

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

Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1
do hipocampo de ratos submetidos à isquemia global
transitória e reperfusão

Dissertação de Mestrado

ALINE DE SOUZA PAGNUSSAT

Porto Alegre
2005

ALINE DE SOUZA PAGNUSSAT

Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1
do hipocampo de ratos submetidos à isquemia global
transitória e reperfusão

Dissertação de Mestrado

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

Orientadores:

Prof. Dr^a Matilde Achaval Elena
Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Porto Alegre, março de 2005.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Vilma de Souza Pagnussat.

AGRADECIMENTOS

- À professora Matilde Achaval Elena e ao professor Carlos Alexandre Netto pela orientação e confiança;
- À professora Maria Cristina Faccioni Heuser e às técnicas Cristiane e Moema pela amizade e pelo auxílio com a microscopia eletrônica.
- Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada Cláudia Forti, Giordano, Érica, Flávia, Simone, Alinezinha, Jocemar, Paula Rigon, Juliana e Günther pela transmissão do conhecimento sobre as técnicas de laboratório, pelo auxílio “braçal” quando necessário e, sobretudo, pelos momentos de “lazer”.
- À Claudia Puperi e Maria Izabel Ugalde Marques da Rocha, pela amizade, companheirismo, e muitas outras coisas que as palavras não expressam.
- À minha família.
- Ao meu pai Hermes, que sempre me incentiva em tudo o que faço, pelo carinho.
- À minha irmã Vanessa pela amizade e pelo apoio em todas as ocasiões.
- Ao Eduardo por ter permanecido sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, por acreditar sempre em mim, incentivar-me e fazer-me cada dia mais feliz.
- À UFRGS por oportunizar a realização deste trabalho e à CAPES pela bolsa concedida durante o período.

“Jamais debes buscar a coisa em si, a qual depende tão-somente dos espelhos.

A coisa em si, nunca: a coisa em ti.

Um pintor, por exemplo, não pinta uma árvore: ele pinta-se uma árvore.

E um grande poeta - espécie de rei Midas à sua maneira - um grande poeta, bem
que ele poderia dizer:

- Tudo o que eu toco se transforma em mim.”

Mário Quintana

“... Os ganhos ou os danos dependem da perspectiva e possibilidades de quem
vai tecendo a sua história. O mundo em si não tem sentido sem o nosso olhar que
lhe atribui identidade, sem o nosso pensamento que lhe confere alguma ordem...

... que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se
conseguiu fazer.”

Lya Luft

RESUMO

Caracterização da morte celular em neurônios da região CA1 do hipocampo de ratos submetidos à isquemia global transitória e reperfusão

Pagnussat, A.S.; Faccioni-Heuser, M.C.; Netto, C. A.; Achaval, M. Ciências Morfológicas, ICBS, UFRGS, RS.

A caracterização da morte neuronal após injúria neuronal aguda é um assunto muito discutido e que está sob constante investigação. O presente estudo tem por objetivo caracterizar a morte celular na camada de células piramidais da região CA1 do hipocampo após 10 minutos de isquemia e períodos precoces de reperfusão, utilizando a microscopia eletrônica da transmissão. O modelo animal empregado para produzir a isquemia prosencefálica foi o de oclusão dos 4 vasos com modificações (Netto et al, 1993). Após 3, 6, 12 e 24 h de reperfusão, os animais eram anestesiados e perfundidos transcárdiacamente. Os encéfalos eram removidos e seccionados. Os cortes contendo o hipocampo eram desidratados, incluídos em resina, seccionados, observados no microscópio eletrônico de transmissão e eletromicrografados. As células piramidais da região CA1 do hipocampo de todos os grupos submetidos à isquemia apresentavam alterações morfológicas. Em tempos precoces de reperfusão as alterações eram menos expressivas quando comparadas a maiores tempos de reperfusão, e envolviam sinais de necrose apoptótica e necrose oncótica. Com 12 h de reperfusão, as células apresentavam uma aparente recuperação. Decorridas 24 h do insulto isquêmico, o dano neuronal era mais severo e incluía sinais de necrose oncótica, assim como, corpos apoptóticos, os quais caracterizam a morte celular por necrose apoptótica. É possível que as células no período pós-isquemia passem por um processo conhecido como um *continuum* entre a apoptose e a necrose, ou, um processo denominado *parapoptose*. A aparente recuperação ocorrida com 12 h de reperfusão pode dever-se à influência das células gliais, em especial das células astrocíticas. Dessa forma, o presente estudo fornece evidências que a morte celular após evento isquêmico global transitório, em ratos Wistar adultos envolve características de necrose apoptótica e necrose oncótica.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
	1.1 Isquemia Prosencefálica.....	1
	1.2 Modelos Animais.....	2
	1.3 Hipocampo e Formação Hipocampal.....	2
	1.4 Vulnerabilidade Seletiva e Morte Neuronal Tardia.....	5
	1.5 Fisiopatologia da Isquemia.....	7
	1.5.1 Papel do Cálcio no Dano Celular Pós-isquemia.....	8
	1.5.2 Excitotoxicidade Glutamatérgica.....	8
	1.5.3 Alterações Mitocondriais.....	12
	1.6 Tolerância e Pré-condicionamento Isquêmico.....	16
	1.7 Caracterização da Morte Neuronal após Isquemia Prosencefálica.....	17
	1.7.1 Morte Celular Programada ou Necrose Apoptótica.....	18
	1.7.2 Morte Celular por Necrose Oncótica.....	21
	1.7.3 Necrose Apoptótica <i>versus</i> Necrose Oncótica.....	22
2	HIPÓTESE DE TRABALHO.....	26
3	OBJETIVO.....	27

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
	4.1 Animais.....	27
	4.2 Tratamento.....	28
	4.3 Procedimentos Cirúrgicos.....	28
	4.3.1 Isquemia por Oclusão dos 4 vasos.....	28
	4.4 Perfusão Transcardíaca.....	29
	4.5 Preparação Histológica para Microscopia Eletrônica.....	32
5	ARTIGO.....	35
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7	PERSPECTIVAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corno de Ammon de um coelho de 1 mês.....	3
Figura 2. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo.....	4
Figura 3. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo.....	5
Figura 4. Mecanismos moleculares da morte celular programada.....	15
Figura 5. Mecanismo pelo qual a célula controla as vias alternativas de morte celular por necrose apoptótica ou necrose oncótica.....	25
Figura 6. Ilustração do procedimento cirúrgico utilizado para reprodução da isquemia global transitória por oclusão dos quatro vasos em ratos.....	31
Figura 7. Procedimento de perfusão por via intracardíaca.....	32

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Figura 1 - Schematic representation of the CA1 field rat hippocampus

Anexo 2 - Figura 2 - Control Group

Anexo 3 - Figura 3 - 10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion

Anexo 4 - Figura 4 - 10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion

Anexo 5 - Figura 5 - 10 minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion

10 Anexo 6 - Figura 6 - minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion

Anexo 7 - Figura 7 - 10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion

Anexo 8 - Figura 8 - 10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion

Anexo 9 - Figura 9 - 10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion

Anexo 10 - Figura 10 - 10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion

1 Introdução

1.1 Isquemia prosencefálica

Uma das discussões mais cruciais dentro da neurologia refere-se à compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos na morte neuronal após eventos lesivos agudos, como a hipóxia, a isquemia, as crises epileptogênicas, a hipoglicemia, entre outros (ROY & SAPOLSKI, 1999).

O encéfalo é um dos órgãos mais sensíveis à redução do fluxo sanguíneo, pois possui alta demanda metabólica e ausência de reservas energéticas substanciais. Dessa forma, é necessário um fluxo constante de sangue para fornecer as quantidades adequadas de oxigênio e glicose aos neurônios. Em vista disso, o bloqueio do fluxo sanguíneo, denominado de isquemia, e a redução do conteúdo de oxigênio no sangue, ou hipóxia, provocam importantes alterações teciduais, que podem culminar com a morte celular (ZEMKE et al, 2004; Taylor et al, 1996; Schmidt – Kastner & Freund, 1991).

Com base no tempo de duração da obstrução vascular, a isquemia pode ser classificada em transitória ou perene. Na isquemia perene, não há retorno do fluxo sanguíneo aos vasos inicialmente obstruídos, ao contrário do que ocorre na isquemia transitória, na qual há retorno do fluxo ao leito vascular. Esse fenômeno é denominado de reperfusão. Quanto à topografia, a isquemia pode ser classificada em global, focal ou multifocal. Na isquemia global, todo o encéfalo é privado do aporte sanguíneo, ao contrário do que ocorre na isquemia focal ou multifocal, quando uma ou mais regiões são afetadas (GINSBERG, 1997; HUNTER et al, 1995; GINSBERG & BUSTO, 1989).

Em humanos, as alterações de fluxo sanguíneo são agrupadas no termo *Acidente Vascular Cerebral (AVC)*. Estas podem ter origem a partir da isquemia ou a partir da ruptura de um vaso encefálico com extravasamento de sangue no

tecido circundante, condição essa denominada hemorragia. As principais causas naturais de isquemia em humanos são a trombose, o embolismo e o decréscimo sistêmico da perfusão sanguínea por falência cardíaca (ZEMKE, 2004).

1.2 Modelos Animais

Não é possível instituir um modelo animal que mimetize fielmente as conseqüências neuropatológicas do AVC. Isso se deve ao fato de existir diversos agentes causadores dessa patologia em humanos. Provavelmente o modelo mais simples e amplamente utilizado é o de oclusão bilateral das artérias carótidas, precedido ou não da obstrução permanente das artérias vertebrais (MCBEAN & KELLY, 1998).

O procedimento de oclusão transitória das artérias carótidas resulta em isquemia global transitória. Quando a oclusão carotídea é precedida pela obstrução irreversível das artérias vertebrais obtém-se a “isquemia por oclusão dos quatro vasos” (NETTO et al, 1993; PULSINELLI et al, 1979).

1.3 Hipocampo e Formação hipocampal

O hipocampo é a região mais utilizada para o estudo das alterações morfo-fisiológicas decorrentes da isquemia. Tal prevalência se deve ao fato dessa estrutura possuir um arranjo neuronal relativamente simples quando comparado a outras regiões encefálicas. Além disso, apresenta alta sensibilidade ao estresse isquêmico, mantendo, dentro de cada região, uma determinada homogeneidade de alterações (BRODAL, 1984).

O hipocampo estende-se ao longo do assoalho do corno temporal dos ventrículos laterais. É dividido em áreas chamadas CA1, CA2 e CA3. As iniciais C e A maiúsculas referem-se à abreviatura de *Corno de Ammon* (LORENTE DE NÓ,

1934). Além disso, pode-se dividir o hipocampo em quatro camadas: *Estratos Oriens, Piramidal, Radial* e *Lacunoso - Molecular*. No *estrato piramidal* localizam-se os somas neuronais das células piramidais. No *Estrato Oriens* encontram-se os dendritos basais e no *Radial* os dendritos apicais dessas mesmas células. Ramificações dos dendritos apicais estão dispostos no *Estrato Lacunoso Molecular* (PAXINOS, 2004; BRODAL, 1984) (Fig. 1).

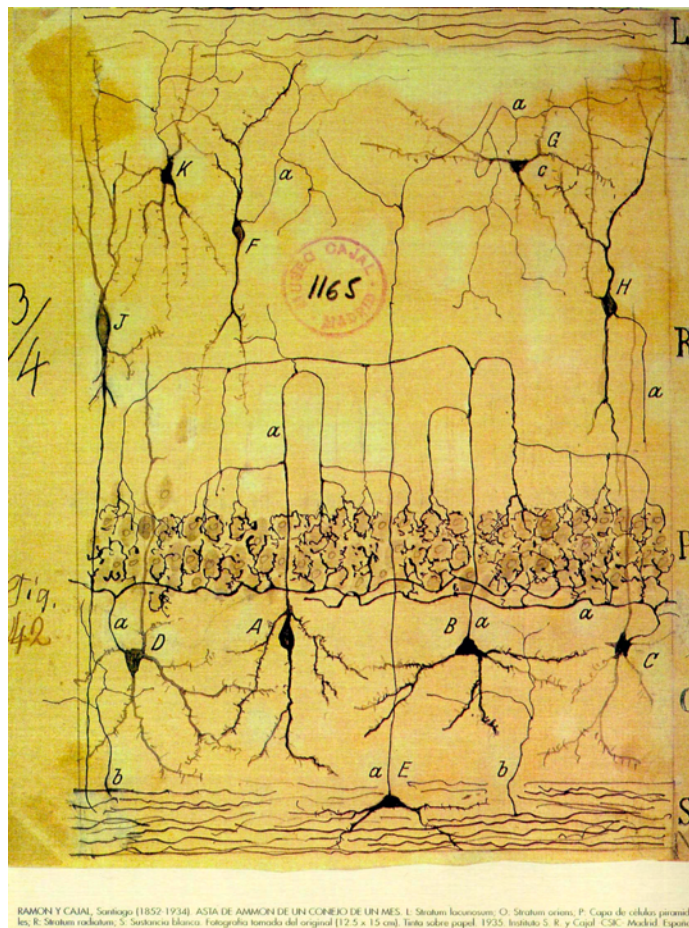


Fig. 1. Corno de Ammon de um coelho de 1 mês. L: *Estrato Lacunoso*; O: *Estrato Oriens*; P: *Camada de células Piramidais*; R: *Estrato Radiatum*; S: *Substância Branca*. Fotografado do original (12.5 x 15 cm). Tinta sobre papel. 1935. Instituto S. R. y Cajal – CSIC – Madri. Espanha. Ramón y Cajal, S. (1852-1934).

O hipocampo, juntamente com o giro denteado e os córtices transitórios associativos (córtex entorrinal e subicular), constitui a formação hipocámpal. A justificativa para que essas estruturas sejam consideradas como uma unidade

morfofuncional é que, todas fazem parte do sistema límbico e estão interconectadas por um sistema de fibras que forma a “via tri-sináptica” (PAXINOS, 2004).

Os feixes eferentes, provenientes dos neurônios piramidais, deixam o hipocampo via fórnix. Algumas aferências penetram no hipocampo através dos feixes perforantes medial e lateral, provindos das regiões medial e lateral do córtex entorrinal respectivamente. Essa via é chamada de *via perforante* ou *via temporodentada* e, quantitativamente, é considerada a mais importante. Outras vias, provenientes do córtex entorrinal, penetram na camada molecular do giro denteado, onde fazem sinapse com os dendritos das células granulares. Os axônios das células granulares, situados na camada granular do giro denteado, projetam-se para a região hilar e para a região CA3 do hipocampo. Essas projeções são chamadas de *fibras musgosas*. A comunicação das camadas CA3 e CA1 do hipocampo, por sua vez, dá-se através dos *colaterais de Schaffer*, que correspondem à maior via de entrada de impulsos em CA1. Essas conexões, de natureza predominantemente excitatória, são chamadas conjuntamente de “via tri-sináptica” (PAXINOS, 2004) (Figs. 2 e 3).

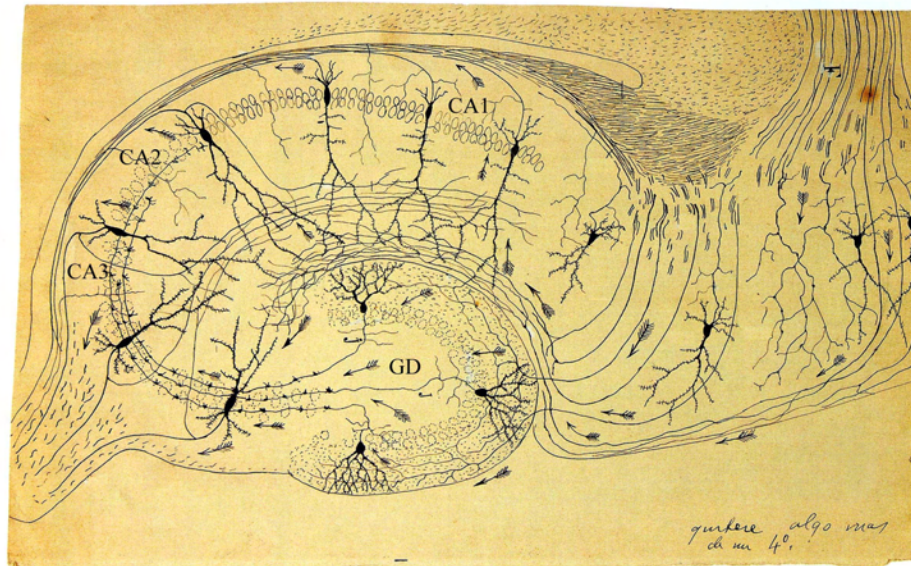


Fig. 2. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo. CA: abreviatura de Corno de Ammon; GD: Giro Denteado (adaptado de Ramón y Cajal, 2003).

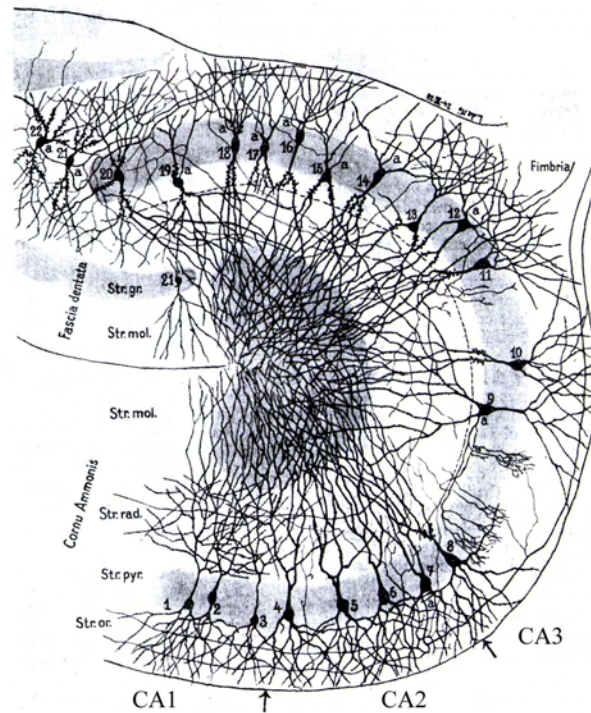


Fig. 3. Esquema da estrutura e conexões do hipocampo. CA: abreviatura de Corno de Ammon; Str.or.: estrato oriens; Str.pyr.: estrato piramidal; Str.rad.: estrato radiato; Str.mol.: estrato molecular; Str.gr: estrato granular (adaptado de Lorente de Nó, 1934).

1.4 Vulnerabilidade Seletiva e Morte Neuronal Tardia

A isquemia global transitória, induzida em ratos por oclusão dos 4 vasos, ocasiona morte celular diferenciada tanto em humanos quanto em modelos animais. A injúria neural é diretamente proporcional à duração e ao grau de hipoperfusão (BRIONES et al, 2004; NITATORI, 1995).

As regiões mais sensíveis são a CA1, a CA3 e a CA4 do hipocampo, o núcleo caudato, o cerebelo e as camadas 3, 5 e 6 do neocórtex (ZENG e XU, 2000).

Privando o encéfalo de oxigênio e glicose durante 15 minutos, ocorre dano substancial na região CA1 do hipocampo e prejuízo celular mínimo nas demais regiões encefálicas (RAMI, 2003; NETTO et al, 1993).

Mesmo dentro do hipocampo, há certa heterogeneidade de alterações, sendo que, dentre as regiões da formação hipocampal, as regiões CA1 e CA3 são particularmente mais sensíveis do que o giro denteado quando submetido ao mesmo estresse isquêmico. Além disso, existe ainda uma vulnerabilidade distinta entre as regiões ântero-ventral da camada CA1 do hipocampo, sem explicação plausível (BRIONES et al, 2004; RAMI, 2003; SHELDON et al, 2001; NITATORI et al, 1995).

