

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA SOBRE A FOSFORILAÇÃO
E O IMUNOCONTEÚDO DA PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA
EM HIPOCAMPO DE RATOS.

LAUREN MARTINS VALENTIM

Orientadora

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO

Co-orientador

CARLOS ALEXANDRE NETTO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

1998

' O cérebro humano é uma máquina extraordinária,
que começa a operar quando
a gente nasce e só pára quando a gente levanta
para falar em público.'

Luis Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

À Christianne, pela orientação maravilhosa e pela amizade;
Ao Alex, co-chefe, pela orientação e pelos ótimos conselhos;
Ao Rod, pelo apoio em todas as pesquisas do grupo FPC;
À Paulette, Simone e Trícia, pelo socorro nas horas tumultuadas no laboratório;
À Cecília, por todo o apoio durante a realização do projeto;
À Carmem e ao C.A. pelas consultas constantes e pela correção da tese;
À Gissele e Silvana, por tudo;
À Beti, Suca, Denize, Ju, Danis, Carla e Guido, por serem amigos maravilhosos;
À Nice e ao grupo da isquemia, pela participação no projeto;
Ao Günther, pela ajuda na etapa final da tese;
À minha família, pelo amor que dá a todas as pessoas;
Aos meus pais, por me apoiarem em todos os meus projetos, incondicionalmente.

RESUMO

Os astrócitos desempenham diversas funções no cérebro e respondem a diferentes tipos de injúrias ao SNC. Esta resposta é conhecida como gliose reativa, e inclui alterações na Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), a principal componente dos filamentos intermediários dos astrócitos. Animais submetidos à isquemia cerebral transitória apresentam morte neuronal no campo CA₁ do hipocampo, enquanto as células do giro dentado não sofrem lesão aparente, fenômeno conhecido como vulnerabilidade seletiva. Foram estudadas, nas regiões CA₁ e giro dentado do hipocampo de ratos, alterações no estado de fosforilação e imunoconteúdo de GFAP, depois de um insulto isquêmico transitório, utilizando a técnica de eletroforese bi-dimensional de proteínas marcadas com ³²P, seguido de *immunoblotting* usando anticorpo anti-GFAP. Foram estudados diferentes tempos de reperfusão (1, 4, 7, 14 e 30 dias) e observou-se que, na região CA₁, a fosforilação e o imunoconteúdo de GFAP tiveram um aumento significativo em todos os períodos estudados, indicando uma gliose reativa. No giro dentado, que é uma área resistente, a fosforilação e o imunoconteúdo de GFAP sofreram um aumento depois de 4 dias de reperfusão, mantendo-se significativo até 30 dias, o que sugere que a morte neuronal não é o único fator determinante da gliose. Após 7 dias de reperfusão, observou-se uma queda na porcentagem de proteína fosforilada, indicando uma resposta dos astrócitos do giro dentado à morte neuronal na região CA₁. Os animais "controle cirúrgico" não apresentaram alterações na GFAP. A sinapsina I uma proteína neuronal, apresentou um decréscimo transitório na incorporação de ³²P, assim como uma proteína ainda desconhecida, chamada Cpp-40. Também foi observado o aparecimento transitório de uma proteína ainda não descrita, a pp25, que foi observada em estudos anteriores em nosso laboratório. Mudanças nas fosfoproteínas dos astrócitos podem ser essenciais para a resposta plástica das células gliais ao dano neuronal, já que neurônios e astrócitos podem agir como uma unidade funcional envolvida na homeostase, plasticidade e neurotransmissão.

ABSTRACT

Astrocytes carry out a large number of different functions in brain and they respond to several types of CNS injuries. This response is known as reactive gliosis, and include alterations in Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), the major component of intermediate filaments in astrocytes. Transient cerebral ischemia induces neuronal death in CA₁ hippocampal region, whereas cells of dentate gyrus survive; this process is known as selective vulnerability. We studied changes in the phosphorylation state and immunocontent of GFAP, in CA₁ and dentate gyrus regions of the hippocampus, after a transient ischemic insult, using bi-dimensional electrophoresis of ³²P-labelled proteins, followed by immunoblotting using policlonal anti-GFAP antibody. We studied different times of reperfusion (1, 4, 7, 14 and 30 days) and noticed that, in CA₁ region, phosphorylation and immunocontent of GFAP were significantly increased in all periods after ischemia, indicating a reactive gliosis. In dentate gyrus, a resistat area, phosphorylation and immunocontent increased after 4 days of reperfusion and remained significant until 30 days, what suggests that neuronal death is not the only determinant factor for gliosis. After 7 days of reperfusion, there was a decrease in the percentage of phosphorylated protein, indicating a response of DG astrocytes to the CA₁ neuronal death. Sham-operated animals did not show any alterations in GFAP. Sinapsin I, a neuronal protein, presented a transient decrease in the incorporation of ³²P, which also occurred with an unknown protein, named Cpp-40. We also noticed the transient appearance of an undescribed protein, pp25, that was detected in previous studies in our laboratory. Changes in astrocytic phosphoproteins may be essential for the plastic response of glial cells to the neuronal damage, as neurons and astrocytes can act as functional units involved in homeostasis, plasticity, and neurotransmission.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. NEURÔNIOS	1
2. CÉLULAS GLIAIS	2
2.1 Oligodendrócitos, Células de Schwann e Microglia	4
2.2 Astrócitos	4
3. INTER-RELAÇÃO NEURÔNIO-GLIA E GLIA-GLIA	6
3.1 Relações Glia-Glia	7
3.2 Relações Neurônio-Glia	7
4. CITOESQUELETO	8
4.1 Filamentos de Actina	9
4.2 Microtúbulos	9
4.3 Filamentos Intermediários (FI)	10
4.3.1 FIs nas Células Gliais	11
5. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SNC	13
5.1 Proteínas Quinases Caracterizadas no SNC	14
5.2 Proteínas Fosfatases Caracterizadas no SNC	15
5.3 Fosfoproteínas Neurais	16
6. LESÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	17
6.1 Gliose Reativa	18
6.1.1 Características da Astrogliose Reativa	18
6.1.2 Microglia Reativa e Sistema Imune	20
6.1.3 Extensão da Gliose	20
6.1.4 Gliose: Benéfica ou Prejudicial para os Neurônios?	21
6.2 Sinaptogênese Reativa	22
6.3. Isquemia	22
6.3.1 Modelos Experimentais	23
6.3.2 Hipocampo- Vulnerabilidade Seletiva	23
6.3.3 GFAP e Astrócitos	24
6.3.4 Fosforilação de Proteínas	25
6.3.5 Estado Energético das Células e Acidose Láctica	26
6.3.6 Cálcio	26
6.3.7 Glutamato	27
6.3.8 Radicais Livres	28
6.3.9 Expressão Gênica e Síntese de Proteínas	29
6.3.10 Morte Celular Isquêmica	29
6.3.11 Papel dos Astrócitos na Plasticidade	30
OBJETIVOS	32
MATERIAL E MÉTODOS	33

1. MATERIAIS	33
2. CIRURGIA	33
3. MARCAÇÃO	34
4. ANÁLISE DAS FOSFOPROTEÍNAS	36
4.1 Eletroforese Bidimensional	36
4.1.1 Primeira Dimensão - NEPHGE	36
4.1.2 Segunda Dimensão - SDS – PAGE	37
5. “IMMUNOBLOTTING”	38
6. QUANTIFICAÇÃO E ESTATÍSTICA	39
RESULTADOS	41
1. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE A GFAP NA REGIÃO CA₁	44
1.1 Fosforilação	44
1.2 Imunoconteúdo	46
2. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE A GFAP NO GIRO DENTEADO (DG)	47
2.1 Fosforilação	47
2.2 Imunoconteúdo	48
3. ANIMAIS “CONTROLE CIRÚRGICO”	49
4. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE OUTRAS FOSFOPROTEÍNAS	51
4.1 pp25	51
4.2 Sinapsina I	54
4.3 Cpp-40	57
DISCUSSÃO	60
1. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE A GFAP	60
1.1 Região CA ₁	60
1.2 Região DG	62
1.3 Animais “controle cirúrgico”	63
2. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE OUTRAS FOSFOPROTEÍNAS	63
2.1 pp25	63
2.2 Sinapsina I	64
2.3 Cpp-40	65
CONCLUSÕES	67
PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Neurônio do SNC de vertebrados, mostrando suas estruturas: corpo celular, dendritos, axônio, bainha de mielina e nódulo de Ranvier. Baseado em Kandel, 1995. _____	1
FIGURA 2: As células do SNC e suas inter-relações: astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, células endoteliais e células ependimais. VS: vaso sanguíneo; M: superfície da meninge; V: espaço ventricular. _____	3
FIGURA 3: Astrócitos de córtex em cultura, marcados com anticorpo anti-GFAP (x250). Segundo Eng e Lee, 1995. _____	5
FIGURA 4: Arranjo helicoidal das moléculas de actina no filamento. Segundo Alberts, 1994. _____	9
FIGURA 5: Visão lateral de um microtúbulo, mostrando as moléculas de tubulina alinhadas, formando os protofilamentos. Segundo Alberts, 1994. _____	10
FIGURA 6: Modelo atual da formação de filamentos intermediários. A) monômero; B) dímero; C) tetrâmero antiparalelo com 4 cadeias polipeptídicas; D) dois tetrâmeros associados; E) filamento intermediário de 10 nm. Segundo Alberts, 1994. _____	12
FIGURA 7: Representação esquemática do sistema de fosforilação de proteínas, mostrando alguns dos agentes regulatórios. Baseado em Nestler e Greengard, 1995. _____	13
FIGURA 8: Diagrama hipotético ilustrando o envolvimento de receptores glutamatérgicos, íons cálcio e degradação de fosfolipídios de membrana durante a isquemia cerebral. ACPD-R, KA/AMPA-R e NMDA-R: receptores glutamatérgicos; DAG: diacilglicerol; G: proteína G; IP3: inositol tri-fostato; PIP2: fosfoinositol bisfosfato; PKC: proteína quinase C; PL: fosfolipídio; PLA2: fosfolipase A2; PLC: fosfolipase C; VSCC: canais de cálcio dependentes de voltagem. Baseado em Faroogui, 1995. _____	28
FIGURA 9: Diagrama ilustrativo, mostrando as etapas do processo de isquemia cerebral experimental descrito no texto. _____	33
FIGURA 10: Representação esquemática do hipocampo, mostrando as regiões CA1 e giro denteado. Os círculos representam as áreas em que foram retiradas as micofatias. Segundo Paxinos e Watson, 1986. _____	34
FIGURA 11: Primeira dimensão. _____	36
FIGURA 12: Segunda dimensão. _____	38
FIGURA 13: Sistema de anticorpos usados para a imunodeteção. _____	39
FIGURA 14: Fotografia ilustrativa do efeito da isquemia cerebral sobre as células neuronais do hipocampo. A seta indica a ausência de células piramidais na região CA ₁ e a cabeça de seta mostra a manutenção da camada celular no giro denteado. Corado com cresil-violeta. _____	42
FIGURA 15: Autorradiografia indicando as fosfoproteínas alteradas pela isquemia. Exemplo da região CA ₁ , com 7 dias de reperfusão. g-GFAP; s- Sinapsina I; c- Cpp-40; p- pp25 _____	43
FIGURA 16: Conjunto de autorradiografias mostrando as alterações no perfil de fosforilação da GFAP na região CA ₁ do hipocampo em diferentes tempos de reperfusão. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	44

FIGURA 17: Alterações no estado de fosforilação da proteína GFAP na região CA ₁ do hipocampo nos períodos de 1 a 30 dias após o insulto isquêmico (n, em média, 7 animais). _____	45
FIGURA 18: Alterações na fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP detectadas na nitrocelulose; região CA ₁ (n, em média, 7 animais). _____	46
FIGURA 19: Autorradiografias comparativas do estado de fosforilação da GFAP em giro denteado no decorrer dos períodos de reperfusão considerados. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	47
FIGURA 20: Alterações no perfil de fosforilação da região DG do hipocampo (n, em média, 7 animais). _____	48
FIGURA 21: Alterações na fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP na região DG na nitrocelulose (n, em média, 7 animais). _____	49
FIGURA 22: Perfil de fosforilação e porcentagem de proteína fosforilada da região CA ₁ de animais "controle cirúrgico" (n, em média, 4 animais). _____	50
FIGURA 23: Perfil de fosforilação e porcentagem de proteína fosforilada da região DG de animais "controle cirúrgico", nos diferentes períodos após a cirurgia (n, em média, 4 animais). _____	50
FIGURA 24: Autorradiografias comparativas da incorporação de ³² P pela proteína pp25 durante os diferentes tempos de reperfusão na região CA ₁ . A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	52
FIGURA 25: Conjunto de autorradiografias ilustrando a incorporação de ³² P pela proteína pp25 no giro denteado durante os períodos de reperfusão estudados. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	53
FIGURA 26: Porcentagem de aparecimento da pp25 nas amostras analisadas, nas regiões CA ₁ e giro denteado durante os períodos analisados após o insulto isquêmico. _____	54
FIGURA 27: Conjunto de autorradiografias mostrando as alterações na fosforilação da sinapsina I, na região CA ₁ do hipocampo, durante os períodos de reperfusão analisados. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	55
FIGURA 28: Autorradiografias ilustrando as modificações no estado de fosforilação da proteína sinapsina I em giro denteado em diferentes períodos depois da isquemia. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	56
FIGURA 29: Autorradiografias comparativas do perfil de fosforilação da Cpp-40 na área CA ₁ em diferentes períodos depois da lesão isquêmica. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	57
FIGURA 30: Autorradiografias ilustrativas do estado de fosforilação da Cpp-40 em giro denteado nos períodos de reperfusão estudados. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias. _____	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Meio de incubação	TABELA 2: Solução de amostra	35
TABELA 3: SDS- PAGE		37
TABELA 4: Quantificação visual da incorporação de ^{32}P , na região CA ₁ , pelas proteínas pp25, Sinapsina I e Cpp-40 depois de um insulto isquêmico.		59
Tabela 5: Quantificação visual do estado de fosforilação das proteínas pp25, Sinapsina I e Cpp-40, em giro denteado, em diferentes tempos de reperfusão.		59

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAE – Aminoácido Excitatório
- CA – corno de Ammon (*cornus ammonis*)
- CaMK II – Ca²⁺ - calmodulina quinase II (*Ca²⁺/ Calmodulin Kinase II*)
- AMP – Adenosina Mono-Fosfato (*Adenosine Mono-Phosphate*)
- ATP – Adenosina Tri-Fosfato (*Adenosine Tri-Phosphate*)
- CREB – *Cyclic AMP Response Element-Binding protein*
- DAG – Diacil Glicerol
- DARPP-32 – fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina e AMP cíclico
(*Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa*)
- DG – Giro Denteado (*Dentate Girus*)
- FI – Filamento Intermediário
- GABA – Ácido Gama-Amino Butírico (*Gama- Amino Butiric Acid*)
- GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)
- GMP – Guanosina Mono-Fosfato (*Guanosine Mono-Phosphate*)
- IP₃ – Inositol tri-Fosfato (*Inositol Phosphate*)
- LTP – Potenciação de Longa Duração (*Long Term Potentiation*)
- MAPK – Proteína Quinase Associada aos Microtúbulos (*Microtubule-Associated Protein Kinase*)
- MARCKS – *Myristoiled Alanin-rich C Kinase Substrate*
- mgluR – Receptor Glutamatérgico do tipo Metabotrópico
- mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro
- NC – Nitrocelulose
- NEPHGE – Eletroforese em Gradiente de pH não Equilibrado (*Non-Equilibrated pH Gradient Electrophoresis*)
- NMDA-R – Receptor Glutamatérgico do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato)
- KA/AMPA-R – Receptor Glutamatérgico do tipo Cainato/AMPA
- NO – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)
- PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

PIP – Fosfatidil Inositol Bisfosfato (*Phosphatidil Inositol Phosphate*)
PKA – Proteína Quinase A (*Protein Kinase A*)
PKC – Proteína Quinase C (*Protein Kinase C*)
PL – Fosfolípido (*Phospholipid*)
PLA2 – Fosfolipase A₂ (*Phospholipase A₂*)
PLC – Fosfolipase C (*Phospholipase C*)
PP1 – Proteína Fosfatase tipo 1 (*Protein Phosphatase 1*)
PP2A – Proteína Fosfatase do tipo 2A (*Protein Phosphatase 2A*)
PP2B – Proteína Fosfatase tpo 2B (*Protein Phosphatase 2B*)
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
TBS – Solução Salina Tamponada com Tris (*Tris-Buffered Saline*)
TCA – Ácido Tri-cloro Acético (*Trichloroacetic Acid*)
TEMED – Tetrametil – Etilenodiamina (*Tetramethyl-Ethylenediamine*)
4VO – Oclusão dos 4 Vasos (*4-Vessel Occlusion*)
VSCC – Canal de Cálcio Dependente de Voltagem (*Voltage-Sensitive Calcium Channel*)

INTRODUÇÃO

1. NEURÔNIOS

Os neurônios são células que diferem de todas as outras por serem excitáveis, isto é, eles apresentam potenciais elétricos por causa do fluxo de íons para dentro e para fora das células. A excitabilidade resulta de proteínas especializadas na membrana dos neurônios (os canais de íons e bombas de íons que utilizam ATP). Um neurônio típico tem quatro regiões morfológicas definidas: corpo celular, axônio, dendritos e terminais pré-sinápticos (FIGURA 1). O corpo celular é o centro metabólico da célula. Dele saem usualmente dois tipos de processos: os dendritos, que podem estar em número bastante grande, e o axônio, usualmente único. O axônio é a principal unidade condutora do neurônio; como ele pode sofrer ramificações, leva a informação a diferentes alvos (KANDEL *et al.*, 1995).

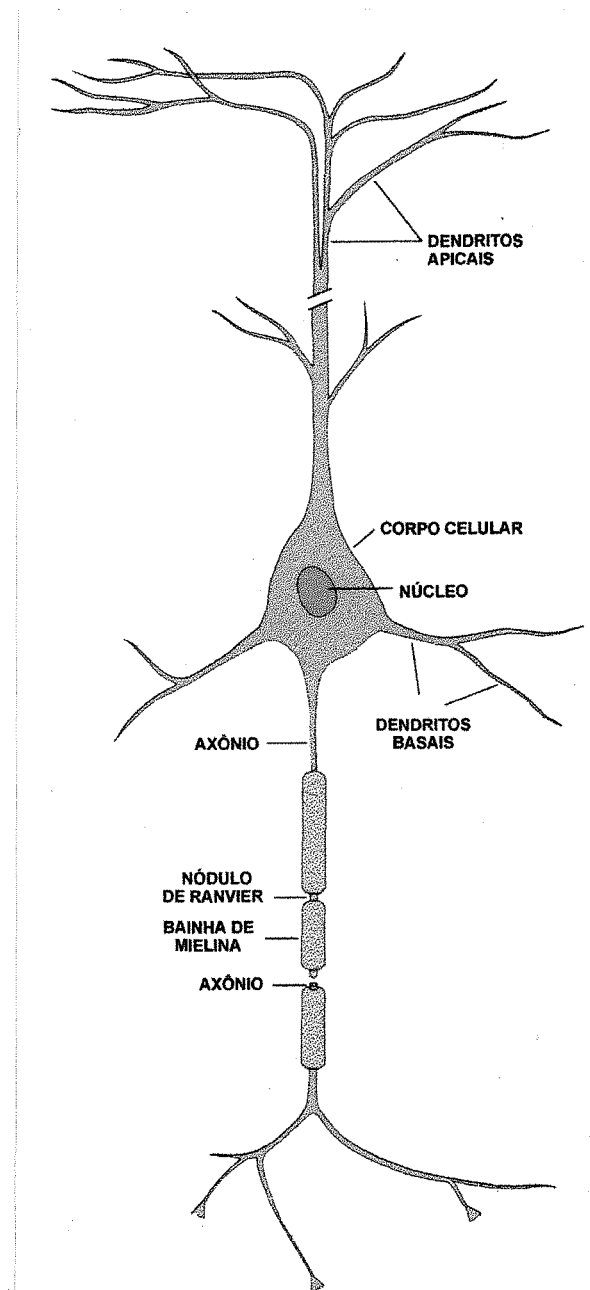


FIGURA 1: Neurônio do SNC de vertebrados, mostrando suas estruturas: corpo celular, dendritos, axônio, bainha de mielina e nódulo de Ranvier. Baseado em Kandel *et al.*, 1995.

Transmissão Sináptica: Axônios e dendritos provenientes de diferentes neurônios se intercomunicam por junções complexas conhecidas como sinapses, as quais transmitem o potencial de ação de um neurônio para outro. As sinapses acontecem, principalmente, através da liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico, que se ligam a receptores e abrem, direta ou indiretamente, canais iônicos. As sinapses podem ser excitatórias ou inibitórias, quando despolarizam ou hiperpolarizam a membrana, respectivamente (KANDEL *et al.*, 1995). Uma célula nervosa central pode receber conexões de centenas de neurônios, algumas excitatórias, outras inibitórias. No Sistema Nervoso Central (SNC) os impulsos para uma única célula são mediados por uma variedade de neurotransmissores, cada um controlando diferentes canais iônicos. Os neurônios podem, portanto, integrar diferentes impulsos em uma resposta coordenada (RAINE, 1994).

As sinapses têm uma certa seqüência de ação: 1) os terminais pré-sinápticos contêm inúmeras vesículas sinápticas carregadas de neurotransmissores, que são liberados na fenda sináptica em resposta a um influxo de cálcio que ocorre durante o potencial de ação; 2) as moléculas de transmissor difundem-se na fenda sináptica e ligam-se a receptores específicos na membrana da célula pós-sináptica, alterando seu potencial de ação. Desta maneira, os neurônios passam as informações de uma célula para outra (ERULKAR, 1994).

2. CÉLULAS GLIAIS

Em 1846, Virchow reconheceu a existência no SNC de células não-neuronais, com aspecto estrelado ou alongado, às quais ele deu o nome de neuroglia ("nerve glue"). Somente no início do século XX estes elementos intersticiais foram classificados como tipos celulares distintos. Os dois grupos mais conhecidos de células gliais são a macroglia, que inclui astrócitos e oligodendrócitos, e a microglia (RAINE, 1994).

Embora seu nome seja originado da palavra grega para "cola", as células gliais não exatamente prendem as células umas às outras. Na verdade, elas desempenham um papel essencial no processamento das informações e têm inúmeros papéis vitais, como: servir como elementos de suporte, promovendo

firmeza e estrutura ao cérebro; produzir mielina; remover detritos depois de injúria ou morte neuronal; tamponar a concentração de íons potássio no espaço extracelular; recaptar neurotransmissores; orientar a migração de neurônios durante o desenvolvimento; formar, junto com as células ependimais, a barreira hemato-encefálica que evita que substâncias tóxicas do sangue entrem no cérebro, fornecer suporte energético para o metabolismo neuronal entre outras funções (KANDEL *et al.*, 1995; KEISER E PELLMAR, 1994; BARRES, 1991; FORSYTH *et al.*, 1996). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que há uma íntima comunicação entre neurônios e células gliais, estabelecendo uma importante relação entre os dois principais elementos do SNC (FIGURA 2) (CHIU E KRIEGLER, 1994; GLOWINSKI *et al.*, 1994; ATTWELL, 1994).

