

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E ESTEREOLÓGICO EM
UM MODELO DE TOLERÂNCIA INDUZIDA À
ISQUEMIA EM RATOS ADULTOS**

NARA IVANA PEREIRA DOS SANTOS

Orientadores:

**Profa. Dra. Matilde Achaval Elena
Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto**

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.

PORTO ALEGRE

2001

AGRADECIMENTOS

À minha família, e principalmente à Paula, pelo apoio, ajuda e paciência.

Um agradecimento especial para a Prof^a. Matilde, pela competência, dedicação e amizade com que me orientou, e também pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Um agradecimento especial também para o Prof. Alex , pela orientação competente e pelo carinho.

À Nice pela grande ajuda, pelas boas risadas e pela boa música.

Ao Giordano, pela amizade e pela grande ajuda na finalização do trabalho.

Ao Léder, pela ajuda e conhecimento.

Aos bolsistas do grupo de isquemia, que realizaram tantos procedimentos.

Aos colegas e amigos do laboratório: Günther, Cristina F., Cristina M., Karen, Gabriel, Gustavo, Alberto, pelo apoio, carinho, amizade e alegria em todos os momentos.

À todos que, de alguma maneira, participaram da realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Apoio financeiro: PRONEX, FINEP, FAPERGS.

RESUMO

A morte neuronal é uma causa importante de disfunção no sistema nervoso central, que se manifesta comportamentalmente como déficits motores, cognitivos ou de memória. Uma causa importante de morte neuronal é a isquemia que é definida como a falta, ou diminuição, do aporte de sangue para os tecidos (GINSBERG, 1995 a; PULSINELLI, 1997). A região CA1 do hipocampo é a mais vulnerável à isquemia (PULSINELLI *et al.*, 1982; SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997), e está relacionada com a memória tanto em humanos como em animais (SQUIRE, 1992). Vários trabalhos mostram que os animais isquêmicos apresentam pior desempenho em tarefas de aprendizado e memória (GINSBERG, 1997; SQUIRE, 1992; NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997).

Estratégias visando proteger as células contra um dano letal vêm sendo estudadas há vários anos. A tolerância induzida à isquemia é a neuroproteção induzida por uma isquemia transitória breve a um evento isquêmico transitório de longa duração. Em geral, um evento isquêmico breve, de 2 minutos de duração, protege contra a morte celular induzida por uma isquemia grave, de 10-20 minutos de duração, desde que haja um período de 24 horas entre os dois eventos isquêmicos (CHEN & SIMON, 1997; KITAGAWA *et al.*, 1997; BARONE *et al.*, 1998; ROSA NETO, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo reproduzir o fenômeno da tolerância induzida à isquemia em ratos adultos e avaliar o efeito da tolerância induzida sobre o aprendizado e a memória da tarefa no labirinto aquático de Morris e sobre o volume da região CA1 hipocampal, pelo método de Cavalieri, em ratos submetidos à isquemia transitória grave.

Os animais foram submetidos a um estudo do aprendizado da tarefa de localização da plataforma em um labirinto aquático em três fases. O labirinto aquático foi dividido virtualmente em 4 quadrantes com um ponto de largada entre cada um. Na primeira fase, a plataforma foi colocada em um dos quadrantes, onde permaneceu durante os 6 dias de treino., com 4 largadas em cada dia, e um teste no 7º dia sem a plataforma. Na segunda fase foram 4 dias de treino, seguido pelo teste, com a plataforma no quadrante oposto. Na última fase, a plataforma era colocada em um local diferente a cada dia para testar a memória de trabalho. Não foi observado diferença estatisticamente significativa nas latências para encontrar a plataforma entre os grupos controle e isquêmicos em todas as tarefas.

Na análise do volume da região CA1, observamos uma diminuição de 20% nos animais submetidos à isquemia de 10 min., comparado com os dos grupos controle, isquemia de 2 min. e isquemia de 2+10 min. (neuroproteção) ($p < 0.05$).