Os conceitos de “morte neuronal tardia” e “vulnerabilidade seletiva” são fundamentais para compreender que algumas células podem permanecer viáveis após o insulto isquêmico. Isso significa que nem todas as células sofrem danos imediatamente após o evento, ao contrário, podem morrer no decorrer de alguns dias (SHELDON et al, 2001; NITATORI et al, 1995).

Por meio de análises bioquímicas e fisiológicas, verificou-se que os neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos Wistar permanecem viáveis até 24 horas após um evento isquêmico breve. O auge do dano celular ocorre entre 2 a 4 dias, restando apenas 5,8% dos neurônios íntegros no decorrer de 3 semanas após terem sido privados de oxigênio e glicose (NITATORI et al, 1995).

A recomendação do *Comitê da Sociedade de Patologistas Toxicológicos*, referente à nomenclatura da morte celular, é do termo “necrose” para descrever características evidentes em secções histológicas, mas que não façam menção ao mecanismo de morte celular. Quando a referência for a respeito do padrão de degeneração celular, os termos mais bem aplicados são os de “apoptose” - para morte celular programada, e “oncoses” - para morte celular onde sejam exibidos sinais de necrose (LEVIN et al, 1999).

Dentre os critérios morfológicos para classificar o processo de morte celular como necrose apoptótica estão a condensação da cromatina e a retração

celular, seguida pela heterofagocitose. Alguns autores observam essas alterações 3 a 4 dias após a interrupção do fluxo sanguíneo. Isso sugere que a morte neuronal tardia é por necrose apoptótica, e não por necrose oncolítica (NITATORI et al, 1995).

Em culturas de células granulares do cerebelo expostas ao glutamato observou-se, inicialmente, morte por necrose oncolítica, fenômeno que seria responsável pelo dano celular imediato. Posteriormente, nessas mesmas culturas, identificou-se morte por necrose apoptótica, a qual estaria envolvida no dano celular tardio. Esse padrão é atribuído à falência precoce e posterior recuperação do potencial de membrana mitocondrial (SHELDON et al, 2001).

1.5 Fisiopatologia da Isquemia

No tecido nervoso submetido à isquemia são observadas alterações neurais e não-neurais. Essas modificações incluem a reatividade glial, a reestruturação dendrítica, a sinaptogênese reativa, a acentuação da neurogênese e o aumento de fatores neurotróficos, especialmente, o fator de crescimento neural (NGF). É possível que essas mudanças adaptativas sejam apropriadas para promover uma condição altamente permissiva para a plasticidade sináptica pós-lesão (BRIONES et al, 2004).

Em 1969, começou-se a utilizar o termo “excitotoxicidade” para indicar a neurodegeneração mediada por aminoácidos excitatórios (OLNEY, 1969). Desde então, tem-se investigado o papel do glutamato em uma série de injúrias do sistema nervoso central (SNC). Hoje, sabe-se que a excitotoxicidade contribui para a lesão neuronal em diversas neuropatologias, incluindo a isquemia, a epilepsia, o traumatismo crânio-encefálico e as doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), o Mal de Parkinson e a Doença de Alzheimer (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003; MATUTE et al, 2002).

1.5.1 Papel do Ca^{+2} no dano celular pós-isquemia

O mediador chave do dano excitotóxico é o íon Ca^{+2} , um importante sinalizador celular. Esse íon, em condições fisiológicas, está envolvido com diversos processos celulares, incluindo a atividade sináptica, a exocitose, a excitabilidade da membrana e o crescimento e a diferenciação celulares (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

Em condições normais, a célula disponibiliza de uma vasta gama de mecanismos homeostáticos, os quais objetivam a manutenção das concentrações intracelulares de Ca^{+2} suficientemente baixas a fim de evitar danos celulares. O Ca^{+2} sinalizador, por sua vez, permanece temporalmente e espacialmente localizado, permitindo que múltiplas vias sinalizadoras ocorram independentemente na mesma célula. Esse controle é dependente de uma interação complexa entre influxo e efluxo desse íon, tamponamento e manutenção das reservas intracelulares de Ca^{+2} (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

O distúrbio inicial na homeostase do Ca^{+2} , após isquemia transitória, pode causar excitotoxicidade via mecanismos disparados por sobrecarga intracelular desse íon. De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que bloqueadores dos canais de Ca^{+2} e antagonistas dos receptores para glutamato previnem a morte neuronal por excitotoxicidade (NITATORI, 1995).

1.5.2 Excitotoxicidade Glutamatérgica

Durante a isquemia e a reperfusão, ocorre um aumento na liberação de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato. O aumento na liberação glutamatérgica é combinado com o prejuízo na recaptação desse neurotransmissor. Esse fato é consequência da falência elétrica da célula e é freqüentemente chamado de excitotoxicidade glutamatérgica (ZEMKE et al, 2004).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos. Em condições fisiológicas, encontra-se em concentrações milimolares no meio extracelular. Quando liberado no terminal sináptico, desempenha papéis variados de acordo com a ativação de receptores específicos, que podem ser ionotrópicos ou metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos, que incluem os subtipos NMDA, AMPA e cainato, estão ligados a canais iônicos. A ativação desses receptores permite o fluxo iônico através da membrana a favor dos gradientes de concentração, K^+ para o meio extracelular e Na^{+2} e Ca^{+2} para o meio intracelular. Os receptores metabotrópicos estão ligados a proteínas G e exercem seus efeitos de forma mais abrangente e duradoura (ZEMKE et al, 2004; ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003; MATUTE et al, 2002; ANDERSON & SWANSON, 2000).

A ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e o excesso na liberação do neurotransmissor glutamato são os principais responsáveis pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} e dano celular subsequente. Entretanto, sabe-se que a ativação de outros subtipos de receptores, como o AMPA e o cainato, também está envolvida com o aumento do influxo de Ca^{+2} , sendo capaz de desencadear a morte neuronal (MATUTE et al, 2002).

O excessivo aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular ativa cascatas sinalizadoras de forma inapropriada. Processos, que se encontram dormentes, ou que operam em níveis muito baixos, são superativados, causando um desarranjo metabólico e, eventualmente, morte celular. Essa superativação ocorre sobre proteases, lipases, fosfolipases e endonucleases, lesando estruturas celulares e induzindo a formação de radicais livres de oxigênio (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

Com base nas modificações, as quais envolvem o glutamato e o Ca^{+2} , inicialmente, tentou-se reduzir o dano celular excitotóxico através do uso de antagonistas de receptores glutamatérgicos. Entretanto, ficou claro que o bloqueio desses receptores não é a melhor alternativa, pois influencia o funcionamento normal do encéfalo e pode produzir efeitos adversos. As pesquisas recentes visam

não somente a prevenção da sobrecarga de Ca^{+2} , mas também a sinalização intracelular e a regulação de vias disparadas pela superativação dos receptores de glutamato (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

Existe mais um fator relevante quando se observam os danos ocasionados pelo excesso de transmissão excitatória pós-lesão. Após a transmissão sináptica, há a necessidade de remover o excesso de glutamato da fenda sináptica. Isso se deve ao fato dos níveis extracelulares desse aminoácido terem que ser mantidos muito baixos, a fim de evitar-se o dano celular. Envolvidos nesse processo, estão os transportadores de glutamato, presentes em neurônios e em células gliais (ANDERSON & SWANSON, 2000; MATUTE et al, 2002; TAPIERO et al, 2002).

Pelo menos 5 subtipos de transportadores foram clonados até o momento. Destes, o transportador de glutamato I (GLT-I), que está localizado quase que exclusivamente em células astrocíticas, é o mais expresso e, conseqüentemente, o principal responsável pela recaptação de glutamato na fenda sináptica (ANDERSON & SWANSON, 2000; MATUTE et al, 2002; TAPIERO et al, 2002).

Visto que, o mecanismo de recaptação via transportadores de glutamato é realizado de forma dependente de energia, em situações onde há redução de ATP, há também prejuízo no funcionamento desses transportadores. Isso resulta em uma “função reversa” dos transportadores, o que culmina com o efluxo de glutamato e conseqüente elevação de seus níveis extracelulares. Dessa forma, supõe-se que exista uma íntima relação entre dano celular excitotóxico e o distúrbio dos mecanismos de recaptação de glutamato na fenda sináptica pós-lesão isquêmica (ANDERSON & SWANSON, 2000; ROSSI et al, 2000).

Além dos neurônios, as células gliais também morrem em decorrência da excitotoxicidade. Nessa situação, as células gliais mais afetadas são os oligodendrócitos. Entretanto, existem evidências de que a ativação sustentada de receptores glutamatérgicos ionotrópicos também pode lesar astrócitos e células da microglia. Todavia, diferentemente dos neurônios, em células gliais, são os receptores AMPA e kainato os principais responsáveis pelo processo de excitotoxicidade glutamatérgica (MATUTE et al, 2002).

Outros autores acreditam que o grau de neurotoxicidade mediado pela ativação dos canais de glutamato, e conseqüente influxo de Ca^{+2} , poderia não ser relevante. O processo mais bem caracterizado de influxo de Ca^{+2} se dá via operação reversa dos trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ da membrana plasmática. Esse mecanismo, que ocorre com o aumento na concentração intracelular de Na^+ e conseqüente despolarização da membrana, está presente após os danos hipóxico e isquêmico (YU & CHOI, 1997).

Existem outras vias de entrada de Ca^{+2} , cujos mecanismos e relação com a neurodegeneração não estão completamente elucidados. Um exemplo é o receptor nicotínico para acetilcolina, que contém a subunidade α -7. Esses receptores apresentam permeabilidade maior ao Ca^{+2} do que os receptores glutamatérgicos NMDA. Altos níveis de RNAm para esse receptor foram encontrados no hipocampo e no córtex cerebral, duas das regiões mais susceptíveis aos efeitos lesivos da isquemia (SEGUELA et al, 1993).

Assim como o glutamato, o ATP extracelular tem se mostrado atuante na transmissão excitatória rápida tanto no SNC, quanto no sistema nervoso periférico (SNP). Os neurônios expressam receptores específicos para o ATP (receptores P2X), que são estruturalmente distintos do receptor nicotínico e dos subtipos de receptores glutamatérgicos. O receptor P2X também é permeável ao íon Ca^{+2} , e sua ativação promove um rápido aumento intracelular desse íon. Além disso, o ATP também está implicado na modulação da liberação pré-sináptica de neurotransmissores (SALTER & HICKS, 1994; ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

Embora seja evidente que há um declínio nos níveis de ATP extracelular após a hipóxia e a isquemia, o produto da hidrólise do ATP, ou ADP, promoveria o prejuízo metabólico, uma vez que também pode se ligar aos receptores P2X. Esse seria o mecanismo dominante de ativação dos receptores de ATP P2X em períodos de anóxia (ARUNDINE & TYMIANSKI, 2003).

A deficiência de O_2 durante a isquemia ocasiona a produção de substâncias tóxicas à célula. Somando-se a isso, as mitocôndrias, que são incapazes de realizar a fosforilação oxidativa em condições de baixa concentração

de O_2 , alteram o mecanismo metabólico de lactato, levando ao acúmulo de ácido láctico em quantidades tóxicas (BLONGREN et al, 2003; ZEMKE et al, 2004).

Os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ROS), são átomos ou moléculas que contêm no orbital externo um elétron não pareado. São produzidos sob condições de baixo limiar de O_2 , e podem reagir com lipídeos e proteínas, afetando sua estrutura molecular. Isso provoca lesão em organelas e desintegração da membrana plasmática. Com o rompimento da membrana plasmática, a função de controle do fluxo iônico fica altamente prejudicada, e o ciclo de acúmulo de Ca^{+2} se reinicia (BLONGREN et al, 2003; ZEMKE et al, 2004).

Há múltiplas vias pelas quais os radicais livres são produzidos no encéfalo. A mitocôndria parece ser o local de produção e também o alvo dos radicais livres (BLONGREN et al, 2003).

1.5.3 Alterações Mitocondriais

O tipo de morte celular excitotóxica depende da intensidade e duração da exposição ao agente agressor. O padrão de dano celular mantém íntima relação com a fisiologia mitocondrial, podendo envolver características distintas de necrose apoptótica e necrose oncótica. A mitocôndria acumula grande parte do Ca^{+2} que entra na célula. Dessa forma, a disfunção mitocondrial está diretamente relacionada aos altos índices citosólicos desse íon, os quais ocorrem após o evento isquêmico (MATUTE et al, 2002; OUYANG & GIFFARD, 2004).

Durante o período de ausência de O_2 , ocorre colapso do potencial de membrana mitocondrial. Esse potencial é fundamental para o processo de recaptção de Ca^{+2} citosólico pela mitocôndria (BLONGREN et al, 2003).

A despolarização mitocondrial, que ocorre após a isquemia, aumenta a produção de radicais livres e ocasiona a liberação de fatores pró-apoptóticos (HANSSON et al, 2003; ZEMKE et al, 2004).

Com a desintegração mitocondrial ocorre, na membrana interna, a abertura do chamado “poro de transição mitocondrial”. Esse poro desencadeia um intenso edema na mitocôndria e, posteriormente, provoca a ruptura da membrana externa mitocondrial. O “poro de transição mitocondrial” forma-se devido ao acúmulo de Ca^{+2} nessa organela, ou em decorrência do estresse oxidativo. Nessas circunstâncias, a mitocôndria desenvolve uma permeabilidade a moléculas com massa molecular superior a 1500 Da. Sendo assim, moléculas, que em condições normais permanecem confinadas à mitocôndria, como o citocromo *c*, são liberadas no citoplasma, onde podem inativar inibidores de caspases e disparar a necrose apoptótica (MATUTE et al, 2002; BLOMGREN et al, 2003; HANSSON et al, 2003; ZEMKE et al, 2004).

As caspases são proteínas com características estruturais típicas, envolvidas na homeostase, no reparo e na morte celular. Todas as caspases são sintetizadas a partir de pró-enzimas latentes, as quais podem ser clivadas e ativadas por outras caspases, seguindo um padrão de cascata. A caspase 3 parece ser a mais abundante das caspases reconhecidas no encéfalo, e todas as vias que envolvem outros tipos de caspase culminam em sua ativação (BLOMGREN et al, 2003).

Além disso, parece haver uma relação entre a quantidade de citocromo *c* liberado pela mitocôndria e a falência energética. Dessa forma, dependendo do nível de liberação de citocromo *c*, a quantidade de ATP pode ser insuficiente para a célula completar o processo de necrose apoptótica, podendo, então, morrer por necrose oncótica (MATUTE et al, 2002).

O citocromo *c*, liberado pela mitocôndria, interage com o fator ativador de apoptose 1 (APAF-1) para formar um apoptossoma heptamérico, que leva à ativação da pró-caspase 9, a qual, por sua vez, ativa a pró-caspase 3. Como a caspase 3 é a maior efetora de caspases no encéfalo, ela permanece fortemente inibida no sistema nervoso central adulto em condições fisiológicas (BLOMGREN et al, 2003).

A alteração da permeabilidade da membrana externa mitocondrial é diretamente controlada por uma família de proteínas chamada Bcl-2. As proteínas Bcl-2 regulam as modificações mitocondriais durante ambos os processos, necrose oncótica e necrose apoptótica. A família das Bcl-2 está dividida em dois grupos: o anti-apoptótico, que inclui a Bcl-2 e a Bcl-x_L, e o pró-apoptótico, que inclui a Bax e a Bid. Modificações pós-traducionais podem transformar membros da família anti-apoptótica em formas pró-apoptóticas. A Bcl-2 e a Bcl-x_L estão localizadas junto à membrana externa mitocondrial. A Bax está localizada predominantemente no citosol de células saudáveis e é translocada até a mitocôndria após a ocorrência de um estímulo apoptótico (BLOMGREN et al, 2003; OUYANG & GIFFARD, 2004).

Dessa forma, pode-se afirmar que, por influenciar a formação do “poro transicional” na membrana mitocondrial, as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 podem regular a liberação de fatores apoptóticos da mitocôndria, a produção de radicais livres, a homeostase do cálcio, bem como a função respiratória (OUYANG & GIFFARD, 2004). A interação entre os membros da família das proteínas Bcl-2 e sua influência na mitocôndria pode ser visualizada na figura 4.

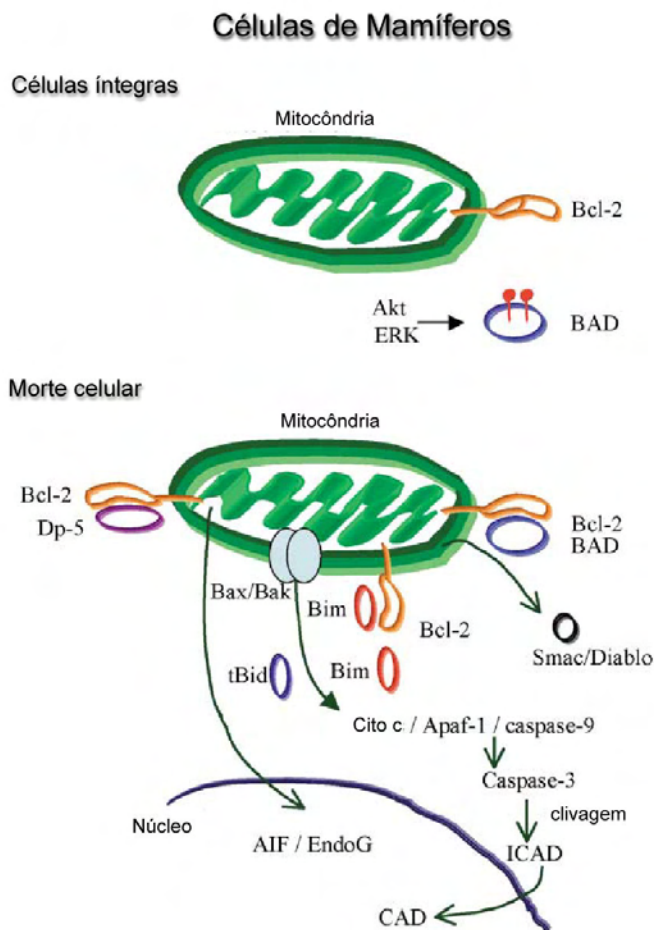


Fig. 4. Mecanismos moleculares da morte celular programada: a família das proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas e as kinases anti-apoptóticas AKT e ERK protegem a integridade mitocondrial em condições normais, por inibirem os membros pró-apoptóticos da família das proteínas Bcl-2. Quando a célula desenvolve o mecanismo de apoptose, alguns membros Bcl-2 pró-apoptóticos (tBid, Dp-5, Bim, Bax, Bak e Bad) podem antagonizar as proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas e induzir o dano mitocondrial. Com isso, ocorre liberação do citocromo *c* da mitocôndria, que, por sua vez, induz a formação de apoptosoma através do recrutamento da caspase-9 e Apaf-1. A caspase-9 ativa e cliva a caspase-3, que, por sua vez, cliva uma variedade de substratos, incluindo ICAD e em seguida o CAD, envolvidos na fragmentação do DNA. O aumento da permeabilidade mitocondrial pode também liberar outros fatores, como o AIF e Endo G, que facilitam a fragmentação do DNA, e o Smac/DIABLO, que induz a ativação de caspases. CAD: ADNase ativada por caspase; ICAD: inibidor da CAD (adaptado de Yuan et al, 2003).

