dos neurônios apresentou alterações iniciais e portanto, encontramos grande quantidade de neurônios nesta área do hipocampo que não haviam ainda perdido totalmente suas características morfológicas, supondo desta forma, que não haviam perdido sua funcionalidade e sendo possivelmente passíveis da recuperação através de uma intervenção, a fim de impedir a progressão do processo neurodegenerativo e que segundo Ordy e colaboradores (1993) ainda deixam uma “janela” de oportunidades para intervenção farmacológica vários dias depois do insulto. Kumar e colaboradores (1987) mostraram a importância do retorno da síntese protéica durante a reperfusão precoce, pois 8 horas de reperfusão seguido de parada cardíaca em cães, o potencial de membrana foi perdido e ultra-estruturalmente já haviam ocorrido grandes rupturas no plasmalema. Desta forma White e colaboradores (2000) sugeriram que a proposta terapêutica deveria permitir a síntese de proteínas antes de 4 – 8 horas de reperfusão.

A partir destas constatações, questiona-se sobre qual é o padrão das alterações celulares. Segue um padrão de um programa genético da apoptose ou um padrão da necrose oncolítica ?

Através da análise dos resultados, verificou-se que na fase inicial do processo neurodegenerativo nos grupos de isquemia de 10 e 20 minutos, encontrou-se padrões morfológicos típicos da necrose oncótica, representado pelas alterações citoplasmáticas iniciais através do edema das organelas, tais como, retículo endoplasmático, mitocôndrias, complexo de Golgi, resultando na formação de vacúolos, ou seja, alterações na homeostasia do volume celular e da função mitocondrial. Estas características também foram descritas por vários autores (DEAN, 1987; LAIKO et al., 1971; LAIKO et al., 1975; MERGER et al., 1990). Também foi observado picnose nuclear representado pela condensação de cromatina que aparece com contorno irregular, dispersas no nucleoplasma. Características que foram descritas por Trump e colaboradores (1965) e Kerr e colaboradores (1995) não ser da apoptose. A necrose oncótica é definida como um processo de desintegração citoplasmática rápida na ausência de grumos organizados de cromatina (PORTERA-CAILLIAU et al., 1997a), condizentes, portanto com o que se observou neste estudo. Estes são padrões iniciais de degeneração, nos quais as modificações citoplasmáticas preponderaram sobre as nucleares.

Um outro padrão celular, observado na fase inicial do grupo de 10 min após 2 dias de reperfusão, mostrou uma condensação da cromatina de forma organizada em grumos arredondados. Segundo Kerr e Wyllie (1972), Wyllie e colaboradores (1980); Kerr e Harmon (1991), em estágios iniciais do processo apoptótico mudanças definitivas ocorrem dentro do núcleo como a condensação da cromatina que aparece em número reduzido como massas redondas lisas, uniformemente densas e desintegração nucleolar. Mas nestes tipos, não se observou a compactação de organelas levando a um citoplasma condensado, somente havia edema de organelas, inclusive das mitocôndrias. No estudo de Nitatori e colaboradores (1995) após isquemia cerebral global transitória de 5 min seguido de 3 dias de reperfusão, observaram que o pericário continha numerosos corpos densos e vacúolos envolvidos por membrana contendo numerosas estruturas e partes do citoplasma que pareciam ser vacúolos autofágicos e o perfil da mitocôndria e complexo de Golgi pareciam estar intactos nesta fase. Portanto esta característica diferencia-se da que encontramos, pois já aos 2 dias tanto o complexo de Golgi quanto as mitocôndrias estavam alteradas. No estudo de Sloviter e colaboradores (1993) de animais adrenalectomizados observaram que em estágios precoces as células granulares hipocámpais exibiam massas condensadas de cromatina usualmente na periferia nuclear,

observadas também em nosso estudo, porém neles verificaram-se pequena alteração citoplasmática (RE e mitocôndrias eram relativamente normais). Já em nosso estudo, apesar desta condensação nuclear arredondada, sempre encontrou-se uma grande alteração citoplasmática através do edema das organelas, inclusive das mitocôndrias, e a formação de vacúolos.

Outra característica da fase inicial do processo neurodegenerativo, nos dois grupos, foi o enrugamento nuclear, formando indentações da membrana nuclear acompanhada de edema das organelas. Nitatori e colaboradores (1995) também encontraram após 3 de dias de reperfusão um contorno nuclear freqüentemente indentado, porém em seu estudo, as organelas como complexo de Golgi e as mitocôndrias não estavam alteradas. No entanto, em nosso estudo, observaram-se estas indentações do núcleo associado ao edema das organelas citoplasmáticas, inclusive das mitocôndrias. Assim descartou-se que o processo de morte celular seja apoptótico em nossos animais experimentais, pois neste seria necessário a integridade mitocondrial (WYLLIE et al., 1980a; ARENDS et al., 1990; KERR e HARMON, 1991; KERR et al., 1995), pois elas são necessárias para o processo apoptótico (KROEMER et al., 1995; NEWMAYER et al., 1994; ZAMZAMI et al., 1996).

Alguns neurônios, no grupo de 10 min apresentaram, além da indentação nuclear, uma hiperdensidade nuclear e citoplasmática, sendo que as organelas eram de difícil visualização e a membrana plasmática estava íntegra. Segundo Kerr e colaboradores (1995) e Lashley (1941) as alterações citoplasmáticas, na apoptose, podem ser observadas através da condensação do citoplasma devido a compactação das organelas e estas alterações são freqüentemente associadas com a formação de vacúolos citoplasmáticos translúcidos e a permanência da membrana plasmática intacta. Portanto, estes neurônios mostram algumas características apoptóticas, no entanto as demais alterações celulares condizem com a necrose oncolítica.

Especificamente no grupo de 20 min além das indentações observaram-se outras características, tais como condensação de cromatina contra a membrana nuclear em grandes grupos, diminuição do tamanho nuclear e condensação do citoplasma. Estes tipos possuíam mais que uma característica da apoptose (KERR et al., 1995; LASHLEY, 1941). Em outras células, as

indentações do núcleo eram acompanhadas pela condensação da cromatina, organizada em grandes grumos de forma arredondada, diferentemente da necrose oncótica que ocorre condensação em pequenos grumos, também denominado de picnose nuclear (KERR e HARMON, 1991; KERR e WYLLIE, 1972; WYLLIE et al., 1980). Outras células, no grupo de 20 minutos, somente se diferenciavam destas últimas, por possuir a condensação de cromatina em grandes grumos arredondados acompanhado de edema de organelas e em algumas células identificavam-se vacúolos intra-nucleares. Como já foi comentado, a condensação com este aspecto é uma característica da apoptose. Os vacúolos intra-nucleares foram encontrados por Colbourne e colaboradores (1999) em animais controles (SHAM) de gerbilos, bem como em animais que sofreram um insulto de isquemia cerebral global transitória de 5 min após 4 dias de reperfusão, o citoplasma possuía organelas edemaciadas e não foram encontrados condensação da cromatina em grumos arredondados, possuindo portanto, todas as características do processo de oncose necrótica.

Já outras células caracterizavam-se principalmente por possuir grandes grumos de condensação de cromatina, mas esta contra a membrana nuclear acrescido de um citoplasma com poucas organelas e muitas mitocôndrias intactas. Fukuda e colaboradores (1991) em um estudo de hipóxia-isquemia observaram este evento mas com 4 dias de reperfusão, ou seja, um núcleo com condensação de cromatina e desintegração do citoplasma, sendo que também a maioria das organelas desapareceram do citoplasma com exceção das mitocôndrias e a membrana plasmática estava conservada. Sloviter e colaboradores (1993) também ao observarem as células granulares do giro denteado após adrenalectomia, constataram uma condensação de cromatina usualmente na periferia nuclear, porém com pequena alteração citoplasmática. Estes estudos evidenciaram um processo de apoptose.

Os neurônios que se encontravam na fase intermediária, apresentavam maiores alterações celulares. Alguns eram neurônios eletron-lúcidos, claros, encontrados em ambos os grupos de 10 e 20 minutos. Eles apresentavam como principais alterações, além desta hipodensidade, a ausência de organelas e as que restavam estavam alteradas, inclusive as mitocôndrias. Também mostravam vários vacúolos de diferentes tamanhos, com preservação do núcleo arredondado, porém em muitas destas células não se identificavam mais as membranas plasmática e nuclear.

Através destas características, não se poderia classificar o processo pré-letal de apoptose, pois verificaram-se a ruptura da membrana plasmática em muitos neurônios e alterações mitocondriais, as quais são características morfológicas que deveriam estar preservadas nas fases inicial e intermediária do processo apoptótico.

Embora raramente, foram também encontrados massas degeneradas eletrodensas, nos quais não era mais possível de identificar os componentes celulares. Estas características são condizentes com a fase final do processo degenerativo, quando a célula já morreu e que segundo a classificação dos termos do Comitê da Sociedade de Patologistas Toxicológicos (LEVIN et al., 1999) é denominado de necrose. Como foi descrito, são raramente vistos neste período de reperfusão e se supõe que isto ocorra devido ao fenômeno de morte celular tardia, em que os neurônios morrem 2 a 3 dias após o insulto isquêmico (KIRINO, 1982; PULSINELLI et al., 1982).