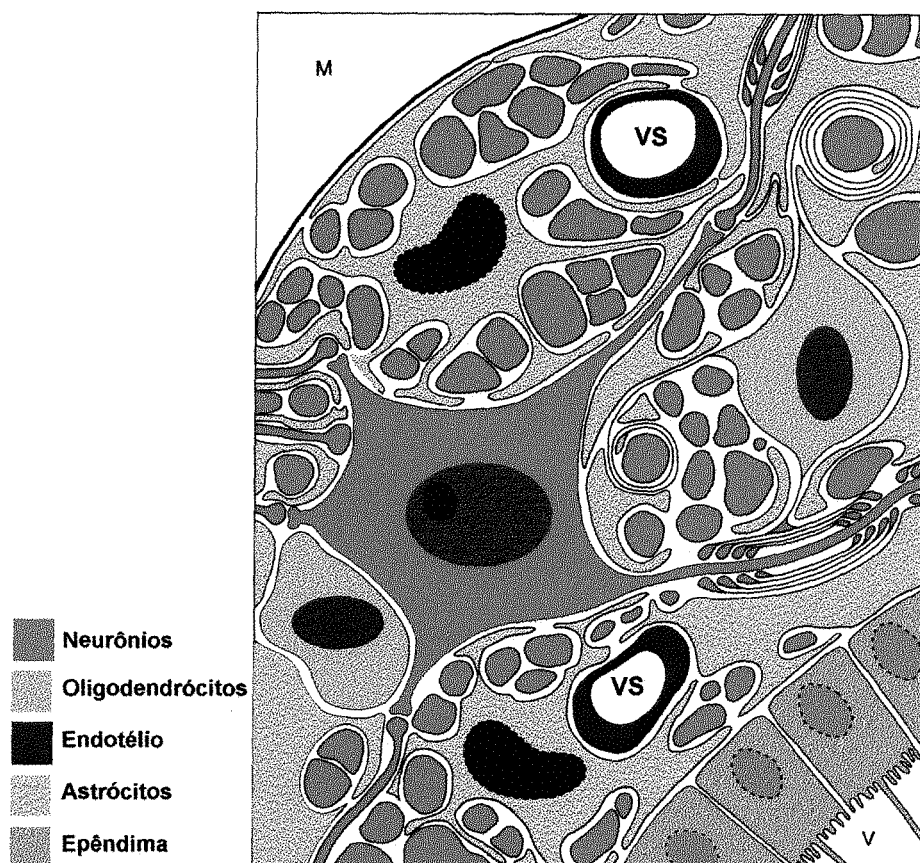


FIGURA 2: As células do SNC e suas inter-relações: astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, células ependimais e células endoteliais. **VS:** vaso sanguíneo; **M:** superfície da meninge; **V:** espaço ventricular.

Numa escala filogenética ascendente, a preponderância numérica da glia sobre os neurônios, já conhecida em roedores, aumenta muito em primatas e atinge seu ápice nos humanos, que tem o maior número de células gliais (RAISMAN, 1991). Diferentemente das células neuronais, as células gliais mantêm sua capacidade proliferativa no cérebro de mamíferos adultos, havendo uma constante perda e proliferação de células para manter o equilíbrio. Esta característica das células gliais torna-se particularmente importante na resposta à injúria ou doenças no SNC (JACOBSON, 1991). Este aspecto será discutido com maiores detalhes adiante.

2.1 Oligodendrócitos, Células de Schwann e Microglia

Os oligodendrócitos e células de Schwann são definidos como sendo as células que fazem e mantêm a mielina. São células pequenas, com poucos processos, que se “enrolam” nos axônios formando um espiral, a bainha de mielina. Cada oligodendrócito (que ocorre no SNC) pode envolver vários axônios, enquanto as células de Schwann (que ocorrem no SNP) envolvem somente um axônio cada (KANDEL *et al.*, 1995; SZUCHET, 1995).

As células da microglia representam em torno de 10% do total de células gliais. Elas estão localizadas no cérebro normal em estado de repouso e tornam-se macrófagos ativos quando acontece um distúrbio, por isso desempenham um papel na fagocitose e em respostas inflamatórias (RAINE, 1994). São células de corpo pequeno, com núcleo denso e numerosas ramificações. Sua ampla capacidade plástica em resposta às lesões tornou-as alvo de intensos estudos. Depois de um insulto patológico, as células microgлияis tendem a se tornar hipertrofiadas, com processos robustos e, se ocorrer neurodegeneração, elas continuam sua metamorfose e se tornam macrófagos cerebrais arredondados (STREIT, 1995a).

2.2 Astrócitos

Os astrócitos constituem o tipo de células gliais presentes em maior número no SNC. Seus corpos celulares têm forma estrelada e freqüentemente

apresentam processos relativamente longos, cujas extremidades envolvem os capilares sanguíneos deixando somente pequenas regiões para a difusão de substâncias dos capilares para os espaços extracelulares do cérebro (BRADFORD, 1985).

Há dois tipos de astrócitos: os fibrosos, que ocorrem na substância branca e têm numerosas fibrilas, e os protoplasmáticos, presentes na substância cinzenta, que contêm poucas fibrilas (FIGURA 3).

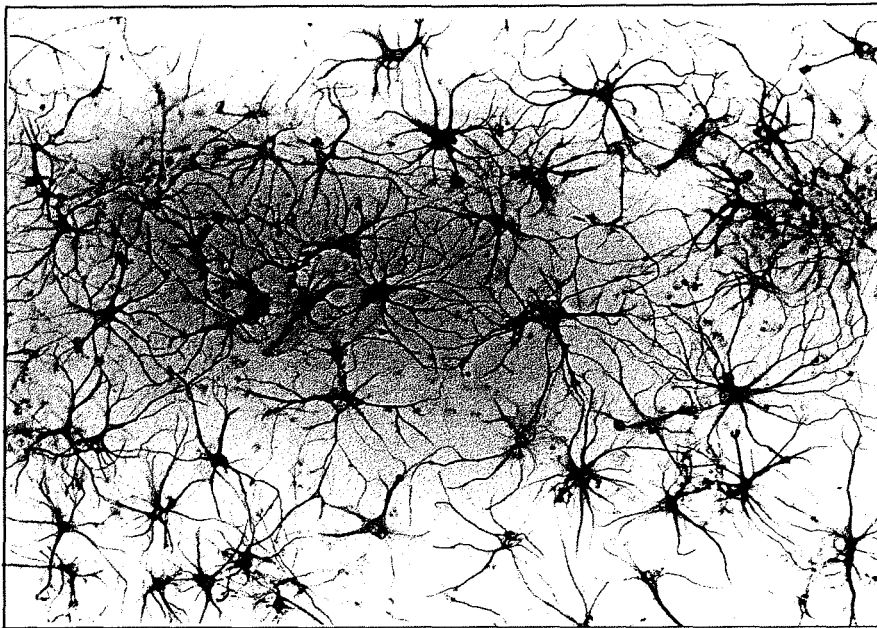


FIGURA 3: Astrócitos fibrosos de córtex em cultura, marcados com anticorpo anti-GFAP (x250). Segundo Eng e Lee, 1995.

Embora existam poucas fibrilas nos astrócitos protoplasmáticos normais, elas podem ser formadas em um número bastante grande sob condições patológicas. Estas fibrilas ou filamentos gliais são formados, basicamente, pela Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP) (PETERS *et al.*, 1976; JACOBSON, 1991).

Dentre as funções da glia descritas anteriormente, algumas desempenhadas pelos astrócitos têm um papel fundamental na manutenção da fisiologia normal do cérebro:

Metabolismo de neurotransmissores: Os astrócitos são responsáveis por remover neurotransmissores como glutamato e GABA, que são liberados na fenda sináptica (KIMELBERG E NOREMBERG, 1989).

Metabolismo energético: Os astrócitos captam a glicose, transformam-na em lactato ou alanina e só depois distribuem os nutrientes para os neurônios (TSACOPOULOS E MAGISTRETTI, 1996). Além disso, há estoques de gliogênio quase exclusivos dos astrócitos, servindo como fonte de combustível para as células vizinhas (DRINGEN *et al.*, 1993; FORSYTH *et al.*, 1996).

Barreira hemato-encefálica: Os processos astrocíticos sofrem um pequeno inchamento próximo aos capilares sanguíneos formando uma espécie de barreira ao redor dos vasos que, em conjunto com as células endoteliais, impedem que diversas substâncias grandes ou moléculas carregadas do sangue entrem no SNC (BRADFORD, 1985).

Tamponamento de K⁺: Os astrócitos captam os íons liberados na fenda sináptica e os carregam para outros lugares, onde a concentração de K⁺ no meio extracelular é menor. Mantendo o correto balanço de potássio, os astrócitos mantêm o meio próprio para os neurônios (BARRES, 1991).

Presença de receptores: Apesar do fato de as células gliais não serem capazes de sofrer excitação como os neurônios, sabe-se que os astrócitos apresentam vários receptores em sua superfície e podem responder a neurotransmissores liberados, via receptor ionotrópico ou via segundos mensageiros (KEISER E PELLMAR, 1994).

3. INTER-RELAÇÃO NEURÔNIO-GLIA E GLIA-GLIA

A idéia de que os neurônios enviam mensagens para as células gliais sugere que a glia também se comunica com os neurônios e com outras células gliais. De fato, a glia (especialmente os astrócitos) pode sintetizar e liberar substâncias neuroativas e fatores tróficos, fazendo com que estes dois tipos de células formem uma comunidade integrativa dentro do cérebro (BRADFORD, 1985).

3.1 Relações Glia-Glia

Junções intercelulares são regiões de aposição e aparente fusão entre as membranas das células. Os astrócitos formam junções *gap* uns com os outros e com os oligodendrócitos, unindo a macroglia num sincício funcional, capaz de redistribuir íons extracelulares, especialmente o potássio, mantendo constantes o pH extracelular e a composição iônica (ROSENBLUTH, 1995; BRADFORD, 1985).

3.2 Relações Neurônio-Glia

Desenvolvimento do SNC: Os neurônios afetam a proliferação e diferenciação das células gliais durante o desenvolvimento. Sinais mitóticos inibitórios ou excitatórios passam dos neurônios para as células gliais, ocorrendo problemas na reprodução ou no metabolismo da glia se os neurônios associados morrerem (JACOBSON, 1991).

As células embrionárias da glia radial, precursoras dos astrócitos, têm o papel de guiar a migração dos neurônios do epitélio germinal para sua localização adulta; os axônios somente podem crescer ao longo de um substrato glial. Isto se reflete também na resposta do cérebro à lesão, em que a plasticidade neuronal se dá através do auxílio das células gliais (RAISMAN, 1991).

Metabolismo do glutamato: Como os astrócitos apresentam diversos receptores glutamatérgicos em sua membrana plasmática, eles podem responder ao glutamato liberado dos terminais sinápticos neuronais, aumentando sua concentração interna de cálcio (PORTER E MCCARTHY, 1996; CHIU E KRIEGLER, 1994). Os astrócitos têm a responsabilidade de recaptar o glutamato liberado pelos neurônios no meio extracelular. Quando isso acontece, entra Na^+ na célula junto com o neurotransmissor, o que leva a um inchamento da célula glial (SCHNEIDER E BAETHMANN, 1992; HANSSON E RÖNNBÄCK, 1995). Por outro lado, as células gliais também podem liberar glutamato, o qual causa um aumento na concentração neuronal de cálcio por um mecanismo mediado por receptores NMDA (PARPURA *et al.*, 1994).

Cálcio: Quando um potencial elétrico focal é aplicado em astrócitos, em

culturas mistas, ocorre um aumento no cálcio intracelular da célula alvo, provocando ondas de cálcio que se propagam de astrócito a astrócito. Os neurônios próximos desses astrócitos respondem aumentando sua concentração citosólica de cálcio, provavelmente por uma sinalização através de junções *gap*, e não sinapticamente (NEDERGAARD, 1994; ZANOTTI E CHARLES, 1997).

Outros neurotransmissores: Os astrócitos também possuem receptores adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos, purinérgicos, entre outros. As funções dessas estruturas ainda merecem muito estudo, mas certamente estão também envolvidas com a intercomunicação neurônio-glia (KIMELBERG, 1995).

As células gliais também liberam fatores tróficos que interferem no crescimento dos neurônios. Este aspecto é particularmente importante nas lesões, quando o cérebro precisa sofrer uma adaptação ao dano (GIULIAN, 1993a).

Energia: Os aminoácidos excitatórios (AAEs) liberados pelos neurônios podem estimular a glicólise aeróbica nos astrócitos, por um mecanismo que envolve a ativação da Na^+/K^+ ATPase. Junto com os AAEs, entram na célula íons Na^+ , que são trocados por K^+ através da Na^+/K^+ ATPase. Como essa bomba usa, preferencialmente, ATP gerado glicoliticamente, sua estimulação aumenta a utilização de glicose, formação de lactato e sua conseqüente liberação pelos astrócitos (PELLERIN E MAGISTRETTI, 1996).

GFAP: Camundongos mutantes, que não expressam GFAP, sofrem uma alteração na LTP na região CA_1 do hipocampo. Esses camundongos apresentam um processo de LTP prolongado, o que sugere que a GFAP é importante para as interações neurônio-glia. Como os processos dos astrócitos estão intimamente associados à fenda sináptica, onde podem regular a função sináptica através da captação de neurotransmissores e do tamponamento de íons, eles podem desempenhar um papel vital na modulação da eficácia sináptica no SNC (McCALL *et al.*, 1996).

4. CITOESQUELETO

O citoesqueleto é um sistema de filamentos protéicos que dá às células forma e capacidade de executar movimentos dirigidos. Trata-se de uma estrutura

altamente dinâmica, que se reorganiza continuamente à medida que a célula altera sua forma, se divide, ou responde ao meio ambiente. Os componentes mais abundantes são os filamentos de actina, os microtúbulos e os filamentos intermediários (ALBERTS *et al.*, 1994).

4.1 Filamentos de Actina

A actina é a proteína mais abundante em muitas células eucarióticas. Os filamentos de actina podem formar tanto estruturas estáveis quanto lábeis, sendo as estáveis componentes cruciais do aparato contrátil das células musculares e as lábeis responsáveis pelos movimentos celulares. Os filamentos consistem de uma hélice de moléculas de actina uniformemente orientadas (FIGURA 4) (ALBERTS *et al.*, 1994).

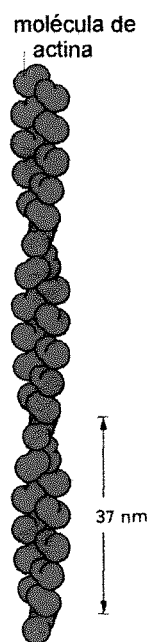
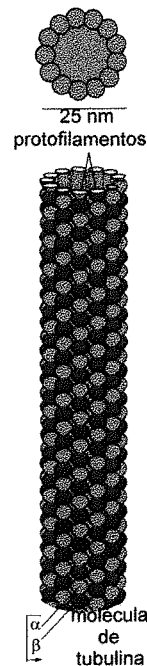


FIGURA 4: Arranjo helicoidal das moléculas de actina no filamento. Segundo Alberts *et al.*, 1994.

4.2 Microtúbulos

Os microtúbulos são polímeros longos, que se estendem pelo citoplasma e controlam a localização de organelas ligadas à membrana e a outros componentes celulares. Eles são formados por moléculas de tubulina, que formam um heterodímero de polipeptídios globulares interligados chamados α e β -tubulina. Estes dímeros se enrolam formando uma estrutura cilíndrica com 24 nm de diâmetro (FIGURA 5). Em neurônios os microtúbulos formam uma rede estrutural para muitos axônios e dendritos, sendo os principais determinantes do tamanho e morfologia neuronais (HAMMERSCHLAG *et al.*, 1994).

FIGURA 5: Visão lateral de um microtúbulo, mostrando as moléculas de tubulina alinhadas, formando os protofilamentos. Segundo Alberts *et al.*, 1994.



4.3 Filamentos Intermediários (FI)

Os filamentos intermediários (FIs) são fibras de proteínas resistentes encontradas no citoplasma de muitas, mas não de todas, células animais. Eles são chamados de intermediários porque têm um diâmetro de 8-10 nm, entre os finos filamentos de actina e os robustos microtúbulos. Enquanto a actina e a tubulina são proteínas globulares, os monômeros das proteínas de FIs são moléculas fibrosas contendo uma cabeça amino-terminal, uma cauda carboxi-terminal e um domínio central (ALBERTS *et al.*, 1994). Todas as cadeias protéicas de FIs estão sujeitas a modificações que regulam sua função e sua organização dinâmica dentro da célula. Isto inclui acetilação da extremidade amino-terminal, fosforilação e proteólise. Estas modificações permitem aos FIs terem um dinamismo essencial para suas funções na célula (STEINERT E ROOP, 1988).

A organização da rede de FIs sugere que eles ligam a superfície celular com a nuclear e que estão envolvidos em numerosas funções celulares, incluindo a manutenção da integridade do citoplasma e a forma celular. Estudos têm demonstrado que os FIs exibem rápidas mudanças organizacionais e bioquímicas em resposta a estímulos como choque térmico, exposição a fatores de crescimento que podem estimular a fosforilação, e sinais na superfície celular, que podem levar à associação transitória dos FIs com a PKC. Estas descobertas demonstram um papel dinâmico dos FIs em várias das atividades celulares, incluindo a transdução de sinal. Além disso, sua despolimerização *in vitro* leva a uma alteração na forma celular desestabilizando as redes de microtúbulos e actina, sendo que estas mudanças podem ser revertidas pela repolimerização. Estes fatos indicam a participação dos FIs na determinação da forma celular e na

manutenção da integridade e das propriedades mecânicas do citoplasma, bem como na estabilidade dos outros sistemas citoesqueléticos (GOLDMAN, 1996).

4.3.1 FIs nas Células Gliais

O citoesqueleto astrogial contém dois componentes principais, os microfilamentos de actina e os FIs. Nos animais imaturos, o FI encontrado é formado por vimentina, que é substituída pela GFAP durante o desenvolvimento. As duas proteínas são semelhantes, tendo aproximadamente de 60% de homologia (BRESSLER E EDWARDS, 1992).

4.3.3.1 GFAP

A GFAP é uma proteína com, aproximadamente, 50 kDa e com ponto isoelétrico em torno de 6,3, de acordo com estudos realizados em nosso laboratório (GONÇALVES E RODNIGHT, 1992). Assim como os outros FIs, a GFAP é formada por três regiões distintas: a cabeça amino-terminal, o domínio central e a cauda carbóxi-terminal. A cabeça tem 35 resíduos de aminoácidos e, em função dos aminoácidos que a compõem, é uma região extremamente básica. A fosforilação e a desfosforilação de aminoácidos específicos nesta área promovem o controle da polimerização/despolimerização da GFAP. O domínio central tem 345 resíduos de aminoácidos e a cauda tem aproximadamente 50 resíduos e pode estar envolvida nas interações da GFAP com outras proteínas (INAGAKI *et al.*, 1994).

A GFAP é a principal proteína de FIs de astrócitos cerebrais maduros. Os estudos sobre GFAP começaram com pesquisas sobre esclerose múltipla, uma doença desmielinizante, caracterizada por intensa gliose reativa e formação de cicatriz glial. O controle do seu metabolismo, expressão e polimerização são vitais para o funcionamento dos astrócitos (ENG, 1985).

Fosforilação: A GFAP sofre fosforilação em resíduos de serina números 8, 13, 17, 34, 389 e na treonina número 7 (INAGAKI *et al.*, 1990). Estudos *in situ* mostram que a GFAP, nessas condições, é fosforilada pela PKC e PKA, mas *in vitro*, em preparações de citoesqueleto, a GFAP é fosforilada pela CaMK II e quinase cdc2. Isto sugere que a fosforilação da GFAP pode ser regulada por múltiplas vias de segundos mensageiros (NOETZEL, 1990; TSUGIMURA *et al.*, 1994).

Em contraste com extensivos estudos feitos sobre a fosforilação da GFAP, pouco se sabe sobre sua desfosforilação. Pelo menos em animais imaturos, a desfosforilação da GFAP de hipocampo é catalisada principalmente pela proteína fosfatase tipo 1, de acordo com estudos realizados em nosso laboratório (VINADÉ E RODNIGHT, 1996).

Em células vivas, é importante manter a estrutura dos FIs intacta, mas eles entram em uma reorganização dinâmica durante mitose, diferenciação, locomoção e processos patológicos. Nestas condições, a fosforilação e a desfosforilação da cabeça amino-terminal da proteína têm um papel crítico na manutenção e reconstrução dos filamentos intermediários (ENG E LEE, 1995).

Polimerização: Sob condições fisiológicas, a GFAP polimeriza-se formando filamentos de 10nm, seguindo algumas etapas (FIGURA 6): 1) duas moléculas de GFAP formam um dímero paralelo cauda-cauda; 2) dois dímeros formam um tetrâmero anti-paralelo, os protofilamentos; 3) os protofilamentos organizam-se formando o filamento de 10nm (INAGAKI *et al.*, 1994).

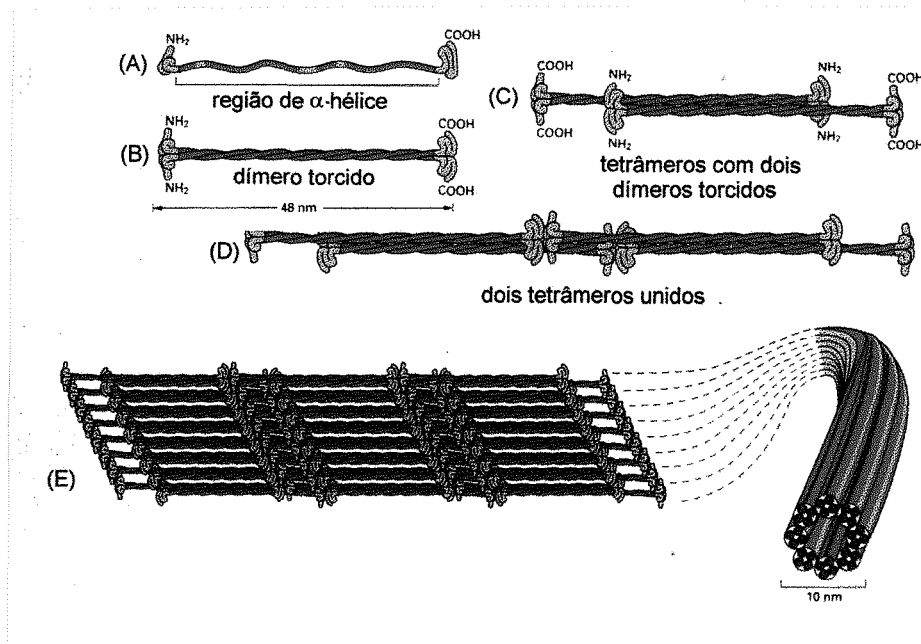


FIGURA 6: Modelo atual da formação de filamentos intermediários. A) monômero; B) dímero; C) tetrâmero antiparalelo com 4 cadeias polipeptídicas; D) dois tetrâmeros associados; E) filamento intermediário de 10 nm. Segundo Alberts *et al.*, 1994.

Expressão: A regulação da expressão da GFAP desempenha um papel fundamental para os astrócitos em desenvolvimento, nos quais sua expressão

está envolvida na diferenciação celular e também na resposta astrocítica à lesão, onde há um aumento na quantidade de GFAP (MASSOD *et al.*, 1993; LAPING *et al.*, 1994).

5. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SNC

A fosforilação de proteínas é uma via de fundamental importância na regulação biológica. Praticamente todos os tipos de sinais extracelulares, tanto dentro quanto fora do SNC, produzem diversos efeitos fisiológicos através da regulação do estado de fosforilação de fosfoproteínas específicas nas células alvo (O'CALLAGHAN, 1994). Muitos agentes regulam a fosforilação de proteínas por alterar os níveis intracelulares de segundos mensageiros tais como: AMP cíclico, GMP cíclico, ou cálcio (FIGURA 7) (NESTLER E GREENGARD, 1994).

O sistema de fosforilação de proteínas consiste de, no mínimo, três componentes: as fosfoproteínas, as proteínas quinases e as proteínas fosfatases.

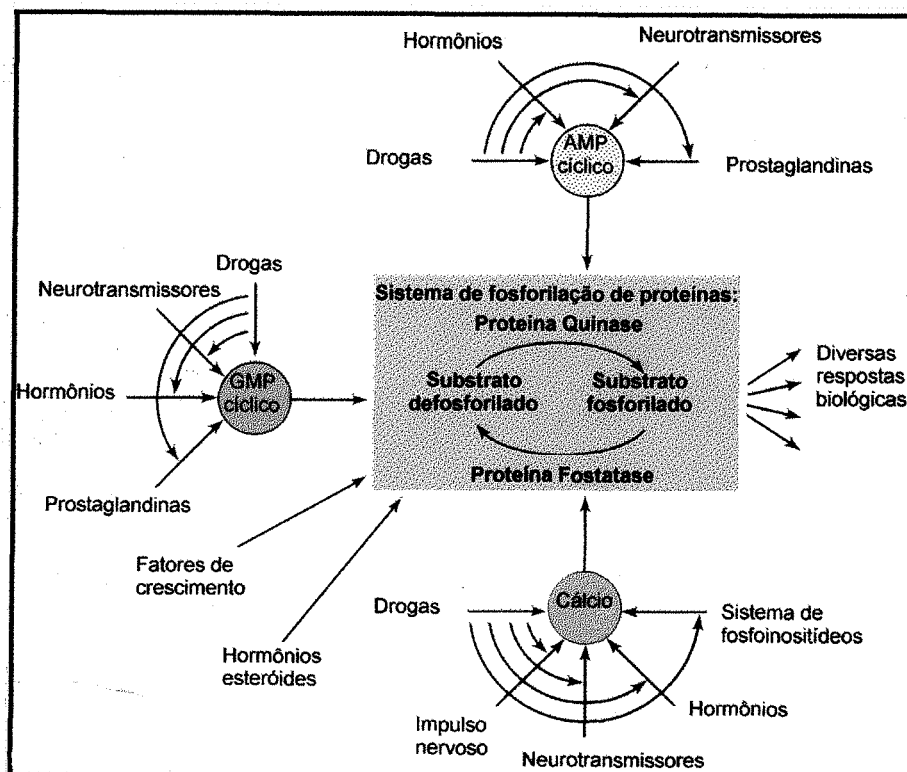


FIGURA 7: Representação esquemática do sistema de fosforilação de proteínas, mostrando alguns dos agentes regulatórios. Baseado em Nestler e Greengard, 1994.

As quinases são enzimas que transferem o fosfato proveniente do ATP para substratos protéicos, nos resíduos de serina, treonina ou tirosina. As fosfatases desfosforilam as fosfoproteínas, revertendo o sistema. Aumentos no estado de fosforilação protéica podem ser devidos à ativação de quinases, inibição de fosfatases ou mudanças nas propriedades dos substratos protéicos destas enzimas. Entretanto, o mecanismo melhor caracterizado até o momento é o de ativação de proteínas quinases (WALAAS E GREENGARD, 1991).

5.1 Proteínas Quinases Caracterizadas no SNC

Existem três mecanismos fisiológicos que podem ativar as proteínas quinases, de acordo com estudos no SNC de mamíferos: geração de segundos mensageiros, autofosforilação da enzima e ligação direta de primeiros mensageiros a complexos receptor-quinase (WALAAS E GREENGARD, 1991).

Ativação por segundos mensageiros: Receptores de neurotransmissores podem ativar ou inibir a adenilil ciclase e a guanilil ciclase e alterar a síntese de cAMP e cGMP, respectivamente. Outros neurotransmissores estão ligados à ativação ou inibição da fosfolipase C, que gera IP_3 e diacilglicerol a partir de fosfatidil inositol- 4,5- bisfosfato. O IP_3 regula o Ca^{2+} de estoques internos. Alguns receptores são ligados ao influxo de Ca^{2+} através de canais; outros são ligados à fosfolipase A_2 , que gera ácido araquidônico e, finalmente, há casos em que o próprio impulso nervoso gera um influxo de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem (WALAAS E GREENGARD, 1991).

Ativação por autofosforilação: A maioria das quinases estudadas têm sítios de autofosforilação, que mudam profundamente a atividade da enzima. Dentro desse grupo de proteínas estão a PKC e a CaMK II.

De acordo com o mecanismo de ativação, as proteínas quinases mais estudadas são classificadas em:

a) Proteína Quinase Dependente de AMP cíclico (PKA): A PKA é composta por duas subunidades catalíticas e duas regulatórias; o cAMP ativa a holoenzima ligando-se às subunidades regulatórias, o que causa a dissociação da holoenzima em subunidades regulatórias livres e subunidades catalíticas também livres, porém agora ativas (TAYLOR *et al.*, 1993).

b) Proteína Quinase Dependente de Ca^{2+} e Fosfolipídio (PKC): Há diversas isoformas da enzima, com diferentes distribuições e propriedades regulatórias. A PKC existe sob condições fisiológicas como um polipeptídeo simples, com um domínio regulatório que se liga ao domínio catalítico, inibindo a enzima. Esta inibição é liberada quando o Ca^{2+} e/ou o diacilglicerol se ligam ao domínio regulatório (NISHIZUKA, 1992).

c) Proteína Quinase Dependente de Ca^{2+} / calmodulina (CaMK): A atividade dessas enzimas é regulada por Ca^{2+} e calmodulina, sendo a mais conhecida a CaMK II. Ela contém um domínio regulatório que, no estado de repouso, se liga ao domínio catalítico, inibindo-o. Esta inibição é liberada quando o complexo Ca^{2+} /calmodulina se liga ao domínio regulatório (YANO *et al.*, 1994).

d) Proteínas Quinases Dependentes de Ciclina (cdc2 quinase): As ciclinas são proteínas que se acumulam durante a interfase e são especificamente degradadas durante a mitose. Essas quinases são proteínas reguladoras do ciclo celular, regulando a divisão celular em todas as células eucarióticas (GOULD, 1994). Durante o processo de divisão celular, a cdc2 quinase atua na fosforilação de filamentos gliais, incluindo a GFAP (MATSUOKA *et al.*, 1992).

e) Proteínas Tirosina Quinases: Além das quinases para serina e treonina, o cérebro possui quinases específicas para tirosina. Muitas evidências sugerem que as tirosina quinases desempenham um papel importante na regulação da função neuronal do adulto, incluindo transdução de sinal, regulação do crescimento e diferenciação (NESTLER E GREENGARD, 1994).

5.2 Proteínas Fosfatases Caracterizadas no SNC

Se conhece muito pouco sobre as proteínas fosfatases, em comparação com as quinases. Alguns estudos recentes indicam que muitos primeiros mensageiros levam a respostas fisiológicas no cérebro através da regulação de proteínas fosfatases, além das quinases. As fosfatases também são classificadas como serina/treonina fosfatases ou tirosina fosfatases, baseado nos resíduos de aminoácidos que elas desfosforilam (NESTLER E GREENGARD, 1994).

O cérebro contém, no mínimo, quatro tipos de fosfatases de serina/treonina: Proteína fosfatase 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B ou calcineurina)

e 2C (PP2C). Há dois mecanismos de regulação descritos para estas fosfatases. Um deles é que ela pode ser ativada por se ligar diretamente a segundos mensageiros, como a calcineurina que se liga a Ca^{2+} e calmodulina e a PP2B, que se liga a Mg^+ . Alternativamente, uma fosfatase pode ser regulada indiretamente por segundos mensageiros através de uma classe de proteínas conhecidas como “inibidores de fosfatases”. Neste caso, os segundos mensageiros ativam uma quinase, a qual fosforila o inibidor. Este, quando fosforilado, tem sua atividade inibitória regulada. Um exemplo deste tipo de regulação é a PP1, que é inibida pelo Inibidor-1, pelo Inibidor-2 e pela DARPP-32 (WALAAS E GREENGARD, 1991; NAIRN E SHENOLIKAR, 1992). Há ainda um outro tipo de regulação, descoberto mais recentemente, em que as proteínas fosfatases podem ser reguladas diretamente por fosforilação catalisada por proteínas quinases. A PP2A pode ser fosforilada e inativada por diversas proteínas quinases (NESTLER E GREENGARD, 1994).

O cérebro contém altos níveis de atividade de fosfatases de tirosina, mas o número preciso e características detalhadas destas enzimas ainda devem ser determinados, bem como os mecanismos pelos quais sinais extra e intracelulares regulam sua atividade (NESTLER E GREENGARD, 1994).

5.3 Fosfoproteínas Neurais

As fosfoproteínas que parecem ser particularmente importantes na função neuronal incluem enzimas envolvidas na biossíntese de neurotransmissores, proteínas associadas à vesícula sináptica, inibidores de proteínas fosfatases, receptores de neurotransmissores, canais iônicos e proteínas de citoesqueleto (WALAAS E GREENGARD, 1991).

A sinapsina I é uma fosfoproteína presente em, praticamente, todos os terminais nervosos, regulando a liberação de neurotransmissores. Somente quando está fosforilada ela se dissocia da vesícula sináptica, permitindo a liberação do neurotransmissor.

A proteína conhecida como DARPP-32, quando fosforilada, torna-se um potente inibidor da PP1 que pode estar envolvida na regulação do efeito excitatório do glutamato através do neuromodulador dopamina (GREENGARD, 1987).

A MARCKS é uma proteína de 80-87 kDa, cuja fosforilação está relacionada com o aumento da liberação de transmissores em sinaptossomas. Ela parece estar amplamente distribuída em neurônios e células gliais e é um substrato característico da PKC (WALAAS E GREENGARD, 1991).

A GAP-43 (Growth Associated Protein) ou B-50 é fosforilada pela PKC nos terminais nervosos. Ela representa uma proteína específica de neurônios, está associada à membrana e sua expressão está aumentada durante o desenvolvimento neuronal e a regeneração. Suas funções permanecem essencialmente desconhecidas (WALAAS E GREENGARD, 1991).

CREB é um dos elementos de uma família de proteínas que mediam os efeitos do cAMP na expressão gênica. Ele se liga a uma região específica do DNA, na região promotora dos genes, e aumenta ou diminui sua transcrição. A fosforilação deste fator estimula sua atividade transcripcional e, conseqüentemente, a transcrição do gene (NESTLER E GREENGARD, 1994).

GFAP: Conforme descrito acima, a GFAP é uma fosfoproteína característica de astrócitos. Em nosso laboratório são realizados muitos estudos sobre características específicas da fosforilação da GFAP. Determinou-se que sua fosforilação é estimulada por glutamato, num mecanismo via receptores metabotrópicos (WOFCHUK E RODNIGHT, 1990; WOFCHUK E RODNIGHT, 1994) e que a principal quinase que fosforila a GFAP é a CaMK II (LEAL, 1995). Sabe-se também que em fatias de hipocampo de ratos jovens, a fosforilação da GFAP é inibida por íons cálcio e por glutamato porém, no animal adulto, esta situação se inverte (WOFCHUK E RODNIGHT, 1995; RODNIGHT *et al.*, 1997).

Além das fosfoproteínas citadas, existem muitas outras envolvidas com diversas funções no cérebro, indicando a grande diversidade de proteínas cerebrais reguladas por fosforilação (NESTLER E GREENGARD, 1994).

6. LESÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Depois de uma injúria a recuperação neuronal é incompleta, porque no cérebro adulto os neurônios são incapazes de sofrer mitose. A recuperação é, então, limitada à restauração de conexões que foram interrompidas, e a reabilitação de células danificadas transitoriamente. As conexões pré-existentes,

entretanto, nunca são restauradas completamente (LANDIS, 1994).

Mudanças nos astrócitos são amplamente reconhecidas como sendo as mais notáveis respostas celulares a uma ampla variedade de insultos ao SNC. Estes danos são bem descritos em doenças neurodegenerativas, que incluem doença de Alzheimer, esclerose múltipla, epilepsia, trauma, isquemia cerebral, entre outras. É necessário um conhecimento maior sobre os astrócitos e suas características particulares para elucidar a sua função real nesta resposta cerebral à injúria (NORENBERG, 1994).

6.1 Gliose Reativa

Também conhecida como astrogliose reativa e astrocitose reativa, a gliose é um evento universal no SNC depois de um dano de qualquer tipo. É caracterizada pela presença de um grande número de astrócitos reativos, que se distinguem dos normais pelo seu maior tamanho, processos mais longos e largos e aumento da expressão de GFAP. Os núcleos são freqüentemente grandes, irregulares e muitas vezes apresentam numerosos nucléolos. Estudos recentes mostram que diferentes tipos de danos ao SNC causam uma grande variedade de respostas astrocíticas, indicando que a gliose varia de acordo com a lesão (NORTON *et al.*, 1992).

6.1.1 Características da Astrogliose Reativa

a) Hipertrofia dos astrócitos e alterações morfológicas: O edema dos astrócitos representa um fenômeno comum e, talvez, a primeira resposta glial à injúria no SNC. O edema é causado por um excesso de concentração intracelular, com um influxo secundário de água causado por inúmeros agentes, como o glutamato (HANSSON, 1994). A glia hipertrofiada perde sua habilidade de manter os gradientes iônicos necessários para regular o glutamato e os íons. Além disso, esses astrócitos podem liberar glutamato, o que contribui para a excitotoxicidade (STAUB *et al.*, 1993).

A redução do espaço extracelular, em função do edema das células, pode alterar as concentrações iônicas extracelulares (especialmente cálcio) que pode

afetar a excitabilidade neuronal. Quando a hipertrofia é severa, a membrana celular pode romper e causar a morte da célula (NORENBERG, 1994).

b) Hiperplasia dos astrócitos: Um aspecto amplamente estudado é se a proliferação dos astrócitos contribui para a gliose. Enquanto há um *pool* de astrócitos capazes de entrar no ciclo mitótico, sua capacidade proliferativa é limitada no cérebro adulto. Embora o número de astrócitos GFAP-positivos aumente (o que nos leva a imaginar um aumento no número de astrócitos), em muitos casos isto é devido ao fato de células GFAP-negativas terem se tornado positivas (NORTON *et al.*, 1992).

Embora seja comumente considerado que os astrócitos proliferam em resposta à injúria cerebral, isto é evidente somente em certos tipos de lesões, especialmente quando há rompimento do tecido. Nestes casos, a proliferação acontece nas proximidades da lesão. Estudos de injúrias não invasoras como a anóxia não confirmam a idéia de que astrócitos proliferam em resposta ao dano. São necessários estudos mais detalhados para confirmar em quais situações e quais regiões a glia sofre proliferação em resposta à injúria (HATTEN *et al.*, 1991; NORENBERG, 1994).

c) Aumento de GFAP e expressão de vimentina: Normalmente são encontrados níveis aumentados de GFAP e de seu mRNA em regiões lesionadas, sendo que o aumento de mRNA precede o aumento de GFAP em dois dias, e cai mais rápido do que o lento declínio do conteúdo de GFAP (NORTON *et al.*, 1992).

A vimentina é uma proteína de filamentos intermediários que é substituída pela GFAP quando o cérebro atinge a maturidade. Entretanto, ela pode reaparecer em astrócitos reativos proliferativos e está restrita ao sítio da lesão, sendo co-expressa com a GFAP (JANECZKO, 1993). Aumento na proteína S-100 também tem sido observado depois de trauma e isquemia (NORENBERG, 1994).

d) Cicatriz glial: A cicatriz glial é formada pelos longos e espessos processos citoplasmáticos da glia reativa. Trat-se de uma mistura complexa de astroglia, microglia, oligodendrócitos, neutrófilos, macrófagos e outras células, que varia de acordo com o tipo de lesão e a idade do animal (HATTEN *et al.*, 1991).

e) Fatores de crescimento: Alguns fatores de crescimento produzidos pela glia podem recuperar neurônios danificados e favorecer a sobrevivência neuronal, auxiliando na restauração dos processos (COTMAN *et al.*, 1994).

6.1.2 Microglia Reativa e Sistema Imune

A microglia forma o sistema imune do cérebro; essas células são normalmente protetoras, mas podem ser surpreendentemente destrutivas, contribuindo para a patologia nas doenças neurodegenerativas. A microglia aparece, no cérebro em desenvolvimento, como corpos amorfos e depois se diferencia formando numerosos processos ramificados. Em reação a uma lesão, a microglia volta ao seu aspecto imaturo, recolhendo seus delicados processos. Torna-se então semelhante aos macrófagos sanguíneos, assumindo a função fagocitária. Se os neurônios morrem, a microglia assume o estado fagocítico e tenta remover o material morto. Entretanto, quando fortemente ativadas, podem secretar substâncias que aumentam o dano e matam os neurônios (STREIT E KINCAID-COLTON, 1995b).

Os sistemas nervoso e imune interagem durante o desenvolvimento normal, mas no cérebro maduro essa relação fica restrita aos casos de infecções patogênicas e lesões traumáticas (PERRY *et al.*, 1995). A atividade dos macrófagos inclui a remoção do tecido morto e detritos por fagocitose, além de secretar citocinas que podem auxiliar a regeneração (LOTAN E SCHWARTZ, 1993).

6.1.3 Extensão da Gliose

A gliose pode aparecer em áreas distantes da região onde ocorreu o dano. Por exemplo, a GFAP pode estar aumentada em áreas sem um claro dano ao tecido, indicando que os astrócitos podem responder a sinais patológicos na ausência de mudanças morfológicas significativas. Isto pode ser devido à difusão de sinais ao longo do meio extracelular ou através das junções *gap* (NORENBERG, 1994). Em modelos de trauma parece que a gliose é permanente em áreas em que o dano é irreversível, mas é transitória em áreas distantes da lesão (NORTON *et al.*, 1992). Pode também ocorrer claramente uma gliose bilateral em um hipocampo lesionado unilateralmente. Neste caso, provavelmente, há uma contribuição inter-hemisférica e a ação de alguns agentes difusíveis. Essa gliose bilateral provavelmente fornece suporte trófico para os neurônios danificados, num

processo compensatório pós-lesão (JEGLINSKI *et al.*, 1995).

6.1.4 Gliose: Benéfica ou Prejudicial para os Neurônios?

Há uma controvérsia ao redor dos astrócitos reativos no que diz respeito ao seu papel na regeneração. Embora a cicatriz glial possa agir benéficamente separando o tecido lesionado do tecido normal, ela pode ser uma barreira mecânica nociva, impedindo o crescimento dos axônios. Indo contra essa visão negativa, há estudos que mostram que a membrana plasmática dos astrócitos favorece o crescimento dos neuritos e que eles produzem fatores de crescimento. Além disso, os astrócitos exibem uma considerável plasticidade, removendo excitotoxinas, restaurando o meio iônico, produzindo proteínas da matriz extracelular, fagocitando terminais sinápticos danificados e outros resíduos e proporcionando a orientação axonal. Todas essas atividades podem ser cruciais para uma perfeita resposta regenerativa (HATTEN *et al.*, 1991).

Em contraste, os astrócitos reativos podem interferir na regeneração neuronal, já que astrócitos mais velhos não favorecem o crescimento neuronal tão bem quanto os jovens (NORENBERG, 1994). Um modelo alternativo diz que o grau de diferenciação das células gliais, e não sua idade cronológica, é o fator determinante do favorecimento glial ao crescimento axonal (HATTEN *et al.*, 1991). Em co-culturas de astrócitos-neurônios lesionadas, os astrócitos reativos parecem ser um substrato não-permissivo para a regeneração neuronal. Inibindo-se a síntese de GFAP e diminuindo-se a hipertrofia dos astrócitos, observa-se um desbloqueio do crescimento dos neuritos, num mecanismo que pode envolver mudanças na secreção de moléculas do meio extracelular pelos astrócitos (LEFRANÇOIS *et al.*, 1997).

A microglia ativada secreta pequenos fatores neurotóxicos, enquanto a astroglia libera proteínas que favorecem o crescimento neuronal. Essas proteínas liberadas pela astroglia atenuam a toxicidade da microglia, mostrando que as diferentes populações gliais têm ações opostas na sobrevivência neuronal (GIULIAN *et al.*, 1993b; GIULIAN, 1993a).

A incapacidade de alguns axônios de crescerem novamente pode não ser somente devido a algumas características dos astrócitos reativos. É possível que

os fatores que guiam o crescimento dos axônios durante o desenvolvimento não estejam disponíveis depois de uma injúria. Além disso há evidências somente de um remodelamento dos corpos celulares e dendritos dos neurônios no tecido adulto, e não do desenvolvimento de novas conexões axonais (LANDIS, 1994).

6.2 Sinaptogênese Reativa

Axônios danificados podem crescer e restabelecer suas conexões originais; este processo é conhecido como regeneração. A formação de sinapses que ocorre em reação a estímulos (como lesões, por exemplo) é chamada de sinaptogênese reativa. Parece que o cérebro tem uma pré-disposição intrínseca para a plasticidade, que está aumentada quando a homeostase do cérebro é quebrada (COTMAN *et al.*, 1994).

6.3 Isquemia

A isquemia e a hipóxia constituem importantes mecanismos patofisiológicos do dano cerebral e são alvo de intensa investigação. A isquemia é definida como uma redução severa ou um completo bloqueio do fluxo sanguíneo. A hipóxia denota a redução no conteúdo de oxigênio no sangue, que ainda circula e pode remover metabólitos (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991). A redução do fluxo sanguíneo cerebral para menos de 15 ml/min/100g de tecido resulta em falha da atividade elétrica e a redução para menos de 10 ml/min/100g de tecido causa a perda do gradiente iônico transmembrana (FAROOQUI, 1994).

O cérebro é muito sensível à hipóxia-isquemia por causa do 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 sanguínea (reperfusão) podem aumentar ainda mais o dano neuronal, especificamente em áreas vulneráveis do cérebro. Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, sozinhos ou combinados, levam ao dano neuronal: aumento de Ca^{2+} intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, formação de radicais livres e acidose láctica (TAYLOR *et al.*, 1996).

6.3.1 Modelos Experimentais

Os modelos de isquemia podem ser globais quando afetam todo o cérebro; focais quando afetam uma pequena região; permanentes quando sem reperfusão e transitórios quando seguidos de reperfusão.

Isquemia cerebral global: Há muitas causas da isquemia cerebral em humanos, incluindo trauma e ataque cardíaco. Nos modelos experimentais para a isquemia cerebral global são interrompidos as grandes vasos extracranianos, simulando distúrbios circulatórios globais que acontecem durante um ataque cardíaco ou hipotensão severa (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991). O modelo experimental mais usado nesse caso é o da oclusão dos 4 vasos (4VO), que inclui a cauterização das artérias vertebrais seguida de oclusão temporária das artérias carótidas comuns (FAROOQUI, 1994).