Ocorrem também modificações metabólicas no soma neuronal imediatamente após a isquemia. Essas alterações incluem o aumento no suprimento de O_2 e na fração de extração de O_2 nas regiões acometidas. Da mesma forma, o transporte de glicose e a glicólise aumentam nessas mesmas regiões, o que pode permitir que mitocôndria sustente níveis metabólicos relativamente baixos durante algum período. Algumas dessas respostas, entretanto, podem ter efeitos maléficos. O tecido lesado estimula uma resposta inflamatória, resultando em aumento do fluxo sanguíneo local e liberação de citocinas. Embora a intensificação do suprimento de sangue ajude na distribuição de O_2 e glicose, ela pode também difundir o Ca^{+2} , e assim, aumentar a lesão. Da mesma forma, os leucócitos atraídos para a área acometida liberam mais

citoquinas, cujos níveis podem acumular-se a ponto de tornarem-se tóxicas, intensificando o dano neural (ZEMKE et al, 2004).

1.6 Tolerância ou Pré-condicionamento Isquêmico

O processo de tolerância, ou pré-condicionamento isquêmico, ocorre tanto em células neurais quanto em não-neurais. Esse processo foi inicialmente identificado em células musculares estriadas cardíacas. Baseia-se no princípio de que um agente potencialmente lesivo ao tecido, quando administrado em níveis insuficientes para causar dano permanente, estimula respostas protetoras, as quais reduzem o dano causado por eventos isquêmicos posteriores (ZEMKE et al, 2004).

Sabe-se que há dois valores que delimitam o perfil de dano celular pós-isquêmico, que estão diretamente relacionados com a intensidade do insulto. A redução até o primeiro valor limite resulta em falência elétrica. A redução até o segundo ocasiona alterações metabólicas e prejuízo no funcionamento das bombas iônicas. As células que atingem esse segundo estágio estão destinadas a morrer, ao contrário daquelas que permanecem entre os dois valores. Essas células podem manter um certo nível de atividade metabólica ainda por algumas horas, e, se o fluxo sanguíneo for restaurado dentro de um período razoável, podem recuperar-se sem dano aparente. Os neurônios, que permanecem entre os dois valores limite, constituem o que é conhecido como *penumbra isquêmica*, e são os mais beneficiados quando se realiza o pré-condicionamento isquêmico (ZEMKE et al, 2004).

1.7 Caracterização da morte neuronal após isquemia prosencefálica

O processo de morte celular pode ser classificado como “necrose apoptótica” ou “necrose oncótica”, com base em critérios morfológicos e bioquímicos (BLOMGREN et al, 2003).

Sabe-se que ocorre lesão neuronal irreversível em algumas regiões encefálicas após 10 minutos de isquemia, porém, ainda permanece indefinido o perfil da degeneração neural após esse período (RAMI, 2003; NITATORI et al, 1995; ROY & SAPOLSKY, 1999).

A morte neuronal induzida pela isquemia é um processo dependente de energia, portanto, ativo. Resulta da ativação de cascatas e eventos bioquímicos prejudiciais, que incluem: a irregularidade da homeostase do cálcio, a qual leva ao aumento da excitotoxicidade; a disfunção do retículo endoplasmático rugoso e da mitocôndria; a elevação do estresse oxidativo, a qual causa detrimento ao DNA; a alteração na expressão gênica pró-apoptótica; e a ativação de caspases e endonucleases, as quais conduzem à degradação final do genoma (HOU & MACMANUS, 2002). Estudos recentes indicam que a morte celular nesses casos envolveria um processo de suicídio celular ativo e programado, conhecido como necrose apoptótica (RAMI, 2003).

Entretanto, sob o ponto de vista morfológico, dois tipos de morte celular já foram descritos, a necrose apoptótica e a necrose oncótica (BRIONES et al, 2004; RUAN et al, 2003).

O padrão de morte celular hipocampal após o insulto hipóxico-isquêmico é avaliado principalmente através de alterações morfológicas visualizadas aos níveis óptico e eletrônico, e parece estar diretamente relacionada com a qualidade e duração do estímulo agressor. Além disso, outros fatores como a idade do animal, condições nutricionais e modelo experimental empregado parecem influenciar as características do dano celular (RUAN et al, 2003; SHELDON et al, 2001).

1.7.1 Morte celular programada ou Necrose Apoptótica

A necrose apoptótica, ou morte celular programada, é um processo de morte celular que requer energia, e no qual a célula em questão participa ativamente. Está presente nos processos fisiológicos normais, mas também pode ser vista em processos neurodegenerativos, como na doença de Parkinson e no Mal de Alzheimer. Durante o desenvolvimento embriológico, a morte celular programada é de fundamental importância para a eliminação do excedente celular. Seria impossível às células remanescentes permanecerem dentro da normalidade se houvesse envolvimento de processo inflamatório extensivo durante essa fase (BLOMGREN et al, 2003; RUAN et al, 2003; HOU & MACMANUS, 2002; ROY & SAPOLSKY, 1999).

A manutenção da integridade mitocondrial é uma das características mais relevantes para definir o padrão de morte celular como sendo de necrose apoptótica. A função mitocondrial inalterada deve-se à necessidade da célula desempenhar diversos processos ativos. Dentre esses processos destacam-se a proteólise do citoesqueleto, a modificação da morfologia celular, a condensação e a fragmentação do DNA e a alteração da superfície antigênica. Da mesma forma, a ativação da caspase – 9, envolvida na cascata apoptótica, realiza-se de forma dependente de ATP (ROY & SAPOLSKI, 1999).

Os eventos, inicialmente observados na morte celular programada, envolvem a translocação da proteína pró-apoptótica Bax, o colapso do potencial de membrana mitocondrial, a formação do poro de permeabilidade transicional e a liberação do citocromo *c*. Posteriormente, ocorre intensa agregação de cromatina nuclear, desintegração nucleolar, redução no tamanho do núcleo e clivagem internucleosomal do DNA. No citoplasma, observa-se condensação e formação de vacúolos translúcidos, mas com manutenção da integridade das organelas. Em estágios finais, verifica-se a formação de corpos apoptóticos, que são rapidamente eliminados por células fagocitárias, sem sinal evidente de processo inflamatório. A mitocôndria permanece intacta, já que é fundamental para desenvolvimento do

processo apoptótico, que requer energia (RAMI, 2003; RUAN et al, 2003; ROY & SAPOLSKY, 1999; MARTIN et al, 1998; KERR et al, 1995).

O mecanismo de morte celular envolve muitas proteínas diretamente, que interagem de forma complexa com as organelas celulares. Alguns dos efeitos mais importantes da necrose apoptótica estão descritos a seguir:

- Caspases: estão envolvidas em várias vias da morte celular programada descrita na literatura. Elas são uma família de proteases cisteína. Muitas delas estão implicadas na iniciação e efetuação do processo apoptótico. Até agora, pelo menos 14 membros dessa família foram identificados, mas somente um subgrupo foi parcialmente ou completamente caracterizado. Como muitas outras enzimas, as caspases são sintetizadas na célula como precursores inativos.

- AIF: O fator indutor de apoptose (AIF) é uma proteína de 57KDa que reside principalmente entre as membranas mitocondriais interna e externa. Com a perda da integridade da membrana da mitocôndria, o AIF é liberado e induz a condensação nuclear e fragmentação do DNA em larga escala, ocasionando a morte celular sem a participação de caspases. Conseqüentemente, o AIF é um elemento chave para a compreensão da necrose apoptótica independente de caspases, a qual pode ocorrer na célula.

- Bcl: são proteínas importantes na regulação do processo apoptótico. Até o momento, 20 diferentes tipos de Bcl foram identificadas em mamíferos. Dentre elas, membros, como Bcl-2, Bcl-XL, McL-1 e Bcl-W, exibem características antiapoptóticas, enquanto outras, como a Bax, Bak, Bok, Bcl_XS, Bad, Bid, são de natureza pró-apoptótica. As Bcl podem formar canais iônicos ou poros, os quais têm impacto direto na permeabilidade da membrana mitocondrial. Aumentos na

permeabilidade da membrana externa da mitocôndria podem levar à liberação de proteínas mitocondriais apoptóticas, tais como o citocromo c, Smac/DIABLO e AIF.

- p53: a proteína p53 é um dos fatores de transcrição mais versáteis na célula. A capacidade da p53 em disparar apoptose reside em sua habilidade de regular um grupo de alvos gênicos que estão intimamente envolvidos com a apoptose. Por exemplo, a p53 ativada aumenta a expressão de Bcl-2 pró-apoptóticas, Bax e Bak. A Bax pode deslocar-se para a mitocôndria e alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando em necrose apoptótica. Além disso, a p53 também pode aumentar a expressão de Apaf-1, o qual facilita a ativação da caspase 9 na presença do citocromo c (LIOU et al, 2003).

Diversos outros agentes relevantes estão envolvidos no complexo mecanismo de morte celular programada. Dentre eles estão o TNF (fator de necrose tumoral) e o TRADD (domínio catalítico associado ao receptor TNF); o Ligante Fas (FasL/Fas) (antígeno Fas-L - proteína de superfície que pode estimular o processo de apoptose quando unido ao seu ligante Fas presente na superfície da célula alvo) (LIOU et al, 2003).

Alguns autores defendem a hipótese de que a apoptose poderia ser benéfica ao tecido nervoso lesado. Isso ocorreria com a finalidade de evitar-se a ruptura do corpo celular, e possibilitar que os resquícios celulares fossem inteiramente englobados por macrófagos ou células ativas da microglia. Por não haver evidência de processo inflamatório na morte celular programada, poder-se-ia evitar que as citocinas e seus efeitos secundários afetassem as células neuronais ainda íntegras (ROY & SAPOLSKY, 1999).

Determinados fatores, que envolvem tempo de exposição ao agente estressor e viabilidade energética celular, podem aumentar as possibilidades da célula morrer de forma apoptótica. Quanto maior a quantidade de energia disponível, mais jovem for o neurônio, menor for a liberação de agentes excitotóxicos ou menor for a duração da exposição ao agente lesivo, maiores as

chances da célula desenvolver o processo de morte programada (ROY & SAPOLSKY, 1999).

1.7.2 Morte celular por Necrose Oncótica

O processo de necrose oncótica envolve o rompimento da estrutura da membrana com conseqüente prejuízo da integridade funcional, rápido influxo de Ca^{+2} e água, e posterior desintegração celular. A necrose oncótica não é induzida por um estímulo celular intrínseco "*per se*", como acontece na morte celular programada. Para desencadear um mecanismo necrótico, há necessidade de uma perturbação abrupta do ambiente celular, e alteração das condições fisiológicas normais (MARTIN et al, 1998).

Na morte celular por necrose oncótica, as primeiras alterações visíveis são a modificação do volume celular e da função mitocondrial. Logo após, observa-se a desintegração da membrana citoplasmática e o extravasamento do conteúdo citoplasmático. Ao contrário da necrose apoptótica, a necrose oncótica segue-se sempre a um processo patológico, e está associada à inflamação do tecido adjacente (RAMI, 2003; RUAN et al, 2003; KERR et al, 1995).

Na morte celular necrótica são observadas modificações ultraestruturais tanto nucleares quanto citoplasmáticas. Observa-se, primeiramente, condensação da cromatina nuclear, edema e degeneração das organelas, perda da integridade das membranas, e eventual dissolução celular. A picnose nuclear, com condensação de cromatina em grumos irregulares, contrasta com a formação de pequenos agregados de forma e densidade regulares, observados na morte celular programada. Além disso, na necrose oncótica não são formados pequenos corpos circundados por membrana contendo material nuclear, como é observado na necrose apoptótica. Essas diferenças, referentes à condensação da cromatina,

são muito importantes na determinação do tipo de degeneração pelo qual a célula está passando (MARTIN et al, 1998).

Durante a progressão da necrose celular, as organelas começam a apresentar danos estruturais. A mitocôndria passa por uma seqüência de alterações morfológicas complexas, as quais incluem a contração ou a condensação de sua membrana interna e a dissipação dos grânulos da matriz, o edema da membrana interna, a lise das cristas, a formação de agregados floculentos e, então, a desintegração. Os ribossomos desprendem-se do retículo endoplasmático rugoso e os polirribossomos se dissociam. Isso resulta em múltiplos ribossomos monoméricos livres no citoplasma, dando aparência densa e granular à matriz citoplasmática. As cisternas do retículo endoplasmático rugoso e do aparato de Golgi podem dilatar-se, fragmentar-se ou vesicular-se. A membrana plasmática pode passar por um processo denominado *blebbing* (MARTIN et al, 1998).

Acredita-se que os neurônios necróticos podem disparar a morte celular programada em outras células, entretanto, a apoptose, incitada dessa maneira, raramente assemelha-se à forma clássica, observada durante o desenvolvimento ou renovação fisiológica de células fora do sistema nervoso (ROY & SAPOLSKI, 1999).

1.7.3 Necrose Apoptótica *versus* Necrose Oncótica

Diversos métodos já foram sugeridos na avaliação da morte neuronal após hipóxia e isquemia. A análise da morfologia ultraestrutural ainda é considerada a melhor forma de caracterizar a morte celular após dano isquêmico, visto que, técnicas bioquímicas específicas para reconhecimento da apoptose podem, muitas vezes, ser também positivas em alguns estágios de necrose (SHELDON et al, 2001; BICKNELL & CHEN, 1995). Além disso, tem-se sugerido que eventos determinantes da necrose apoptótica, como a fragmentação do DNA, são visualizados em alguns neurônios após os mesmos terem morrido. Assim,

desempenhariam um papel secundário no processo de degeneração celular (ROY & SAPOLSKY, 1999).

Colboune e colaboradores (1999), reconheceram sinais de necrose no hipocampo submetido à isquemia, enquanto Zeng & Xu (2000) afirmam que as características ultraestruturais dessa região, quando submetida ao evento isquêmico, referem-se à morte celular programada. Já Ruan (2003), avaliou a ultraestrutura do estriado, quando submetido a diferentes tempos de isquemia e reperfusão, verificando a presença de características de ambos os processos, necrose apoptótica e necrose oncótica. Esse autor defende ainda a teoria de que o processo pelo qual a célula morre depende diretamente da intensidade do fator agressor, e, seria por necrose apoptótica em isquemias moderadas (10 minutos), e por necrose oncótica no processo isquêmico severo (mais de 20 minutos).

A patogênese da isquemia foi também avaliada no SNC de animais adultos e naqueles ainda em desenvolvimento. Verificou-se que, à microscopia eletrônica, os neurônios exibiam tanto características apoptóticas quanto oncóticas. Além disso, os animais mais jovens apresentavam maior tendência a exibir características típicas de necrose apoptótica, ao contrário dos animais mais velhos (LIU et al, 2004). Isso indica que existem diferenças significativas entre as respostas celulares ao insulto isquêmico em encéfalos imaturos e em encéfalos adultos (BLOMGREN et al, 2003).

Estudos recentes sugerem que a morte celular após hipóxia e isquemia é diferente da morte celular que ocorre durante o desenvolvimento encefálico, não podendo ser descrita como apoptose clássica (OUYANG & GIFFARD, 2004). Embora diversos estudos demonstrem uma variedade de alterações ultraestruturais compatíveis com apoptose, nenhum desses evidencia a apoptose clássica, como descrita em células não neurais (SHELDON et al, 2001).

As características de morte neuronal pós-isquemia variam muito entre o modelo empregado e o animal analisado (RUAN et al, 2003). Em gerbilos submetidos a 5 minutos de isquemia e 72 horas de reperfusão foram observadas,

em nível ultraestrutural, características de necrose apoptótica, tais como massas nucleares densas de cromatina e corpos apoptóticos (NITATORI et al, 1995).

Além disso, cada neurônio pode diferir com relação à extensão relativa do dano oxidativo, à degeneração do citoesqueleto, à disfunção dos microtúbulos, etc. Da mesma forma, o colapso energético pode ser variável. Isso poderia explicar a variabilidade de alterações morfológicas que ocorrem em grupos de células neuronais submetidas ao mesmo tempo de isquemia e reperfusão (ROY & SAPOLSKI, 1999).

Talvez, essas células iniciem o processo de necrose apoptótica num momento em que não exista quantidade energética suficiente para que o processo seja finalizado. Esse seria o motivo pelo qual as células não desenvolvem um padrão de morte celular compatível com a apoptose clássica, que ocorre em tecidos não neurais (ROY & SAPOLSKI, 1999).

Deve-se levar em consideração também que, dada a distribuição desigual da entrada de Ca^{+2} na célula, a degeneração dependente desse íon apresenta certa heterogeneidade dentro do mesmo neurônio. Similarmente, a ativação de caspases, que levará à liberação de citocromo *c* da mitocôndria, varia, se essa ocorreu inicialmente em um espinho dendrítico distante do soma neuronal ou próxima à membrana nuclear (ROY & SAPOLSKI, 1999).

Devido à variedade de características morfológicas, que, ora são evidências de morte celular por apoptose, ora por necrose, muitos autores reconhecem a possibilidade do neurônio passar por um processo que seria um *continuum* entre a necrose apoptótica e necrose oncolítica, também denominado de “parapoptose” (HOU & MACMANUS, 2002; SHELDON et al, 2001; ROY & SAPOLSKI, 1999; MARTIN et al, 1998).

Dependendo da severidade do insulto e da localização anatômica da região acometida, os neurônios podem exibir sinais de necrose oncolítica ou necrose apoptótica, ou ainda, de ambos. Os mecanismos apoptóticos podem ser ativados e, dessa forma, contribuir para o dano celular. No entanto, o resultado final será diferente da morfologia apoptótica clássica (OUYANG & GIFFARD,

2004). O suposto mecanismo que influencia a decisão celular por morte programada ou oncose pode ser visualizada na figura 5.

Em suma, sugerem-se algumas hipóteses na tentativa de elucidar o mecanismo de morte celular após eventos nocivos. Em tempos precoces, quando ainda há disponibilidade energética e a função mitocondrial permanece intacta, a célula desenvolveria alterações morfo-funcionais compatíveis com a necrose apoptótica. Sabe-se que alguns processos celulares são comuns, tanto na degeneração por morte celular programada quanto por necrose. Isso é o que acontece com alguns substratos, que podem ser clivados por caspases apoptóticas, ou por proteólises necróticas, por exemplo. Acredita-se que, conforme a quantidade de ATP decline, o processo apoptótico vai cedendo lugar ao processo necrótico, e, que, se um mesmo substrato pode ser alvo das duas vias, a primeira ocorre enquanto a energia é plena, enquanto a segunda quando a energia é exaurida (ROY & SAPOLSKY, 1999).

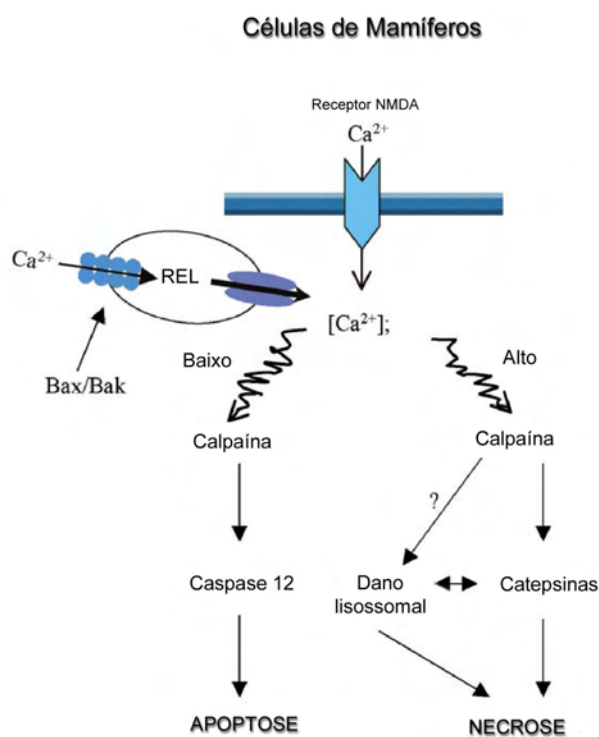


Fig 5. Mecanismo pelo qual a célula controla as vias alternativas de morte celular por necrose apoptótica ou necrose oncótica: Baixos níveis de Ca²⁺ intracelular, liberados das reservas intracelulares de Ca²⁺ (retículo endoplasmático liso) podem induzir apoptose através da ativação localizada de calpaína, a qual, por sua vez, ativa a caspase 12. Altos níveis de Ca²⁺ intracelular podem induzir a necrose por extensa ativação de calpaínas, as quais, subseqüentemente ativam catepsinas (adaptado de Yuan et al, 2003).