Em relação ao neuropilo foi constatado que se apresentava ainda organizado, apesar de algumas regiões possuírem vacúolos, mas estes eram de pequeno e médio tamanho, alguns com material floculento em seu interior, ou seja, materiais que não se consegue definir sua origem, que provavelmente são o resultado da degeneração de alguns componentes celulares em uma fase mais adiantada de edema dos dendritos. Também foram encontradas características precoces da necrose oncótica como o edema de dendritos (JOHANSEN et al., 1984; YAMAMOTO et al., 1990). Esta evidência está de acordo com as alterações que foram encontradas no corpo celular, ou seja, neste estudo a maioria dos neurônios encontravam-se com alterações iniciais, indicando que as células estavam iniciando o processo degenerativo e estava ocorrendo o mesmo com os prolongamentos celulares (dendritos, axônios).

Também foram encontrados células gliais, dentre eles os astrócitos, apresentando filamentos intermediários, mas a quantidade delas era menor se comparada com os grupos de 4 e 10 dias de reperfusão, ademais foram encontrados células microglias.

A ativação microglial pode ser disparada por uma despolarização em resposta a danos, durante e após lesões traumáticas ou injúrias isquêmicas (KETTENMAN et al., 1993). Esta

ativação microglial é caracterizada pela transformação em uma forma celular móvel, fagocítica e que secreta proteases, citocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, além de ser capaz de neurofagia (BANATI et al., 1993).

Em relação a quantidade de filamentos intermediários dos astrócitos, sabemos que de acordo com a estrutura analisada, a quantidade de GFAP pode variar, sendo encontrada em maior quantidade no hipocampo. Podem variar também em forma e tamanho, ou na extensão e ramificação dos processos. No pós-trauma, os astrócitos proliferam, crescem, acumulam glicogênio, aumentam sua atividade metabólica e sofrem fibrose pelo acúmulo de filamentos (HOZUMI et al., 1990; ENG e GHIRNIKAR, 1994; DALBY et al., 1995) e o envelhecimento dos astrócitos também pode provocar este aumento dos filamentos intermediários (RAINE, 1994). Muitos estímulos podem ativar os astrócitos, tais como: físicos, químicos, virais e ou bacterianos (NORENBERG et al., 1994). A astrogliose reativa é um aumento no número de células (hiperplasia); no tamanho das células; na quantidade, ramificação e orientação dos prolongamentos celulares; e na expressão de GFAP e vimentina (hipertrofia). A gliose é quase sempre um fenômeno secundário a eventos neuronais, mas não necessariamente um resultado da degeneração neuronal (SARTHY et al., 1991). Gehlen (2002) verificou que no hipocampo dos animais isquêmicos, houve um aumento geral na imunorreatividade a GFAP quando comparado aos controles. Muitos astrócitos imunorreativos foram observados em todos os estratos da região CA1 e do giro denteado, porém sem alterações na orientação dos processos. As camadas que mostraram maior marcação astrogliar na região CA1, foram as camadas oriens e radiatum, enquanto a camada lacunoso molecular mostrou escassa marcação de GFAP-IR, quando comparados aos controles. Alguns poucos astrócitos GFAP positivos foram observados entre os somas neuronais do estrato piramidal. Nosso estudo não teve como objetivo analisar as células gliais, mas como eram frequentemente encontradas e se destacavam pelo grande número de filamentos intermediários encontrados nos astrócitos achamos conveniente citá-lo, também como proposta para outros estudos sobre a mesma.

Apesar de ter-se encontrado muitos neurônios degenerados, persistiam neurônios sem alterações, e possivelmente estas células foram menos vulneráveis ao insulto isquêmico, porém mais tarde, estas poderão entrar em processo pré-letal da morte celular.

Pelos resultados obtidos foram identificados duas características principais na fase inicial de degeneração. Primeiro, as alterações se iniciam pelo citoplasma através do edema de organelas, inclusive das mitocôndrias e que neste tipo celular a condensação de cromatina era pouco encontrada, e se estava presente era organizada em pequenos grumos e de forma irregular, sendo estas características mais consistentes com a oncose necrótica. Segundo, algumas células mostravam grânulos de condensação de heterocromatina organizado de forma arredondada ou em grandes grumos contra a margem nuclear, características que são mais consistentes com a apoptose, porém no citoplasma as organelas apresentavam-se edemaciadas, sendo esta última característica consistente com a necrose oncótica. Entretanto, nestas células que apresentaram alterações iniciais, algumas delas possuíam características de apoptose e outras com características completas de oncose. Por outro lado, as células com características mais avançadas do processo de morte celular, como as células hipodensas, foram encontradas com maior frequência que as demais, e possuíam alterações não consistentes com apoptose, pois tanto o citoplasma como o núcleo eram eletron-lúcido, o núcleo possuía pouca cromatina e estava organizado de forma irregular e o citoplasma possuía organelas que já perderam totalmente seu aspecto normal, inclusive as mitocôndrias, as quais teriam que estar intactas no processo apoptótico (KERR et al., 1995; KERR e HARMON, 1991; WYLLIE et al., 1980a; ARENDS et al., 1990) e foi visto que isto não ocorre. Tanto nas fases inicial como na intermediária ainda possuíam membranas nuclear e plasmática intactas.

Desta forma, concluímos que não podemos classificar o processo de morte celular por necrose apoptótica, pois somente temos algumas características iniciais, e nenhuma característica mais avançada deste processo como por exemplo o brotamento e a conseqüente formação de corpos apoptóticos (KERR et al., 1995; WYLLIE et al., 1980). Entretanto, a maioria das outras células estariam morrendo por necrose oncótica, e esta última forma predominou sobre a necrose apoptótica.

6.2. EPISÓDIOS DE 10 MIN E 20 MIN DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITÓRIA SEGUIDOS DE 4 DIAS DE REPERFUSÃO

Neste grupo, também foram encontrados neurônios em diferentes fases do processo degenerativo, mas ao contrário do grupo de 2 dias de reperfusão, a maioria dos neurônios já encontravam-se em um processo mais avançado da degeneração, predominando, portanto, as fases intermediária e final. Os neurônios “condenados a morte” já apresentavam alterações avançadas ou já estavam em processo irreversível, de morte celular. Havia neurônios em processo inicial de degeneração, mas estes, não eram muito frequentes. As modificações morfológicas eram grotescas, como uma “explosão celular”. Na maioria dos neurônios havia uma grande desorganização e conseqüentemente, também o neuropilo estava muito alterado. Observaram-se poucos neurônios intactos.

O que diferencia o grupo de 20 min do grupo de 10 min, são as alterações mais bizarras, pois encontraram-se uma maior quantidade de neurônios alterados ou já mortos. O neuropilo estava totalmente desorganizado, apresentando grandes vacúolos.

A isquemia com duração de 10 minutos, em ratos, já foi o suficiente para induzir a lesão hipocampal e o aumento desta para 15 minutos, produziu uma perda de células piramidais em CA1 estimadas em 80 a 85% na região dorsal de CA1 (NETTO et al., 1993). Uma isquemia com duração de 20 minutos foi acompanhada por uma marcada gliose (BLOCK et al., 2001). Um período de reperfusão de 3 dias após um insulto isquêmico induzido por 30 minutos de isquemia, resultou em um número reduzido de células piramidais normais. O percentual de aparência normal dos neurônios variou entre 5 a 30%, dependendo do intervalo de tempo entre o insulto isquêmico e a análise histológica. Os animais apresentaram somente 14%, 15%, 23% e 30% de neurônios normais no 3º, 10º, 15º e 65º dias após a isquemia respectivamente (VERGONI et al., 2000). Em nosso estudo, também observou-se uma grande perda de neurônios com 10 e com 20 minutos de isquemia. Poucas células normais eram identificadas, confirmando os achados da literatura. Ademais, a duração de 20 minutos de isquemia acarretou maiores danos quando comparado com os 10 minutos de insulto isquêmico, porém ambos possuíam a maioria

dos neurônios nas mesmas fases de degeneração. Não podemos estimar a percentagem de neurônios normais, pois não foi o objetivo deste estudo.

Nestes grupos, ocorriam alterações iniciais, começando no citoplasma pelo edema das organelas, incluindo as mitocôndrias, ribossomos dissociando-se do retículo endoplasmático e a desagregação de poliribossomos, ficando livres no citoplasma, que segundo Laiko e colaboradores (1971) e Kerr e colaboradores (1995) são características da necrose oncótica; bem como as características nucleares através da picnose nuclear em pequenos grumos irregulares (TRUMP et al., 1965; KERR et al., 1995). A degeneração de neurônios em CA1, 3 dias após o episódio de isquemia cerebral global transitória de 10 minutos não mostraram características morfológicas de apoptose, tanto na microscopia óptica quanto na eletrônica (MARTIN et al., 1998). Contestabili e colaboradores (1990) também identificaram um padrão de necrose oncótica em células granulares do giro denteado 4 dias após a injeção intra-hipocampal da neurotoxina volkensin, através de alterações citoplasmáticas representado pelo edema de organelas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi.