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

6.3.2 Hipocampo- Vulnerabilidade Seletiva

Quando a isquemia cerebral global é transitória, algumas regiões do cérebro são mais suscetíveis ao dano neuronal do que outras, sendo o hipocampo uma das regiões mais vulneráveis. Mesmo dentro do hipocampo a morte celular não é uniforme. A vulnerabilidade seletiva refere-se ao fato de que populações neuronais são diferencialmente vulneráveis a reduções iguais de fluxo sanguíneo e estresse isquêmico (SCHREIBER E BAUDRY, 1995).

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 subpopulação 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 DG permanecem intactas. Os neurônios da região CA₁ e do hilo são, talvez, os mais vulneráveis de todo o cérebro. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue a seqüência: CA₁, hilo > CA₂ > CA₃ > DG. É

importante ressaltar que, apesar de os neurônios morrerem depois do insulto, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do cérebro (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991).

Morte neuronal tardia: As duas populações de células vulneráveis do hipocampo não se degeneram de maneira semelhante. As do hilo denteado degeneram dentro de 24 horas, enquanto as 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).

Os fatores que determinam essa seletividade ainda são um mistério. Uma das hipóteses para explicar a vulnerabilidade das células CA₁ refere-se a um aumento na liberação de glutamato durante a isquemia, superativando os receptores; há um excesso de cálcio livre na célula, ativando proteases, endonucleases e a síntese de radicais livres, além da ativação de “genes de morte celular”. Alguns estudos bioquímicos e morfológicos indicam que morte neuronal tardia pode acontecer por morte celular programada, ou apoptose (HSU *et al.*, 1994; SCHREIBER E BAUDRY, 1993).

6.3.3 GFAP e Astrócitos

Depois de um insulto isquêmico, os astrócitos e a microglia sofrem mudanças morfológicas e fisiológicas, e apresentam aumento da síntese de diversas proteínas (gliose reativa). Já foi descrito anteriormente que a gliose não acontece somente na área lesionada, podendo ocorrer em regiões bastante distantes da lesão e em áreas onde os neurônios são resistentes (PETITO *et al.*, 1988). Os astrócitos possuem propriedades fisiológicas e metabólicas que os torna capazes de manter a homeostase normal do cérebro e responder às lesões. Em resposta à lesão, pode ocorrer, em astrócitos, um aumento da imunorreatividade à GFAP, mudanças proliferativas nas organelas citoplasmáticas e aumentos em certas enzimas (PETITO E HALABY, 1993).

Petito e Halaby (1993) demonstraram que o aumento na imunorreatividade

da GFAP é diretamente proporcional à gravidade do insulto isquêmico e a duração desse aumento é paralela ao desenvolvimento da necrose neuronal na região CA₁ do hipocampo. Essas alterações na GFAP também foram observadas na região CA₃, onde os neurônios são resistentes à isquemia e não sofrem danos permanentes. Vários tipos de danos causados às células, inclusive a isquemia cerebral, induzem a expressão de uma proteína não constitutiva, uma proteína de choque térmico chamada HSP-72, que provavelmente desempenha um papel protetor para os neurônios.

Como a GFAP faz parte dos filamentos intermediários de astrócitos, ela não é normalmente solúvel. Entretanto, em córtex de camundongos, o insulto isquêmico aumenta sua solubilidade, o que pode indicar uma modificação no seu estado de polimerização e, conseqüentemente, de fosforilação em resposta à lesão isquêmica (FAHRING, 1994).

6.3.4 Fosforilação de Proteínas

Muitos estudos têm demonstrado que o Ca²⁺ e o ATP são cruciais para as funções do SNC. É possível que alterações quantitativas dessas substâncias durante a isquemia estejam envolvidas no processo que leva ao dano neuronal irreversível. As atividades das quinases PKC e CaMK II são severamente diminuídas durante a isquemia, sugerindo uma provável degradação por proteólise, enquanto a PKA não parece ser afetada. O curso de tempo da diminuição da atividade da PKC corresponde à perda irreversível da função neurológica, sugerindo que a fosforilação de proteínas pode ser crítica para manutenção da função cerebral (ZIVIN *et al.*, 1990; SAITOH *et al.*, 1991).

A PKC é uma das quinases mais abundantes no tecido nervoso. Durante um insulto isquêmico de 5-15 min há uma perda de 60% da atividade da PKC, sem modificações na proporção da fração particulada para a solúvel. Em ensaios de isquemia cerebral transitória acontece uma translocação da enzima, que vai da fração solúvel para a membrana, causando um aumento de 162% da atividade da enzima na membrana em 1 dia de reperfusão. Este aumento de atividade pode participar do fenômeno de morte neuronal tardia (DOMANSKA-JANIK E ZALEWSKA, 1992).

A isquemia cerebral leva à redução na atividade da CaMK II já nos

primeiros minutos do insulto, precedendo o dano celular (YAMAMOTO *et al.*, 1992). Ocorre também uma redistribuição subcelular da enzima, que vai para a fração particulada, sem afetar seu conteúdo total. Estes processos acontecem tanto em hipocampo (KOLB *et al.*, 1995) quanto na medula espinhal (SHACKELFORD *et al.*, 1993). Considerando a ampla variedade de substratos fosforilados pela CaMK II, muitas rotas celulares podem ser afetadas pela inativação da enzima.

6.3.5 Estado Energético das Células e Acidose Láctica

Sob condições normais o cérebro utiliza glicose e oxigênio para a produção de ATP. Em segundos, a isquemia depleta o oxigênio e cessa a fosforilação oxidativa. Nessas condições, a única fonte de ATP é a glicólise anaeróbica e o cérebro passa então a usar todos os estoques de glicogênio que possui e as rotas alternativas de produção de ATP, através da creatina quinase e da adenilato quinase. Apesar disso, o ATP termina depois de 4 min do início da isquemia (FAROOQUI, 1994).

À medida em que os níveis de ATP caem, a célula perde o potencial de membrana, resultando em liberação de K^+ e glutamato, agravando ainda mais o processo. Os níveis de ácido láctico aumentam bruscamente por causa da glicólise anaeróbica e, juntamente com a alta tensão de CO_2 , causa uma acidose que pode baixar o pH da célula para 6,0. A hidrólise do ATP gera prótons, que não podem ser reciclados pela fosforilação oxidativa. A acidose afeta drasticamente o metabolismo celular, podendo contribuir para o dano neuronal (SWEENEY *et al.*, 1995).

Durante a reperfusão, na região CA₁ do hipocampo, o consumo de glicose volta ao normal nos primeiros dias de reperfusão e é significativamente mais alto do que no controle aos 7 dias. Isto acontece, possivelmente, por causa da gliose reativa, que usa muita energia para o seu metabolismo (RISCHKE E KRIEGLSTEIN, 1991).

6.3.6 Cálcio

Durante a isquemia, o aumento da concentração interna de Ca^{2+} acontece através da entrada de Ca^{2+} extracelular e também liberação de Ca^{2+} dos estoques

internos (MITANI *et al.*, 1993). A perda da homeostase do cálcio pode estar envolvida na degeneração neuronal. A excessiva entrada de Ca^{2+} e a conseqüente morte neuronal é uma etapa chave na injúria induzida pela exposição ao glutamato, como acontece na isquemia cerebral (CHOI, 1995). A incapacidade em regular os níveis Ca^{2+} intracelulares resulta na morte necrótica da célula. Essas quantidades excessivas podem afetar a transcrição gênica através da CaMK II. O cálcio ativa fosfolipases, proteases, quinases e fosfatases, além de desacoplar a fosforilação oxidativa e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio. (SWEENEY *et al.*, 1995).

6.3.7 Glutamato

Excessivas quantidades de glutamato e outros aminoácidos excitatórios são liberados no espaço extracelular durante a isquemia e contribuem para a injúria neuronal através da superativação de receptores. Este processo é chamado **excitotoxicidade** (CHOI E ROTHMAN, 1990).

A exposição dos neurônios ao glutamato pode causar um edema neuronal agudo, por causa da despolarização mediada por Na^+ , Cl^- e água. Esta água que entra pode causar lise osmótica e prejudicar o funcionamento neuronal. Uma excessiva quantidade de cálcio entra através dos canais dos receptores de aminoácidos, ativando diversas enzimas que podem aumentar o dano (FIGURA 8) (FAROOQUI, 1994).

Apesar de o glutamato ser um dos principais responsáveis por desencadear o dano neuronal causado pela isquemia, a ativação do receptor metabotrópico tipo II tem atividade neuroprotetora. Essa atividade envolve uma sinalização glia-neurônio, possivelmente através de substâncias liberadas pelas células gliais (BRUNO *et al.*, 1997) ou através da modulação de proteínas quinases como PKC e PKA (MAIESE *et al.*, 1996).

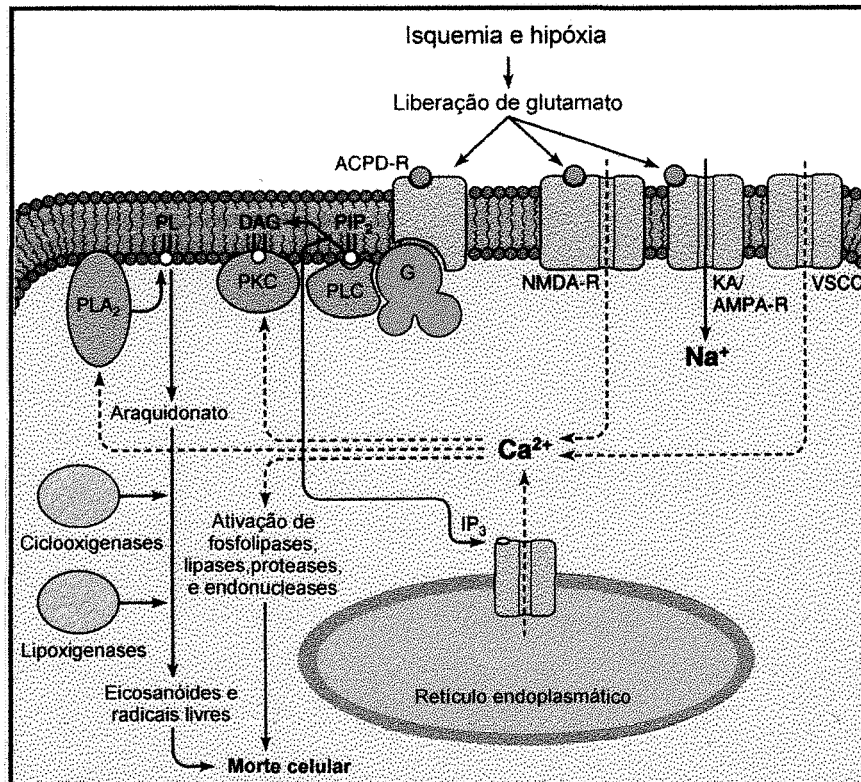


FIGURA 8: Diagrama hipotético ilustrando o envolvimento de receptores glutamatérgicos, íons cálcio e degradação de fosfolipídios de membrana durante a isquemia cerebral. **ACPD-R, KA/AMPA-R e NMDA-R:** receptores glutamatérgicos; **DAG:** diacilglicerol; **G:** proteína G; **IP₃:** inositol tri-fostato; **PIP₂:** fosfoinositol bisfosfato; **PKC:** proteína quinase C; **PL:** fosfolipídio; **PLA₂:** fosfolipase A₂; **PLC:** fosfolipase C; **VSCC:** canais de cálcio dependentes de voltagem. Baseado em Farooqui, 1994.

6.3.8 Radicais Livres

A isquemia e a reperfusão favorecem a formação de radicais livres. Depois da isquemia, as mitocôndrias estão debilitadas em função da abstinência de oxigênio. O oxigênio que volta a circular pode não ser usado totalmente pela fosforilação oxidativa, gerando radicais livres extremamente danosos para o tecido (PHILLIS, 1996). Há uma redução nos antioxidantes endógenos, e os que existem

são usados na tentativa de consumir os radicais que estão sendo produzidos. O principal agente é o radical hidroxil, que causa, principalmente, peroxidação lipídica nos neurônios vulneráveis (SWEENEY *et al.*, 1995).

A ativação de receptores NMDA gera óxido nítrico (NO) de maneira Ca^{2+} -dependente, levantando a hipótese de que o NO participa da neurotoxicidade ocasionada pelo glutamato. Como o NO pode agir também como uma molécula sinalizadora, vários estudos foram feitos para determinar o seu papel na isquemia. As evidências obtidas sugerem que o NO pode ser tanto protetor quanto destrutivo, dependendo do estágio de evolução do processo isquêmico e da fonte de NO (IADECOLA, 1997; CHAN, 1996).

➤ 6.3.9 Expressão Gênica e Síntese de Proteínas

Durante a isquemia ocorre uma clara redução na síntese de proteínas. O mecanismo mais plausível é a inibição da iniciação da cadeia polipeptídica, porque há uma desagregação dos ribossomos. A síntese de proteínas retorna aos níveis normais com a recirculação de sangue (FAROOQUI, 1994).

A isquemia e a reperfusão podem induzir a síntese de proteínas específicas, apesar da redução geral da síntese, por exemplo as Heat Shock Proteins (HSP) (LI *et al.*, 1995), vimentina, e GFAP. A indução dessas proteínas pode estar relacionada com o aumento da resistência à injúria (HSP) e resposta glial à lesão (GFAP e vimentina) (KINDY *et al.*, 1992).

➤ 6.3.10 Morte Celular Isquêmica

A morte de neurônios depois de um insulto isquêmico pode ser imediata ou tardia. A imediata é causada pelo mecanismo necrótico, enquanto a tardia ocorre por necrose ou apoptose. Apoptose é a morte celular programada, em que 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+} (SWEENEY *et al.*, 1995). A inibição da síntese de proteínas parece estar relacionada com a morte neuronal, pois a morte nas áreas vulneráveis é precedida por uma severa inibição na síntese protéica, e a restauração da síntese previne a injúria neuronal (HOSSMANN, 1993).

Os mecanismos para a morte celular tardia ainda não são claros. Há dados na literatura demonstrando (CHOI, 1996; VEXLER *et al.*, 1997) e descartando (BEILHARZ *et al.*, 1995) a presença de apoptose nesses casos.

6.3.11 Papel dos Astrócitos na Plasticidade

Os astrócitos desempenham um grande número de funções no cérebro e são capazes de modificar suas características em resposta a alterações no meio, ou seja, eles exibem um alto grau de plasticidade no seu fenótipo (SHAO E MCCARTHY, 1994). Durante o desenvolvimento embrionário, os astrócitos fornecem uma base para a migração neuronal. É possível que, em resposta à injúria, eles retomem esse papel; o aumento de GFAP torna possível o restabelecimento das conexões do sistema nervoso que foram rompidas. Esta função pode ser auxiliada pela liberação de fatores que promovem o crescimento das células nervosas. Então, a expressão da GFAP pode estar relacionada com o possível efeito protetor para os neurônios em regiões do cérebro que permanecem viáveis depois de uma isquemia (LI *et al.*, 1995).

Os astrócitos são os responsáveis por recaptar o glutamato do meio extracelular e transformá-lo em glutamina. Estudos mostram que a imunorreatividade para glutamina sintetase e o número de astrócitos que expressam a enzima aumentam no período de reperfusão, indicando um aumento no metabolismo de glutamato pelos astrócitos (PETITO *et al.*, 1992).

Há vários outros exemplos de plasticidade astrogliar: a) as células astrogliais reconhecem sinais neuronais e sofrem mudanças qualitativas e quantitativas na células; b) a expressão de receptores pode ser regulada por sinais intrínsecos e extrínsecos; c) a expressão de receptores adrenérgicos muda em resposta à degeneração neuronal (provável papel na gliose reativa). A plasticidade dos astrócitos pode desempenhar um papel central em muitas mudanças que ocorrem no funcionamento do cérebro normal e lesionado (SHAO E MCCARTHY, 1994).

A isquemia cerebral pode levar à morte um número considerável de neurônios na área CA₁ do hipocampo, provocando danos irreversíveis na estrutura funcional desta região. Como resposta a esta morte, os astrócitos desenvolvem

uma reação chamada de gliose, que altera todo o seu fenótipo para que eles possam responder à morte neuronal (RIDET *et al.*, 1997). A fosforilação da GFAP é uma alteração plástica dos astrócitos, mudando a forma celular por alterar o estado de polimerização dos filamentos intermediários (INAGAKI *et al.*, 1990). A glia pode desempenhar um papel ativo na formação das sinapses depois de uma injúria no cérebro adulto, e as possíveis alterações no estado de fosforilação da GFAP na lesão isquêmica podem ser cruciais para este papel, já que podem modificar a forma das células astrocíticas e, conseqüentemente, seus processos podem atingir outras regiões o que pode auxiliar na formação de novas sinapses depois da injúria (RAISMAN, 1991).

OBJETIVOS

- Investigar alterações no imunoconteúdo de GFAP, como resposta da glia à lesão isquêmica, caracterizando a gliose reativa;
- Verificar alterações no estado de fosforilação da GFAP, como possível resposta astrocítica ao dano cerebral;
- Acompanhar as alterações no imunoconteúdo e no estado de fosforilação em diferentes tempos de reperfusão;
- Analisar alterações no estado de fosforilação de outras fosfoproteínas do hipocampo detectadas pela metodologia utilizada, em resposta à lesão isquêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAIS

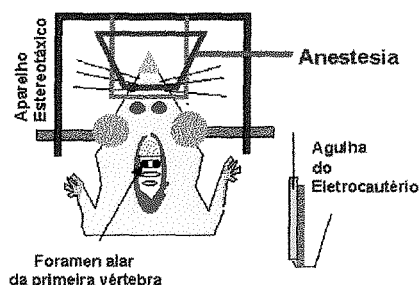
$[^{32}\text{P}]\text{Na}_2\text{HPO}_4$ foi comprado da Companhia Nacional de Energia Nuclear, CNEN, São Paulo. Acrilamida, bis-acrilamida, SDS, β -mercaptoetanol, nonidet P-40, TEMED, Anti-GFAP policlonal, foram obtidas da Sigma. "Anti-Rabbit" IGg biotinilada, Peroxidase conjugada com streptavidina e reagentes para a detecção do luminol foram obtidos da Amersham. Demais reagentes utilizados foram de qualidade P.A.

2. CIRURGIA

Foram usados ratos Wistar machos e fêmeas, provenientes do biotério da UFRGS, com idade média de 90 dias.

Método de Oclusão dos 4 Vasos

1ª fase: Electrocoagulação das Artérias Vertebrais



2ª fase: Isolamento das Artérias Carótidas

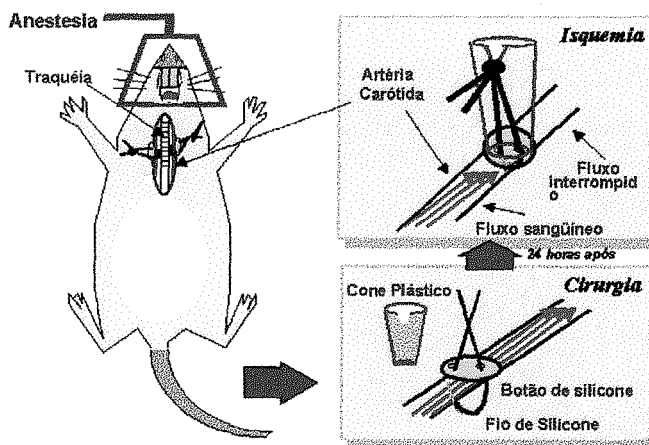


FIGURA 9: Diagrama ilustrativo, mostrando as etapas do processo de isquemia cerebral experimental descrito no texto.

A isquemia foi induzida seguindo-se o método de oclusão dos 4 vasos (FIGURA 9). Os animais foram anestesiados com halotano e tiveram suas artérias vertebrais coaguladas utilizando-se um eletrocautério. As duas artérias carótidas comuns foram envoltas por um fio de silicone preso por um botão, sem interromper o fluxo sanguíneo. No dia seguinte, utilizando-se um cone plástico, o fio foi puxado e preso ao cone por um nó. Este procedimento foi mantido por 20 min, interrompendo-se o fluxo de sangue. Os animais que não perderam o reflexo de endireitamento em dois minutos foram descartados. Este método reduz o fluxo cerebral a menos de 10% (NETTO *et al.*, 1993). Com a finalidade de descartar qualquer efeito da cirurgia e não da isquemia sobre as proteínas estudadas, utilizaram-se animais “controle cirúrgico”, que sofreram somente a cirurgia, sem terem o fluxo sanguíneo das carótidas interrompido. Estes animais foram mortos nos mesmos tempos dos animais isquêmicos.

3. MARCAÇÃO DAS FOSFOPROTEÍNAS

Os ratos foram mortos por decapitação com 1, 4, 7, 14 e 30 dias após a volta do fluxo sanguíneo (período de reperfusão). Estes intervalos foram escolhidos com a finalidade de comparar resultados anteriores obtidos em nosso laboratório, nos estudos de lesões com ácido caínico (LENZ *et al.*, 1997).

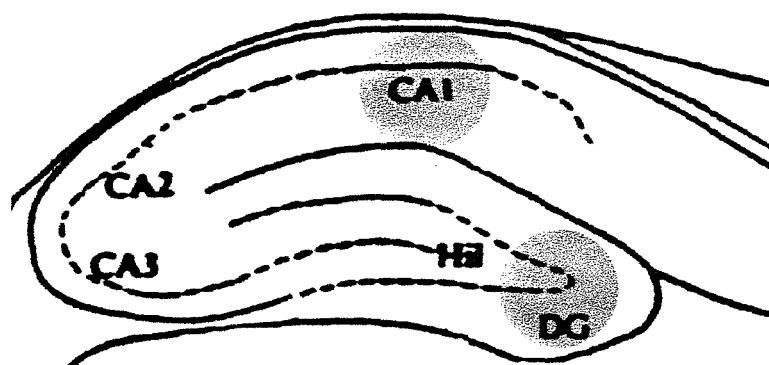


FIGURA 10: Representação esquemática do hipocampo, mostrando as regiões CA₁, CA₂, CA₃ e giro denteado. Os círculos representam as áreas em que foram retiradas as micofatias. Segundo Paxinos e Watson, 1986.

Os hipocampos foram dissecados sobre gelo e cortados em fatias de 0,4 mm de espessura usando um "McIlwain chopper". Foram utilizados os hipocampos direito e esquerdo, separadamente, dos quais foram escolhidas as fatias de número 12 e 13, iniciando-se a contagem a partir da região dorsal. Destas fatias foram retiradas microfatias redondas das regiões CA₁ e DG, com com um *punch* de 0.7 mm de diâmetro interno (FIGURA 10).

Foram pré-incubadas duas microfatias por tubo de ensaio por 30 min em 200µl do meio de incubação (TABELA 1). Este procedimento foi realizado à temperatura ambiente e os tubos foram gaseificados com O₂. A seguir, o meio de pré-incubação foi retirado e foram adicionados 200µl de meio contendo 80µCi de [³²P] ortofosfato, gaseificado com O₂ e as microfatias foram incubadas a 30°C por 60 min, sob agitação constante.

A reação foi interrompida com a adição de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% e as microfatias foram mantidas no gelo por 10 min. Após, elas foram lavadas uma vez com 1 ml de TCA 4% para eliminar o excesso de fosfato radioativo não incorporado e duas vezes com 2 ml de água destilada para eliminar a acidez. O tecido foi então solubilizado em 70µl de solução de amostra sem β-mercaptoetanol (TABELA 2). Desta solução, foram retiradas duas alíquotas de 10µl para dosagem de proteínas, e a seguir adicionou-se 10µl da mesma solução de amostra contendo β-mercaptoetanol 12%, para dar uma concentração final de 2%. Isto foi necessário pois o método de dosagem de proteínas é sensível ao β-mercaptoetanol.