2 HIPÓTESE DE TRABALHO

A caracterização da morte celular após eventos isquêmicos é um assunto que permanece pouco esclarecido e que está em constante investigação.

Embora existam diversas técnicas indicadas para o estudo da morte celular após a isquemia, a análise ultra-estrutural continua sendo a melhor dessas. Isso deve-se ao fato de técnicas bioquímicas específicas para apoptose serem, muitas vezes, positivas em alguns estágios de necrose.

A incoerência entre os resultados obtidos por diversos autores pode, até certo ponto, resultar da diversidade de modelos experimentais empregados. Além disso, as condições gerais dos animais analisados, as técnicas de avaliação utilizadas e, principalmente, a espécie estudada interferem nos resultados obtidos. Muitos estudos avaliam o padrão de morte neuronal no campo CA1 do hipocampo, entretanto, muito poucos utilizam ratos Wistar para essa análise. Além disso, maior ênfase é dada a tempos maiores de reperfusão, uma vez que a literatura afirma que a morte neuronal ocorre 24 h após o evento isquêmico.

Com base nisso, e sabendo que a região CA1 do hipocampo figura entre as mais sensíveis à redução do fluxo sanguíneo, estudar-se-á a ultra-estrutura das células piramidais do hipocampo, quando submetidas à isquemia e tempos precoces de reperfusão.

É essencial, para que se possa interferir no processo de degeneração celular, não somente a definição da morte neuronal, como também a identificação das alterações iniciais sofridas por essas células.

Tendo como referência estudos prévios, que utilizaram a mesma metodologia, porém com tempos mais prolongados de reperfusão, acredita-se que o padrão de morte neuronal na região CA1 do hipocampo submetida à isquemia global transitória e tempos precoces de reperfusão seria do tipo necrose oncótica

e poderia apresentar, em algum momento do processo, sinais de necrose apoptótica.

3 OBJETIVO

Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão, caracterizar a morte celular na camada CA1 do hipocampo após isquemia global transitória (10 minutos) seguida de tempos precoces de reperfusão (3, 6, 12 e 24 horas).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados neste estudo, 25 ratos machos Wistar, adultos (3 meses), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais permaneciam em caixas de plexiglass medindo 27 x 26 x 31 cm, recoberta por maravalha. Eram mantidos 5 animais por caixa, com ração Nutripal e água *ad libitum*, em ciclo de 12 horas/claro, 12 horas/escuro. Para o manejo dos animais seguiu-se a Lei n.º 6.638 de 08 de maio de 1979, a qual regulamenta o uso de animais para prática didática – científica.

4.2 Tratamento

Os animais foram divididos em 5 grupos, sendo que cada grupo continha 5 animais:

	10 minutos de isquemia			
controle	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas
5	5	5	5	5

O Grupo controle não sofreu qualquer tipo de intervenção. Os animais pertencentes aos demais grupos foram submetidos a 10 minutos de isquemia global transitória por oclusão dos quatro vasos, e perfundidos com 3, 6, 12 e 24 horas de reperfusão.

4.3 Procedimentos Cirúrgicos

4.3.1 Isquemia por oclusão dos quatro vasos

Antes da realização da isquemia propriamente dita, os animais eram submetidos a duas intervenções cirúrgicas. A primeira delas objetivava a obstrução do fluxo sanguíneo pelas artérias vertebrais, e, a segunda, visava a preparação das artérias carótidas para a isquemia global transitória. Esses dois procedimentos guardavam 24h da oclusão transitória das carótidas para obtenção da isquemia prosencefálica.

O método utilizado para induzir a isquemia global transitória foi o de oclusão dos quatro vasos, com modificações (NETTO et al, 1993). Esse método foi desenvolvido para o uso em ratos Wistar por Pulsinelli e Brierley (1979) e causa redução, para menos de 3%, do fluxo sanguíneo encefálico (PULSINELLI et al, 1982).

No primeiro dia, os animais eram anestesiados com halotano 2-4% (Cristália) e posicionados em posição ventral no aparelho estereotáxico. Fazia-se uma incisão, pelo dorso, na linha média cervical a fim de ter acesso ao forame alar, na primeira vértebra cervical. Nesse local, era introduzida uma agulha de electrocautério, e obtinha-se a electrocoagulação das artérias vertebrais, obstruindo, dessa forma, o fluxo por esses vasos. Após esse procedimento, era realizada uma segunda incisão, desta vez, na linha média cervical ventral, com isolamento das carótidas e envolvimento das mesmas com um fio acoplado a um botão, ambos de silicone. A utilização do cordão acoplado ao botão de silicone permitia a oclusão transitória do vaso quando esse tracionado (Fig. 6).

No segundo dia, era realizada a oclusão das carótidas, sem uso prévio de anestésicos. Para esse procedimento, o fio e o botão de silicone transpassavam um cone plástico e ficavam presos em sua extremidade de maior diâmetro por 10 minutos, obstruindo, dessa forma, o fluxo sanguíneo pelas artérias carótidas.

Somente foram mantidos, neste estudo, aqueles animais que mantiveram a temperatura em torno de 37°C (Letica, Espanha) e aqueles que apresentavam perda do reflexo de endireitamento dentro de 2 minutos após a oclusão total dos vasos, com manutenção da respiração espontânea, batimentos cardíacos e reflexo córneo-palpebral.

4.4 Perfusão Transcardíaca

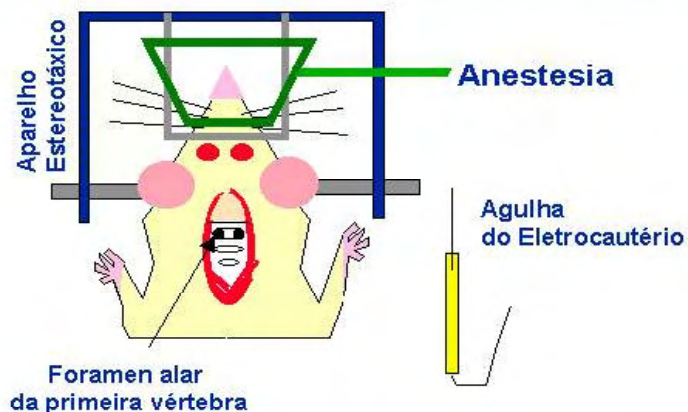
Depois de transcorridos os tempos de reperfusão descritos na tabela 1, os animais eram anestesiados com tiopental sódico (Cristália) intra-peritonal (0,1 ml

por 100 g de peso corporal). Depois de anestesiados, eram realizadas a toracotomia e a exposição do coração. Injetava-se 1000 UI de heparina sódica (Cristália) no ventrículo esquerdo, fazia-se uma incisão nesse mesmo ventrículo, pelo qual era inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Control Company). Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, perfundia-se, inicialmente, solução salina (150 ml), para lavagem da árvore vascular e, posteriormente, solução fixadora (100 ml) de glutaraldeído 2,5% (Sigma), paraformaldeído 2% diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, para fixação do material (Fig. 7).

Após esse procedimento, os encéfalos eram retirados por meio da abertura da calota craniana, e pós-fixados na mesma solução fixadora usada para a perfusão por mais 4 horas à temperatura ambiente.

Método de Oclusão dos 4 Vasos

1ª fase: Eletrocoagulação das Artérias Vertebrais



2ª fase: Isolamento das Artérias Carótidas

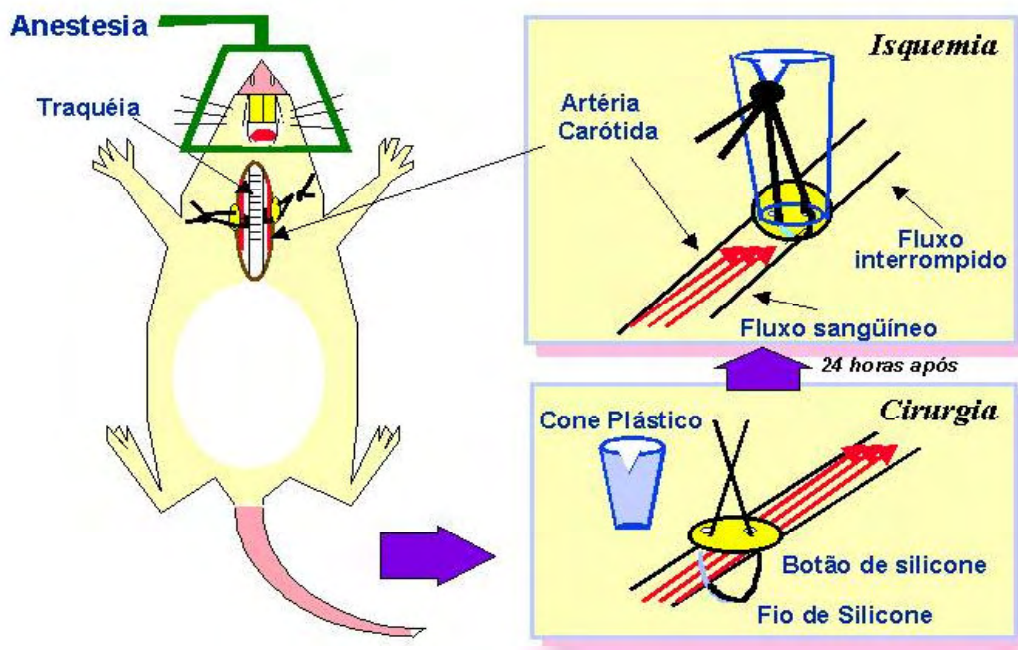


Fig. 6. Ilustração do procedimento cirúrgico utilizado para reprodução da isquemia global transitória por oclusão dos quatro vasos em ratos (elaborado por ARTENI, 1998).

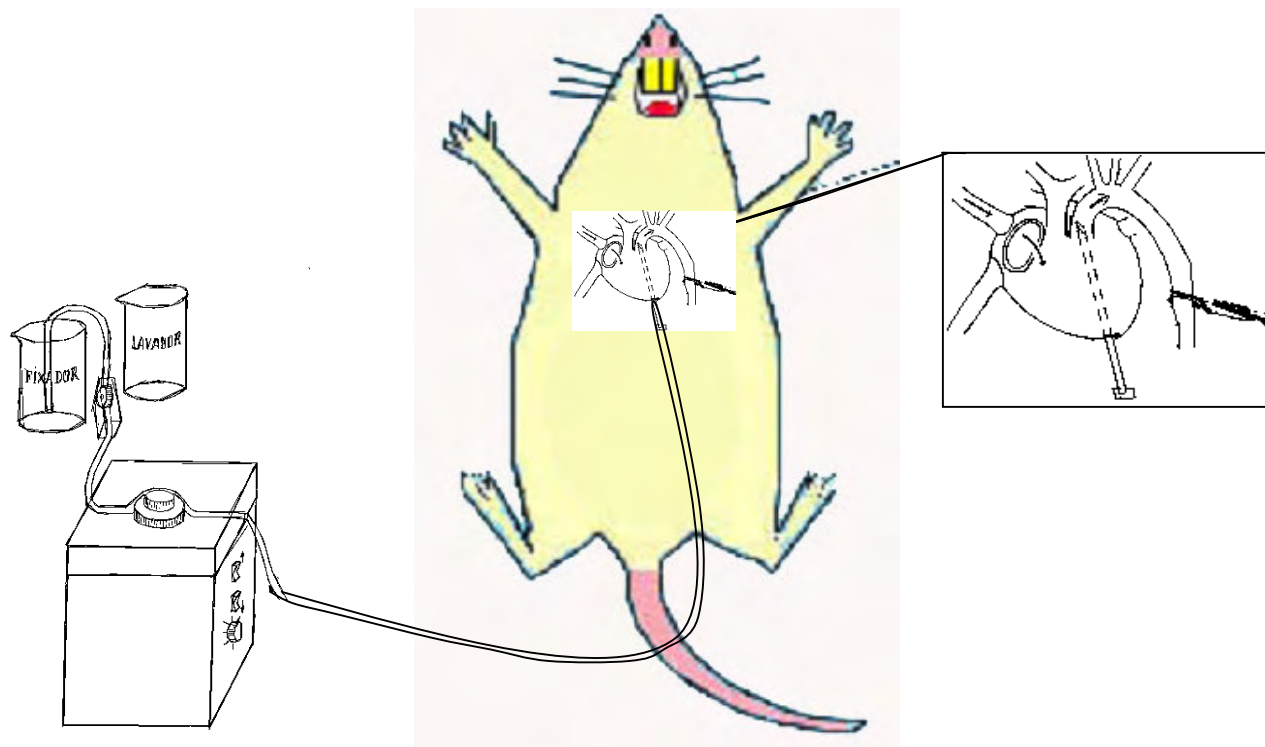


Fig. 7. Procedimento de perfusão por via intracardiaca (elaborado por HERMEL, 2002).

4.5 Preparação Histológica para Microscopia Eletrônica

Após transcorrido o tempo de pós-fixação, faziam-se cortes coronais de 100 μm de espessura em vibratomo (Leica), com a finalidade de obter a região posterior da região CA1 do hipocampo. Depois de selecionada a área de interesse, esses cortes permaneciam pelo menos por 1 hora na mesma solução fixadora. Cada corte era colocado em um Eppendorf e recebia o tratamento que se segue (RODRIGO et al, 1996):

- 1^a lavagem em tampão fosfato salino a 0,1M pH7, 3 - 30 minutos;
- 2^a lavagem em tampão fosfato salino a 0,1M pH7, 3 - 30 minutos;
- 3^a lavagem em tampão fosfato salino a 0,1M pH 7, 3 - 30 minutos;
- Tetróxido de Ósmio (Sigma) 1% diluído em tampão fosfato - 1 hora;

- 1ª lavagem em tampão fosfato salino a 0,1M pH 7, 3 - 15 minutos;
- 2ª lavagem em tampão fosfato salino a 0,1M pH7, 3 - 15 minutos;
- 3ª lavagem em tampão fosfato salino a 0,1M pH7, 3 - 15 minutos;
- 1ª troca de álcool 50% - 5 minutos;
- 2ª troca de álcool 50% - 5 minutos;
- 1ª troca de álcool 70% - 10 minutos;
- 2ª troca de álcool 70% - 10 minutos;
- 1ª troca de álcool 96% - 20 minutos;
- 2ª troca de álcool 96% - 20 minutos;
- 1ª troca de álcool 100% - 20 minutos;
- 2ª troca de álcool 100% - 20 minutos;
- Óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences) por 5 minutos;
- Araldite (Durcupan ACM-Fluka) diluída 1:1 em óxido de propileno - 10 minutos;
- Araldite (Durcupan ACM-Fluka) 100% - 24 horas em vácuo.

Os cortes eram, então, colocados em lâminas, cobertos por resina Durcupan 100% e lamínulas de acrílico a fim de que se evitassem enrugamentos. Permaneciam por 24 horas a 60 °C. Transcorridas as 24 horas, as lamínulas eram retiradas e as lâminas permaneciam por mais 24 horas a 60 °C para a completa polimerização da resina.

Após esse processo, iniciava-se a seleção da área de interesse (Fig. 8). Os cortes eram observados sob microscópio óptico, reconhecia-se a região, e com a ajuda de um estereoscópio (Wild) e material cortante obtinha-se a região a ser estudada. Essa pequena área selecionada era, então, fixada por meio de resina Durcupan 100% em blocos confeccionados previamente, também feitos de resina

Durcupan 100%. Esses blocos permaneciam por mais 24 horas em estufa a 60°C até a completa polimerização da resina (RODRIGO et al, 1996).

Depois de prontos, os blocos eram trimados manualmente, a fim de retirar o excesso de resina, que permanecia em torno do material. Eram, então, realizados cortes semifinos de 800 µm no ultramicrotomo (RMC – MT 6000 – XL) do Centro de Microscopia Eletrônica – CME, UFRGS.

Os cortes semifinos obtidos eram colocados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina. Isso permitia a visualização das células piramidais da região CA1 do hipocampo, e que fosse realizada uma segunda trimagem, desta vez, para que apenas essas células fossem selecionadas para os cortes ultrafinos.

Os cortes ultrafinos, de 80 nm, eram feitos no mesmo ultramicrotomo, colocados em telas (SB100), contrastados em acetato de uranila (MERCK), por 40 minutos, e citrato de chumbo, por 20 minutos (REYNOLDS, 1963). Após 24 horas as telas estavam prontas para a análise no microscópio eletrônico de transmissão (MET).

Durante a análise no microscópio eletrônico de transmissão do CME – UFRGS (JEOL JEM EXII) eram feitas as eletromicrografias. Após a revelação das mesmas, os filmes eram escaneados (Agfa Duoscan 3.03) no CME – UFRGS, ajustando-se brilho e contraste.

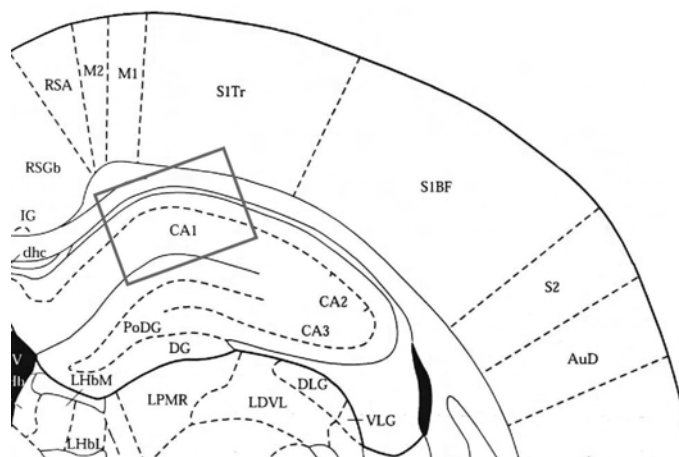


Fig. 8. Seleção da área de interesse – CA1 do hipocampo (Adaptado de Paxinus, 1994)

5 Artigo

O artigo que segue será submetido à revista Brain Research:

AN ULTRASTRUCTURAL STUDY OF CELL DEATH IN THE CA1 PYRAMIDAL FIELD OF THE HIPPOCAMPUS IN RATS SUBMITTED TO TRANSIENT GLOBAL ISCHEMIA FOLLOWED BY EARLY REPERFUSION

Aline de Souza Pagnussat^{1,2}, Maria Cristina Faccioni-Heuser^{1,3}, Carlos Alexandre Netto², Matilde Achaval¹.

¹Morphological Sciences and ²Biochemistry Departments of the Health Basic Sciences Institute and ³Electron Microscopic Center, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil.