A fase inicial de degeneração mostrou algumas características do processo apoptótico. Foram visualizadas as indentações nucleares e estas eram acompanhadas por condensação da cromatina contra a membrana nuclear, no entanto, algumas células já mostravam ruptura da membrana nuclear, representando uma fase mais avançada do processo degenerativo, além de edema de organelas e em alguns neurônios, foram observados lisossomos secundários. Em outros neurônios, a condensação da cromatina possuía conformação arredondada, além das demais características citadas. Algumas destas características iniciais são do processo apoptótico. Nitatori e colaboradores (1995) também observaram características apoptóticas na área CA1 piramidal após 5 minutos de isquemia, relatando aos 3 dias após o insulto isquêmico, neurônios com o núcleo indentado e vacúolos envolvidos por membrana contendo estruturas membranosas e partes do citoplasma, o perfil da mitocôndria e o complexo de Golgi estavam intactos e com 4 dias além do núcleo com formato irregular, havia massas densas de cromatina e hiperdensidade celular.

Portanto, pelo exposto observamos que a maioria dos neurônios encontrados possuem alterações de necrose oncótica e alguns mostravam enrugamento nuclear que é uma das características do processo apoptótico. No estudo de Zeng e Xu (2000) foram encontrados coexistência de oncosse e apoptose no hipocampo seguido de isquemia cerebral global transitória por 14 min. Um dia após reperfusão foi observado edema de organelas, com 60 horas rompimento das membranas plasmática e nuclear, e com 3 dias o resto neuronal foi fagocitado por células gliais, ou seja que mostrava características de oncosse necrótica. Porém, com 2 dias de reperfusão foi observado o enrugamento nuclear e agregação de cromatina em forma arredondada, com 60 horas encontraram agregação em grandes grumos arredondados e com 3 dias esta agregação fragmentou-se. Também no trabalho de Zeng e Xu (2000) não foram identificados os corpos apoptóticos e sua possível explicação é que os corpos apoptóticos podem somente existir por um curto tempo no encéfalo seguido de isquemia cerebral e são totalmente fagocitados por células microgliais. Neste estudo somente encontraram-se algumas alterações iniciais do processo apoptótico, porém as mitocôndrias estavam alteradas precocemente e como já foi comentado nas sessões anteriores, ela é fundamental para que o processo ocorra. Não se identificaram as fases avançadas da apoptose e por isto não se pode afirmar que esta via do processo de morte celular ocorra juntamente com a necrose oncótica, como foi achado por Zeng e Xu (2000).

Também foram observados neurônios eletron-lúcidos, claros, com ausência quase total de organelas. Este tipo de alteração morfológica neuronal predominou entre os tipos morfológicos que estavam na fase intermediária de degeneração. Esta hipodensidade mostra o edema celular em uma fase avançada, na qual já podia ser observada a ruptura da membrana plasmática em muitos neurônios.

Outros neurônios possuíam indentações e uma hiperdensidade que não permitia visualizar as organelas, e se visualizadas estavam todas edemaciadas. Outros caracterizavam-se por possuir a hiperdensidade e edema de organelas com ausência de indentações. Zeng e Xu (2000) também encontraram células escuras, mas na área CA3 e os mesmos relatam que estas células podem reverter as alterações a partir do insulto isquêmico, entretanto, não mostravam os motivos que levaram a esta conclusão. Portera-Cailliau e colaboradores (1997), no estudo da progressão ultra-estrutural da morte neuronal excitotóxica mediada pelo receptor NMDA no estriado de rato

adultos, observaram uma neurodegeneração morfologicamente do tipo oncolítica. Visualizaram a fragmentação do retículo endoplasmático, o edema e a vacuolização das mitocôndrias, bem como a matriz citoplasmática que se tornou progressivamente escura e homogeneamente granular, enquanto que, a célula diminuiu de tamanho adquirindo um contorno angular. O núcleo mostrou uma condensação de cromatina em numerosos grumos irregulares e o nucleoplasma também tornou-se uniformemente escuro, enquanto que, o nucléolo permanecia proeminente até as últimas etapas da desintegração celular. Neste estudo, observaram-se a hiperdensidade celular igualmente encontradas por Portera-Cailliau e colaboradores (1997a), que pode ser explicada pelo padrão celular adquirido pela progressão das alterações, sendo que primeiramente as alterações celulares destacam-se pelo edema de organelas e formação de vacúolos em uma fase posterior, decorrente da desagregação dos polirribossomos e do retículo endoplasmático resulta na hiperdensidade celular dando uma aparência mais escura. Ou resulta no outro tipo morfológico encontrado na fase intermediária que é o neurônio hipodenso dando um aspecto mais claro decorrente provavelmente pelo edema intenso de organelas levando à conseqüente ruptura e desaparecimento das mesmas no citoplasma. Na apoptose o citoplasma, também se encontra condensado, porém deverá estar acompanhado de um núcleo com cromatina condensada em grandes grumos arredondados, pois as alterações nucleares ocorrem em uma fase anterior a esta, já na necrose oncolítica, a condensação do citoplasma ocorre em uma fase posterior às alterações das organelas. Portanto, estas características são condizentes com a necrose oncolítica e não com a necrose apoptótica.

Observaram-se grandes massas celulares de degeneração, parecendo não estar envolvido por membrana. E células gliais envolviam estes restos celulares bem como os enormes vacúolos existentes no neuropilo. Zeng e Xu (2000) no estudo realizado com gerbilos após 14 min de isquemia cerebral global transitória seguidos de 4 dias de reperfusão, observaram que as células gliais envolviam os vacúolos estando em fagocitose ativa, e muitos fagossomas foram vistos em seus citoplasmas, assim como organelas e espaços vazios e polirribossomos dispersos. Ou seja, também constataram as mesmas características observadas neste estudo que estão de acordo com a oncolítica necrótica.

Conclui-se que neste período de reperfusão foram detectadas algumas características iniciais do processo apoptótico, porém sempre com predomínio do processo da necrose oncótica, tendo uma mistura da necrose apoptótica e oncoses necróticas. Porém não se pode afirmar que a célula segue o padrão de apoptose até o final pois não encontramos nenhuma indicativa morfológica, ao contrário da necrose oncótica, a qual possui características mais avançadas da via do processo da morte celular.

6. 3 EPISÓDIOS 10 E 20 MINUTOS DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL TRANSITÓRIA SEGUIDOS DE 10 DIAS DE REPERFUSÃO

Nestes dois tempos de isquemia com 10 dias de reperfusão, também foram encontrados neurônios em diferentes fases do processo pré-letal da morte celular, predominando as fases intermediária e final. Diferenciam-se da fase anterior, de 4 dias de reperfusão, pela quantidade de restos celulares encontrados, indicando que as células estão mortas ou necrosadas. Também, diferenciado pela maior organização do neuropilo, os vacúolos de menor tamanho, dando a impressão que os restos celulares da fase anterior já haviam sido reabsorvidos. Ou seja, os neurônios que eram vulneráveis ao insulto isquêmico, já haviam morrido, ou estavam em um processo muito avançado de degeneração. Algumas áreas do neuropilo ainda possuíam grandes vacúolos, embora eram infreqüentes.

Comparando-se o grupo de 20 minutos com o grupo de 10 minutos de isquemia seguidos de 10 dias de reperfusão, observou-se que as alterações daquele grupo eram mais bizarras, o neuropilo ainda estava mais desorganizado, e havia uma maior quantidade de células hipodensas e restos degenerados. Isto sugere uma demora na reorganização tecidual, ou que a reabsorção é mais demorada, devido a isquemia ser mais intensa (20 min) sendo maior o número de células que entram em um processo de degeneração. Pressupõem-se que as células menos vulneráveis desta região resistem ao insulto e acabam morrendo mais tardiamente, resultando em uma imagem mais desorganizada 10 dias após o insulto isquêmico.

Foram encontrados alguns neurônios que se caracterizavam por possuir edema de organelas e outros neurônios, além desta característica também ocorriam vacúolos e a membrana plasmática estava descontínua. Ademais outros neurônios estavam em uma fase mais avançada de degeneração, onde ocorria rompimento de ambas as membranas nuclear e citoplasmática. Estas são características que marcam um processo de necrose oncótica e não da apoptose (KIRINO, 1982; KIRINO e SANO, 1984 a; PETITO e PULSINELLI, 1984; DESHPANDE et al., 1992; COLBOURNE et al., 1999).