Para dosagem de proteínas utilizou-se o método de Peterson (PETERSON, 1979) que usa a base do método de Lowry *et al.* (1951), com algumas alterações para permitir a presença do detergente, importante para a solubilização das proteínas.

TABELA 1: Meio de incubação

Composto	Conc.
NaCl	124mM
KCl	4mM
MgSO ₄	1,2mM
NaHEPES (pH 7.4)	25mM
glicose	12mM
CaCl ₂	1mM
O ₂	15 min

TABELA 2: Solução de amostra

Composto	Conc.
uréia	9 M
lisina	12,5 mM
Nonidet P-40	4%
β-Mercaptoetanol	2%

4. ANÁLISE DAS FOSFOPROTEÍNAS

4.1 Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional consiste em separar as proteínas segundo duas propriedades distintas. Neste caso, as proteínas foram separadas na primeira dimensão segundo a sua carga por uma eletroforese com gradiente de pH (FIGURA 11) e na segunda dimensão pela eletroforese de gel de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) (FIGURA 12), que separa as proteínas basicamente pelo peso molecular.

4.1.1 Primeira Dimensão - NEPHGE

Foi utilizado o método de eletroforese em gradiente de pH não equilibrado (NEPHGE) conforme descrito por O'Farrell *et al.* (1977). Neste tipo de eletroforese, o gradiente de pH é conseguido através de polímeros com um pKa

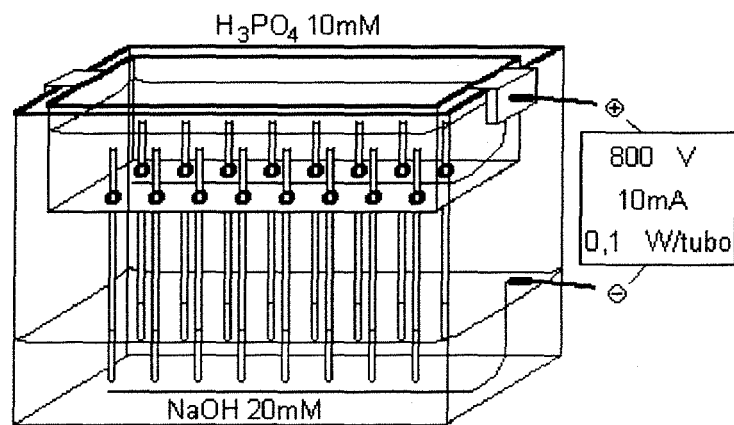


FIGURA 11: Primeira dimensão.

definido denominados anfóteras. Foi utilizado um gradiente de 2 a 10. Este método é denominado não equilibrado porque as proteínas não atingem o seu ponto isoelétrico. A concentração de acrilamida usada na NEPHGE foi de 3% (LENZ *et al.*, 1997).

Foram aplicados entre 20 e 25 μ g de proteína em cada tubo e usou-se como marcador de frente de corrida o citocromo C. A corrida demora, aproximadamente, 2 horas usando as soluções e condições de voltagem, corrente e potência mostrados na Figura 11. Num experimento usual foram corridos 16 géis de NEPHGE. Após a corrida os tubos contendo os géis foram congelados à -20 °C até sua utilização.

4.1.2 Segunda Dimensão - SDS - PAGE

Os géis da SDS-PAGE foram preparados em conjuntos de 8. Os componentes do gel de separação são mostrados na Tabela 3.

Os géis da primeira dimensão foram expulsos do tubo e imersos em uma solução contendo tampão superior, SDS 2% e β -mercaptoetanol 1% por 15 min, o que promove a remoção do Nonidet e ligação do SDS às proteínas. A seguir, dois géis de primeira dimensão, um controle e um tratado, foram aplicados num gel de SDS-PAGE, com a extremidade ácida voltada para o centro. Todas as comparações entre o controle (C) e o tratado (T) foram feitas em um mesmo gel. A corrida teve uma duração média de 7 horas, sob as condições indicadas na Figura 12.

TABELA 3: SDS- PAGE

Compostos	Separação	Entrada
Acrilamida/ bisacrilamida (39;1)	9%	4%
Tampão tris HCl	373mM pH 8,8	123mM pH 6,8
SDS	0,1%	0,1%
Glicerol	7,46%	-
TEMED	0,06%	0,05%
Persulfato	0,045%	0,098%
Volume	402ml	91ml

% expressa em v/v

Após a corrida, os géis foram colocados em uma solução fixadora (ácido acético 7%, metanol 53% e água 40%), por 18 horas em média, e a seguir imersos por 2 horas numa solução de secagem (metanol 50%, glicerol 1% e água 49%). Depois desse processo, os géis foram montados entre dois papéis celofane sobre uma placa de vidro e secos com a ajuda de lâmpadas infra-vermelho. Depois de secos, os géis foram expostos a filme de raio X (X Kodak X-Omat), por tempos variáveis de acordo com a atividade do isótopo, em média por 18 horas no "freezer" - 70°C (RODNIGHT *et al.*, 1988).

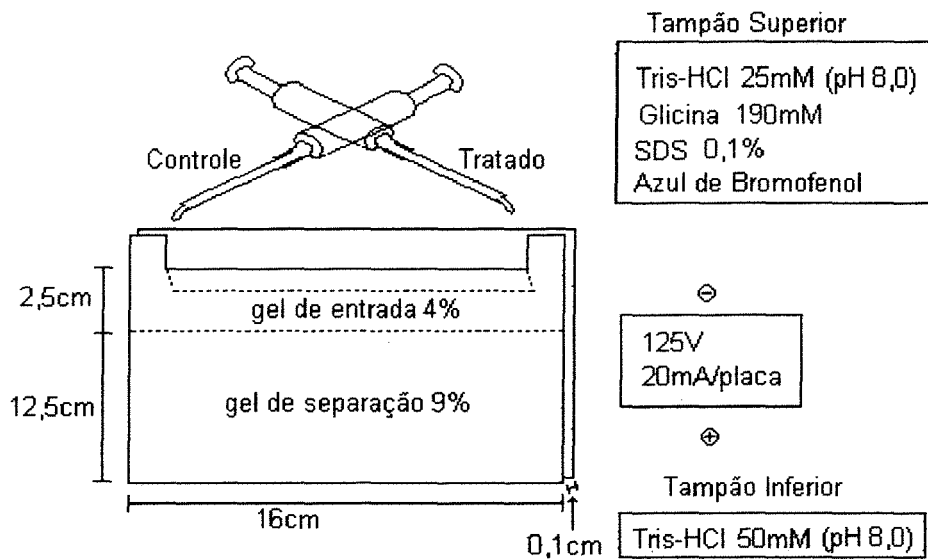


FIGURA 12: Segunda dimensão.

5. "IMMUNOBLOTTING"

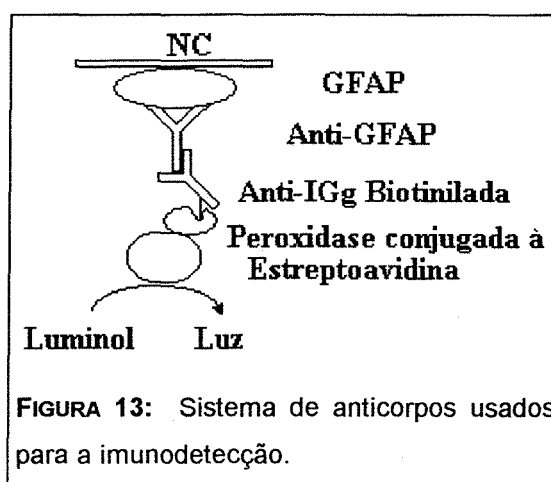
Com o auxílio do filme, identificou-se a posição da GFAP no gel e recortou-se um retângulo de 1X1,5 cm (um do lado tratado e outro do controle). Este pedaço de gel foi hidratado com tampão contendo Tris 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1% por 45 min, retirando-se o papel celofane. Em seguida, o gel foi lavado por 30 segundos com tampão Bjerrum (Tris 48mM, glicina 39mM, metanol 20%) para retirar o excesso de SDS (HEEGARD E BJERRUM, 1988).

As proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (NC) usando o sistema semi-seco (Trans-blot RD® - Bio Rad). Para isso, organizou-se sobre o ânodo: 2 folhas de papel filtro Sigma *Blotting Paper*, a membrana de NC, o gel contendo as proteínas a serem analisadas, e novamente 2 papéis filtro, todos previamente embebidos em tampão Bjerrum tomando-se o cuidado de não deixar bolhas de ar entre os papéis. Tanto os papéis filtro como a NC foram cortados com uma área 20% maior do que o gel seco. Sobre este "sanduíche" foi colocado o cátodo. As condições da transferência foram as seguintes: corrente: 1,2 mA/cm², voltagem: 15V durante 60 minutos.

Após a transferência, a NC foi lavada com uma solução fixadora contendo metanol 40% e ácido acético 10%. A NC foi lavada com água, seca e exposta a um filme de raio X para confirmar a transferência das fosfoproteínas e para servir como base no estudo comparativo entre a incorporação de ^{32}P e o imunconteúdo.

A NC foi incubada com solução MTBS, constituída de leite em pó desnatado 5% (leite Molico) em TBS (Tris 20mM, NaCl 500mM, pH 7.5) por, pelo menos, 2 horas. Esta etapa serve para bloquear a NC impedindo a ligação inespecífica dos anticorpos. A seguir, incubou-se com os anticorpos anti-GFAP, anti IGg e peroxidase por uma hora, diluídos em MTBS.

Entre as incubações com os anticorpos eram feitas duas lavagens, de 5 min cada, com uma solução contendo TBS mais 0,05% de Tween 20. No nosso sistema foram usados anti-GFAP policlonal (diluição de 1:500) como primeiro anticorpo, anti-IGg de coelho biotinizada (1:400) como segundo anticorpo e peroxidase conjugada a estreptoavidina (1:3000) (FIGURA 13).



Para a identificação da reação, utilizou-se o método do luminol, onde a peroxidase reage com o reagente de luminol (Amersham International) emitindo luz, que pode ser medida pela impressão do filme de raio-X e quantificada por densitometria. Este valor fornece a quantidade relativa de GFAP, fosforilada e não fosforilada. As amostras de animais controle e tratado sempre foram analisados numa mesma NC, para que seus valores pudessem ser comparados.

6. QUANTIFICAÇÃO E ESTATÍSTICA

A quantificação foi feita usando-se um densitômetro de varredura "Hoefer Scientific Instruments, San Francisco". A sensibilidade do aparelho foi ajustada de acordo com a mancha mais forte, medindo-se a mais fraca com o mesmo

ajuste. Para a quantificação dos picos foi utilizado o produto da altura versus a largura.

Para avaliar a relação entre a incorporação relativa de ^{32}P e a imunodeteção relativa foi considerado o valor da fosforilação na exposição da NC, ou seja a quantidade relativa de ^{32}P incorporado na GFAP e transferido para a NC, e a imunodeteção. Deve-se ressaltar que os valores são sempre expressos em % do controle, estando C e T no mesmo gel. Essa relação entre a fosforilação e o imunoc conteúdo mostra os valores da % de proteína fosforilada em cada um dos tempos de reperfusão. A altura e a largura dos picos foram medidos e a sua multiplicação dava um valor aproximado para a área. Para esta relação consideraram-se os valores de fosforilação na NC e não no gel em função da perda de proteína que pode acontecer na transferência. Se ambos os valores (fosforilação e imunoc conteúdo) forem analisados na nitrocelulose, anula-se qualquer alteração do resultado causada pela transferência. Os resultados da fosforilação absoluta, sem comparar com o imunoc conteúdo, foram representados pela fosforilação no gel de SDS-PAGE.

O controle foi considerado como 100%, sendo o tratado (tanto o animal isquêmico quanto o "controle cirúrgico") uma relação do controle. Estes dados foram logaritmizados, no intuito de normalizá-los, pois quando se possui dados percentuais abaixo e acima de 100%, existe uma marcada fuga da linearidade, sendo os dados abaixo de 100% comprimidos e os dados acima estendidos, e o uso do logaritmo torna os dados mais lineares (ZAR, 1984). Para isto, todas as relações C/T foram transformadas em logaritmo e estes valores foram usados para o cálculo da média, da dispersão dos dados (erro padrão) e da significância (teste t). A logaritmização não alterou a significância dos dados. O n foi entre 5 e 10 para os grupos isquêmicos e entre 3 e 5 para os "controle cirúrgico". A análise estatística dos dados foi feita usando ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan, para comparar os períodos de reperfusão entre si, e o teste t pareado para comparar cada período com o controle 100%.

RESULTADOS

Os resultados da fosforilação e imunoconteúdo de GFAP foram expressos em logaritmo (eixo Y), no eixo X estão representados os dias de reperusão. O controle foi considerado 100% e os tratados foram expressos em porcentagens do controle. Nas Figuras 17, 20, 22 e 23 a fosforilação é representada pelos resultados obtidos diretamente pela densitometria das autorradiografias obtidas pela exposição do gel ao filme de raio X. A porcentagem de proteína fosforilada refere-se à quantidade de GFAP marcada com ^{32}P em relação à quantidade total de GFAP detectada pela imunodeteção.

Nas Figuras 18 e 21 estão representados os valores isolados de fosforilação através da densitometria das autorradiografias obtidas pela exposição da nitrocelulose após o "*Blotting*", e do imunoconteúdo de GFAP obtido por densitometria dos filmes de raio X após imunorreacção detectada pelo Luminol. As Tabelas 4 e 5 relatam uma quantificação visual da fosforilação das proteínas citadas, através da observação das autorradiografias.

Como foi descrito anteriormente, os hemisférios direito e esquerdo de cada animal foram analisados separadamente, durante o processo experimental. Como não foram observadas diferenças no perfil fosfoprotéico das proteínas analisadas, os resultados referentes aos hemisférios direito e esquerdo foram reunidos em uma única tabela, analisando-se os resultados finais a partir desses dados.

A Figura 14 mostra uma fotografia do hipocampo, ilustrando a morte neuronal na região CA₁ e a resistência das células do giro denteado a um insulto isquêmico. Esta fotografia foi feita anteriormente pelo Laboratório de Isquemia Cerebral, através da mesma técnica de isquemia experimental utilizada neste trabalho.



FIGURA 14: Fotografia ilustrativa do efeito da isquemia cerebral sobre as células neuronais do hipocampo. A seta indica a ausência de células piramidais na região CA₁ e a cabeça de seta mostra a manutenção da camada celular no giro denteado. Corado com cresil-violeta.

A Figura 15 mostra uma autorradiografia ilustrativa que indica as fosfoproteínas alteradas pela isquemia. Observa-se, na região CA₁, um nítido aumento na incorporação de ³²P pela GFAP, o desaparecimento da sinapsina I fosforilada, a diminuição do estado de fosforilação da proteína Cpp-40 e o aparecimento de uma fosfoproteína com peso molecular aparente de 25 kDa (pp25).

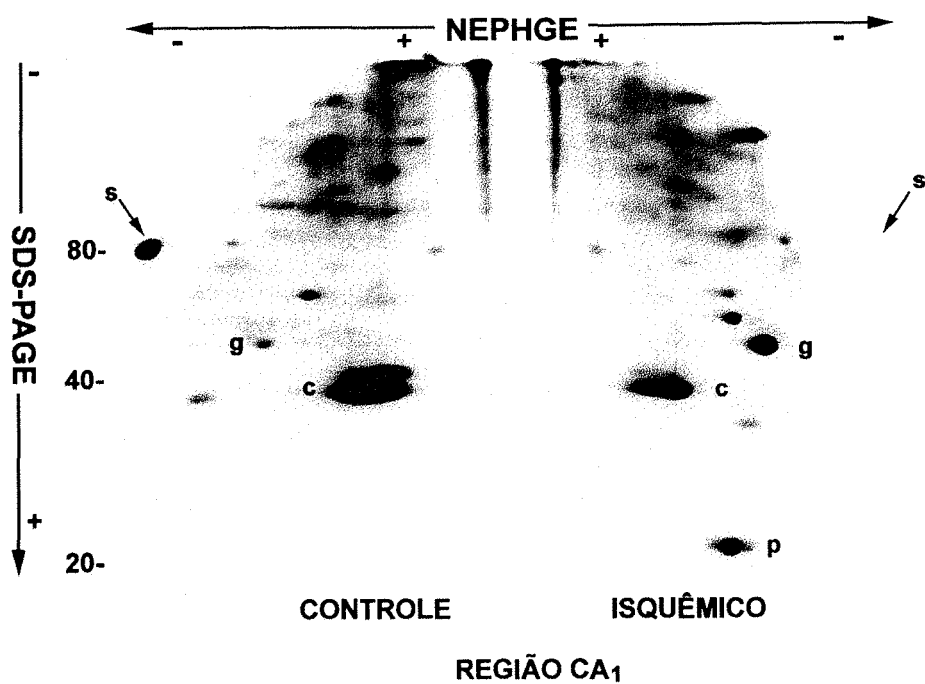


FIGURA 15: Autorradiografia indicando as fosfoproteínas alteradas pela isquemia. Exemplo da região CA₁, com 7 dias de reperfusão. g-GFAP; s- Sinapsina I; c- Cpp-40; p- pp25

1. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE A GFAP NA REGIÃO CA₁

1.1 Fosforilação

A Figura 16 mostra uma comparação, através das autorradiografias, do estado de fosforilação da GFAP nos diferentes tempos de reperfusão estudados. Observou-se um aumento de fosforilação em todos os períodos analisados, que atinge seu máximo aos 14 dias de reperfusão.

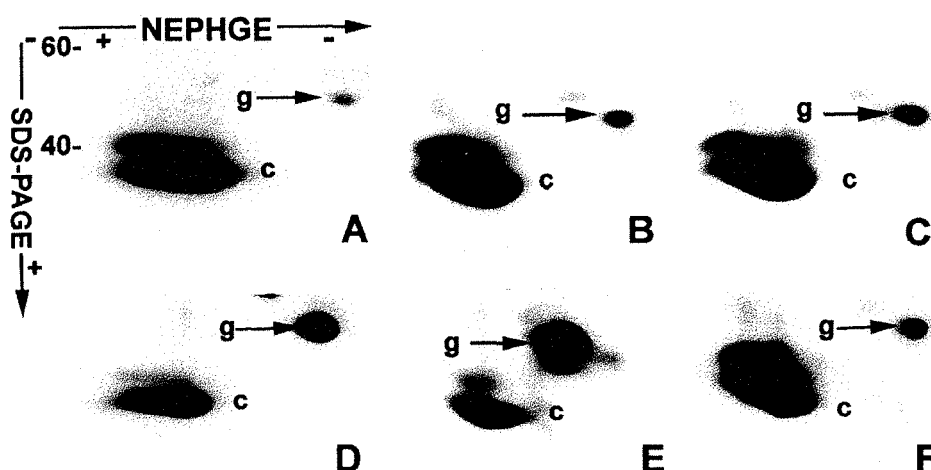


FIGURA 16: Conjunto de autorradiografias mostrando as alterações no perfil de fosforilação da GFAP na região CA₁ do hipocampo em diferentes tempos de reperfusão. **A:** controle; **B:** 1 dia; **C:** 4 dias; **D:** 7 dias; **E:** 14 dias e **F:** 30 dias.

A Figura 17 refere-se à quantificação densitométrica das autorradiografias. Observou-se um aumento de fosforilação absoluta (detectada no gel) durante todos os tempos de reperfusão estudados (FIGURA 17). Este aumento foi

detectado a partir do primeiro dia de reperfusão e permaneceu significativo em relação ao controle aos 30 dias após o insulto isquêmico. Aos 14 dias, a incorporação relativa de ^{32}P pela GFAP foi significativamente diferente de todos os outros grupos, além do controle.

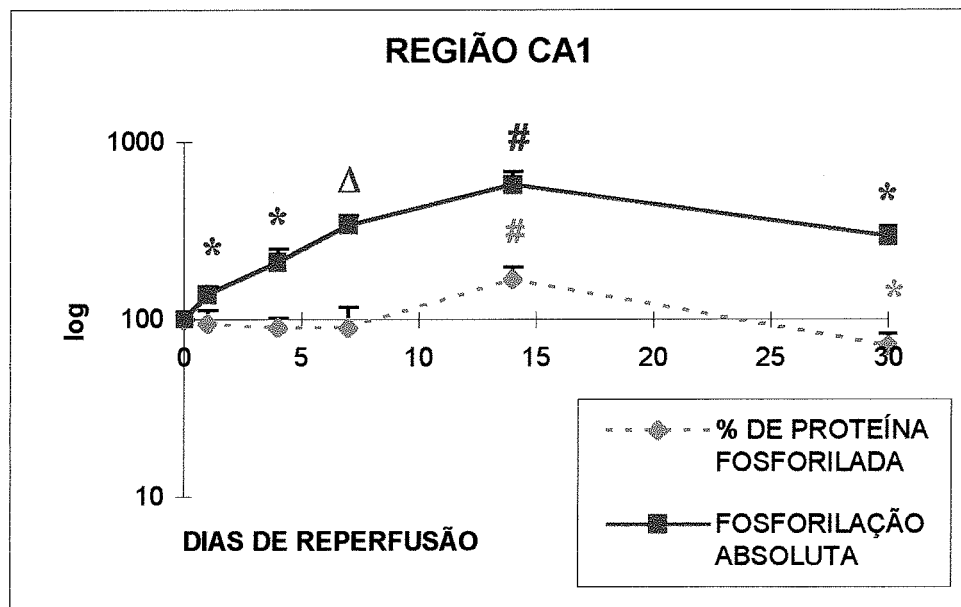


FIGURA 17: Alterações no estado de fosforilação da proteína GFAP na região CA₁ do hipocampo nos períodos de 1 a 30 dias após o insulto isquêmico (n, em média, 7 animais).

* diferente do controle para $p < 0,05$

diferente do controle e de todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$)

Δ diferente do controle e do grupo 1 dia ($p < 0,05$)

As cores das marcações mostradas no gráfico se referem à sua respectiva curva.

A porcentagem de proteína fosforilada sofreu alterações significativas, em relação ao controle, aos 14 e aos 30 dias de reperfusão. Nos demais períodos, o aumento de fosforilação da proteína foi acompanhado por um aumento no seu imunoconteúdo, como será mostrado a seguir (FIGURA18).

1.2 Imunoconteúdo

Foi detectado um aumento significativo do imunoconteúdo em relação ao controle na região CA₁ do hipocampo, a partir de 1 dia de reperfusão. Estas alterações mantiveram-se até os 30 dias, como pode ser visto na Figura 18. Como foi dito anteriormente, este aumento do imunoconteúdo de GFAP foi paralelo ao aumento de fosforilação nos tempos de 1, 4, e 7 dias de reperfusão, o que manteve constante a porcentagem de proteína fosforilada. Houve uma alteração significativa nesta relação somente aos 14 dias de reperfusão, onde o aumento de fosforilação foi maior que o de imunoconteúdo e aos 30 dias, onde o aumento de imunoconteúdo superou o de fosforilação. Aos 14 dias, o aumento de fosforilação foi significativamente diferente de todos os outros grupos, além do controle.