Correspondence address:

Matilde Achaval

Laboratório de Histologia Comparada

Departamento de Ciências Morfológicas

Instituto de Ciências Básicas da Saúde - ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: + 55-51-33163624

Fax: + 55-51-33163092

e-mail: 003522@ufrgs.br

Running title: Cellular death characterization after cerebral ischemia and early reperfusion periods

ABSTRACT

The characterization of neuronal death after acute brain injury is the subject of ongoing investigation and debate. The aim of the present study was to characterize cellular death in the CA1 hippocampus field pyramidal cells after mild ischemia followed by short reperfusion periods using the electron microscopy. Forebrain ischemia was induced using the four-vessel occlusive method. After 3, 6, 12 and 24 h of reperfusion, the animals were anaesthetized and fixed. Brain slices were dehydrated, embedded, sectioned and examined under a transmission electron microscopy. The CA1 pyramidal cells of all groups presented alterations after the ischemic insult. In earlier reperfusion periods slight alterations could be visualized, including signs of apoptotic necrosis and oncotic necrosis. With 12 h of reperfusion, there was apparent recovery. At 24 h after ischemia, the neuronal damage was more severe. Necrotic-like neurons were found together with some apoptotic bodies, characterizing apoptotic death. It is possible that ischemic neurons undergo by a process know as a *continnum* between apoptosis and necrosis, or, a *parapoptosis* process. The apparent recuperation that occurred with 12 hours of reperfusion may be due to the influence of glial cell. The present report provides evidence that cellular death after ischemic insult involves characteristics of both apoptotic necrosis and oncotic necrosis.

Keywords

Ischemia, neuronal death, apoptosis, necrosis, hippocampus, electron microscopy.

INTRODUCTION

In neurology, one of the most discussed themes is the determination and comprehension of the cellular and molecular events involved in neuronal death after acute brain injury, such as that resulting from hypoxia, ischemia, epilepsy and hypoglycemia. Human blood flow alterations are grouped in the expression *stroke*, whose natural causes include thrombosis, embolism and systemic decrease of blood perfusion due to heart failure (Zemke, 2004; Roy & Sapolski, 1999; Mcbean & Kelly, 1998).

Transient global forebrain ischemia causes neuronal death both in humans and rodents. Among the more sensitive encephalic areas are the CA1, CA3 and CA4 fields of the hippocampus, caudate nucleus, striatum, cerebellum and layers 3, 5 and 6 of the cerebral cortex. A heterogeneous pattern of alterations exists in the hippocampus, and among regions of the hippocampal formation, the CA1 and CA3 fields are more sensitive than the dentate gyrus when submitted to the same ischemic insult. Nevertheless, in experimental animals, including neonatal mice, rats and gerbils, the CA1 pyramidal neurons undergo cell death several days after brief forebrain ischemia, a phenomenon known as delayed neuronal death (Briones et al, 2004; Rami, 2003; Lee et al, 2002; Sheldon et al, 2001; Zeng & Xu, 2000; Nitatori et al, 1995).

An increase in excitatory amino acid release, mainly glutamate, associated with impairment of its uptake occurs during the course of ischemia and reperfusion. This is a consequence of cellular electrical collapse and is known as excitotoxicity. The excessive synaptic release of glutamate can lead to disturbance in Ca^{+2} homeostasis and trigger neuronal death in several neuropathologies. However, the

degenerate neural pattern that occurs after ischemic events remains undefined and continues under constant investigation (Zemke et al, 2004; Arundine & Tymianski, 2003; Blomgren et al, 2003; Rami, 2003; Matute et al, 2002; Anderson & Swanson, 2000; Rossi et al, 2000; Roy & Sapolsky, 1999; Nitatori et al, 1995).

Excitotoxic cell death is closely related to mitochondrial physiology and can involve features either apoptosis or necrosis. The pattern of neuronal hippocampal death subsequent to ischemia can be evaluated by means of morphologic modifications visualized at optical and electronic microscopic levels and appears to be intimately related to the quality and duration of the aggressor stimuli, animal age, nutritional conditions and animal experiment model employed (Ouyang & Giffard, 2004; Zemke et al, 2004; Blomgren et al, 2003; Hansson et al, 2003; Ruan et al, 2003; Matute et al, 2002; Sheldon et al, 2001; Bicknell & Chen, 1995).

Apoptosis is present in the physiological process, but can also be found in neuropathologic processes. This form of cell death needs energy and requires the active participation of the cell. In apoptosis there is a decrease in nuclear size, intense nuclear chromatin aggregation, nucleolus disintegration and cytoplasmic condensation with the formation of vacuoles, but organelle integrity is maintained. In the final stages apoptotic bodies are formed, which are then quickly eliminated by phagocyte cells (Blomgren et al, 2003; Rami, 2003; Ruan et al, 2003; Hou & Macmanus, 2002; Roy & Sapolsky, 1999; Martin et al, 1998; Kerr et al, 1995).

In cellular necrosis there is modification in cellular volume, disruption of the plasma membrane and alteration in mitochondrial physiology. In contrast to apoptosis, necrosis always occurs in the pathologic process and is associated with

adjacent tissue inflammation (Kerr et al, 1995; Martin et al, 1998; Rami, 2003; Ruan et al, 2003).

The pathological alterations to the pyramidal cells to the CA1 hippocampal field found in adult male rats submitted to 10 and 20 minutes of ischemia and 2, 4 and 10 days of reperfusion showed different degrees of tissular modification, and permitted the classification of the degenerative process into three stages: initial, intermediate and final, which corresponded to slight, moderate and severe cellular modifications, respectively. The prevalence in one of these stages was related with the reperfusion times and with the duration of the ischemia (Winkelmann, 2002).

A recent study of the CA1 field of rat hippocampus submitted to ischemic insult (10 or 20 min) and 2, 4 and 10 days of reperfusion did not reveal any cellular characteristics of apoptotic necrosis (Winkelmann et al, submitted). On the other hand, ischemic cell death is also characterized by a long delay between the ischemic insult and the manifestation of the major cell damage (Lipton, 1999). Additionally, physiological and biochemical analyses have demonstrated CA1 pyramidal neurons from gerbils to be normal 24 h after forebrain ischemia (Nitatori et al, 1995). Vessel occlusion in gerbils is the most studied model because the operation is simpler than in the rat. However, there are many differences between the two species, both in terms of metabolic and genetic alterations during and after ischemia, and the abilities of agents to protect against damage. Thus, the process of cell death may be different and the results from one species cannot necessarily be generalized (Lipton, 1999).

Transient global ischemia is a severe and acute insult, but the mechanism of post-ischemic neuronal death remains unclear (Ruan et al, 2003). Therefore, the

aim of present study was to characterize the cellular death of pyramidal cells from the CA1 field of hippocampus after 10 minutes of transitory global ischemia followed by short reperfusion periods, by the use of electron microscopy. Based on previous studies, we hypothesize that neuronal death in early reperfusion times would be a predominantly oncotic necrosis process.

MATERIAL AND METHODS

Animals

For this study we used 25 adult male Wistar rats weighing between 280 and 320 g from the UFRGS Animal House (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). The animals were kept under a constant 12:12 h light-dark cycle at a room temperature of $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ and maintained with food and water ad libitum. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of the animals needed. The Brazilian Laws and the National Institute of Health Guide for Animal Care and Use of Laboratory Animals were strictly followed.

Experimental groups

The animals were divided into 5 groups, each with 5 animals. Twenty animals received 10 min of ischemia, and were divided in to four groups receiving 3, 6, 12 and 24 h of reperfusion respectively, and a control group consisting of intact animals.

Ischemic surgical technique

Transient forebrain ischemia was produced using the 4-vessel occlusive method, with minor modifications. Briefly, animals were anaesthetized with halothane (Cristália, Brazil) mixed with breathing air and an occluding device (a loop of silicone tubing) was loosely placed around each carotid artery to allow subsequent occlusion of these vessels with minimal mechanical disturbance. The animals were then placed on a stereotaxic frame and the vertebral arteries were electrocoagulated (Netto et al 1993; Pulsinelli et al 1979). One day after surgery, the occlusion of both common carotid arteries for 10 minutes produced forebrain ischemia. Animals that did not lose the righting reflex or that convulsed during the ischemic insult were not used in the experiments. In all the experiments, the temperature was maintained at 37°C during the ischemic insult, using a homeothermic blanket with digital display and feedback regulated maintenance of body temperature (Letica, Spain). The control group was composed of naive, untouched animals.

Electron microscopy

After either 3, 6, 12 and 24 h of reperfusion, the animals were re-anaesthetized with 0.1 ml/100 g of sodium thiopental (Cristália, Brazil) and injected with 1000 UI heparin (Cristália, Brazil). Thereafter, they were transcardially perfused through the left ventricle, using a peristaltic pump (Control Company, Brazil; 20 ml/min) with 200 ml of saline solution followed by 100 ml of fixative solution composed of 2.5% glutaraldehyde (Sigma, USA) and 2%

paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.4 at room temperature. Then the brain was removed and immersed overnight in the same fixative solution.

Coronal sections (100 μm) of the brain were obtained using a vibratome (Leica, Germany) and postfixed in the same fixative solution for at least 1 h. Then the sections were washed in phosphate solution and postfixed in 1% osmium tetroxide (Sigma, USA) for 1 h at room temperature. The material was dehydrated in ascending graded series of alcohol and propylene oxide (Electron Microscopy Sciences, USA), embedded in araldite (Durcupan ACM, Fluka, Switzerland) and maintained in a *vacuum* for 24 h. Following which, they were put onto slices with resin and polymerized for 48 h at 60°C. Areas containing the CA1 field of the dorsal hippocampus were selected (Fig. 1) and removed from the slices, employing a stereomicroscope (Wild, Switzerland). The selected CA1 field sections was glued on a resin block and newly polymerized for 48 h at 60°C. Semithin sections (1 μm) were obtained using an ultramicrotome (M T 6000-XL, RMC, Tucson, USA) and stained with 1% toluidine blue diluted in 1% sodium tetraborate to identify the CA1 pyramidal neurons (Rodrigo et al, 1996). Then ultrathin sections (80 nm) were obtained with the same ultramicrotome and stained with 2% lead citrate (Merck, Germany) and 1% uranyl acetate (Merck, Germany) (Reynolds, 1963), and examined using a transmission electron microscope (JEM 1200 EXII, Japan, CME-UFRGS).

RESULTS

Electron microscopic observation

The CA1 field pyramidal cells from rat hippocampus submitted to ischemia exhibited intracellular alterations consistent with a degenerative process, and the ultrastructural features of these alterations varied in intensity according to the reperfusion period.

Control Group

In the control group, the pyramidal neurons had a pale round or oval nucleus surrounded by cytoplasm with mitochondria, Golgi complex (GC), smooth endoplasmic reticulum (SER), rough endoplasmic reticulum (RER), free ribosomes and polysomes, lysosomes, neurotubules and neurofilaments. Blood capillaries were surrounded by thin astrocytic end feet and showed endothelial cells with euchromatic nuclei, tight junctions between the adjacent plasma membranes and no transendothelial vesicles.

10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion

In comparison with the control animals, the rats submitted to global transitory ischemia followed by 3 h of reperfusion showed slight ultrastructural alterations. The majority of neurons exhibited a pale round or oval nuclei and intact nucleolus, sometimes, were localized in eccentric positions. Plasma and nuclear membranes remained intact, as did the neurofilaments and mitochondria, which maintained their normal appearance, with recognizable cristae. However, many

empty spaces inside the large electron lucent nuclei were found. Initial cytoplasmic vacuolization was also detected. While the majority of neurons had slightly dilated RER and GC, some cells displayed more significant edema in their organelles. Sometimes polysomes were disassociated, displaying desegregated ribosomes, giving the cytoplasm a dark aspect. Pleomorphic lysosomes with a dense content were evident when compared with control animals and some electron dense neurons appeared among clear cells. These cells displayed dilated RER, however, ribosomes persisted against the cisternae. In addition, neurons with electron lucid cytoplasm also exhibited some chromatin clumps, scanty organelles, mitochondria and altered SER.

The oligodendrocytes had a normal dense aspect. Nuclei were irregularly shaped and RER were more dilated than in normal conditions, however ribosomes persisted. Several astrocytes showed nuclei with irregular shapes, pale and edematous cytoplasm, relatively sparse organelles, some pleomorphic lysosomes and glycogen granules. Bundles of intermediate filaments were distributed throughout the perikaryon, but within the processes the distribution was looser than that found in the control animals. Some astrocytic end feet that surround the blood capillaries were swollen, showing electron lucid cytoplasm with some vacuoles, glycogen granules and disassociated intermediate filaments. The capillary lumen was also modified, showing a reduced diameter due to folding of the vessel walls.

10 minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion

In animals submitted to 10 min of ischemic insult followed by 6 h reperfusion, the neuronal changes were more evident than in the 3 h reperfusion

group. Several neurons exhibited wrinkled nuclei, with angular shapes and the persistence of nuclear vacuoles. Chromatin clumps appeared against the inner aspect of the nuclear membrane and dispersed into the karyoplasm. While the nuclear membrane was usually intact, at times it was arranged in deep folds that extended across almost all the nuclear diameter. Though, the nucleoli frequently appeared normal, they sometimes displayed shape modifications and had a more electron lucid appearance, with predominance of the *pars fibrosa*. Numerous cytoplasmatic vacuoles, containing cellular debris were identified. RER cisternae lacked ribosomes, were dilated and several were in the process of forming vacuoles. There was an increase in the levels of free ribosomes located throughout the cytoplasmatic matrix. Some polysomes were disassociated, the GC was fragmented and mitochondria were swollen and presented structural disorder with a vacuolated aspect and scanty cristae. However, the inner and outer membranes of some mitochondria appeared to be intact and the cristae displayed a normal aspect. Frequently, the plasma membrane remained intact.

Some neurons in the intermediate stage of degenerative process, exhibited increased heterochromatin initiating a nuclear pyknosis and very pale and edematous cytoplasm with portions of RER and GC with a fragmented aspect. While small Nissl bodies persisted in the cytoplasm of these neurons. Mitochondria were of different sizes, with dilated spaces in the mitochondrial matrix and no identifiable cristae.

The blood capillaries were surrounded by astrocytic end feet with expressive edema and loose intermediate filaments with a fuzzy aspect. The endothelial cells

showed several transendotelial vesicles, numerous microfolds on the luminal side and intact basal lamina and tight junctions.

10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion

In animals submitted to 10 minutes of ischemia and 12 h reperfusion, neurons were observed in different stages of degeneration. Numerous neurons retained their normal aspect with little modification. This can suggest cells had undergone recuperation, once they displayed more severe alterations with 3 and 6 h reperfusion. These neurons had large and round nuclei, clear karyoplasm, intact nucleolus and slight organelle modification. Nevertheless, other cells exhibited nuclei with irregular shapes, numerous nuclear indentations, more numerous bundles of nuclear filaments and chromatin clumps against the double nuclear envelope, persisting the nuclear vacuolization. The nucleolus was, at times, more electron lucid, with predominance of the *pars fibrosa* and localized in eccentric position, and in some cases, the nuclear membranes were disrupted. Some mitochondria had identifiable cristae, outer and inner membranes. Other numerous edematous mitochondria had an electron dense aspect and exhibited a loss of matrix structure. RER and GC, which presented greater dilation of their cisternae originating into cytoplasmatic vacuoles. Some ribosomes remained against the RER cisternae. Filaments, microtubules, pleomorphic lysosomes, as well as the polysomes were apparently intact. The plasma membrane still remained intact in the majority of neurons. While, in neurons in more advanced stages of degeneration, the plasma membrane was not visible. In such cases, the vacuoles in the neuronal cytoplasm and neuropilar region showed membrane agglomeration

or myelin-like figures. An increase of empty spaces with cellular debris was also identified.

The astrocytes showed increased ultrastructural alterations. Microglial cells and oligodendrocytes exhibited no significant ultrastructural modifications.

In some blood capillaries the luminal space and the basal lamina were preserved, but were surrounded by edematous astrocytic end feet in which glycogen granules and transendotelial vesicles were absent.

10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion

Animals submitted to 10 min of ischemia and 24 h of reperfusion displayed more severe signs of the degenerative process. Few neurons retained their ultrastructure intact.

In some cases, neurons in the initial stage of degeneration exhibited large euchromatic nuclei, in others, nuclei with small accumulations of chromatin. More numerous bundles nuclear filaments were observed and the GC were dilated, though they kept their parallel arrangement. There was some dilation of the RER, but the ribosomes remained up against their cisternae. The plasma and nuclear membranes in these neurons were continuous, without structural alterations.

Most neurons showed more severe signs of degeneration than 12 h of reperfusion, displaying more nuclear indentations, shape irregularity, chromatin clumps and chromatin agglomerations, against the nuclear envelope. The cytoplasm was often very pale, with edematous and vacuolated aspect and scanty organelles. Though most nuclear membranes were disrupted, the plasma membrane remained intact. The vast majority of mitochondria had an altered

aspect, in which the matrix was darkened and the cristae not visible. The SER, GC and RER were extremely swollen, and there was a total absence of ribosomes against the RER cisternae, forming vacuoles throughout the perinuclear cytoplasm. Disassociated pleomorphic lysosomes and polyribosomes were also identified.

Intense disorganization of the neuropilar region was noted in the analyzed animals. Organized structures containing cellular debris were observed in the neuropilar region, some had a dark or electron dense aspect. Besides, the structures with degenerative aspect, like membrane agglomeration or myelin-like figures, were more evident than in less time of reperfusion.

In animals submitted to ischemic insult and 24 h reperfusion, some structures with apoptotic features were found: chromatin aggregated into large round clumps; preserved RER, with ribosomes against their cisternae and relatively intact mitochondria. In some cases, the chromatin clumps were round and surrounded by a membrane, resembling apoptotic bodies.

The astrocytic end feet that surround the blood capillaries were excessively swollen, with numerous vacuoles in the electron lucid cytoplasm, at times with an absence of glycogen granules. The vascular wall of the capillaries were folded capillary displayed a folding of such which resulted in intense reduction of the luminal side. The basal lamina and the tight junctions were preserved and some transendotelial vesicles were also visualized.

DISCUSSION

Ultrastructural alterations were observed in all animals submitted to 10 min of ischemia and different times of reperfusion. However, these modifications varied intensity, presenting an increase in degenerative features directly related to increases in the reperfusion period. Moreover, neurons in different stages of degeneration were identified in the same analyzed animal, which permitted classification of the degenerative process into three stages: initial, intermediate and final. As the three stages of degeneration were found in the neurons of all the animals, the prevalence of one of these characterized the severity of the lesion (Winkelmann et al, submitted).

Even so literature asserts that neuronal death in CA1 layer of gerbils hippocampus submitted to 10 minutes of ischemia just occurs 24 h after the insult, we could observe structural alterations in early periods, involving, beyond organelles edema, the nuclear vacuoles formation (Nitatori et al, 1995).

In early periods (3 h) cellular modifications were slight when compared with longer reperfusion times, and was the prevalence in the initial stage of degeneration.

In longer reperfusion periods (6 h), the degree of ultrastructural modification was greater. Initial stages of mitochondrial swelling were observed and nuclear and plasma membranes remained untouched. In this group several neurons in intermediate stage of degenerative process were more numerous than in the 3 h reperfusion group.

However, with 12 h of reperfusion, cells presented an apparent recuperation. As in the case of shorter reperfusion times, neurons with varied morphologic alterations were identified, but there was a notable predominance of apparently intact neurons.

In the 24 h of reperfusion group neurons in the intermediate and final stages of degeneration were more prevalent. In some animals, were observed large chromatin clumps and relatively intact organelles enveloped by plasma membrane.

The glial cells displayed an increase of the ultrastructural alterations, in agree with ischemic insult period followed. In all animals, were identified modifications of the astrocytic end feet, whose edema reduced the vascular lumen, and probably harmed the blood perfusion. In global ischemia, there is often marked hypoperfusion, which is extreme between 6 and 24h after the insult, with blood flow between 30 and 50% of normal conditions (Lipton, 1999; Kagstrom et al, 1983).