Algumas células, observadas no grupo de 10 minutos de isquemia, caracterizavam-se pela alteração da membrana nuclear formando indentações, reduzindo o tamanho do núcleo, acrescidas pelo edema das organelas, inclusive das mitocôndrias e uma certa hiperdensidade celular. Na apoptose ocorre a redução do tamanho do núcleo (WYLLIE et al., 1980 a,b; ARENDS et al., 1990), porém as mitocôndrias, na fase inicial, são necessárias para o processo apoptótico (KROEMER et al., 1995; NEWMAYER et al., 1994; ZAMZAMI et al., 1996). Desta forma, não segue o padrão da apoptose, pois também possui características da necrose oncótica. Já no grupo de 20 minutos de isquemia também foi encontrado este tipo celular com o núcleo indentado, porém apresentava-se hiperdenso sendo difícil a visualização de organelas, encontrando-se alguns vacúolos. Outros possuíam somente grânulos de heterocromatina arredondadas sendo isto uma característica da fase inicial da apoptose. Porém, o resto as características eram escassas para caracterizar o processo apoptótico.

Foram encontradas células que se caracterizavam pela hipodensidade tanto nuclear como citoplasmática com poucas organelas e as presentes estavam alteradas e como já discutimos estas são características da necrose oncótica.

Foram encontrados uma grande quantidade de massas eletron-densas, de intensidade variável de degeneração, umas mais e outras menos escuras, representando um estágio final do processo de morte celular e que o mesmo estava presente em grande quantidade nestes grupos. Na maioria das vezes, não se conseguia mais definir os componentes do mesmo. Não se observavam membranas envolvendo-as e as mesmas apresentavam-se de tamanho considerável (médio para grande). Somente uma massa degenerada visualizada aos 10 min de isquemia apareceu com

formato arredondado e membrana nuclear envolvendo-o. Fato interessante pois na literatura se descreve que na apoptose ocorre a formação de corpos apoptóticos, como última etapa do evento pré-letal antes do resto celular ser reabsorvido, que ocorre a partir da divisão da célula após os componentes do núcleo terem sido misturados com os componentes do citoplasma decorrentes da ruptura da membrana nuclear. Estes corpos apoptóticos estão envolvidos por membrana e englobados por células vizinhas (KERR et al., 1995; WYLLIE et al., 1980 a,b) ou são absorvidos por macrófagos (WYLLIE et al., 1980; ARENDS et al., 1990). Já a descrição ultra-estrutural da morte celular por necrose oncótica, salienta a ruptura tanto da membrana nuclear assim como da citoplasmática e o resto celular fica exposto no neuropilo e ocorre a vinda de células polimorfinucleares estabelecendo-se um processo inflamatório (MARTIN et al., 1998), após também ocorreria um processo de reabsorção pelas células vizinhas ou gliais. Em nosso estudo não foram identificadas células polimorfinucleares e na maioria estes restos celulares possuíam vacúolos ou células gliais na sua vizinhança. Questionamos dois aspectos. Quantos corpos apoptóticos a célula forma durante o processo de degeneração? Não temos dados na literatura sobre isto. Pode a célula formar poucos e grandes corpos de tamanho considerável? Poderia as células polimorfinucleares já terem aparecido e não terem sido captadas por este período de reperfusão? Não temos na literatura descrito quanto tempo é a permanência das mesmas e por este motivo isto poderia ter sido viável. Entretanto, as evidências são de que a morte celular se produz por oncose e não por apoptose, mas isto merece ainda mais estudos com uma ordem cronológica dos acontecimentos nos demais tempos de reperfusão, não realizados neste trabalho.

No neuropilo, a presença, na maioria das vezes, de vacúolos de tamanho reduzido comparado a estágios anteriores, principalmente aos 4 dias, representam um processo final, e possivelmente uma reorganização celular que ocorre após este processo massivo de morte celular. A hipodensidade era uma característica marcante do neuropilo, sugerindo ser dendritos ainda edemaciados e o resultado da reabsorção de vacúolos, agora de menor tamanho. O edema de dendritos seletivamente (JOHANSEN et al., 1984; YAMAMOTO et al., 1990) são achados que não indicam apoptose como a via de morte celular.

Numerosas células gliais e muitas das quais estavam envolvendo e reabsorvendo os restos celulares e os vacúolos. Kirino e Sano (1984 a,b) já salientavam que as células astrocitárias

invadem a camada piramidal de CA1 quando os neurônios piramidais degeneram. Representando a gliose reativa que ocorre após a lesão do tecido nervoso com o fim de reorganizá-lo e substituir o espaço ocupado pelas células agora inexistentes. Zeng e Xu (2000) no estudo com 14 minutos de isquemia em gerbilos, já encontraram com 7 dias de reperfusão, o estrato hipocampal compacto, com vacúolos colapsados e tecido degenerado, muitas células gliais e poucos neurônios, características que foram encontradas neste estudo aos 10 dias de reperfusão. Segundo Ordy e colaboradores (1993) a camada piramidal só apresentou astrócitos reativos após o sexto dia de reperfusão e somente após 14 dias observou-se intensa proliferação astrocitária. Em nosso estudo numerosos astrócitos foram encontrados aos 10 dias de reperfusão.

Kim e colaboradores (1999) estudaram a morte celular de neurônios corticais em cultura após neurotoxicidade de zinco, através de métodos bioquímico e ultra-estrutural. Observaram algumas características da apoptose através da positividade na técnica de TUNEL e pela fragmentação internucleosomal, mas ao realizarem a análise ultra-estrutural verificaram alterações morfológicas consistentes com a necrose oncótica como a ruptura e edema de organelas intracelulares. Outra característica encontrada foram as neurotrofinas e alta concentração de K^+ , que potencialmente reduz várias formas de apoptose neuronal em culturas de neurônios, inclusive de neurônios corticais, porém foram completamente ineficazes na proteção contra a neurotoxicidade de zinco.

Portanto, segundo as observações encontradas concluí-se que nestes grupos de isquemia global transitória de 10 e 20 minutos submetidos a 10 dias de reperfusão, as evidências estão de acordo com as características da necrose oncótica. O período de 10 dias de reperfusão é marcado por alterações finais do processo de morte celular e neste não foram encontradas características do processo avançado de morte celular por apoptose. Nunca foi visualizado nenhum processo de brotamento e formação de corpos apoptóticos.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, sugerimos que:

1) Existem neurônios resistentes à morte celular na área CA1 do hipocampo de ratos machos adultos após isquemia cerebral global transitória de 10 e 20 minutos, pois encontravam-se, em todos os tempos de reperfusão, neurônios com alterações morfológicas nas fases inicial, intermediária e final da degeneração;

2) Não há grandes diferenças no padrão de morte celular entre os grupos submetidos a 10 e 20 minutos de isquemia cerebral global transitória nos diferentes tempos de reperfusão, com exceção do grupo de 20 minutos que possui, em todos os tempos de reperfusão, alterações mais evidentes que os grupos de 10 minutos de isquemia;

3) Os grupos de 10 e 20 minutos de isquemia após 2 dias de reperfusão possuíam ainda grande quantidade de neurônios intactos e a maioria dos neurônios iniciando o processo degenerativo. Poucos neurônios apresentavam alguma característica do processo de morte celular apoptótica e a maioria possuía características da necrose oncótica e portanto, nesta fase encontramos predominância das etapas iniciais e intermediária do processo oncótico;

4) Os grupos com 4 dias de reperfusão após episódios de 10 e 20 minutos de isquemia possuíam a maioria dos neurônios alterados e em fase mais avançada do processo degenerativo, não sendo encontrado nenhuma característica do processo avançado da apoptose e somente da necrose necrótica;

5) Os grupos com 10 dias de reperfusão após episódios de 10 e 20 minutos de isquemia também possuíam a maioria dos neurônios em degeneração avançada, porém os poucos neurônios restantes apresentaram o neuropilo já em reorganização. Nenhuma característica do processo avançado da apoptose foi encontrada, assim como nos grupos de 4 dias; logo sugerimos que a morte celular isquêmica aconteça por necrose oncótica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M.P. Specific semantic memory loss after hypoxic-ischemic injury. **Neurology**, v. 48, p.165-73, 1997.
- AMARAL, D.G; WITTER, M.P. Hippocampal formations. In: Paxinos, G. **The rat nervous system**. Sidney: Academic Press, 1995.
- AMES, A; WRIGHT, L; KOWADA, M; THURSTON, J. M; MAJNO G. Cerebral ischemia: the no-reflow phenomenon. **Am. J. Pathol.**, v. 52, p.437-53, 1968
- AMES, A; EARLIES, T. Irreversible changes during ischemia. **Am. J. Emerg. Med.**, v.2, p. 139-43, 1983.
- ANDERSON, K.J; NELLGARD, B; WIELOCH, T. Ischemia-induced upregulation of excitatory amino acid transport sites. **Brain Res.**, v.622, n. 1-2, p. 93-8, 1993.
- ARAKI, T; KATO, H.; INOUE, T.; KOGURE, K. Regional impairment of protein synthesis following brief cerebral ischemia in the gerbil. **Acta Neuropathol.**, v. 79, p. 501-5, 1990.
- ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. **Amer. J. Pathol.**, v. 136, p. 593-608, 1990.
- BANATI, R.; GERHMANN,J.; SCHUBERT, P.; KREUTZBERG, G.W. Cytotoxicity of microglia. **Glia**, v. 7, p. 111-118, 1993.
- BASSETI, C; BOMIO, F; MATHIS, J; HESS, C.W. Early prognosis in coma after cardiac arrest: a prospective clinical, electrophysiological, and biochemical study of 60 patients. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.**, v. 61, p. 610-5, 1996.
- BENVENISTE, H.; JORGENSEN, M.B.; SANDBER, G.M.; CHRISTENSEN, T.; HAGERG, H.; DIEMER, N.H. Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate release and intact innervation from CA3. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.9, n. 5, p.629-39, 1989.
- BICKNELL, G.R.; COHEN, G.M. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 207, p. 40-7, 1995.
- BLACKSTAD, T.W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J. Comp. Neurol.**, v. 105, p.417-537, 1956.