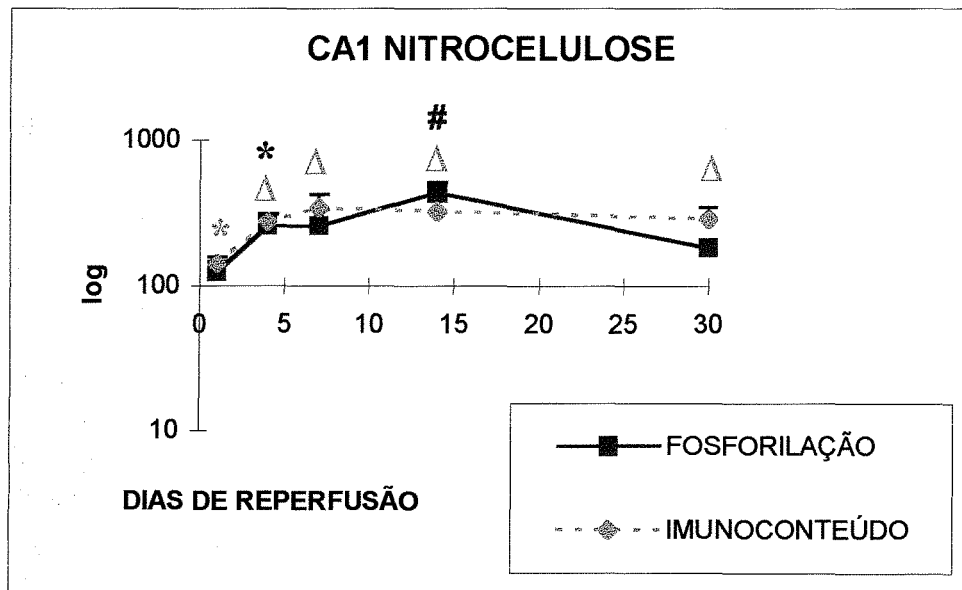


FIGURA 18: Alterações na fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP detectadas na nitrocelulose; região CA₁ (n, em média, 7 animais).

* diferente do controle para $p < 0,05$

Δ diferente do controle e do grupo 1 dia para $p < 0,05$

diferente do controle e de todos os outros grupos experimentais para $p < 0,05$

As cores das marcações mostradas no gráfico se referem à respectiva cor da curva.

2. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE A GFAP NO GIRO DENTEADO (DG)

2.1 Fosforilação

A Figura 19 mostra uma comparação das autorradiografias da fosforilação da GFAP na região do giro denteado nos tempos de reperfusão estudados. Pode-se observar que houve um aumento de fosforilação em 4, 7, 14 e 30 dias de reperfusão, em relação ao controle.

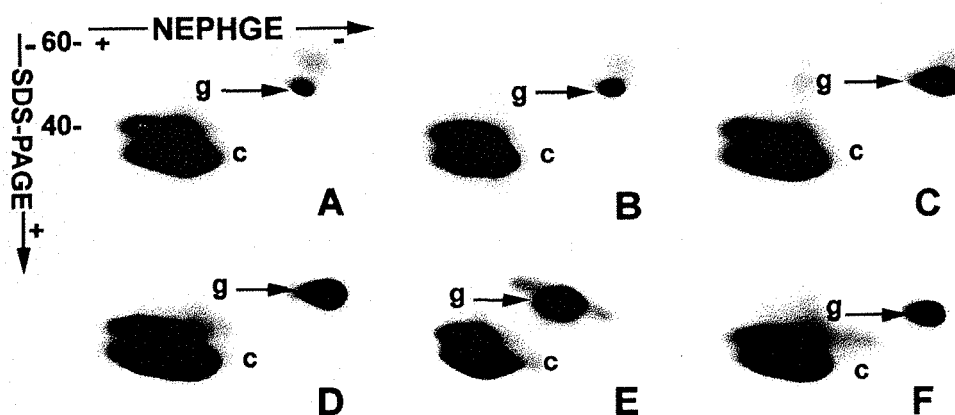


FIGURA 19: Autorradiografias comparativas do estado de fosforilação da GFAP em giro denteado no decorrer dos períodos de reperfusão considerados. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias.

A quantificação densitométrica da fosforilação absoluta da GFAP, apresentada na Figura 20, demonstrou um aumento significativo em relação ao controle a partir de 4 dias de reperfusão, mantendo-se até 30 dias depois da lesão.

A porcentagem de proteína fosforilada sofreu uma queda aos 7 dias de reperfusão, retornando aos valores basais aos 14 dias, como pode ser observado

na Figura 20. Esta alteração pode ser melhor visualizada na Figura 21, onde pode-se observar que o aumento no imunoconteúdo não foi acompanhado pela fosforilação neste período.

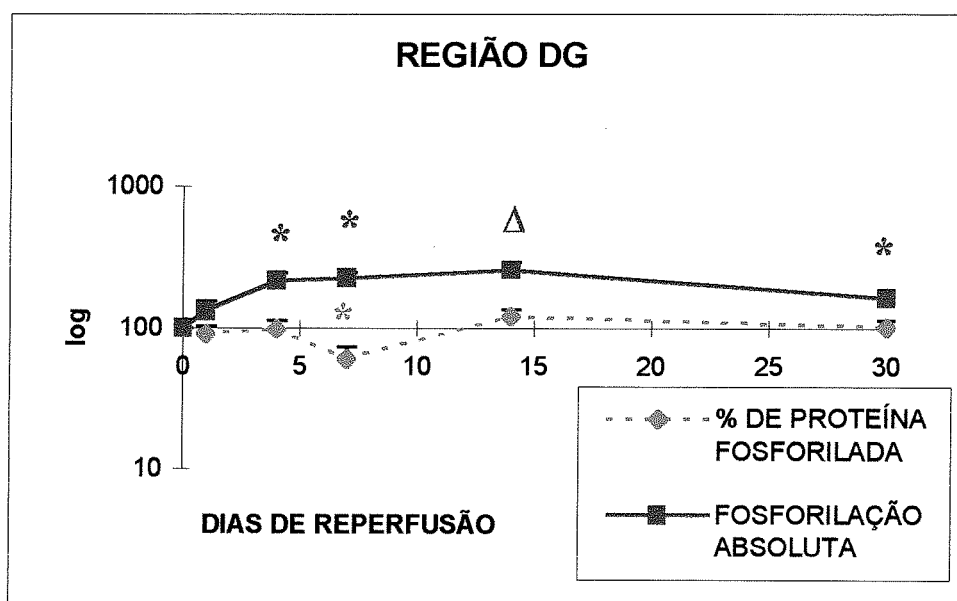


FIGURA 20: Alterações no perfil de fosforilação da região DG do hipocampo (n, em média, 7 animais).

* diferente do controle para $p < 0,05$

Δ diferente do controle e do grupo 1 dia ($p < 0,05$)

As cores das marcações representam a linha da mesma cor.

2.2 Imunoconteúdo

O imunoconteúdo de GFAP sofreu um aumento, relativo ao controle, na região DG do hipocampo aos 4, 7, 14 e 30 dias de reperfusão, como pode ser observado na Figura 21. Este aumento no imunoconteúdo foi acompanhado pela

fosforilação, com exceção do sétimo dia de reperfusão, onde o aumento de expressão da proteína não foi acompanhado pela fosforilação, conforme citado anteriormente.

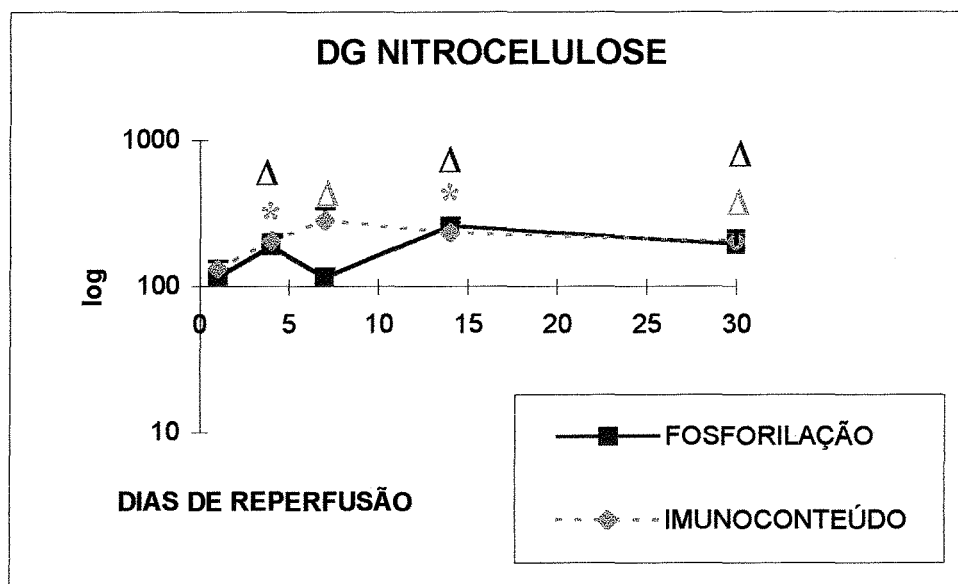


FIGURA 21: Alterações na fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP na região DG na nitorcelulose (n, em média, 7 animais).

* diferente do controle para $p < 0,05$

Δ diferente do controle e do grupo 1 dia ($p < 0,05$)

As cores das marcações representam a linha da mesma cor.

3. ANIMAIS “CONTROLE CIRÚRGICO”

Como foi descrito anteriormente, os animais “controle cirúrgico” sofreram o processo da cirurgia para a realização da isquemia experimental, mas não tiveram o fluxo sanguíneo cerebral interrompido. O objetivo deste procedimento é confirmar que as alterações observadas são devidas à isquemia e não ao procedimento cirúrgico. Tanto na região CA₁ quanto no giro denteado, não foram observadas alterações significativas na fosforilação e na porcentagem de proteína

fosforilada, em relação ao controle ou entre os grupos experimentais, de acordo com as Figuras 22 e 23.

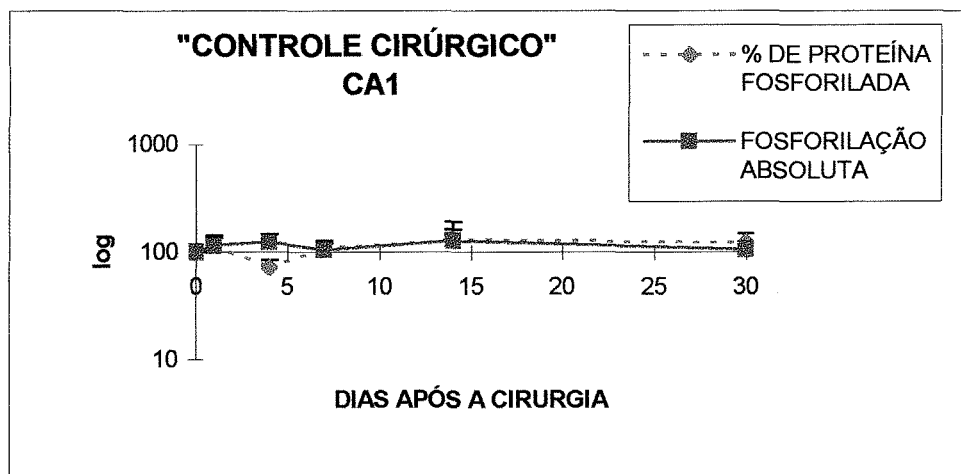


FIGURA 22: Perfil de fosforilação e porcentagem de proteína fosforilada da região CA₁ de animais "controle cirúrgico" (n, em média, 4 animais).

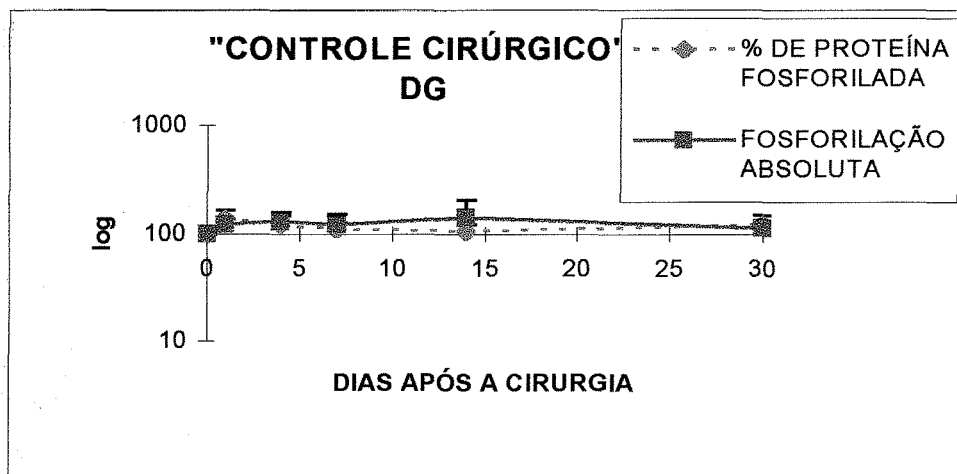


FIGURA 23: Perfil de fosforilação e porcentagem de proteína fosforilada da região DG de animais "controle cirúrgico", nos diferentes períodos após a cirurgia (n, em média, 4 animais).

4. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE OUTRAS FOSFOPROTEÍNAS

4.1 pp25

As Figuras 24 e 25 ilustram a incorporação de ^{32}P pela proteína denominada, em nosso laboratório, de pp25. Como ela só foi detectada nas fatias de hipocampo dos animais isquêmicos, os conjuntos de autorradiografias mostram somente o lado do gel em que se encontram as amostras de animais que sofreram a lesão isquêmica. De acordo com as Tabelas 4 e 5, pode-se notar a inexistência da forma fosforilada da proteína nas amostras de animais isquêmicos com 1 e 30 dias de reperfusão, tanto em CA₁ (TABELA 4) quanto em giro denteado (TABELA 5). A forma fosforilada da pp25 começou a ser detectada aos 4 dias de reperfusão, teve um aumento na incorporação de ^{32}P aos 7 e aos 14 dias e não foi mais detectada aos 30 dias de reperfusão. Observou-se também uma incorporação maior de ^{32}P pela proteína na região CA₁ do que em giro denteado.

A proteína pp25 não foi detectada em todas as amostras de animais tratados. Em função disso, a Figura 26 mostra a frequência de aparecimento da proteína, que se refere ao número de vezes em que ela apareceu, em relação ao total de amostras analisadas. Observou-se que a proteína apareceu mais frequentemente nas amostras de giro denteado do que nas de CA₁. Em giro denteado, ela apareceu com mais frequência nas amostras de animais isquêmicos com 7 dias de reperfusão, e na região CA₁ o ponto máximo de frequência aconteceu aos 14 dias.

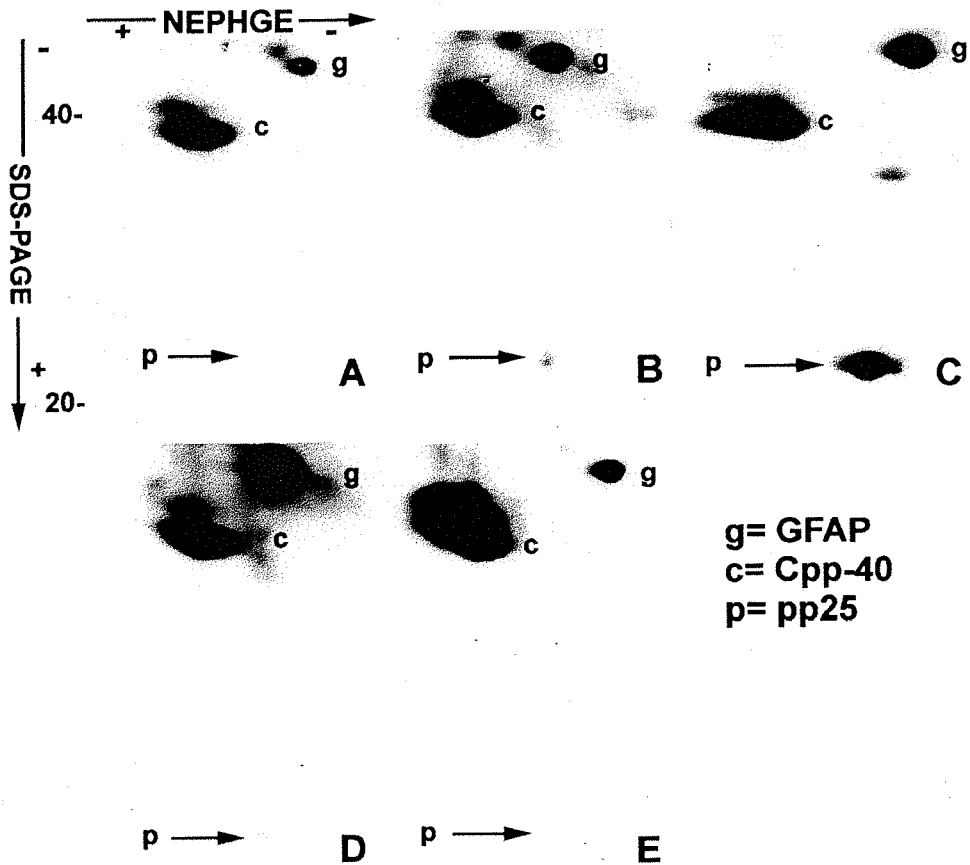


FIGURA 24: Autorradiografias comparativas da incorporação de ^{32}P pela proteína pp25 durante os diferentes tempos de reperfusão na região CA₁. A: 1 dia; B: 4 dia; C: 7 dias; D: 14 dias e E: 30 dias.

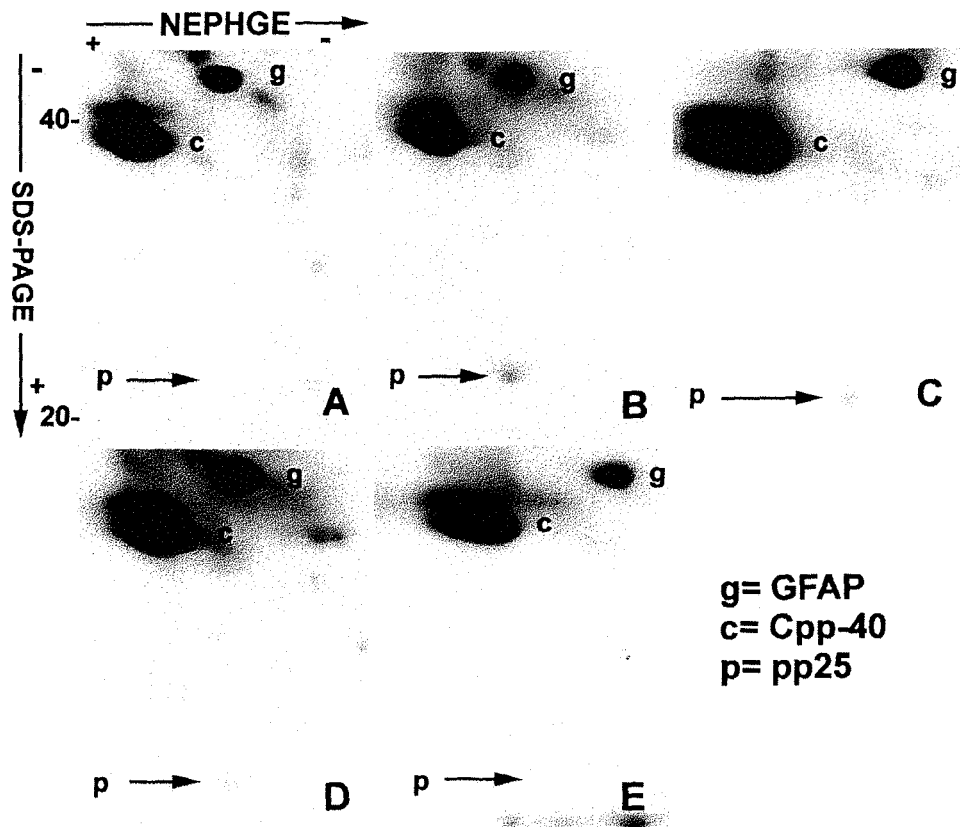


FIGURA 25: Conjunto de autorradiografias ilustrando a incorporação de ^{32}P pela proteína pp25 no giro denteado durante os períodos de reperfusão estudados. A: 1 dia; B: 4 dia; C: 7 dias; D: 14 dias e E: 30 dias.

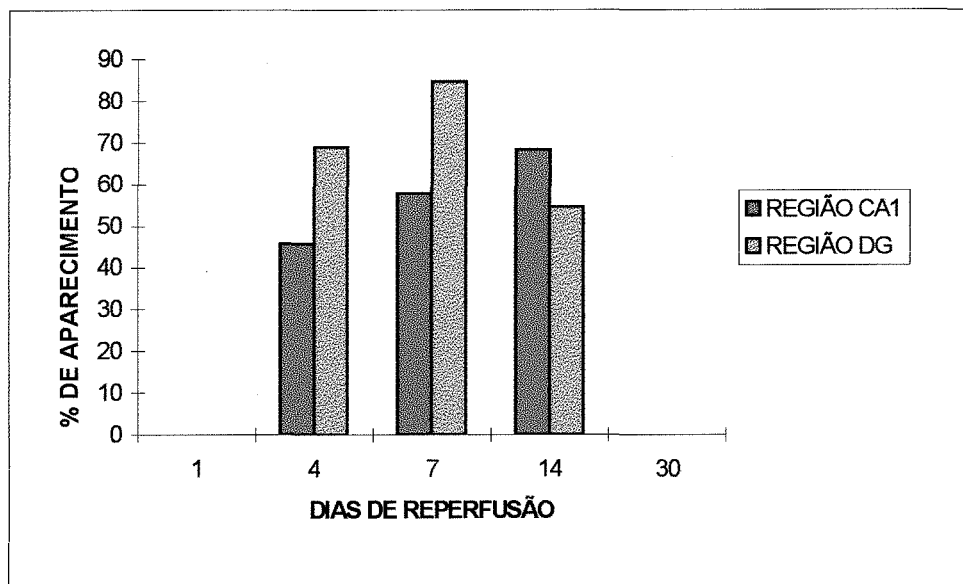


FIGURA 26: Porcentagem de aparecimento da pp25 nas amostras analisadas, nas regiões CA₁ e giro denteado durante os períodos estudados após o insulto isquêmico.

4.2 Sinapsina I

Como se pode observar na Figura 27 e na Tabela 4, na região CA₁, a sinapsina I começou a sofrer uma diminuição na fosforilação aos 4 dias de reperfusion, desapareceu aos 7 e 14 dias e reapareceu aos 30 dias.

No giro denteado, não foram observadas alterações visíveis na proteína em nenhum dos tempos de reperfusion estudados (FIGURA 28 e TABELA 5).