Ours findings show that neuronal death that occurs after slight ischemic insult includes characteristics typical of both apoptosis and necrosis. However, features typical of the necrotic process predominate (Roy & Sapolsky, 1999).

There may well be a direct relationship between the duration of the reperfusion time and the prevalence of the different degenerative characteristics. With precocious times, the mitochondria appeared normal and the nuclear and plasma membranes were intact, characteristics that are associated with the apoptotic process. However, with increase of reperfusion times, features associated with a process of necrotic cell death were found, such as mitochondrial swelling, plasma and nuclear membrane disruption and cytoplasmic vacuolization (Martin et al, 1998).

Several cells exhibited condensed nuclei and clumps of chromatin, features frequently described as apoptosis. However, when high magnification was used to view the ultrastructure, it was possible to note that these same cells did not display

the classic features of apoptosis, as the cytoplasm appeared highly vacuolated and in a process of dissolution (Sheldon et al, 2001).

Modifications to both nucleolar morphology and arrangement within the nucleus were observed. These nucleolar features correspond to the apoptotic process, as precocious desegregation of this structure occurs in programmed cellular death (Martin, 1998; Wyllie et al, 1980).

Organelle edema was present in early reperfusion times, a typical characteristic of necrosis (Briones et al, 2004; Martin, 1998). Other signs seen that conform to the necrosis process included modification of the cellular volume, disintegration of nuclear membranes, and nuclei with pycnotic appearance (Rami, 2003; Ruan et al, 2003; Kerr et al, 1995).

In cellular necrosis the mitochondria undergo a sequence of complex morphologic alterations that includes contraction or condensation of the inner membrane, dissipation of matrical granules, inner membrane swelling, cristaeolysis, formation of flocculent aggregates, and then disintegration (Martin, 1998).

The mitochondria play a significant role in cellular homeostasis and in pathological conditions, as not only do they serve as the major energy factory of living cells, but they can also either trigger or amplify the signals that lead to cell death (Guimarães & Linden, 2004). The mitochondrial functional integrity is one of the most important discriminating characteristics between apoptosis and necrosis, since the programmed cellular death occurs in an ATP dependent form (Weishaupt et al, 2003; Roy & Sapolski, 1999). In our research the mitochondria were found to display results were identified that displayed progressive ultrastructural

modifications that were possibly due to post-ischemic hypoperfusion. The literature suggests that post-ischemic hypoperfusion, which occurs between 6 to 24 h after the insult, does not cause damage; rather, it appears to reflect a reduced metabolic rate in postischemic tissue. Such a reduction may result in mitochondrial damage or reductions in ATP utilizing process (Lipton, 1999; Pulsinelli, 1982a).

In cellular necrosis RER and GC cisternae can dilate, fragment and vesiculate (Martin, 1998). In our results, these organelles were dilated and the ribosomes separated from the RER cisternae. Moreover, the polyribosomes were disassociate, giving rise to many free monomeric ribosomes and in a dense or granular aspect within the cytoplasm matrix. These characteristics result in impaired protein synthesis.

There may be a “window” lasting for some days after the ischemic insult that would allow measures to be taken to counteract the degenerative process (Ordy et al, 1993). The apparent recuperation observed in 12 h reperfusion animals could be attributed to glial cells, in particular astrocytes and microglia that may play an important role in the recuperation phase. Astrocytes play a major role in limiting the growth of ischemic lesions, and antiapoptotic mechanisms are a key element of astrocyte-mediated neuroprotection after stroke. Astrocytes are a major source of growth factors that protect neurons against ischemic damage (Kettmann & Ransom, 2005; Ruscher et al, 2002; Louw et al, 1998). On the other hand, it has been demonstrated that excitatory amino acids are released in greater amounts from astrocytes than neurons following hipoxic-hipoglycemic stimulation. This suggests that surrounding astrocytes contribute to the excitotoxic death of ischemic neurons (Louw et al, 1998).

Some structures, resembling apoptotic bodies were found in animals following 24 h of ischemic insult. In these cases, RER and mitochondria were apparently intact, which are indispensable by the apoptotic process (Ruan, 2003). These findings could mean that soon after ischemia, while ATP remains available, the cell initiates a process of cellular degeneration similar to apoptosis. However, with prolonged reperfusion times, impairment of the blood perfusion, mitochondrial failure and consequent energy collapse, it would be impossible to complete the process of programmed cellular death. Then, neurons would change the cell death pattern, and develop a process of degeneration similar to necrosis (Weishaupt et al, 2003; Yuan et al, 2003).

In fact, electronic microscopy is still considered the best method of evaluating cellular death, since some specific biochemical techniques for identifying apoptosis can also show positive in some stages of necrosis (Sheldon et al, 2001; Bicknell & Chen, 1995). However, there are some limitations to its use. Apoptotic bodies are quickly removed from the tissue by microglial cells, within 30 to 60 min of the beginning of apoptosis, which would impede the observation of such cells with electronic microscopy (Lee et al, 2002).

Numerous factors must be considered when analyzing neuronal death such as encephalic structure and the animal specie studied. Less ischemic periods and cellular energy viability can increase the possibilities of the cell death due to apoptosis. Other factors, such as high levels of energy availability, younger animals, release of lower quantities of excitotoxic agents or minimal duration of harmful agent exposure can increase the possibility of the cells entering into a process of programmed death (Roy & Sapolsky, 1999).

Due to the diversity of the morphologic modifications, which sometimes indicate apoptosis, and at other times point to necrosis, many researchers recognize the possibility that ischemic neurons undergo a process that would be a *continuum* between apoptosis and necrosis, referred to as "*parapoptosis*" (Hou & Macmanus, 2002; Sheldon et al, 2001; Roy & Sapolski, 1999; Martin et al, 1998). Some researchers affirm that, in some cases, mixed features of both apoptosis and necrosis can be seen in the same neurons after brain injury (Liu et al, 2004). Thus, combined strategies targeting apoptosis as well as necrosis will be necessary to protect against ischemic damage in brain structures after cerebral ischemic insult (Wei et al, 2004).

Based on the reported findings, it is possible to assert that neuronal death in the CA1 field of rat hippocampus submitted to 10 min of ischemia and early reperfusion times comprise apoptotic and necrotic features. However, based on the prevalence of the ultrastructural alterations, it is possible to affirm that necrosis is the major form of cell death in these cases.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the CA1 field rat hippocampus. The boxed indicate the area analyzed.

Figure 2. Electron micrographs from CA1 field of control animals. A: Euchromatic pyramidal neuron, nucleus (N), nucleolus (nu), plasma membrane (open arrow) and nuclear membrane (arrow). B: CA1 field pyramidal cell, nucleus with nucleolus (nu), plasma membrane (open arrow). C: Detail of the electron micrograph B, showing Golgi complex (G), rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria (M), lysosomes (Ly), free ribosomes (R) and RER that is in continuity continued with nuclear membrane (arrow). D: Detail of the electron micrograph B, Golgi complex (G), rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria (M) and plasma membrane (open arrow). E: Pyramidal cell cytoplasm with its organelles, mitochondria (M). Neurofilaments (Nf), lysosomes (Ly) and nuclear membrane (arrow) F: Blood capillary (BV) with preserved lumen, surrounded by astrocytic end feet (EF – open arrows), showing an euchromatic endothelial nucleus (EC). Scale bar: A, B: 2 μm ; C, D, E: 500 nm; F: 1 μm .

Figure 3. Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion. A: Euchromatic nucleus (N), glial cell – microglia (GC), blood vessel (BV). B: Detail of the electron micrograph A showing an electron lucid nucleus (N) with some vacuoles (V), nuclear membrane preserved (arrow), intact plasma membrane (open arrow). C: Detail of the electron micrograph A illustrating a blood vessel (BV) with diminished lumen, endothelial cell (EC), edematous astrocytic end feet (EF) surrounding the capillary (asterisks) with decreased glycogen granules. D: CA1 pyramidal cell with nucleus (N) with disperse chromatin and intranuclear vacuoles (V), nucleolus (nu) mitochondria (M). E: Detail of electron micrograph D, showing the vacuoles (V) into the nucleus,

preserved nuclear membrane (arrow), apparently intact mitochondria (M). F: Detail of the cytoplasm of pyramidal cell displaying a high rough endoplasmic reticulum dilatation (RER) with decreased ribosomes against them, slight alteration in the mitochondria (M). Scale bar: A: 2 μm ; B, C: 1 μm ; D: 2 μm ; E: 500 nm; F: 1 μm .

Figure 4: Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion. A: Several CA1 pyramidal neurons showing euchromatic nuclei (N). B: Detail of electron micrograph A, neuron with indentation (arrow), preserved nuclear membrane, lysosomes (Ly), apparently normal rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (G), mitochondria (M), free ribosomes (R), intact plasma membrane (open arrow). C: pyramidal cell nucleus (N) and a dendrite emerging from the body; cellular debris. D: Detail of electron micrograph C, nucleus (N) with nuclear indentation (arrow), and an apparently intact mitochondria (M). E: Detail of electron micrograph C showing cellular debris with edematous mitochondria (M), Golgi complex (G) and rough endoplasmic reticulum (RER) with ribosomes against them. F: Neuron with euchromatic nucleus (N), cytoplasm with lysosomes (Ly), dilated Golgi complex (G) and rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria with few alterations (M), preserved nuclear membrane (arrow). Scale bar: A: 2 μm ; B: 500 nm; C: 2 μm ; D: 500 nm; E: 2 μm ; F: 500 nm.

Figure 5. Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion. A: Pyramidal neuron showing nucleus (N) with some indentations (arrow), nucleolus in eccentric position (nu) and rough endoplasmic reticulum (RER) with minor alterations. B: Pyramidal cell exhibiting a heterochromatic nucleus (N), nucleolus (nu). C: Detail of electron micrograph A, preserved nuclear membrane (arrow), intranuclear vacuoles (V), lysosomes (Ly), apparently intact rough endoplasmic reticulum (RER), edematous mitochondria (M). D: Detail of electron micrograph A, nuclear indentations (arrow), nucleolus with predominance of the *pars fibrosa* (nu), intranuclear vacuoles (V), myelin-like

figure (asterisk), apparently intact rough endoplasmic reticulum (RER). E: Detail of electron micrograph B, heterochromatic nucleus (N), dilated rough endoplasmic reticulum (RER), slight modifications in Golgi complex (G) and in mitochondria (M). F: Detail of electron micrograph B, nucleolus with a increment of the *pars fibrosa* (nu), intact nuclear membrane (arrow), dilated rough endoplasmic reticulum (RER), edematous Golgi complex (G), mitochondria with vacuolated aspect (M), preserved plasma membrane (open arrow). Scale bar: A, B, C, D, E, F: 1 μ m.

Figure 6. Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion. A: Pyramidal cells exhibiting a heterochromatic nucleus (N), nucleolus in eccentric position (nu), preserved nuclear membrane (arrow), edematous mitochondria (M). B: Nucleus (N) of CA1 pyramidal cells with intact nuclear membrane (arrow), edematous Golgi complex (G), little dilated rough endoplasmic reticulum (RER). C: Neuron in final stage of degeneration displaying a pyknotic nucleus, edematous mitochondria (M), rough endoplasmic reticulum (RER) with some ribosomes, glial cell (GC). D: Other cell in final stage of degeneration, pyknotic nucleus, swollen mitochondria (M), fragmented Golgi complex (G) and rough endoplasmic reticulum cisternae (RER) with ribosomes. Scale bar: A, B: 500 nm; C, D: 1 μ m.

Figure 7: Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion. A: Two pyramidal neurons, nucleus (N), nucleolus in eccentric position (arrow), vacuolated and edematous cytoplasm (asterisk). B: Neuron with heterochromatic nucleus (N and arrow), neurofilaments (Nf), rough endoplasmic reticulum residues (RER) with several ribosomes. C: Detail of electron micrograph B showing a swollen mitochondria (M), cytoplasm with scanty organelles, preserved nuclear membrane (arrow). D: Pyramidal cell cytoplasm displaying high dilated rough endoplasmic reticulum (RER), little modification in mitochondria (M), lysosomes (Ly). E: Pyramidal cells with minor ultrastructural modifications with dendritic process (D), intact nuclear (arrow) and plasma

membranes (open arrow). F: Two apparently intact pyramidal neurons, euchromatic nucleus (N). Scale bar: A: 2 μm ; B: 1 μm , C, D: 200 nm; E, F: 2 μm .

Figure 8: Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion. A: Blood vessel (BV) with preserved lumen, endothelial cell with euchromatic nucleus (EC), edematous astrocytic end feet (EF) without glycogen granules, pericyte (GC). B: Dark pyramidal neuron, nucleus (N), nuclear indentations (arrow), nucleolus (nu) in eccentric position and with predominance of the *pars fibrosa*, compacted cytoplasm (asterisk), preserved plasma membrane (open arrow). C: Oligodendrocyte cell (OC) with dense cytoplasm and heterochromatic nucleus. D: Neurons in final stage of degeneration showing a nucleus (N) with chromatin aggregates against the nuclear envelope, edematous cytoplasm with sparse organelles, neurofilaments (Nf) and rough endoplasmic reticulum (RER) with some ribosomes, dark and swollen mitochondria (M). Scale bar: A: 500 nm; B: 2 μm ; C: 500 nm; D: 1 μm .

Figure 9: Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion. A: Pyramidal cells exhibiting an euchromatic nucleus (N) and a dendritic process (D). B: Detail of electron micrograph A showing a nucleus (N) with some folds of the nuclear membrane (arrows), slight dilated rough endoplasmic reticulum (RER), vacuolated mitochondria (M), preserved plasma membrane (open arrow). C: Detail of electron micrograph A, showing an oligodendrocyte (OC) with dark cytoplasm. D: Detail of electron micrograph A, nucleus (N), dark and swollen mitochondria (M), dilated rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (G), Lysosomes (Ly), intact nuclear membrane (arrow). E: Detail of the electron micrograph A, showing the nucleus (N), dilated rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (G), vacuolated mitochondria (M), intact nuclear (arrow) and plasma (open arrow) membranes. F: Detail of electron micrograph B, dilated rough endoplasmic reticulum (RER), few modifications in Golgi complex (G), vacuolated mitochondria (M), preserved nuclear

membrane (arrow). Scale bar: A: 2 μm ; B: 1 μm ; C: 2 μm ; D: 500 nm; E, F: 200 nm;

Figure 10: Electron micrographs of CA1 field submitted to 10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion. A: Pyramidal neuron with heterochromatic nucleus (N) with edematous and vacuolated cytoplasm with scanty organelles (asterisk), glial cell (GC). B: Detail of electron micrograph A, showing the cytoplasm with fragments of rough endoplasmic reticulum (RER) and neurofilaments (Nf) with fuzzy aspect, dark mitochondria (M) and without plasma membrane. C: Two electron lucid nucleus (N) with irregular shapes and bundles of nuclear filaments. D: Detail of electron micrograph C, showing cytoplasm with pleomorphic lysosomes (Ly), scanty dilated rough endoplasmic reticulum (RER), preserved nuclear (arrow) and plasma membranes (open arrow), cytoplasm of other cell with edematous aspect, neurofilaments (Nf) and dark vacuolated mitochondria (M). E: Blood vessel (BV) with diminished lumen, endothelial cell (EC) and high edematous astrocytic end feet (EF) surrounding the capillary (asterisks). F: Neuronal cytoplasm showing some apoptotic bodies (AB), rough endoplasmic reticulum (RER) and polysomes. G: Detail of electron micrograph F showing an apoptotic body (AB) with dense content surrounded by a membrane and with apparently intact mitochondria (M) and rough endoplasmic reticulum (RER). Scale bar: A, B: 1 μm ; C: 2 μm ; D: 500 nm; E: 2 μm ; F, G: 500 nm.

REFERENCES

- Anderson, C.M.; Swanson, R.A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation and physiological functions. *Glia*, 32, 1-14, 2000.
- Arundine, M.; Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34, 325–337, 2003.
- Bicknell, G .R.; Cohen, G.M. Cleavage of DNA to large kilobase pair less severe neuronal damage following transient forebrain fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 40–47, 1995.
- Briones, T.L.; Suh, E.; Jozsa, L.; Hattar, H.; Chai, J.; Wadawska, M. Behaviorally-induced ultrastructural plasticity in the hippocampal region after cerebral ischemia. *Brain Res.*, 997, 137-146, 2004.
- Blomgren, K.; Zhu, C.; Hallin, U.; Hagberg, H. Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 304, 551 – 559, 2003.
- Colbourne, F.; Sutherland, G.R.; Auer, R.N. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J. Neurosci.*, 19 4200–4210, 1999.
- Csordás, A.; Mázló, M.; Gallyas, F. Recovery versus death of “dark” (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol.*, 160, 37-49, 2003.
- Hansson, M.J.; Persson, T.; Friberg, H.; Keep, M.F.; Rees, A.; Wieloch, T.; Elmer, E. Powerful cyclosporin inhibition of calcium-induced permeability transition in brain mitochondria. *Brain Res.*, 960, 99-111, 2003.
- Ginsberg, M. D., Busto, R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20, 1627-42, 1989.
- Ginsberg, M. D. Animals Models of global and focal cerebral isquemia. *Primer on Cerebrovascular Diseases*. K. M. A. Welch, I. R. Caplan, D. J. Reis, B. K. Siesjö and B. Weir. New York, Academic Press, 124-126, 1997.
- Guimarães, C.A.; Linden, R. Programmed cell death – Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.*, 271, 1638-1650, 2004.
- Hou, S.T.; Macmanus, J.P. Molecular mechanisms of cerebral ischemia induced neuronal death. *Int. Rev. Cytol.*, 221, 93-148, 2002.

- Hunter, A. J., Green, A. R., Cross, A. J. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol. Sci*, 16 (4), 123-8, 1995.
- Kagstrom, E.; Smith, M.L.; Siesjo, B.K. Recirculation in the rat brain following complete incomplete ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 3, 183-192, 1983.
- Kettenmann, H.; Ransom, B.R. *Neuroglia*, 2^a ed., Oxford University Press, 2005.
- Kerr, J. F. R.; Gobé, G.C.; Winterford, C.M.; Harmon, B. B. Anatomical methods in cell death. *Cell death*. New York: Academic Press, 1995.
- Levin, S.; Bucci, T.J.; Cohen, S.M.; Fix, A.S.; Hardisty, J.F.; Legrand, E.K.; Maronpot, R.R.; Trump, B.F. The nomenclature of cell death: recommendations of an a hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol. Pathol.*, 27, 484 – 490, 1999.
- Liu, C.L.; Siesjö, B.K.; Hu, B.R. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neurosci.*, 127, 113-123, 2004.
- Liou A.K.F.; Clark,R.S.; Henshall, D.C.; Yin, X.M.; Chen, J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog. Neurobiol.*, 69, 103–142, 2003.
- Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, 79: 1431 – 1568, 1999.
- Lorente de Nó; R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II - Continuation of the study of the Ammonic system. *J Psychol Neurol*, 46: 113-177, 1934.
- Louw, D.F.; Masada, T.; Sutherland, G.R. Ischemic Neuronal Injury is ameliorated by astrocyte activation. *Can. J. Neurol. Sci.*, 25, 102-107, 1998.
- Matute, C.; Alberdi, E.; Ibarretxe, G.; Sánchez-Gómez, M.V. Excitotoxicity in glial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 447, 239-246, 2002.
- Martin, L.J.; Al-Abdulla, N.A.; Brambrink, A.M.; Kirsch, J.R.; Sieber, F.E.; Portera-Cailliau, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.*, 46, 281-309, 1998.
- Mcbean, D.R. Kelly, P.A.T. Rodent models of global cerebral ischemia: A comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen. Pharmac.*, 30, 431-434, 1998.