BLOCK, F.; BOZDAG, I.; NOLDEN-KOCK. Inflammation contributes to the postponed ischemic neuronal damage following treatment with a glutamate antagonist in rats. **Neurosc. Let.**, v. 298, p. 103-6, 2001.

BLOCK, F. Global Ischemia and Behavioural Deficits. **Progr. in Neurobiol.**, v.58, p.279-95, 1999.

BODSCH, W.; BARBIER, A.; OEHMICHEN, M., OPHOFF, B.C.; HOSSMANN, K.A. Recovery of monkey brain after prolonged ischemia II. Protein synthesis and morphologic alterations. **J. Cereb. Blood. Flow. Metab.**, v.6, p. 22-33, 1985.

BONNEKOH, P.; BARBIER, A.; OSCHLIES, U.; HOSSMANN, K.A. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus: morphological changes after 5 min. Ischemia and long survival times. **Acta Neuropathol.**, v. 80, p. 18-25, 1990.

BRAUGHTER, J.M. Lipid peroxidation induced inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes: Protection by glucocorticoids. **J. Neurochem.** v. 44, p. 1282-6, 1985.

BRODAL, A. **Neurological anatomy in relation to clinical medicine.** Oxford: Oxford University Press, 1981.

BREDESEN, D.E. Keeping neurons alive: the molecular control of apoptosis. **Neuroscientist**, v.2, p. 211-6, 1996.

BUTTYAN, R. Genetic response of prostate cells to androgen deprivation: Insights into the cellular mechanism of apoptosis. In L.D. Tomei and F.O. Cope (eds): **Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.157-173, 1991.

BUZSAKI, G.; FREUND, T.F.; BAYARDO, F.; SOMOGYI, P. Ischemia-induced changes in the electrical activity of the hippocampus. **Exp. Brain Res.**, v.78, n.2, p.268-78, 1989.

CHARKE, P.G.H. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat. Embryol.**, v.181, p. 195-213, 1990.

CHOI, D.W. Ischemia-induced neuronal apoptosis. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.6, p.667-72, 1996.

CHRONISTER, R.B.; WHITE, L.E. Fiberarchitecture of the hippocampal formation: anatomy, projections, and structural significance. In: Isaacson RL, Pribram KH, eds. **The hippocampus: Structure and development.** New York: Plenum Press 1, 1975.

CHU-WANG, I.W.; OPPENHEIN, R.W. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. A light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development. **J. Comp. Neurol.**, v.177, p.33-58, 1978.

COLBORNE, F.; SUTHERLAND, G.R.; AUER, R.N. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. **J. Neurosc.**, v.11, n. 19, p. 4200-10, 1999.

COLLINS, J.A.; SCHADI, C.A.; YOUNG, K.K.; VESELY, J.; WILLINGHAM, M.C. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.** v. 45, p. 923-34, 1997.

COLLINS, R.J.; HARMON, B.V.; GOBÉ, G.C.; KERR, J.F.R. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 61, p. 451-453, 1992.

COLUMBANO, A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. **J. Cell. Biochem.**, v. 58, p.181-190, 1995.

CONTESTABILE, A.; FASOLO, A.; VIRGILI, M.; MIGANI, P.; VILLNI L.; STIRPE F. Anatomical and neurochemical evidence for suicide transport of a toxic lectin, volkensin, injected in the rat dorsal hippocampus. **Brain Res.**, v. 537, p. 279-286, 1990.

COOPER, R.A.; CASSILETH, P.A., KUO, A.L. Inhibition of sterol and phospholipid synthesis in HL-60 promyelocytic leukemia cells by inducers of myeloid differentiation. **Cancer Res.**, v. 25, p. 1462-8, 1984.

CRAIN, B.J.; WESTERKAM, W.D.; HARRISON, A.H.; NADLER, J.V. Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. **Neuroscience**, v. 27, p. 387- 402, 1988.

CUNNINGHAM, T.J.; MOHLER, I.M.; GIODANO, D.L. Naturally occurring neuron death in the ganglion cell layer of the neonatal rat: Morphology and evidence for regional correspondence with neuron death in superior colliculus. **Dev. Brain Res.**, v. 2, p. 203-215, 1980.

DALBY, N. O.; RONDOUIN, G.; LERNER-NATOLI, M. Increase in GAP-43 and GFAP immunoreactivity in the hippocampus subsequent to perforant path kindling. **J. Neurosc. Res.**, v. 41, p. 613-9, 1995.

DAUDERS, J.W. Death in embryonic systems. Death of cells in the usual accompaniment of embryonic growth and differentiation. **Science**, v. 154, p. 604-12, 1966.

DEAN, R.T. Some critical membrane events during mammalian cell death. In: Potten, C.S., ed. **Perspectives on mammalian cell death**. New York: Oxford University Press, 1987.

DeGRACIA, D.J.; O'NEIL, B.J.; FRISCH, C.; KRAUSE, G.S.; SKJAERLUND, J.M.; WHITE, B.C.; et al.. Studies of the protein synthesis system in the brain cortex during global ischemia and reperfusion. **Resuscitation** , v. 21, p. 161-70, 1993.

DESHPANDE, J.; BERGSTEDT, K.; LINDEN, T.; KALIMO, H.; WIELOCH, T. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. **Exp. Brain Res.**, v.88, p. 91-105, 1992.

DIEMER, N.H.; JOHANSEN, F.F.; JORGENSEN, M.B. N-methyl-D-aspartate and non-n-methyl-D-aspartate antagonists in global cerebral ischemia. **Stroke**, v. 21, p.39-42, 1990.

DIXON, K.C. **Ischaemia and the neuron. Neurohistochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1965.

- DREJER, J.; BENVENISTE, H.; DIEMER, NH.; SCHOUSBOE, A. Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. **J. Neurochem.** v. 45, p. 145-51, 1985.
- ELLIS, R.E.; JACOBSON, D.M.; HORVITZ, H.R. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *C. elegans*. **Genetics**, v.129, p.79-94, 1991.
- ENG, L.F; GHIRNIKAR, R.S. GFAP and astrogliosis. **Brain Pathol.**, v. 4, p.229-37, 1994.
- ERECINSKA, M.; SILVER, I.A. **Loss of neuronal Calcium homeostasis in ischemia. Primer on Cerebrovascular Diseases.** New York: Academic Press., 1997.
- FARBER, J.L.; CHIEN, K.R.; MITTNACHT, S. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. **Am. J. Pathol.**, v.102, p. 271-81, 1981.
- FARBER, E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. **Med. Pathol.**, v.7, p. 605-9, 1994.
- FAROOQUI, A.Q; HAUN, S.E; HORROCKS, L. A. Ischemia and hipoxia. In: GJ. Siegel. **Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.** 5ª ed. New York: Raven Press Ltda, 1994.
- FAROOQUI, A. A.; HAUND, S. E.; HORROCKS, L. A. Ischemia and Hipoxia. In: G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers and P. B. Mollinoff. **Basic Neurochemistry.** New York: Raven Press, 1995.
- FREEMAN, R.S.; ESTUS, S.; HORIGOME, K.; JOHNSON Jr., E.M. Cell death genes in invertebrates and (maybe) vertebrates. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 3, p. 25-31, 1993.
- FURASTÉ, P.A. **Normas técnicas para o trabalho científico. Explicação das normas da ABNT.** 11. ed. Porto Alegre: Dáctilo Plus, 2002.
- FURUTA, S.; OHTA, S.; HATAKEYAMA, T; NAKAMURA, K.; SAKAKI, S. Recovery of protein synthesis in tolerance-induced hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. Berlim, **Acta Neuropathol.**, v.86, p. 329-36, 1993.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, S.A.; BEM-SASSON. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v.119, p. 493-501, 1992.
- GAO, T.M.; PULSINELLI, W.A; XU, Z.C. Prolonged potentiation and depression of synaptic transmission in CA1 pyramidal neurons induced by lethal ischemia in vivo. **Neuroscience**, v. 87, p. 371-383, 1998.
- GEHLEN, G. **Efeitos do lítio sobre a gliose reativa induzidos por isquemia global transitória no hipocampo de ratos adultos.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.
- GERSCHENSON, L.E.; RTELLO, R.J. Apoptosis: A different tupe of cell death. **J. FASEB.**, v.6, p. 2450-5, 1992.