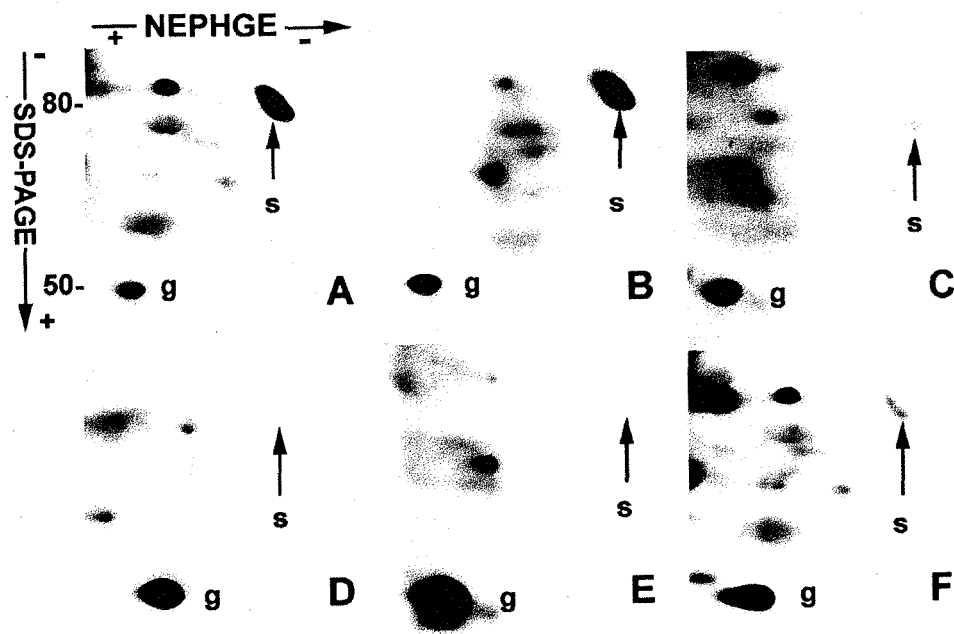


FIGURA 27: Conjunto de autorradiografias mostrando as alterações na fosforilação da sinapsina I, na região CA₁ do hipocampo, durante os períodos de reperusão analisados. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias.

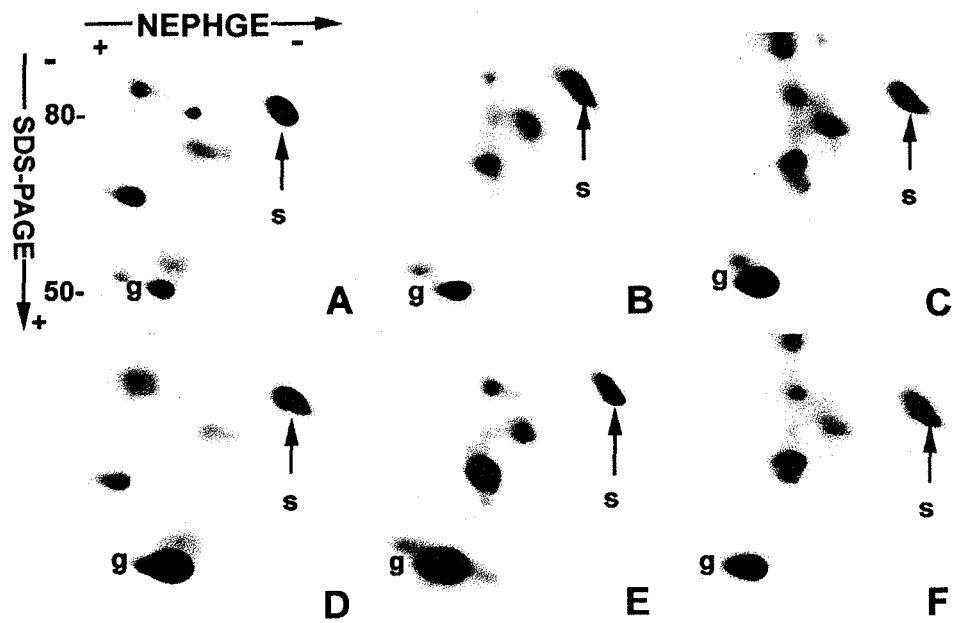


FIGURA 28: Autorradiografias ilustrando as modificações no estado de fosforilação da proteína sinapsina I em giro denteado em diferentes períodos depois da isquemia. **A:** controle; **B:** 1 dia; **C:** 4 dias; **D:** 7 dias; **E:** 14 dias e **F:** 30 dias.

4.3 Cpp-40

As Figuras 29 e 30 e as Tabelas 4 e 5 mostram as alterações na fosforilação da proteína chamada Cpp-40. Ela foi observada primeiramente por Rodnight *et al.* (1986) e não está descrita na literatura. De acordo com a Figura 29, seu comportamento na área CA₁ depois da isquemia foi semelhante ao da sinapsina I, apresentando uma diminuição no estado de fosforilação, principalmente aos 7 e 14 dias de reperfusão, recuperando-se aos 30 dias. Entretanto, não foram observadas alterações na fosforilação da Cpp-40 no giro denteado em nenhum período de reperfusão. As tabelas 4 e 5 mostram a quantificação visual da incorporação de ³²P pela proteína Cpp-40.

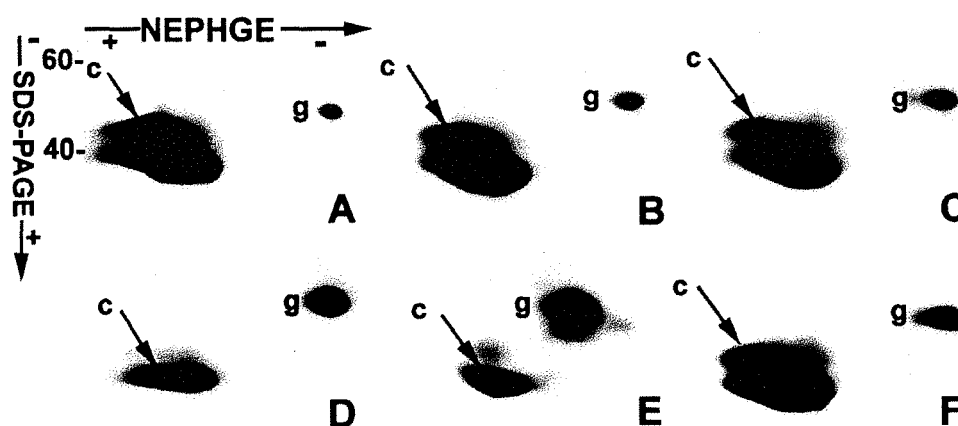


FIGURA 29: Autorradiografias comparativas do perfil de fosforilação da Cpp-40 na área CA₁ em diferentes períodos depois da lesão isquêmica. A: controle; B: 1 dia; C: 4 dias; D: 7 dias; E: 14 dias e F: 30 dias.

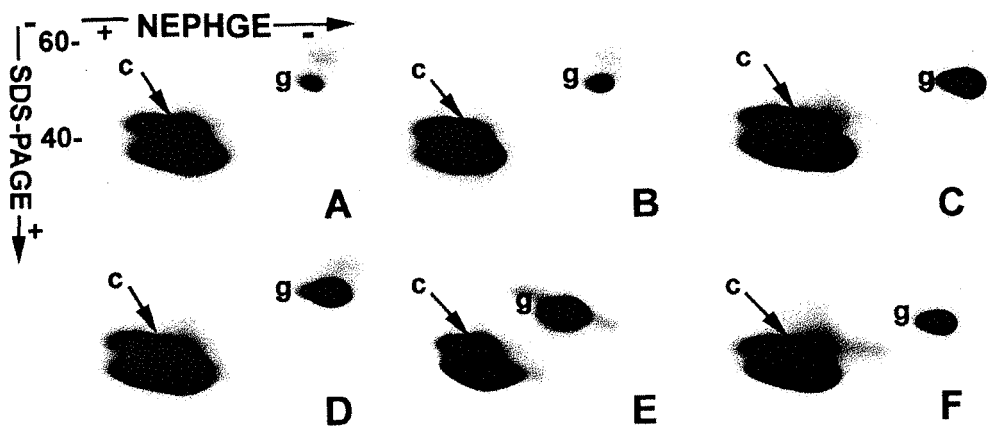


FIGURA 30: Autorradiografias ilustrativas do estado de fosforilação da Cpp-40 em giro denteado nos períodos de reperfusão estudados. **A:** controle; **B:** 1 dia; **C:** 4 dias; **D:** 7 dias; **E:** 14 dias e **F:** 30 dias.

As Tabelas 4 e 5 representam uma quantificação visual das alterações observadas nas proteínas relatadas acima. O controle foi considerado 100% para as proteínas sinapsina I e Cpp-40, e os demais grupos foram comparados com o controle. Para a proteína pp25, considerou-se 100% o período em que ela começou a ser detectada.

Proteína Região CA ₁	Dias de Reperfusão					
	Controle	1	4	7	14	30
pp25	0	0	++	+++	++	0
Sinapsina I	++	++	+	0	0	+
Cpp-40	++	++	++	+	+	++

TABELA 4: Quantificação visual da incorporação de ³²P, na região CA₁, pelas proteínas pp25, Sinapsina I e Cpp-40 depois de um insulto isquêmico.

+++ 200% ++ 100% + 50-75% 0 proteína não detectada

Proteína Região DG	Dias de Reperfusão					
	Controle	1	4	7	14	30
pp25	0	0	++	++	++	0
Sinapsina I	++	++	++	++	++	++
Cpp-40	++	++	++	++	++	++

Tabela 5: Quantificação visual do estado de fosforilação das proteínas pp25, Sinapsina I e Cpp-40, em giro denteado, em diferentes tempos de reperfusão.

++ 100% + 50-75% 0 proteína não detectada

DISCUSSÃO

Por muitas décadas, a gliose reativa que ocorre depois de uma injúria ao SNC foi considerada um impedimento para o crescimento e para a regeneração dos axônios. Entretanto, estudos mais recentes têm sugerido que, em certas condições, os astrócitos reativos podem fornecer um substrato favorável ao desenvolvimento axonal. Os astrócitos reativos poderiam ser considerados, assim como os neurônios, um elemento-chave de um meio dinâmico, formando, junto com os neurônios, uma unidade funcional envolvida na homeostase, plasticidade e neurotransmissão (RIDET *et al.*, 1997).

1. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE A GFAP

Uma das principais características da gliose reativa é o aumento na imunorreatividade da GFAP. Apesar do grande número de investigações, a regulação dessa resposta glial e sua significância funcional ainda não estão completamente elucidadas. Há evidências mostrando que, em resposta à lesão, a plasticidade neuronal se dá através do auxílio das células gliais (RAISMAN, 1991). Também alterações no estado de fosforilação da GFAP podem ser cruciais para uma resposta plástica dos astrócitos à lesão. Vários trabalhos atuais têm considerado que o aumento na expressão de filamentos intermediários está relacionado à preservação ou aumento da integridade estrutural do tecido cerebral (LANDIS, 1994).

1.1 Região CA₁

Vários estudos têm demonstrado que a região CA₁ do hipocampo é a área mais sensível a um insulto isquêmico, onde ocorre uma massiva morte neuronal (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991; ORDY *et al.*, 1993) (FIGURA 14). Nesta região, o aumento na fosforilação absoluta de GFAP foi observado já após 1 dia de

reperfusão. O imunocontéudo de GFAP também sofreu um aumento a partir de 1 dia depois da lesão, caracterizando uma gliose reativa em resposta ao dano isquêmico. Esse aumento mantém-se mesmo com 30 dias de reperfusão, indicando uma gliose permanente em resposta à morte neuronal que ocorreu na área CA₁. *Petito et al.* (1990) demonstraram que o aumento no imunocontéudo de GFAP pode permanecer por até mesmo 5 semanas na região CA₁, depois de um insulto isquêmico de 30 minutos.

Sabe-se que as células piramidais da região CA₁ do hipocampo podem sofrer dois tipos de morte depois da isquemia: a morte imediata e a tardia. Os aumentos significativos do imunocontéudo, do estado de fosforilação da GFAP e da porcentagem de proteína fosforilada observados aos 14 dias de reperfusão podem ser devidos a uma resposta plástica dos astrócitos à morte neuronal tardia, que pode acontecer vários dias depois do insulto. *Petito e Halaby* (1993) obtiveram um pico de imunocontéudo de GFAP também aos 14 dias de reperfusão, para lesões isquêmicas mais graves. O aumento na porcentagem de proteína fosforilada aos 14 dias indica que a GFAP está sofrendo uma despolimerização e, conseqüentemente, está acontecendo uma modificação no citoesqueleto glial, provavelmente como uma resposta adaptativa dos astrócitos às modificações que estão ocorrendo no meio em função da morte neuronal.

A diferença observada entre o aumento de fosforilação absoluta e o aumento de fosforilação da GFAP detectado na nitrocelulose pode ser devido à transferência do gel para a membrana. Neste processo, a proteína pode não ser totalmente transferida, provocando essa alteração. Esse problema foi corrigido calculando-se a porcentagem de proteína fosforilada, que não sofre alterações com a transferência.

Foram realizados, em nosso laboratório, estudos de lesões através da injeção de ácido caínico na região CA₁ do hipocampo em um dos hemisférios cerebrais (*LENZ et al.*, 1997). O perfil de gliose obtido com este tipo de lesão difere bastante do obtido com lesões isquêmicas. Nas lesões com ácido caínico, ocorre uma diminuição inicial na fosforilação e no imunocontéudo de GFAP, provavelmente em função da morte de astrócitos causada pela lesão. A incorporação de ³²P aumenta gradativamente até 84 dias depois da lesão, diferente do que acontece em lesões isquêmicas, em que o 14º dia difere de todos

ou outros no que se refere à fosforilação e ao imunoconteúdo de GFAP. Além disso, em lesões isquêmicas, não se observou a diminuição inicial obtida em lesões com ácido cáinico. Essas diferenças confirmam as observações de alguns trabalhos recentes, que mostram que diferentes tipos de danos ao SNC causam uma grande variedade de respostas astrocíticas, indicando que a gliose varia de acordo com a lesão (NORTON *et al.*, 1992).

1.2 Região DG

Já é bem conhecido que as regiões do giro denteado e CA₃ são as mais resistentes do hipocampo ao dano isquêmico, não ocorrendo morte neuronal (ORDY *et al.*, 1993) (FIGURA 14). Apesar de ser uma região resistente, observou-se, no giro denteado, um aumento significativo na fosforilação absoluta e no imunoconteúdo de GFAP, a partir de 4 dias de reperfusão, sugerindo que a existência de morte neuronal não é o fator determinante da resposta glial. Sabe-se que, em hipocampos que sofreram lesão somente em um dos hemisférios, pode ocorrer uma gliose nos dois hemisférios, com modificações no imunoconteúdo de GFAP (JEGLINSKI *et al.*, 1995). *Petito et al.* (1990) e *Petito e Halaby* (1993) também demonstraram que, na região CA₃, o imunoconteúdo de GFAP também aumenta em resposta à isquemia, retornando aos valores basais somente em 5 semanas de reperfusão. Esta resposta glial sem morte neuronal acontece principalmente em resposta a insultos isquêmicos mais graves, como 30 minutos (PETITO E HALABY, 1993). Portanto, a astrocitose na região do giro denteado pode estar mais relacionada com alterações no meio ambiente neuronal do que com o insulto em si, caracterizando uma resposta plástica dos astrócitos à morte neuronal da região CA₁.

Observa-se também, nitidamente, uma queda na porcentagem de proteína fosforilada aos 7 dias de reperfusão, causada por um aumento no imunoconteúdo que não foi acompanhado pela fosforilação. Esta situação pode ser uma resposta do sistema de fosforilação das células do giro denteado à morte que está ocorrendo neste período na região CA₁. Ressalta-se que esta resposta é característica do giro denteado, não ocorrendo na área CA₁.

Observa-se que há diferenças na resposta dos astrócitos da duas regiões

estudadas em consequência da isquemia. Como são áreas com vulnerabilidade diferente, a resposta das células pode variar de acordo com as alterações que aconteceram no meio onde elas estão, ou com as informações que receberam de outras regiões mais ou menos atingidas pela lesão.

1.3 Animais “controle cirúrgico”

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas alterações no estado de fosforilação da GFAP e na porcentagem de proteína fosforilada em nenhuma das regiões estudadas e em nenhum dos períodos analisados após a cirurgia, o que indica que os resultados obtidos são devidos à lesão somente, e não a uma agressão às células, provocada pela cirurgia.

2. EFEITOS DA ISQUEMIA SOBRE OUTRAS FOSFOPROTEÍNAS

2.1 pp25

A proteína chamada de pp25, como foi dito anteriormente, foi observada em nosso laboratório e ainda não tem descrição na literatura. A forma fosforilada da proteína foi observada por Rocha (1996) no hipocampo de animais intoxicados por cloreto de lítio; por Lenz (1997) na região CA₁ em lesões com ácido caínico e por Gottfried (1996) em cultura de astrócitos.

Em lesões isquêmicas, em ambas as regiões estudadas, observou-se o aparecimento da forma fosforilada da proteína a partir dos 4 dias de reperfusão, sendo que aos 30 dias ela não foi mais detectada. Observou-se, também, que a incorporação de ³²P foi maior na região CA₁, onde existe morte neuronal, mas a frequência de aparecimento nas amostras analisadas foi maior em giro denteado. O fato de esta proteína ser detectada em cultura de astrócitos pode indicar uma possível origem glial.

Em lesões com ácido caínico, a forma fosforilada da pp25 aparece a partir de 1 dia depois da lesão, permanece aos 30 dias e desaparece somente aos 84 dias. Comparando-se com lesões isquêmicas, pode-se notar que sua forma fosforilada aparece mais cedo em lesões químicas do que em isquêmicas, e seu

desaparecimento é anterior nestas do que nas outras. A partir do trabalho com lesões químicas, sugeriu-se a hipótese de que esta proteína possa ser uma marcadora de gliose, pois ela pode ser detectada à medida em que a morte neuronal avança e que a resposta glial se desenvolve. No caso de lesões químicas, foi detectada morte neuronal já 1 dia após a cirurgia, e em lesões isquêmicas sabe-se que a morte neuronal acontece tardiamente. Como se pode observar, o aparecimento da forma fosforilada da pp25 acompanha o desenvolvimento da morte neuronal e, no caso de lesões isquêmicas ela pode ser uma proteína indicadora da morte neuronal tardia. O fato de ela ter sido detectada em amostras da região do giro denteado, pode reforçar a hipótese de que ela esteja envolvida nos fenômenos plásticos da gliose. A maior incorporação de ^{32}P pela proteína pp25 da região CA₁, pode ser uma resposta à excessiva morte neuronal que acontece nesta região.

O fato de a pp25, ou somente sua forma fosforilada, ser detectada somente em tecidos de animais lesionados ou intoxicados, pode sugerir que ela seja uma proteína de choque térmico, ou seja, uma proteína que teria o papel de proteger a células neuronais do dano (WAGSTAFF, 1996; JAKOB, 1993). Esta hipótese deve ser investigada e pode elucidar as características e as funções dessa proteína.

2.2 Sinapsina I

A sinapsina I é uma proteína neuronal envolvida na exocitose dos neurotransmissores na fenda sináptica (GREENGARD, 1987). Como a região CA₁ do hipocampo é uma área extremamente sensível ao dano isquêmico, a diminuição aos 4 dias e posterior desaparecimento da forma fosforilada da proteína, observado aos 7 e 14 dias de reperfusão, pode ser devido à diminuição no número de células neuronais, causada pela morte celular isquêmica. Aos 30 dias de reperfusão, as células neuronais da região CA₁ podem ter iniciado um processo de sinaptogênese reativa, onde os neurônios danificados tentam restabelecer suas conexões originais. Em função deste processo, observa-se o aumento, neste período pós-lesão, da fosforilação da sinapsinal.

O giro denteado, como foi dito anteriormente, é uma área resistente ao dano isquêmico, não ocorrendo morte neuronal. Em função disso, a proteína sinapsina I

não sofre alterações em nenhum dos períodos pós-isquêmicos estudados.

Estas observações sobre a sinapsina I podem indicar a adequação da técnica de isquemia experimental utilizada, já que a sinapsina I sofre uma diminuição somente na área vulnerável ao dano isquêmico.

2.3 Cpp-40

Como foi dito anteriormente, esta proteína foi primeiramente observada por Rodnight (1986) e não tem descrição na literatura. Ela é uma proteína solúvel, formada por duas cadeias polipeptídicas, uma com 40 e a outra com 42 kDa. Em ratos, a cadeia mais leve é expressa antes do nascimento, e a mais pesada somente é expressa aos 14 dias de vida pós-natal.

Na região CA₁, o seu comportamento em lesões isquêmicas acompanha o perfil da sinapsina I, diminuindo seu estado de fosforilação a partir de 4 dias de reperfusão e recuperando-se aos 30 dias. Lesões com ácido caínico levam a uma diminuição no estado de fosforilação da Cpp-40 a partir de 1 dia após a cirurgia, recuperando-se somente aos 84 dias (LENZ, não publicado). Essa diferença em relação às lesões isquêmicas se deve ao fato de que injeções de ácido caínico são agressões mais agudas ao SNC do que a lesão isquêmica.

No giro denteado, a ausência de alterações no perfil fosfoprotéico também acompanha o da sinapsina I. Essas observações sobre o comportamento da Cpp-40, em lesões com Ácido Caínico e em lesões isquêmicas, sugerem que se trata de uma proteína neuronal, que diminui em regiões com morte celular, mas não tem alterações em regiões que não sofreram danos. Ainda são necessário vários estudos sobre as características da Cpp-40 para que se possa entender o papel que ela desempenha no SNC.

Integrando os resultados, pode-se observar que, na região CA₁, ocorreu um aumento paralelo no estado de fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP a partir de um dia de reperfusão, apesar de ainda não ter sido observada uma diminuição no estado de fosforilação da sinapsina I. A partir de 4 dias de reperfusão, quando a morte neuronal tardia avança, o giro denteado sofre um aumento na fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP. Também neste momento

observou-se o início da diminuição no estado de fosforilação da sinapsina I e da proteína Cpp-40, na região CA₁, e o aparecimento da pp25 em ambas as regiões estudadas. Como não há morte neuronal na região do giro denteado, não foram observadas alterações nas proteínas sinapsina I e Cpp-40. A proteína pp25 apareceu junto com o início da morte neuronal, e desapareceu quando esta se estabilizou, o que pode sugerir uma relação desta proteína com a morte neuronal. A sinapsina I e a Cpp-40 (possivelmente uma proteína neuronal), recuperaram seu estado de fosforilação, na região CA₁, aos 30 dias de reperfusão, possivelmente através da sinaptogênese reativa.

Observa-se também uma resposta diferente da GFAP nas duas regiões estudadas. No giro denteado, foi observada somente depois de 4 dias de reperfusão, enquanto na região CA₁ observou-se com 1 dia. Como existe morte neuronal na região CA₁, a resposta glial aconteceu antes, enquanto o giro denteado só apresentou esta resposta quando se iniciou a morte neuronal na área CA₁. Também se observou um aumento na porcentagem de proteína fosforilada, aos 14 dias de reperfusão, somente na região CA₁, provavelmente como uma resposta plástica dos astrócitos à morte neuronal. Entretanto, somente o giro denteado mostrou uma diminuição na porcentagem de proteína fosforilada aos 7 dias de reperfusão, como uma resposta à morte neuronal que aconteceu na região CA₁.

A descoberta da GFAP mostrou que, em resposta à injúria, as células astrogliais agem como uma verdadeira rede, onde distúrbios em um ponto podem se refletir através de todo o sistema. Em função disso, astrócitos do giro denteado, região do hipocampo onde não ocorre morte neuronal causada pela isquemia, também apresentam alterações na GFAP, já que as células gliais parecem ter um papel ativo na formação das sinapses depois de uma injúria ao tecido neuronal adulto.