- 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. *Neuroscience*, 54, 69-92, 1993.
- Nitatori, T.; Sato, N; Waguri, S; Karasawa, Y.; Araki, H.; Shibanaï, K.; Kominami, E.; Uchiyama, Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.*, 15, 1001-1011, 1995.
- Olney, J.W. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164, 719 – 721, 1969.
- 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.*, 119, 128-139, 1993.
- Ouyang, Y.B.; Giffard, R.G. Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-e family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium*, 36 (3-4), 303-311, 2004.
- Paxinos, G. *The rat nervous system*. Ed. Academic Press: 3^a ed. Oval Road, London, 2004.
- Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, 1998.
- Pulsinelli, W. A.; Brierley, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10, 267-272, 1979.
- Pulsinelli, W. A.; Brierley, J.B.; Plum, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* 11, 491- 498, 1982.
- Pulsinelli, W.A.; Levy, D.E.; Duffy, T.E. Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.*, 11, 499-509, 1982a.
- Rami, A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain–calpastatin–caspase hypothesis. *Neurobiol. Dise.*, v 13, 75-88, 2003.
- Reynolds, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-212, 1963.
- Rodrigo, J.; Peinado, M.A.; Sanchez, E.; Pedrosa, J.A.; Bentura, M.L.; Esteban, F.J.; Torres, M.I.; Martínez-Murillo, R. Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica. In: Peinado, M.A.; Rodrigo, J.; Pedrosa, J.A. (ed).

- Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas. Editorial de la Universidad de Jaén, Jaén, Spain, p. 177-201, 1996.
- Rossi, D. J.; Oshima, T.; Attwell, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reverse uptake. *Nature*, 403, 316 – 321, 2000.
- Roy, M.; Sapolsky, R. Neuronal apoptosis in acute necrotic insults. *Trends Neurosci.*, 22, 419-422, 1999.
- Ruan, Y.W.; Ling, G.Y.; Zhang, J.L., Xu, Z.C. Apoptosis in the adult striatum after transient forebrain ischemia and the effects of ischemic severity. *Brain Res.*, 982, 228–240, 2003.
- Ruscher, K.; Freyer, D.; Karsch, M.; Isaev, N.; Megw, D.; Sawitzki, B.; Priller, J.; Dirnagl, U.; Meisel, A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from a *na in vitro* model. *J. Neurosci.*, 22, 10291-10301, 2002.
- Salter, M.W.; Hicks, J.L. ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. *J. Neurosci.*, 14, 1563 – 1575, 1994.
- Schmidt – Kastner, R.; Freund, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neurosci.*, 40, 3, 599-636, 1991.
- Seguela, P.; Wadiche, J.; Dinaley-Miller, K.; Dani, J.A. Patrick, J.W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.*, 13, 596 – 604, 1993.
- Sheldon, R.A.; Hall, J. J.; Noble, L. J.; Ferriero, D.M. Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. *Neurosci. Lett.*, 304, 165-168, 2001.
- Solenski, N. J.; Dipierro, C. G.; Trimmer, P. A.; Kwan, A. L.; Helms, G. A. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke*, 33, 816-824, 2002.
- Tapiero, H.; Mathé, G.; Couvreur, P.; Tew, K.D. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies - II. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother.*, 56, 446 – 457, 2002.
- Taylor, D.; Obrenovitch, T.P.; Symon, L. Cges in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem. Res.*, 21 (9), 1013 – 1021, 1996.
- Viola, G.G. Análise estereológica da região CA1 do hipocampo e do corpo estriado de ratos adultos submetidos à isquemia global transitória. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (PPG Neurociências), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

- Zemke, D. Smith, J.L.; Reeves, M.J.; Majid, A. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology*, 25 (6), 895 – 904, 2004.
- Zeng, Y .S.; Xu, Z.C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia, *Neurosci. Res.*, 37, 113–125, 2000.
- Wei, L.; Ying, D.J.; Cui, L.; Langsdorf, J.; Yu, S.P. Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res.*, 1022, 54-61, 2004.
- Weishaupt, J.H.; Neusch, C.; Bähr, M. Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal death. *Cell Tiss. Res.*, 312, 1-8, 2003.
- Winkelmann, E. R. *Análise ultra-estrutural na morte celular da área CA1 do hipocampo após isquemia cerebral global transitória em ratos Wistar*. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- Winkelmann, E. R., Chrcansky, A., Faccioni-Heuser, M.C., Netto, C.A., Achaval, M. Ultrastructural analysis of the cellular death in the CA1field of the rat hyppocampus after transient forebrain in ischemia following 2, 4 and 10 days of reperfusion. (submitted).
- Wyllie, A.H.; Kerr, J.F.; Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251 – 306, 1980.
- Yu, S.P.; Choi, D.W. Na⁺ - Ca²⁺ exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *Eur. J. Neurosci.*, 9, 1273 – 1281, 1997.
- Yuan, J.; Lipinski, M.; Degtrev, A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron*, 40, 401–413, 2003.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alterações ultra-estruturais leves puderam ser observadas mesmo em tempos precoces de reperfusão.

Tanto a necrose apoptótica, quanto a necrose oncótica clássicas (Lipton, 1999), não foram identificadas nos animais analisados. Entretanto, características de ambos os processos coexistiam na mesma célula. Isso torna possível sugerir que, em situações isquêmicas, poder-se-ia iniciar com necrose apoptótica, no entanto, sendo incapaz de manter o aporte energético, a célula poderia desenvolver necrose oncótica; *parapoptose* (Hou & Macmanus, 2002; Sheldon et al, 2001; Roy & Sapolski, 1999; Martin et al, 1998).

Verificou-se também um predomínio de neurônios oncóticos sobre apoptóticos. Talvez, isso se deva ao fato da necrose apoptótica ser um processo relativamente rápido. Dessa forma, poderia haver morte celular programada no tecido estudado, entretanto, o processo completo não seria visualizado por meio da microscopia eletrônica, devido aos tempos utilizados para obtenção do material.

Assim, pode-se afirmar que a morte celular no campo CA1 do hipocampo de ratos adultos Wistar submetidos à isquemia global transitória é por necrose oncótica e necrose apoptótica, sendo que, em nossos achados há predomínio de necrose oncótica. Assim, acreditamos haver um *continuum* entre necrose apoptótica e oncótica em neurônios submetidos à isquemia e reperfusão (Hou & Macmanus, 2002; Sheldon et al, 2001; Roy & Sapolski, 1999; Martin et al, 1998).

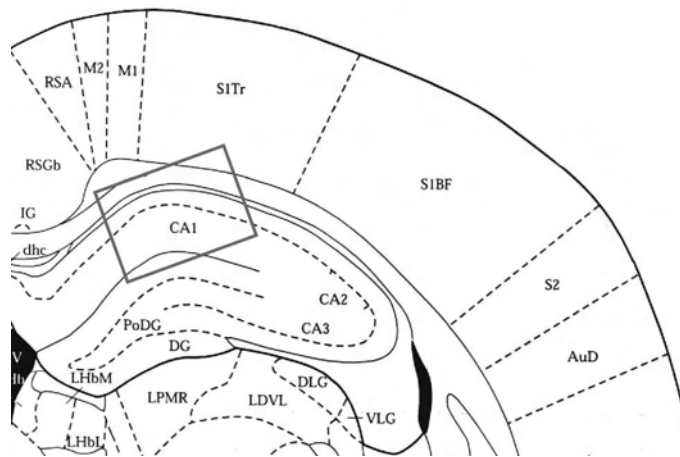
7 PERSPECTIVAS

Uma avaliação mais criteriosa da ultra-estrutura das células gliais, principalmente dos astrócitos, e de seu papel na fisiologia do hipocampo pós-isquêmico é fundamental para o entendimento das alterações celulares nessas situações.

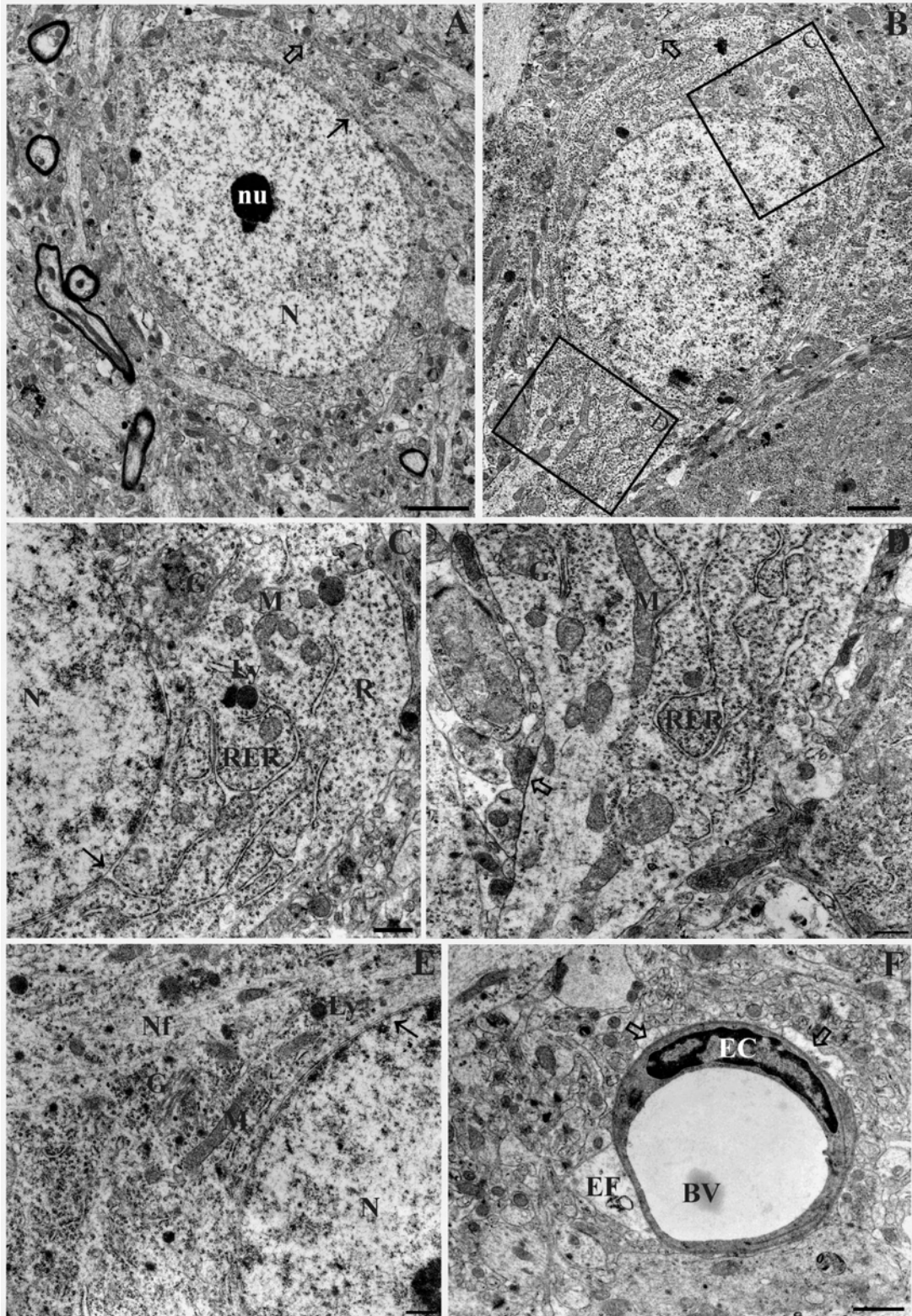
Além disso, a fim de elucidar esse tema, seria fundamental, uma avaliação rigorosa, utilizando conjuntamente, técnicas morfológicas e bioquímicas específicas.

ANEXOS

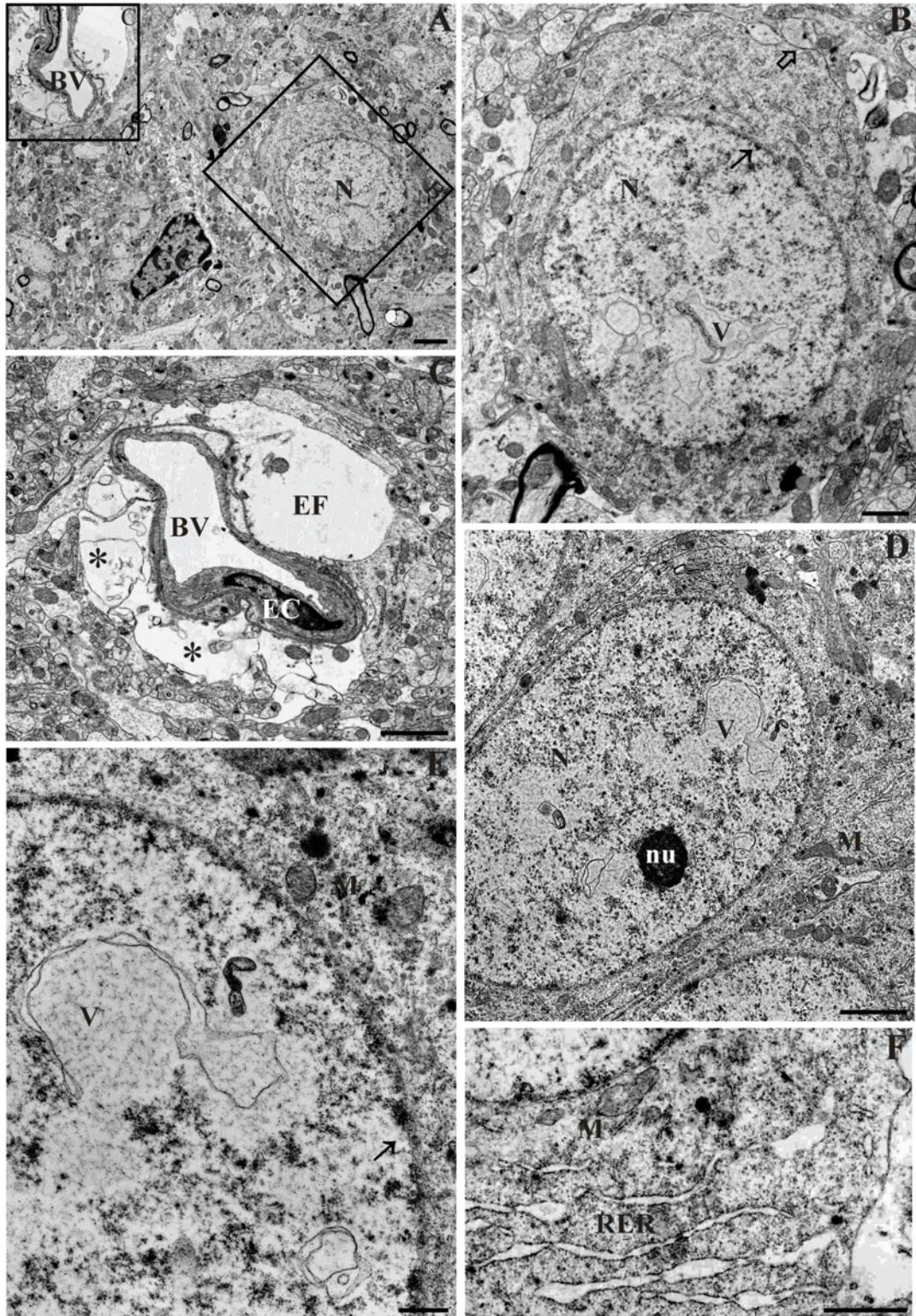
ANEXO 1 - Figure 1 – Schematic representation of the CA1 field rat hippocampus