GINSBERG, S.D; BUSTO, R. Rodent Models of Cerebral Ischemia. **Stroke**, v. 20, p. 1627-42, 1989.

GLUCKSMANN, A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. **Biol. Rev.**, v.26, p. 59-86, 1951.

GOLD, R; SCHMIED, M; GIEGERICH, G; BREITSCHOPF, H; HARTUNG, H.P; TOYKA, K.V. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. **Lab. Invest.**, v. 71, p. 219-25, 1994.

GOTO, K.; ISHIGE, ^a; SEKIGUCHI, K.; LIZUKA, S.; SUGIMOTO, A.; YUZURIHARA, M.; ABURADA, M.; HOSOYA, E.; KOGURE, K. Effects of cicloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus. **Brain Res.**, v. 534, p.117-9, 1990.

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. **Fasbeb. J.**, v.21, p. 1465-1468, 1995.

GULYAS, A, L.; PARRA, P.; MILES, R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? **Neuron.**, v.200, n.5, p.983-93, 1998.

GWAG, B.J; LOBNER, D; KOH, J.Y; WIE, M.B; CHOI, D.W. Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation *in vitro*. **Neuroscience**, v. 68, p. 615-9, 1995.

HAECKER, G., VAUX, D.L. Viral, worm and radical implications for apoptosis. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, p. 99-100, 1994.

HALE, A.J.; SMITH, C.A.; SUTHERLAND, L.C.; STONEMAN, V.E.A.; LONGTHORNE, V.L.; CULHANE, A.C., et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. **Eur. J. Biochem.**, v. 236, p. 1-26, 1995.

HAMBURGER, V.; LEVI-MONTALCINI, R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. **J. Exp. Zool.**, v.111, p. 457-501, 1949.

HATA, R.; MACADA, K.; HERMANN, D.; MILES, G.; HOSSMANN, K.A. Dynamics of regional brain occlusion in mice. **J. Cereb. Blood. Flow Metab.**, v. 20, p. 306-15, 2000.

HAUG, F.M.S. Sulphide silver pattern and cytoarchitectonics of parahippocampal areas in the rat. **Adv. Cell Biol.**, v. 52, p. 7-73, 1976.

HJORTH-SIMONSEN, A; LAURBERG, S. Commissural connections of the dentate area of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 174, p. 591-606, 1977.

HORN, M; SCHLOTE, W. Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia. **Acta Neuropathol.**, v. 85, p. 79-87, 1992.

HOSSMAN, K.A.; SAKAKI, S.; KIMOTO, K. Cerebral uptake of glucose and oxygen in the brain after cat brain after prolonged ischemia. **Stroke**, v.7, p. 301-5, 1976.

HOZUMI, I.; CHIU, F.; NORTON, W.T. Biochemical and immunocytochemical changes in glial fibrillary acidic protein after stab wounds. **Brain Res.**, v.524, p. 64-71,1990.

HSU, M; SIK, A; GALLYAS, F; HORVÁTH, Z; BUSKÁKI, G. Short-term and long-term changes in the postischemic hippocampus. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 743, p. 121-39, 1994.

ISHIZUKA, N; WEBER, J; AMARAL, D.G. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 295, p. 580-623, 1990.

JACOBSON, M.D.; URNE, J.F.; RAFF, M.C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. **EMBO. J.**, v. 13, p. 1899-910, 1994.

JENKINS, L.W.; POVLISHOCK, J.T; LEWELT, W.; MILLER, J.D.; BECKER, D.P. The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. **Acta Neuropathol.**, v. 5, p. 205-20, 1981.

JOHANSEN, F.F; JORGENSEN, M.B; EKSTROM VON LUBITZ. D.K.J; DIEMER, N.H. Selective dendrite damage in hippocampal CA1 stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 291, p. 373-7, 1984.

KERR, J.F.R. A histochemical study of hypertrophy ischaemic injur of rat liver with special reference to change in lysosomes. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 90, p. 4-19-35, 1965.

KERR, J.F.R. An electron-microscopic study of liver cell necrosis due to heliotrine. **J.Pathol.**, v. 97, p. 557-62, 1969.

KERR, J.F.R; WYLLIE, A.H; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetic. **Br. J. Câncer**, v. 26, p. 239-57, 1972.

KERR, J.F.R; HARMON, B.V. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. **Apoptosis: The molecular basis of cell death**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.

KERR, J.F.R; GOBÉ, G.C; WINTERFORD, C.M; HARMON, B.V. Anatomical methods in cell death. **Cell death**. New York: Academic Press, 1995.

KETTENMAN, H.; BANATI, R.; WALZ, W. Electrophysiological behavior of microglia. **Glia**, v. 7, p. 93-101, 1993.

KINDY, M.S.; CARNEY, J.P.; DEMPSY, R.J.; CARNEY, J.M. Ischemic induction of protooncogene expression in gerbil brain. **J. Mol. Neurosci.**, v. 2, p. 217-28, 1991.

KIRINO, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. **Brain Res.**, v. 239, p. 57-69, 1982.

KIRINO, T; SANO, K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. **Acta Neuropathol.** v. 62, p. 201-8, 1984a.

KIRINO, T; SANO, K. Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. **Acta Neuropathol.**, v. 62, p. 209-18, 1984b.

KLEIHUES, P., HOSSMANN, K.A. Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *In: Brain Res.*, v. 35, p. 409-18, 1971.

KNOWLES, W.D. Normal Anatomy and Neurophysiology of the Hippocampal Formation. **J. Clin. Neurophysiol.**, v.2, n. 9, p. 252-263, 1992.

KNOWLES, W.D.; SCHWARTZKROIN, PA. Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. **J. Neurosci.**, v.1, p.318-22, 1981a.

KNOWLES, WD; SCHWARTZKROIN, P.A. Axonal ramifications of hippocampal CA1 pyramidal cells. **J. Neurosci.**, v.1, p.1236-41, 1981b.

KOGURE K.; KATO H. Neurochemistry of Stroke. *In: Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management.* New York: Churchill Livingstone, 1993.

KOZUKA, M; KOBAYASHI, K; IWATA, N. Changes in glucose utilization in the rat brain after transient forebrain ischemia. **Stroke**, v. 10, n. 24, p.1568-75, 1993.

KRAUSE, G.S.; NAYINI, N.R.; WHITE, B.C.; HOENHER, T. J.; GARRITANO, A., M.; O'NEIL, B.J. et al. Natural course of iron delocalization and lipid peroxidation following a 15 minute cardiac arrest in dogs. **Ann. Emerg. Med.**, v. 16, p. 1200-5, 1987.

KRAUSE,G.S; WHITE, B.C; AUST, S.D; NAYINI, N.R; KUMAR, K. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. **Crit. Care Med.**, n. 16, p. 714-26,1988.

KRAUSE,G.S.; DeGRACIA, D.J; SKJAERLUND, J.M, O'NEIL, B.J. Assessment of free radical-induced damage in brain proteins after ischemia and reperfusion. **Resuscitation**, v. 23, p. 59-69, 1993.

KRISTIAN, T; SIESJO, BK. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**, v. 29, p. 705-18, 1988.
KROEMER, G; PETIT, P.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIERE, J.L.; MIGNOTTE,B. The biochemistry of programmed cell death. **J. FASEB**, v. 9, p. 1277-1287, 1995.

KUMAR, K.; GOOSMANN, M.; KRAUSE, G.S.; NAYINI, N.R.; ESTRADA, R.; HOEHNER, T.J., et. al. Ultrastructural and ionic changes in global ischaemic dog brain. **Acta Neuropathol.**, Berlin, v.73, p. 393-9, 1987.

KUNKEL, D.D.; LACAILLE, J.C.; SCHWARTZKROIM, P.A. Ultrastructure of stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. **Synapse**, v.2, p.382-94,1988.

LACAILLE, J.C.; MUELLER, A.L.; KUNKEL, D.D.; SCHWARKROIN, P.A. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. **J. Neurosci.**, v. 7, p.1979-93, 1987.

LAIHO, K.U; SHELBURNE, J.D; TRUMP, B.J. Observations on cell volume, ultrastructure, mitochondrial conformation and vital-dye uptake in Ehrlich ascites tumor cells. **Am. J. Pathol.**, v. 65, p. 203-30, 1971.

LAIKO, K.U; TRUMP, B.J. Studies on the pathogenesis of cell injury. Effects of inhibitors of metabolism and membrane function on the mitochondria of Ehrlich ascites tumor cells. **Lab. Invest.**, v.32, p. 163-82, 1975.

LASHLEY, K.S. Thalamo-cortical connections of the rat's brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 75, p. 67-121, 1941.

LATOV, N.; NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E.A.; JOHNSON, W.G.; SILVERMAN, A.J.; DEFENDINI, R.; COTE, L. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury: a study combining immunoperoxidase technique for glial fibrillary acidic protein and radioautography of tritiated thymidine. **Dev. Biol.**, v.72, n. 2, p. 381-4, 1979.