CONCLUSÕES

1. Região CA₁
 - a) Observou-se um aumento no estado de fosforilação da GFAP a partir de 1 dia de reperfusão, mantendo-se até 30 dias;
 - b) A porcentagem de proteína fosforilada sofre uma alteração aos 14 dias de reperfusão, indicando uma reação dos astrócitos à morte neuronal tardia;
 - c) O imunoconteúdo de GFAP sofreu uma alteração significativa em todos os tempos de reperfusão estudados, sugerindo a presença de uma gliose reativa;
2. Giro denteado
 - a) Foi detectado um aumento significativo no estado de fosforilação da GFAP a partir de 4 dias de reperfusão, mantendo-se até os 30 dias;
 - b) A porcentagem de proteína fosforilada sofreu uma alteração aos 7 dias de reperfusão, sugerindo a presença de uma resposta dos astrócitos dessa região à morte neuronal da região CA₁;
 - c) O imunoconteúdo apresentou um aumento significativo a partir de 4 dias de reperfusão, indicando uma gliose reativa;
3. Os animais "controle cirúrgico" não tiveram alterações significativas na fosforilação e no imunoconteúdo de GFAP em nenhum dos períodos pós-cirurgia estudados. Isto indica que os resultados obtidos são devidos somente à isquemia, e não ao procedimento cirúrgico;
4. A sinapsina I sofreu uma diminuição transitória na incorporação de ³²P na região CA₁, mas não no giro denteado, o que mostra a presença de morte neuronal somente na região CA₁. A recuperação da incorporação de ³²P pela proteína se deve a um processo de sinaptogênese reativa;
5. A proteína chamada Cpp-40 sofreu alterações semelhantes à sinapsina I, durante os períodos de reperfusão. Essas observações podem sugerir que esta seja uma proteína neuronal, que diminui seu estado de fosforilação, em regiões vulneráveis, em função da morte neuronal;

6. A proteína chamada pp25 foi detectada a partir de 4 dias de reperfusão, desaparecendo aos 30 dias. Observou-se uma maior incorporação de ^{32}P pela proteína na região CA₁, o que sugere que ela pode estar ligada a fenômenos plásticos que envolvem a glia depois de uma lesão no CNS.

PERSPECTIVAS

Em continuação a esse trabalho, serão estudados os efeitos da isquemia cerebral sobre a HSP 27, uma proteína de choque térmico expressa principalmente em células gliais. Serão feitos estudos usando tempos diferentes de isquemia e reperfusão, a fim de observar a influência dessas diferentes situações sobre a proteína.

Serão também realizados estudos sobre o fenômeno de tolerância induzida, em que um episódio isquêmico não letal pode induzir uma tolerância das células a um período letal subsequente. Neste processo, serão analisadas alterações no estado de fosforilação e no imunoconteúdo da GFAP e da HSP 27, relacionando-se o papel dessas proteínas no fenômeno de tolerância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. The Cytoskeleton. **Molecular Biology of the Cell.**, 3. ed. Garland Publishing, New York, 1994.
- ATTWELL, D. Glia and neurons in dialogue, **Nature**, v. 369, p. 707-708, 1994.
- BARRES, B. New roles for glia. **J. Neurosci.**, v. 11, n. 12, p. 3685-3694, 1991.
- BEILHARZ, E. J., WILLIAMS, C. E., DRAGUNOW, M., SIRIMANNE, E. S., GLUCKMAN, P. D. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. **Mol. Brain Res.**, v. 29, p. 1-14, 1995.
- BRADFORD, H. F. Glial Cells: mechanical and functional supporting cells of the nervous system. **Chem Neurobiol.**, W.H. Freeman and Company, New York, 1985.
- BRESSLER, J. P., EDWARDS, N. A. Glial shape and cytoskeletal protein synthesis, **Neurochem. Res.**, v.17, n. 2, p. 173-177, 1992.
- BRUNO, V., SUREDA, F. X., STORTO, M., CASABONA, G., CARUSO, A., KNOPFEL, T., KUHN, R., NICOLETTI, F. The neuroprotective activity of group- II metabotropic glutamate receptors requires new protein synthesis and involves a neuronal-glia signaling. **J. Neurosci** , v. 17, n. 6, p. 1891-1897, 1997.
- CHAN, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, n. 6, p. 1124-1129, 1996.
- CHIU, S. Y., KRIEGLER, S. Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. **Glia**, v. 11, p. 191-200, 1994.
- CHOI, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic/ischemic neuronal death. **TINS**, v. 18, p. 58-60, 1995.
- CHOI, D. Ischemia-induced neuronal apoptosis. **Cur. Opinion Neurobiol.**, v. 6, p. 667-672, 1996.
- CHOI, D., ROTHMAN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu. Ver. Neurosci.**, v. 13, p. 171-182, 1990.
- COTMAN, C. W., PINILLA, F. G., KAHLE, J. S. Neural plasticity and regeneration. **Basic Neurochem.** Raven Press, 5. ed., New York, 1994.

- DOMANSKA-JANIK, K., ZALEWSKA, T. Effect of brain ischemia on PKC. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 1432-1439, 1992.
- DRINGEN, R., GEBHART, R., HAMPRECHT, B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. **Brain Res**, v. 623, p. 208-214, 1993.
- ENG, L. F., LEE, Y. L. Intermediate filaments in astrocytes. **Neuroglia.**, Oxford University Press, New York, 1995.
- ENG, L. F. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. **J. Neuroimmun.**, v. 8, p. 203-214, 1985.
- ERULKAR, S.D. Chemically mediated synaptic transmission: an overview. **Basic Neurochemistry**. Raven Press, 5. ed., New York, 1994.
- FAHRING, T. Changes in the solubility of GFAP after ischemic brain damage in the mouse. **J. Neurochem**, v. 63, n. 5, p. 1796-1801, 1994.
- FAROOQUI, A. A., HAUN, S.E., HORROCKS, L.A. Ischemia and hypoxia. **Basic Neurochemistry**. Raven Press, 5. ed., New York, 1994.
- FORSYTH, R., FRAY, A., BOUTELLE, M., FILLENZ, M., MIDDLEDITCH, C., BURCHELL, A. A role for astrocytes in glucose delivery to neurons? **Dev. Neurosci**, v. 18, p. 360-370, 1996.
- GIULIAN, D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. **Glia**, n. 7, p. 102-110, 1993a.
- GIULIAN, D., VACA, K., CORPUZ, M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. **J. Neurosci.**, v. 13, n. 1, p. 29-37, 1993b.
- GLOWINSKI, J., MARIN, P., TENGE, M., STELLA, N., GIAUME, C., PREMONT, J. Glial receptors and their intervention in astrocyto-astrocytic and astrocyto-neuronal interactions. **Glia**, v. 11, p. 201-208, 1994.
- GOLDMAN, R. D., KHUON, S., CHOU, Y. H., OPAL, P., STEINERT, P. M. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. **J. Cell Biol.**, v. 134, n. 4, p. 971-983, 1996.
- GONÇALVES, C. A., RODNIGHT, R. Apparent identity of pph-47, a protein highly phosphorylated in the hippocampus, with a form of GFAP. **Neurosc. Res. Com.**, v. 11, n. 2, p. 109-117, 1992.
- GOTTFRIED, C. Dissociação celular e cultura de astrócitos de hipocampo: padronização metodológica e análise eletroforética do perfil fosfoprotéico. **Tese de Mestrado**, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, UFRGS, 1996.
- GOULD, K.L. Cyclin-dependent protein kinases. **Protein Kinases**, Oxford University Press, New York, 1994.

- GREENGARD, P. Neural phosphoproteins. **Molec. Neurobiol.**, v. 1, p. 81-118, 1987.
- HAMMERSCHLAG, R., CYR, J. L., BRADY, S. T. Axonal transport and the neuronal cytoskeleton. **Basic Neurochemistry**, 5. Ed., Raven Press, New York, 1994.
- HANSSON, E., RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. **FASEB J.**, n. 9, p. 343-350, 1995.
- HANSSON, E. Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. **J. Biol. Chem.**, v. 35, p. 21955-21961, 1994.
- HATTEN, M. E., LIEM, R. K. H., SHELANSKI, M. L., MASON, C. A.. Astroglia in CNS injury. **Glia**, v. 4, p. 233-243, 1991.
- HEEGARD, N.H., BJERRUM, O.J. Immunoblotting: general principles and procedures. **Handbook of Immunoblotting of Proteins 1**, CRC. Boca Raton, Florida, 1988.
- HOSSMAN, K. A. Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. **Prog Brain Res**, v. 96, p. 161-177, 1993.
- HSU, M., SIK, A., GALLYAS, F., HORVÁTH, Z., BUSKÁKI, G. Short-term and long-term changes in the postischemic hippocampus. **Annals NY Acad. Sci.**, v. 743, p. 121-139, 1994.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 132-139, 1997.
- INAGAKI, M., GONDA, Y., NISHIZAWA, K., KITAMURA, S., SATO, C., ANDO, S., TANABE, K., KIKUCHI, K., TSUIKI, S., NISHI, Y. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in *vitro* located in a non- α -helical head domain. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 4722-4729, 1990.
- INAGAKI, M. NAKAMURA, Y., TAKEDA, M., NISHIMURA, T., INAGAKI, N., Glial Fibrillary Acidic Protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. **Brain Pathology**, v. 4, p. 239-243, 1994.
- JACOBSON, M. Neuroglial ontogeny, **Developmental Neurobiology**, 3. ed., p. 100-113, 1991.
- JAKOB, U. GAESTEL, M., ENGEL, K., BUCHNER, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. **J Biol Chem.**, v. 268, n. 3, p. 1517-1520, 1993.
- JANECZKO, K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. **Int. J. Devl. Neurosci.**, v. 11, n. 2, p. 139-147, 1993.

- JEGLINSKI, W., KOCZYK, D., ZAREMBA, M., ODERFELD-NOWAK, B. Bilateral gliosis in unilaterally lesioned septohippocampal system: changes in GFAP immunoreactivity and content. **J. Neurosc. Res.**, v. 41, p. 394-402, 1995.
- KANDEL, E.R.; SHWARTZ, J.H., JESSEL, T.J. **Essentials of neural science and behavior**. Prentice Hall International, New Jersey, 1995.
- KEISER, D. O., PELLMAR, T. C. Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. **Glia**, v. 10, p. 237-243, 1994.
- KIMELBERG, H. K., NOREMBERG, M.D. Astrocytes, **Scientific Am.**, v. 66, 1989.
- KIMELBERG, H. Receptors on astrocytes-What possible functions? **Neurochem. Int.**, v. 26, n. 1, p. 27-40, 1995.
- KINDY, M., BHAT, A. N., BHAT, N. R. Transient ischemia stimulates GFAP and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. **Mol Brain Res.**, v. 13, p. 199-206, 1992.
- KOLB, S.J., HUDMON, A., WAXMAM, M. N. Ca²⁺/Calmodulin Kinase II (CaMKII) translocates in a hippocampal slice model of ischemia. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2147-2152, 1995.
- LANDIS, S. M. D. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury, **Ann. Rev. Neurosc.**, v. 17, p. 133-151, 1994.
- LAPING, N. J., TETER, B., NICHOLS, N. R., ROZOWSKI, I., FINCH, C. E. GFAP: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. **Brain Pathology**, v. 1, p. 259-274, 1994.
- LEAL, R. Estudo do sistema fosforilante da ppH47/GFAP em cérebro de ratos: distribuição regional, identificação das quinases envolvidas na fosforilação e mapeamento fosfopeptídico. Tese de Doutorado, Curso de Pós Graduação em Bioquímica, UFPR, Curitiba, 1995.
- LEFRANÇOIS, T., FAGES, C., PESCHANSKI, M., TARDY, M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense GFAP mRNA in injured neuron-astrocyte co-cultures. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 11, p. 4121-4128, 1997.
- LENZ, G., MANOZZO, L., GOTTARDO, S., ACHAVAL, M., SALBEGO, C., RODNIGHT, R. Temporal profiles of the *in vitro* phosphorylation rate and immunocontent of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) after kainic acid-induced lesions in area CA₁ of the rat hippocampus : demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. **Brain Res.**, v. 764, n. 1-2, p. 188-196, 1997.
- LI, YI, CHOP, M., ZHANG, Z., ZHANG, R. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72 kDa heat shock protein. **J. Neurol. Sci.**, v. 128, p. 134-142, 1995.

- LOTAN, M., SCHWARTZ, M., Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. **FASEB J.** v. 8, p. 1026-1033, 1994.
- LOWRY, O., ROSENBROUGH, N., FARR, A., RANDAL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAIESE, K., SWIRIDUK, M., TENBROEKE, M. Cellular mechanisms of protection by metabotropic glutamate receptors during anoxia and nitric oxide toxicity. **J. Neurochem.**, v. 66, p. 2419-2428, 1996.
- MASSOD, K., BESNARD, F., SU, Y., BRENNER, M. Analysis of a segment of the human GFAP gene that directs astrocyte-specific transcription. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 160-166, 1993.
- MATSUOKA, Y., NISHIZAWA, K., YANO, T., SHIBATA, M., ANDO, S., TAKAHASHI, T., INAGAKI, M. Two different protein kinases act on a different time schedule as glial filament kinases during mitosis. **EMBO Journal**, v. 11, n. 8, p. 2895-2902, 1992.
- McCALL, M.A., GREGG, R. G., BEHRINGER, R. R., BRENNER, M., DELANEY, C. L., GALBREATH, E. J., ZHANG, C. L., PEARCE, R. A., CHIU, S. Y., MESSING, A. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. **Neurobiology**, v. 93, p. 6361-6366, 1996.
- MITANI, A., YANASE, H., SAKAI, K., WAKE, Y., KATAOKA, K. Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 601, p. 103-110, 1993.
- NAIRN, A. C., SHENOLIKAR, S. The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. **Cur. Opinion Neurobiol.**, v. 2, p. 296-301, 1992.
- NEDERGAARD, M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells, **Science.**, v. 263, p. 1768-1771, 1994.
- NESTLER, E., GREENGARD, P. Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. **Basic Neurochemistry**, Raven Press, 5.ed., New York, 1994.
- NETTO, C. A., HODGES, H., SINDEN, J. D., PEILLET, E., KERSHAW, T., SOWINSKI, P., MELDRUM, B. S., GRAY, J. A. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neurosci.**, v. 54, p. 69-92, 1993.
- NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of PKC. **Science**, v. 258, p. 607-613, 1992.

- NOETZEL, M. J. Phosphorylation of the Glial Fibrillary Acidic Protein. *J. Neurosc. Res.*, v. 27, p. 184-192, 1990.
- NORENBERG, M. D. Astrocyte responses to CNS injury. *J. Neuropathol. Exper. Neurol.*, v. 53, n. 3, p. 213-220, 1994.
- NORTON, W.T., AQUINO, D.A., HOZUMI, I., CHIU, F. C., BROSANAN, C. F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.*, v. 17, n. 9, p. 877-885, 1992.
- O'CALLAGHAN, J.P. A potential role for altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology.*, v. 15, n. 1, p. 29-40, 1994.
- O'FARRELL, P. Z., GOODMAN, H. M., O'FARRELL, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, v. 12, p. 1133-1142, 1977.
- 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. 128-139, 1993.
- PARPURA, V., BASARSKI, T. A., LIU, F., JEFTINIJA, S., HAYDON, P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, v. 369, p. 744-747, 1994.
- PAXINOS, G., WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. ed. Academic Press Australia, North Ryde, N. S. W., Plate: v.35, 1986.
- PELLERIN, L., MAGISTRETTI, P. J. Excitatory aminoacids stimulate aerobic glycolysis in astrocytes via na activation of te Na⁺/K⁺ ATPase. *Dev Neurosci.*, v. 18, p. 336-342, 1996.
- PETERS, PALAY, WEBSTER. The neuroglial cells. **The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells**, Saunders, Philadelphia, 1976.
- PETERSON, G. L. Simplificaton of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, v. 83, p. 346-356, 1977.
- PETITO, C. K., MORGELLO, S., FELIX, J. C., HOLDEN, L. M. Astrocytes in cerebral ischemia. **The Biochemical Pathology of Astocytes**, 1988.
- PETITO, C. K., MORGELLO, S., FELIX, J. C., LESSER, M. L. The Two patterns of reactive gliosis in postischemic rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v. 10, n. 6, p. 850-859, 1990.

- PETITO, C. K., CHUNG, M. C., VERKHOVSKY, L. M., COOPER, A. J. L. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 569, p. 275-280, 1992.
- PETITO, C.K., HALABY, I. A.. Relationship between ischemia and ischemic neuronal necrosis to astrocyte expression of Glial Fibrillary Acidic Protein. **Int. J. Dev. Neuroscience.**, v. 11, n. 2, p. 239-247, 1993.
- PERRY, V. H., BELL, M. D., BROWN, H. C., MATYSZAK, M. K. Inflammation in the Nervous System. **Cur. Op. Neurobiol.**, v. 5, p. 636-641, 1995.
- PHILLIS, J.W., O'REGAN, M. H., ESTEVEZ, A. Y., SONG, D., VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **J. Neurochem.**, v. 67, p. 1525-1531, 1996.
- PORTER, J., McCARTHY, K. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 16, p. 5073-5081, 1996.
- RAINE, C.S. Neurocellular anatomy. **Basic Neurochemistry**. 5.ed., Raven Press, New York, 1994.
- RAISMAN, G. Glia, neurons and plasticity. **Annals of the NY Acad. Sci.**, v. 633, p. 209-213, 1991.
- RIDET, J.L., MALHOTRA, S. K., PRIVAT, A., GAGE, F. H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends in Neuroscience**, v. 20, p. 570-577, 1997.
- RISCHKE, R., KRIEGLSTEIN, J. Postischemic neuronal damage causes astroglial activation and increase in local cerebral glucose utilization of rat hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 11, p. 106-113, 1991.
- ROCHA, E. R. Efeitos do tratamento crônico com cloreto de lítio, produzindo lítemia terapeuticamente relevante, sobre parâmetros neuroquímicos, comportamentais e morfologia de astrócitos em ratos. **Tese de Doutorado**, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.
- RODNIGHT, R., GONÇALVES, C. A., WOFCHUK, S. T., LEAL, R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 325-338, 1997.
- RODNIGHT, R., ZAMANI, R., TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying protein phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electroforesis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 24, p. 27-38, 1988.

- ROSENBLUTH, J. Glial membranes and axoglial junctions. **Neuroglia**. Oxford University Press, New York, 1995.
- SAITOH, T., MASLIAH, E., JIN, L.-W., COLE, G. M., WIELOCH, T., SHAPIRO, I. P. Protein kinases and phosphorylation in neurologic disorders and cell death. **Lab. Invest.**, v. 64, n. 5, p. 596-616, 1991.
- SCHMIDT-KASTNER, R., FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 40, p. 599-636, 1991.
- SCHNEIDER, G. H., BAETHMANN, A. Mechanism of glial swelling induced by glutamate. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 70, p. 334S-343S, 1992.
- SCHREIBER, S. S., BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus - a role for gene expression. **TINS**, v. 18, p. 446-451, 1995.
- SHACKELFORD, D.A., YEH, R.Y., ZIVIN, J.A. Inactivation and subcellular redistribution of CaMKII following spinal cord ischemia. **J. Neurochem.**, v. 61, p. 738-747, 1993.
- SHAO, Y., MCCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. **Glia**, v. 11, p. 147-155, 1994.
- STAUB, F., PETERS, J., KEMPSKI, O., SCHNEIDER, G., SCHÜRER, BAETHMAN, A. Swelling of glial cells in lactacidosis and by glutamate: significance of Cl⁻ transport. **Brain Res.**, v. 610, p. 69-74, 1993.
- STEINERT, P. M., ROOP, D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 593-625, 1988.
- STREIT, W. Microglial cells. **Neuroglia**, Oxford University Press, New York, 1995a.
- STREIT, W. J., KINCAID-COLTON, C. A. The brain's immune system, **Sci. Am.**, p.38-43, 1995b.
- SZUCHET, S. The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. **Neuroglia**. Oxford University Press, New York, 1995.
- SWEENEY, M., YAGER, J. Y., WALZ, W., JUURLINK, B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73: p. 1525-1535, 1995.
- TAYLOR, S. S., KNIGHTON, D. R., ZHENG, J., SOWADSKI, J. M., GIBBS, C. S., ZOLLER, M. J. A Template for the Protein Kinase Family, **TIBS**, v. 18, p. 84-89, 1993.
- TAYLOR, D., OBRENOVITCH, T. P., SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochem. Res.**, v. 21, n. 9, p. 1013-1021, 1996.

- TSACOPOULOS, M., MAGISTRETTI, P. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.*, v. 16, n. 3, p. 877-885, 1996.
- TSUJIMURA, K., TANAKA, J., ANDO, S., MATSUOKA, Y., KUSUBATA, M., SUGIURA, H., YAMAUCHI, T., INAGAKI, M. Identification of phosphorylation sites on gfap for cdc2 kinase and CaMK II. *J. Biochem.*, v. 116, p. 426-434, 1994.
- VEXLER, Z., ROBERTS, T. P. L., BOLLEN, A. W., DERUGIN, N., ARIEFF, A. I. Transient cerebral ischemia: association of apoptosis induction with reperfusion. *J. Clin. Invest.*, v. 99, n. 6, p. 1453-1459, 1997.
- VINADÉ, L., RODNIGHT, R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Res.*, v. 732, p. 195-200, 1996.
- WAGSTAFF, M.J.D., COLLAÇO-MORAES, Y., ASPEY, B. S., COFFIN, R. S., HARRISON, M. J. G., LATCHMAN, D. S., BELLEROCHE, J. S. Focal cerebral ischaemia increases the levels of several classes of heat shock proteins and their corresponding m RNAs. *Mol. Brain Research.*, v. 42, p. 236-244, 1996.
- WALAAS, S. I., GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews*, v. 43, n. 3, p. 299-349, 1991.
- WOFCHUK, S. T., RODNIGHT, R. Stimulation by glutamate of the phosphorylation of two substrates of PKC, B-50/GAP-43 and MARCKS, and of the ppH-47, a protein highly labelled in incubated slices from the rat hippocampus. *Neurosc. Res. Com.*, v. 6, n. 3, p. 135-140, 1990.
- WOFCHUK, S. T., RODNIGHT, R. Glutamate stimulates the phosphorylation of GFAP in slices of immature rat hippocampus via a metabotropic receptor. *Neurochem. Int.*, v. 24, p. 517-523, 1994.
- WOFCHUK, S.T., RODNIGHT, R. Age-dependent changes in the regulation by external ions of the phosphorylation of GFAP in slices of rat hippocampus. *Dev. Brain Res.*, v. 85, p. 181-186, 1995.
- YAMAMOTO, H., FUKUNAGA, K., LEE, K., SODERLING, T.R. Ischemia-induced loss of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.*, v. 58, p. 1110-1117, 1992.
- YANO, S., FUKUNAGA, K., USHIO, Y., MIYAMOTO, E. Activation of CaMK II and phosphorylation of intermediate filament proteins by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 5428-5439, 1994.
- ZANOTTI, S., CHARLES, A. Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intracellular signaling. *J. Neurochem.*, v. 69, p. 594-602, 1997.

ZAR, H. H. **Biostatistical analysis**. 2. ed., Prentice-Hall, New Jersey, 1984.

ZIVIN, J.A., KOCHHAR, A., SAITOH, T. Protein phosphorylation during ischemia.
Stroke, 21(suppl III), p.117-121, 1990.