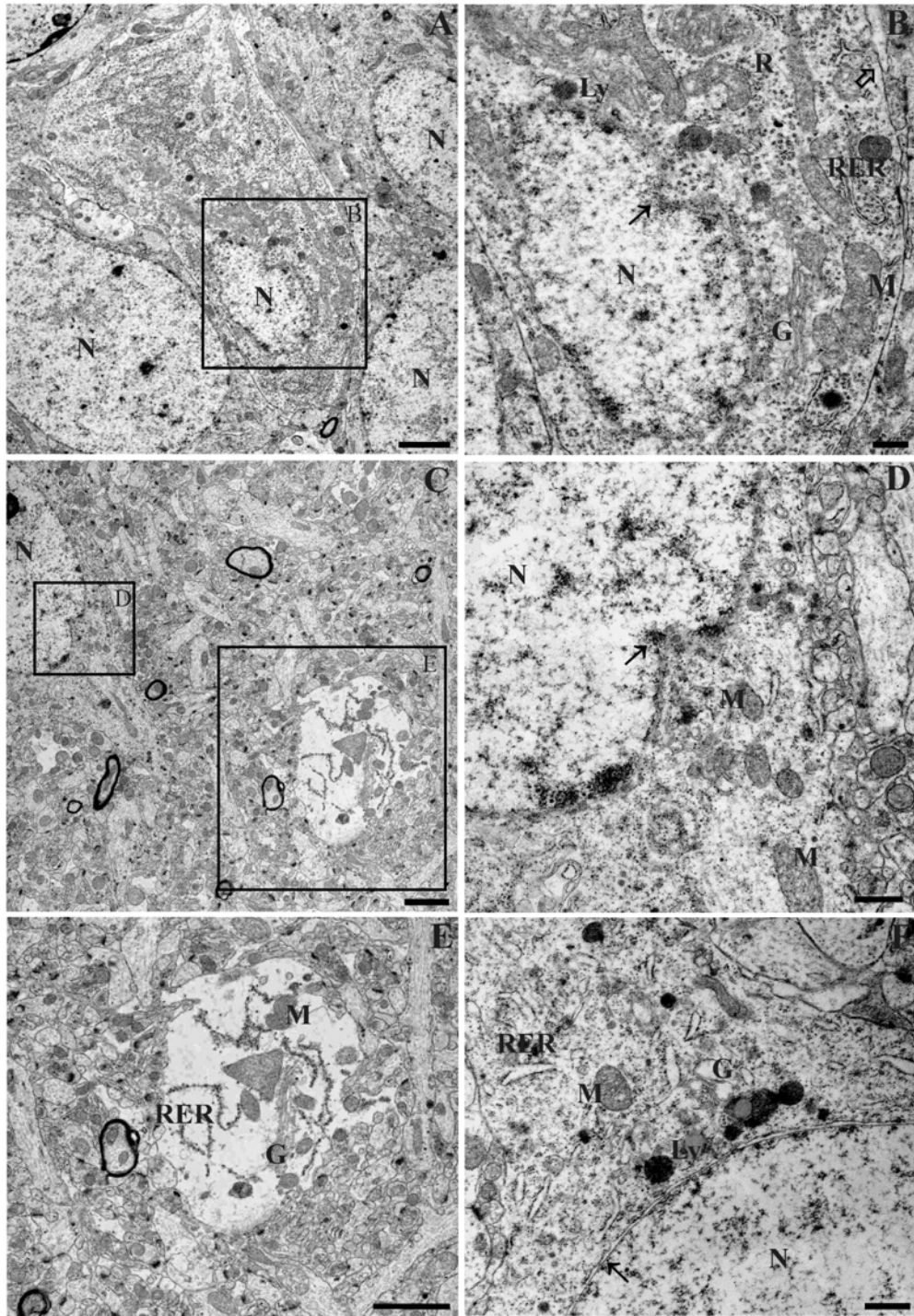
ANEXO 2 - Figure 2 – Control Group



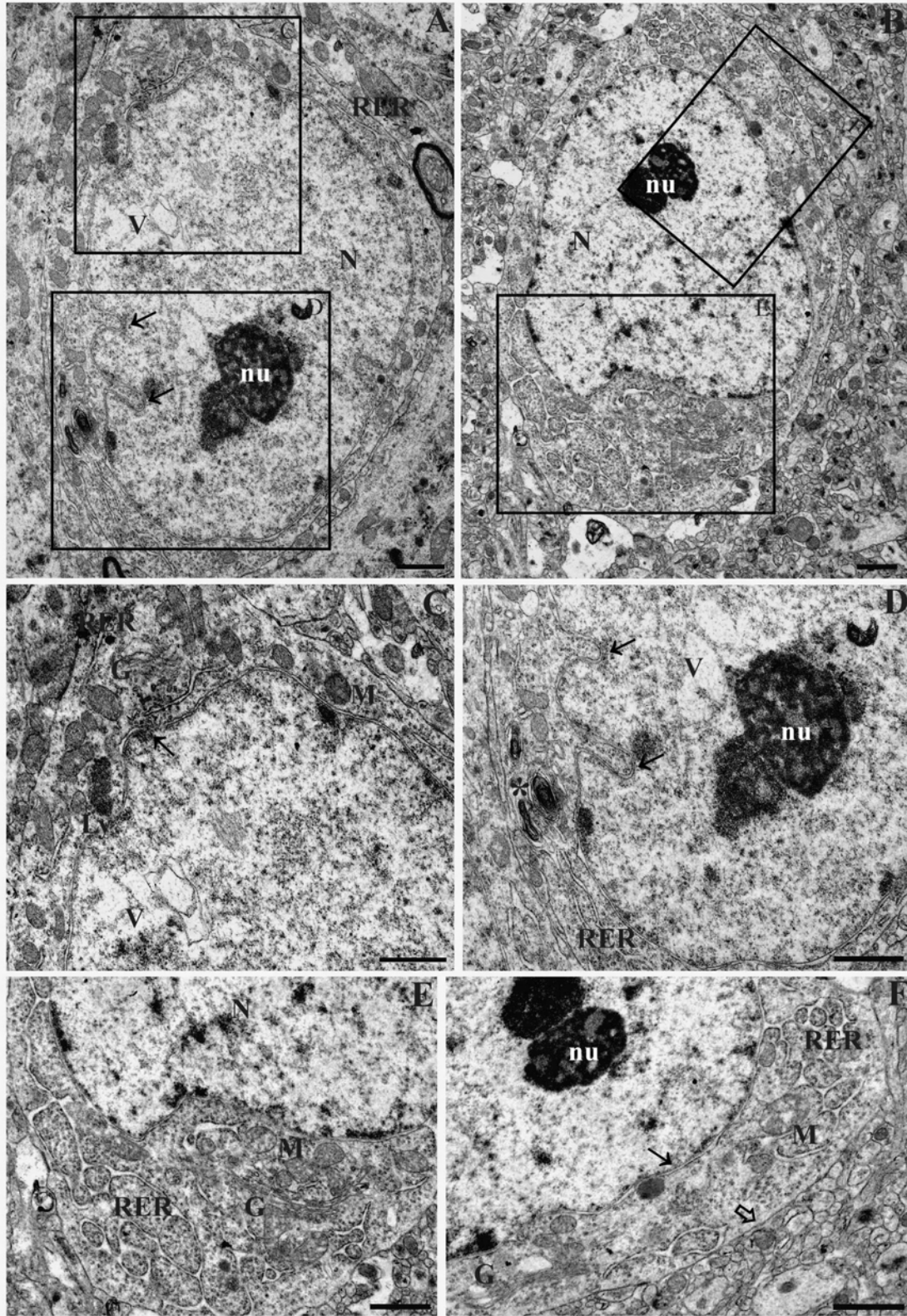
ANEXO 3 - Figure 3 - 10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion



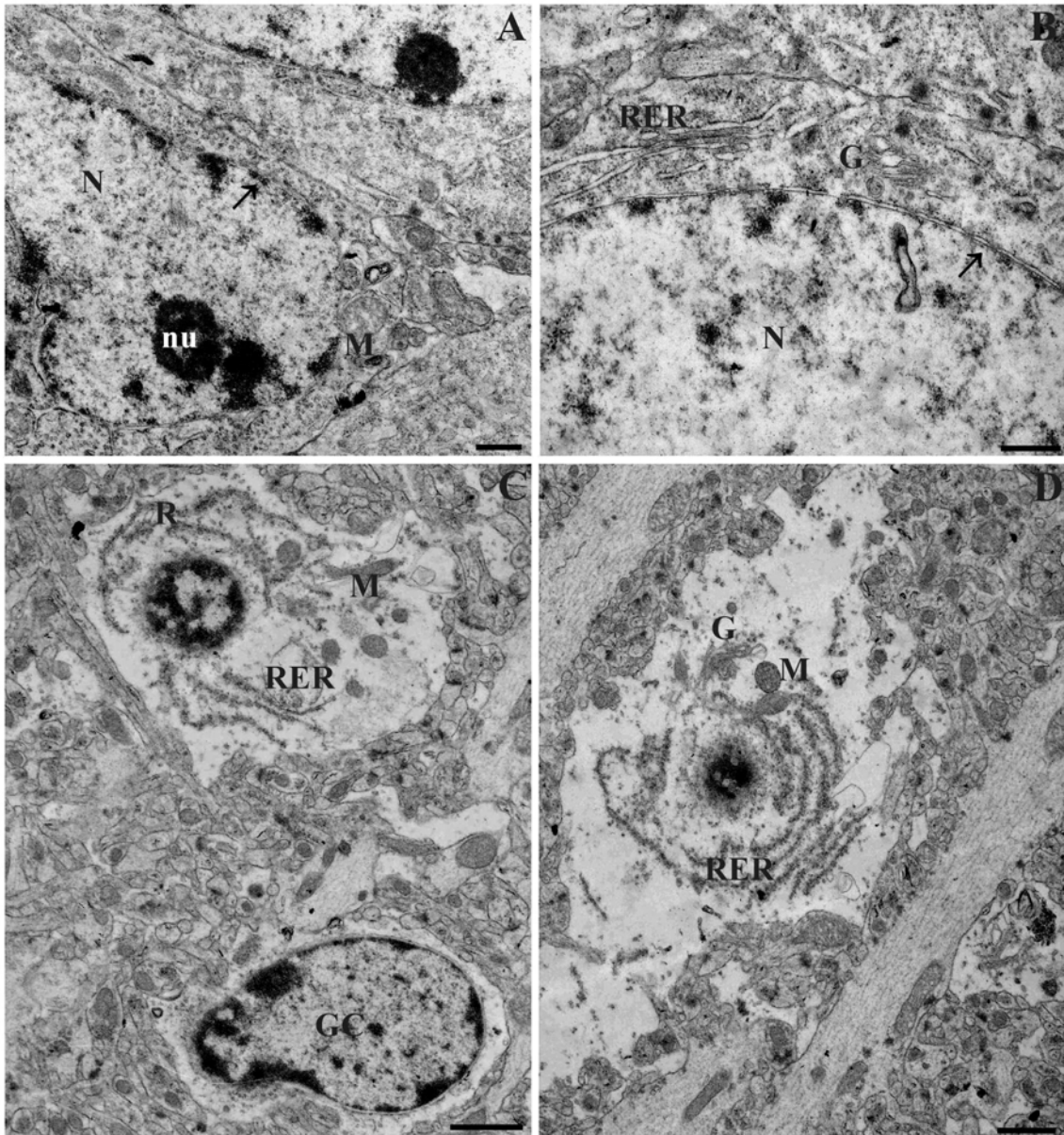
ANEXO 4 - Figure 4 - 10 minutes of ischemia followed by 3 h of reperfusion



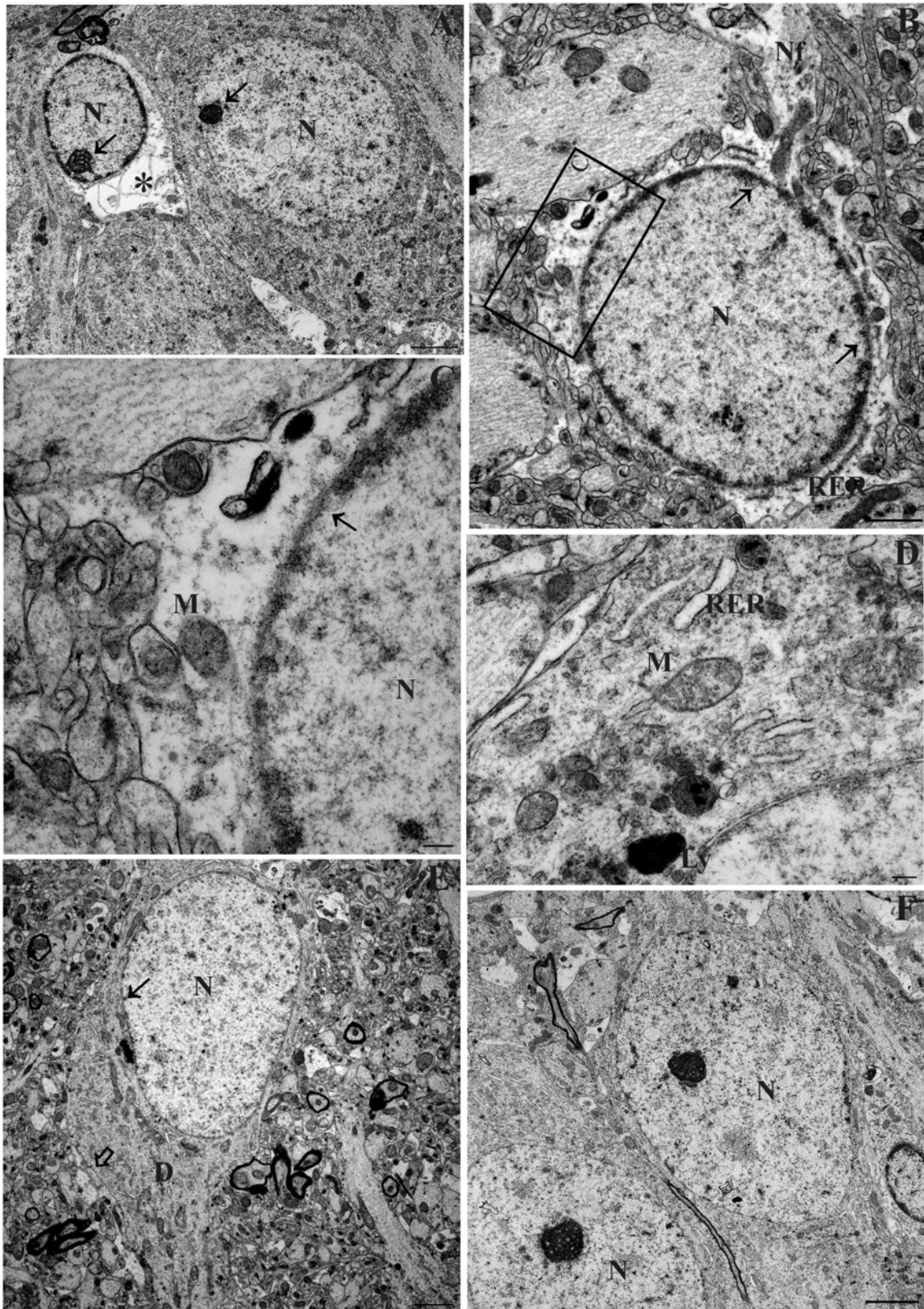
ANEXO 5 - Figure 5 - 10 minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion



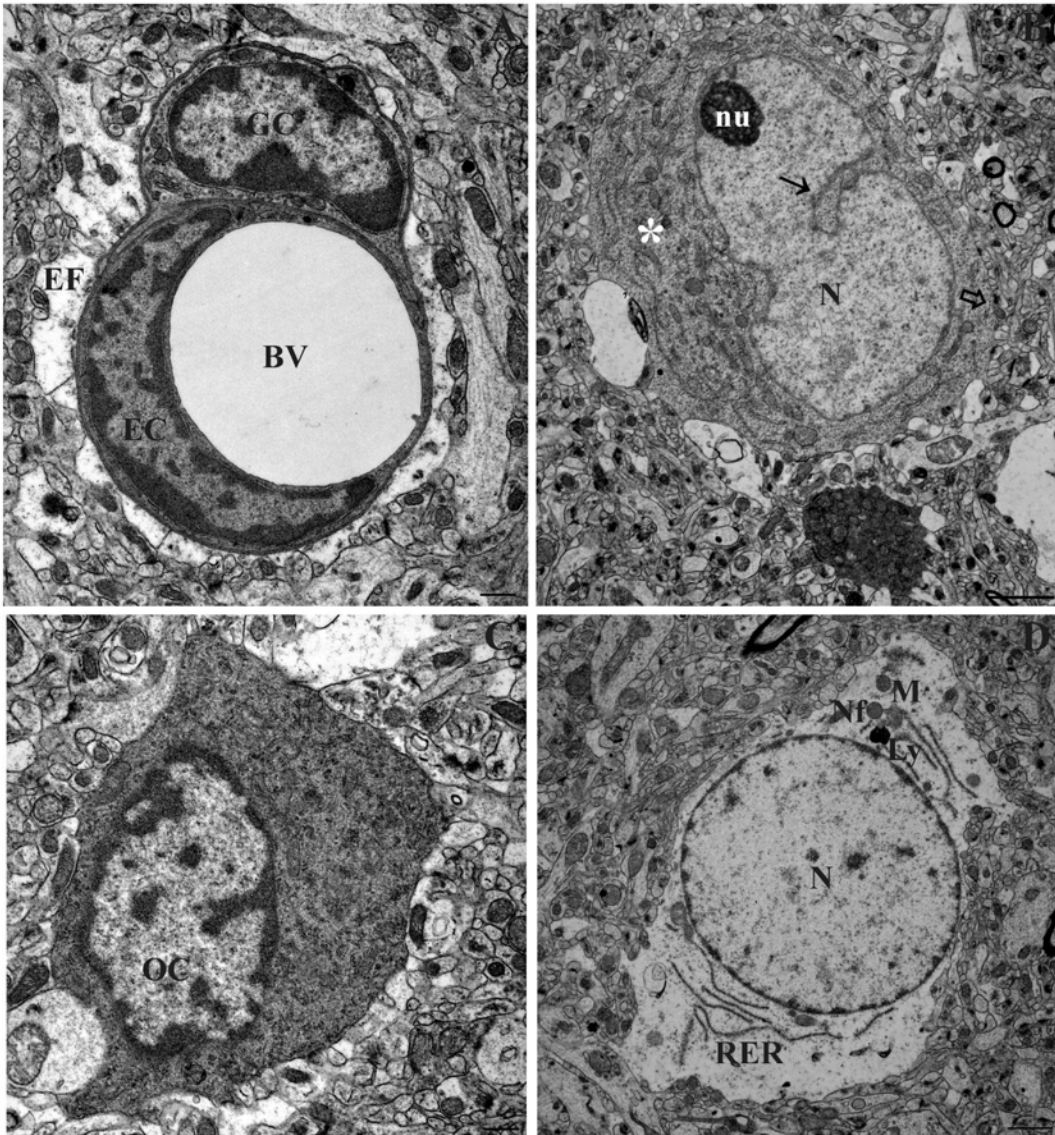
ANEXO 6 - Figure 6 - 10 minutes of ischemia followed by 6 h of reperfusion



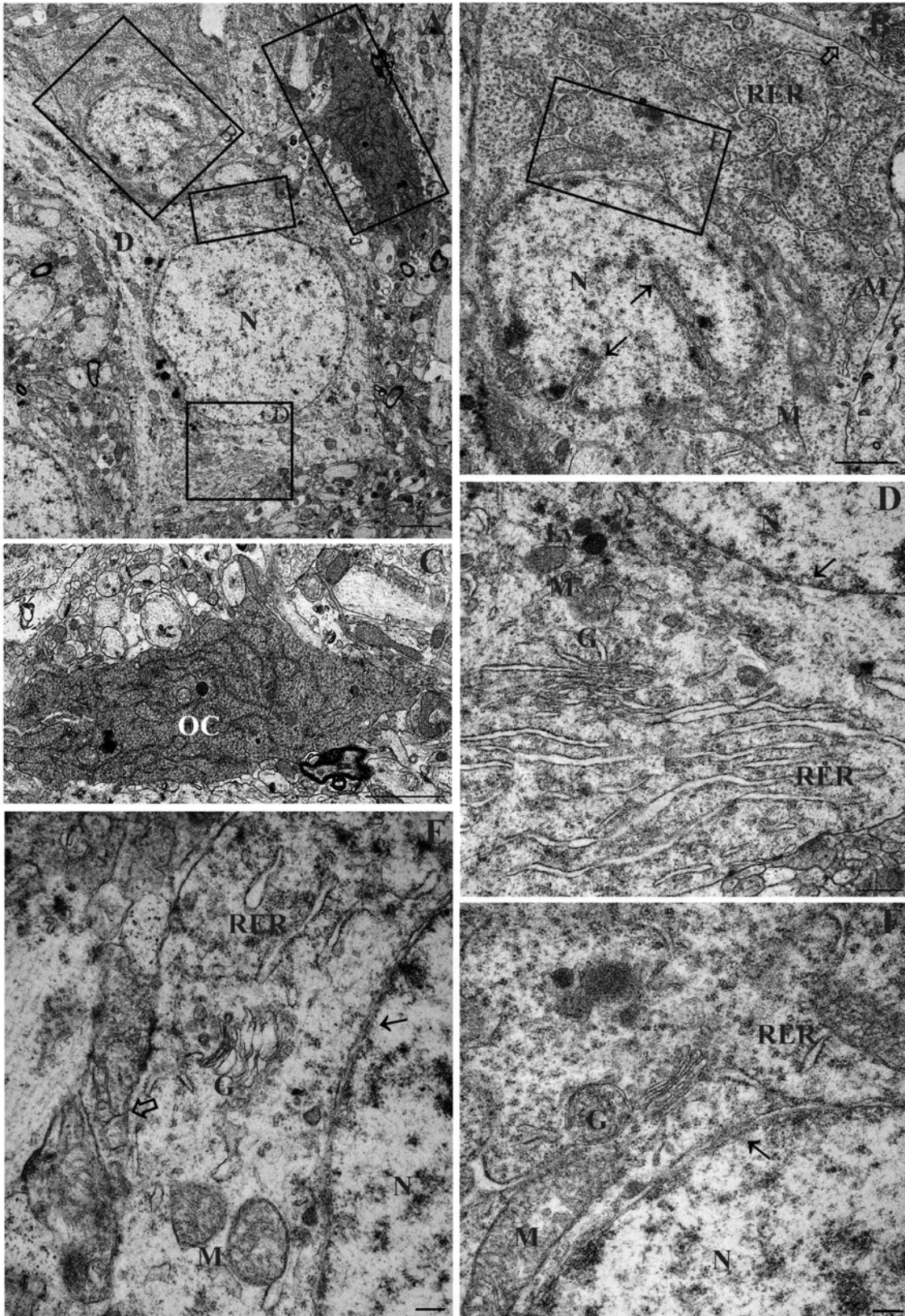
ANEXO 7 - Figure 7 - 10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion



ANEXO 8 - Figure 8 - 10 minutes of ischemia followed by 12 h of reperfusion



ANEXO 9 - Figure 9 - 10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion



ANEXO 10 - Figure 10 - 10 minutes of ischemia followed by 24 h of reperfusion