LEVIN, S. Commentary: A toxicologic pathologist's view of apoptosis blues. **Toxicol. Pathol.**, v. 23, p. 533-9, 1995.

LEVIN, S.; BUCCI, T.J.; COHEN, S.M.; FIX, A.S.; HARDISTY, J.F.; LeGRAND, E.K.; MARONPOT, R.R.; TRUMP, B.F. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc committee of the Society of Toxicologic Pathologists. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, n. 4, p. 484-90, 1999.

LINDVALL, O.; ERNFORS, P.; BENGZON, J.; KOKAIA, Z.; SMITH, M.L; SIEJO, B.K, et al. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 648-52, 1992.

LOCKSHIN, R.A; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis. Edited by LD Tomei and FO Cope. **Apoptosis: The molecular basis of cell death**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.

LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. Continuation of the study of the ammonia system. **J. Psychol. Neurol.**, v. 46, p.113-77, 1934.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v.146, p. 3-15, 1995.

MARTIN, L.J.; AL-ABDULLA, N.A.; BRAMBRINK, A.M.; KIRSCH, J.R.; SIEBER, F.E.; PORTERA-CAILLIAU, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Brain Res.**, v.4, n. 46, p. 281-309, 1998.

MATSUMOTO, K.; YAMADA, K.; HAYAKAWA, T.; SAKAGUCHI, T.; MOGAMI, H. RNA synthesis and processing in the gerbil brain after transient hindbrain ischaemia. **Neurol. Res.**, v. 12, p. 45-8, 1990.

MEIS, G.; PACHEN, W.; HOSSMANN, K.A. Cerebral blood flow, glucose utilization, regional glucose, and ATP content during the maturation period of delayed ischemic injury in gerbil brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 10, p. 638-45, 1990.

MERGNER, W.J.; JONES, R.T.; TRUMP, B.J. **Cell death: Mechanisms of acute and lethal cell injury**. New York: Field & Wood, 1990.

MERRY, D.E.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 gene family in the nervous system. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 20, p. 245-67, 1997.

MILES, R.; WONG, R.K.S. Excitatory synaptic interaction between CA3 neurons in the guinea-pig hippocampus. **J. Physiol.**, v. 373, p. 397-418, 1986.

MILES, R. Synaptic excitation of inhibitory cells by single CA3 hippocampal pyramidal cells of the guinea-pig *in vitro*. **J. Physiol.**, v. 428, p. 61-77, 1990.

MILES, R.; WONG, R.K.S. Unitary inhibitory synaptic potentials in the guinea hippocampus *in vitro*. **J. Physiol.**, v. 356, p. 97-113, 1984.

MONAGHAN, D.T.; HOLETS, V.L.; TOY, D.W.; COTMAN, C.W. Anatomical distributions of four pharmacologically distinct [3H]-L- glutamate binding sites. **Nature**, v. 306, p. 176-9, 1993.

NEGOVSKII, V.A. **Resuscitation and artificial hypothermia**. New York: Consultants Bureau, 1962.

NETTO, C.A.; HODGES, H.; SINDEN, J.D.; LEPEILLET, E.; KERSHAU, T.; SOWINSKI, P.; MELDRUM, B.S.; GRAY, J.A. Foetal grafts from hippocampal region superior alleviate ischaemic - induced behavioral deficits. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 107-112, 1993.

NEWMAYER, D.D.; FARSCHEON, D.M.; REED, J.C. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: Inhibition by bcl-2 and requirement for and organelle fraction enriched in mitochondria. **Cell**, v. 79, p. 353-64, 1994.

NITATORI, T.; SATO, N.; WAGURI, S.; KARASAWA, Y.; ARAKI, H.; SHIBANAI, K.; KOMINAMI, E.; UCHIYAMA, Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. **J. Neurosci.**, v. 15, n.2, p. 1001-11, 1995.

NORENBERG, M.D. The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 27, p. 756-62, 1979.

NORENBERG, M.D. Astrocyte responses to CNS injury. **J. Neuropathol. Exp. Neurology**, v. 53, p. 213-220, 1994.

NOWAK Jr., T.S. Localization of 70 kDa stress protein mRNA induction in gerbil brain after ischemia. **J. Cereb. Blood. Flow Metab.**, v. 11, p. 432-9, 1991.

NOWAK Jr., T.S. Synthesis of a stress protein following transient ischemia in the gerbil. **J. Neurochem**, v. 45, p. 1635-41, 1985.

OLNEY, J.W. **Neurotoxicity of amino acids**. New York: Raven Press, 1978.

OLNEY, J.W. Excitotoxins, an overview. **Excitotoxins**. New York: Plenum, 1984.

O'NEIL, B.J.; KRAUSE, G.S.; WHITE, B.C. Thymine glycols and pyrimidine dimers in brain DNA during post-ischemic reperfusion. **Resuscitation**, v. 21, p. 41-55, 1991.

ONODERA, H.; KOGURE, K.; ONO, Y.; IGARASHI, K.; KIYOTA, Y.; NAGAOKA, A. Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. **Neurosci. Lett.**, v. 98, p. 101, 1989.

OOBOSHI, H.; SADOSHIMA, S.; YAO, H.; IBAYASHI, S.; MATSUMOTO, T.; UCHIMURA, H.; FUJISHIMA, M. Ischemia-induced release of amino acids in the hippocampus of aged hypertensive rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 15, n. 2, p. 227-34, 1995.

ORDY, J.M.; WENGENACK, T.M.; BIALOBOCK, P.; COLEMAN, P.D.; RODIER, P.; BAGGS, R.B.; DUNLAP, W.P.; KATEST, B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Exp. Neurol.**, v. 119, p. 128-39, 1993.

RODRIGO, J.; PEINADO, M.A.; SANCHEZ, E.; PEDROSA, J.A.; BENTURA, M.L.; ESTEBAN, F.J.; TORRES, M.I.; MARTINEZ-MURILLO, R. **Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica**. In PEINADO, M.A.; RODRIGO, J.; PEDROSA, J. A. Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas: Jaén: Universidad, 1996.

PETITO, C.K.; PULSINELLI, W.A. Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 4, p. 194-205, 1984.

PETITO, C.K.; FELDMANN, E.; PULSINELLI, W.A.; PLUM, F.A. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. **Neurology**, v. 37, p. 1281-86, 1987.

PILAR, G.; LANDMESSER, L. Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. **J. Cell. Biol.** v. 68, p. 339-56, 1976.

POLLARD, H.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; CANTAGREL, S.; REPRESA, A.; ROBAIN, O.; MORAU, J.; BEN-ARI, Y. Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 63, n. 7-18, 1994.

PORTERA-CAILLIAU, C.; HEDREEN, J.C.; PRICE, D.L.; KOLIATSOS, V.E. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 3775-87, 1995.

PORTERA-CAILLIAU C; PRICE, D.L; MARTIN, L.J. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: Further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. **J. Comp. Neurol.**, v.378, p 88-104, 1997-a.

PORTERA-CAILLIAU,C; PRICE, D.L; MARTIN, L.J. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. **J. Comp. Neurol.** v. 378, p. 70-87, 1997-b.

PULSINELLY, W.A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog. Brain Res.**, v. 63, p. 29-37, 1985.

PULSINELLI, WA.; BRIERLEY,J.B.; PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann. Neurol.**, v.11, n.5, p. 491-8, 1982.

PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke**, v10, n.3, p. 267-72, 1979.

RAFFIN, C.N.; HARRISON, M.; SICK, T.J.; ROSENTHAL, M. EEG suppression and anoxic depolarization: influences on cerebral oxygenation during ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 11, n.3, p. 407-15, 1991.

RAINE, C.S. Neurocellular Anatomy. In: SIEGEL, G.L. **Basic Neurochemistry**. 5.ed. New York: Raven Press, 1994.

RAMÓN Y CAJAL S. **Histologie du Systeme Nerveu de l' Homme et des Vértèbres**. Paris: Maloine, 1911.

REMPEL-CLOWER, N.L.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R.; AMARAL, D.G. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. **J. Neurosci.** v.16, p. 5233-55, 1996.

RISCHKE,R.; RAMI, A.; BACHMANN,U.; RABIE,^a; KRIEGLSTEIN, J. Activated astrocytes, but not pyramidal cells, increase glucose utilization in rat hippocampal CA1 subfield after ischemia. **Pharmacology**, v.45, n. 3, p.142-53, 1992.

ROBBINS, C.K. **Patología Estructural y Funcional**. 4.ed. Madrid: Interamericana Mcgrae-Hill, 1990.

ROBERTS,S.; MORELOS, B.S. Role of ribonuclease action in phenylalanine-induced disaggregation of rat cerebral polyribosomes. **J. Neurochem.**, v. 26, p. 387-400,1976.

ROETTGER,V.; LIPTON, P. Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during in vitro ischemia. **Neuroscience**, v.75, n. 3, p. 677-85, 1996.

ROSA NETO, P.R. 1998. **Efeitos da isquemia e do pré-condicionamento isquêmico sobre a atividade das enzimas glicogênio fosforilase ativa (FC 2.4.1.1) e citocromo oxidase (EC 2.4.1.1) no hipocampo de rato**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.142, 1998

ROTHMAN, S.M. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. **J. Neurosci.**, v. 4, p. 1884-91, 1984.

SARTHY, P.V.; FU, M.; HUANG, J. Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina. **Cell and Molecular Neurobiology**, v. 11, p. 623-38, 1991.

SAUDERS, J.W. Death in embryonic systems. **Science**, v. 154, p. 604-12, 1966.

SCHARFMAN, H.E., KUNKEL, D.D.; SCHWARTZKROIN, P.A. Synaptic connections of dentate granule cells and hilar neurons: results of paired intracellular recordings and intracellular horseradish peroxidase injections. **Neuroscience**, v. 37, p. 693-707, 1990.

SCHLANDER, M.; FROTSCHER, M. Non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. A combined Golgi-electron microscope study. **Anatomy and Embryology**, v.174, p.35-47, 1986.

SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 599-636, 1991.

SCHREIBER, S.S.; BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus: a role for genes expression. **TINS**, v.18, p. 446-51, 1995.

SCHWARTZ, L.M.; SMITH, S.W.; JONES, M.E.E.; OSBORNE, B.A. Do all programmed cell deaths occurs via apoptosis **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 980-4, 1993.

SCREMIN, O.U. Cerebral vascular system. *In*: G. Paxinos. **The rat nervous system**. Sidney: Academic Press, 1997.

SENGELAUB, D.R.; FINLAY, B.L. Cell death in the mammalian visual system during normal development: I. Retinal ganglion cells. **J. Comp. Neurol.**, v. 204, p.311-7, 1982.

SHAW, P.J.; BATES, D.; CARTLIGDE, N.E.F.; FRENCH, J.M.; HEAVISIDE, D.; JULIAN, D.G.; SHAW, D.A. Neurologic and neuropsychological morbidity following major surgery: comparison of coronary artery bypass and peripheral vascular surgery. **Stroke**. v.18, p. 700-7, 1987.

SHEARDOWN, M.J.; NIELSE, E.O.; HANSEN, A.J.; JACOBSEN, P.; HONORE, T. 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sufamoyl-benzo (F) quinoxaline: A neuroprotect for cerebral ischemia. **Science**, v. 247, p. 571-4, 1990.

SHIGENO, T.; YAMASAKI, Y.; KATO, G.; KUSAKA, K.; MIMA, T.; TAKAKURA, K.; GRAHAM, D.I.; FURUKAWA, S. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. **Neurosci. Lett.**, v.120, p.117-9, 1990.

SIEJO, B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia I. Pathophysiology. **J. Neurosurg.**, v. 77, p. 169-84, 1992.

SIESJO, B.K.; KRISTÍAN, T. **Cell calcium homeostasis and calcium related ischaemic damage. Primer on Cerebrovascular Diseases**. New York: Academic Press, 1997.

SLOVITER, R.S.; DEAN, E.; NEUBORT, S. An electron microscopic analysis of adrenalectomy-induced hippocampal granule cells in the mature rat brain after adrenalectomy. **Science**, v. 243, p. 535-538, 1993.

SLOVITER, R.S.; DEAN, E.; OLLAS, A.L.; GOODMAN, H. Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. **J. Comp Neurol.**, v. 366, p. 516-533, 1996.

SLOVITER, R.S.; DEAN, E.; NEUBORT, S. Electron microscopic analysis of adrenalectomy-induced hippocampal granule cell degeneration in the rat: apoptosis in the adult central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, v. 330, p.337-51,1993.

SMALL, S.S.; HSU, Y.T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENTROCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 183-90, 2003.

STORM-MATHISEN, J. Glutamate in hippocampal pathways. Glutamate as a neurotransmitter. **Adv Biochem Psychopharmacol.**, v. 27, p. 43-55, 1981.

SUGAWARA, Y.; NIU, A.; SHIMAZAK, K.; MIZUI, T.; KAWAI, N. Heterotopic graft of infant rat brain as a ischemia model for prolonged whole brain ischemia. **Neurosci. Let.**, v. 325, p.37-41, 2002.

SUZUKI, R.; YAMAGUCHI, T.; LI, C.L.; KLATZO, I. The effects of 5-minutes ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. **Acta Neuropathol.**, v. 60, p.217-22, 1983.

SWANSON, L.W.; KÖHLER, C.; BJÖRKLUND, A. The limbic region. I. The septohippocampal system. *In*: A Björklund, T Hökfelt, and LW Swanson, eds. **Handbook of Chemical Neuroanatomy Integrated Systems of the CNS**. Part I. Amsterdam: Elsevier 5, p.125-22,1987.

TAYLOR, D.; OBRENOVITCH, T.P.; SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochem. Res.**, v. 21, n.9, p.1013-21, 1996.

THILMANN, R.; XIE, Y.; KLEIHUS, P.; KIESSLING, M. Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in post-ischemic gerbil hippocampus. **Acta Neuropathol.**, v. 71, p. 88-93, 1986.

TIFFANY, B.R.; WHITE, B.C.; KRAUSE, G.S. Nuclear-envelope nucleoside triphosphate kinetic and mRNA transport following brain ischemia and reperfusion. **Ann. Emerg. Med.**, v. 25, p. 809-17, 1995.

TRAUB, R.D.; MILES, R. **Neuronal networks of the hippocampus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

TRAYNELIS, S.F.; CULL-CANDY, S.G. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. **Nature**, v.345, p. 347-50, 1990.

TRUMP, B.J.; GOLDBLATT, P.J.; STOWELL, R.E. Studies of mouse liver necrosis in vitro. Ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei. **Lab. Invest.**, v. 14, p. 1969-99, 1965.

TRUMP, B.F. Reply to commentary: Cell death is alive and well. **Toxicol. Pathol.**; v.23; p. 617-621, 1995.

WHITE, B.C.; DeGRACIA, D.J.; KRAUSE, G.S.; SKJAERLUND, J.M.; O'NEIL, B.J.; GROSSMAN, L.; I. Brain DNA survives cardiac arrest and reperfusion. **Free Radic. Biol. Med.**, v.10, p. 125-35, 1991.

WHITE, B.C.; SULLIVAN, J.M.; DeGRACIA, D.J.; O'NEIL, B.J.; NEUMAR, R.W.; GROSSMAN, L.I.; RAFOLS, J.A.; KRAUSE, G.S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J. Neurol. Sci.** v.179, p. 1-33, 2000.

WIDMANN, R.; KUROIWA, T.; BONNEKO, H.; HOSSMANN, K.A. [¹⁴C] - Leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. **J Neurochem**, v. 56, p. 789-96, 1991.

WIELOCH, T.; GUSTAVSON, I.; WESTERBERG, E. The NMDA antagonist MK-801 is cerebro-protective in situations where some energy production prevails but not under conditions of complete energy deprivation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 9, p. 1-6, 1989.

WITTER, M.P.; GROENEWEGEN, H.J. Laminar origin and septo-temporal distribution of entorhinal and perirhinal projections to the hippocampus in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 224, p.371-85, 1984.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: The significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980-a.

WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, p. 555-6, 1980-b.

XIE, Y.; HERGET, T.; HALLMAYER, J.; STARZINSKI-POWITZZ, A.; HOSSMANN, K.A. Determination of RNA content in postischemic gerbil brain by in situ hybridizations. **Met. Brain. Dis.**, v. 4, p. 239-51; 1989.

XU, Z.C.; GAO, T.M.; REN, Y. Neurophysiological changes associated with selective neuronal damage in hippocampus following transient forebrain ischemia. **Biol. Signals Recept.**, v. 8, p. 294-308, 1999.

ZAKERI, Z; BURSCH, W.; TENNISWOOD, M.; LOCKSHIN, R.A. Cell death: [Programmed, apoptosis, necrosis, or other? **Cell Death Differ.**, v. 2, p. 87-96, 1995.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, A.S.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GÓMEZ-MONTERREY, I.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J. Exp. Med.**, v.183, p.1533-44, 1996.

ZENG, Y.S; XU, Z.C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neurosci. Res.** v.37, p.113-25, 2000.

YAMAMOTO,K.; HAYAKAWA,T.; MOGAMI,H.; AKAI,F.; YANAGIHARA,T.
Ultrastructural investigation of the CA1 region of the hippocampus after transient cerebral ischemia in gerbils. **Acta Neuropathol.**, v. 80, p. 487-92, 1990.

YOSHIDOMI, M.; HAYASHI, T.; ABE, K.; KOGURE, K. Effects of a new calcium channel blocker, KB-2796, on protein synthesis of the CA1 pyramidal cell and delayed neuronal death following transient forebrain ischemia. **J. Neurochem.**, v. 53, p. 1589-94, 1989.