Estes resultados comportamentais estão de acordo com os encontrados por alguns autores (KIYOTA *et al.*, 1991; GREEN *et al.*, 1992), porém outros autores relatam resultados diferentes (NETTO *et al.*, 1993; IQBAL *et al.*, 2001). As diferenças entre as metodologias utilizadas poderiam explicar parcialmente os resultados divergentes, também podemos supor que, 20% de diminuição de volume não é suficiente para provocar comprometimento do aprendizado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Isquemia	1
1.2 Vulnerabilidade Seletiva	6
1.3 Modelo Animal	7
1.4 Modelo de Isquemia Global	9
1.5 Morte Neuronal Tardia	12
1.6 Apoptose e Necrose	13
1.7 Formação Hipocampal	16
1.8 Tolerância Induzida à Isquemia	18
1.9 Aprendizado e Memória	23
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Isquemia	30
3.2 Estudo Comportamental	32
3.3 Análise Histológica	36
4. RESULTADOS	38
4.1 Estudo Comportamental	38
4.1.1 Fase 1	38
4.1.2 Teste da fase 1	40
4.1.3 Fase 2	43
4.1.4 Teste da fase 2	45
4.1.5 Memória de Trabalho	48
4.2 Análise Morfológica	50
4.3 Análise Estereológica	57
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS E TABELAS:

Figura 1: Desenho esquemático dos efeitos deletérios da isquemia	5
Figura 2: Diagrama esquemático das sub-regiões e estratificação laminar do hipocampo	18
Figura 3: Ilustração resumindo os procedimentos cirúrgicos utilizados para a isquemia global por oclusão de 4 vasos	31
Figura 4: Desenho esquemático do labirinto aquático de Morris	34
Figura 5: Desenho esquemático do sistema de vídeo VHS para filmagem na sala de teste.....	35
Figura 6: Desenho esquemático da planilha de cruces	37
Figura 7: Gráfico da média das latências por dia de treino da fase 1.....	39
Tabela 1: Média das latências e desvio padrão por dia de treino da fase 1....	40
Figura 8: Gráfico da média do número de cruzamentos sobre o local da plataforma por grupo estudado na fase 1	41
Figura 9: Gráfico da média do tempo utilizado no quadrante alvo por grupo estudado na fase 1	42
Figura 10: Gráfico da média das latências por dia de treino na fase 2.....	44
Tabela 2: Média das latências e desvio padrão por dia de treino da fase 2... 44	44
Figura 11: Gráfico da média do número de cruzamentos sobre o local da plataforma por grupo estudado na fase 2	45
Figura 12: Gráfico da média do tempo utilizado no quadrante alvo por grupo estudado na fase 2	46
Figura 13: Desenho esquemático da trajetória de nado de um animal representativo de cada grupo nos testes das fases 1 e 2	47
Figura 14: Gráfico da média das latências de cada largada no teste de memória de trabalho	49
Tabela 3: Média das latências por largada e desvio padrão em cada grupo estudado	49
Figura 15: Fotomicrografia do hipocampo direito de um animal representativo do grupo controle. Aumento: 2x, barra = 100µm	53

Figura 16: Fotomicrografia da região CA1 do hipocampo de um animal representativo do grupo controle. Aumento: 20x, barra =20 μ m	53
Figura 17: Fotomicrografia do hipocampo direito de um animal representativo do grupo isquêmico de 2min.. Aumento: 2x, barra = 100 μ m	54
Figura 18: Fotomicrografia da região CA1 do hipocampo de um animal representativo do grupo isquêmico de 2 min.. Aumento: 20x, barra =20 μ m.	54
Figura 19: Fotomicrografia do hipocampo direito de um animal representativo do grupo isquêmico de 10min.. Aumento: 2x, barra = 100 μ m	55
Figura 20: Fotomicrografia da região CA1 do hipocampo de um animal representativo do grupo isquêmico de 10 min.. Aumento: 20x, barra =20 μ m. .	55
Figura 21: Fotomicrografia do hipocampo direito de um animal representativo do grupo isquêmico de 2+10min.. Aumento: 2x, barra = 100 μ m	56
Figura 22: Fotomicrografia da região CA1 do hipocampo de um animal representativo do grupo isquêmico de 2+10 min.. Aumento: 20x, barra =20 μ m.....	56
Tabela 4: Média dos volumes das regiões CA1 direita e esquerda e desvio padrão.....	57
Figura 23: Gráfico da média dos volumes de CA1 direito e esquerdo por grupo analisado.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 ISQUEMIA

Lesões no sistema nervoso central (SNC), devido ao grande potencial de morbidade e mortalidade, causam sério impacto sócio-econômico, tanto para o paciente e sua família, quanto para a sociedade. Vários são os fatores etiológicos passíveis de causar lesões neurológicas e, entre eles temos as doenças vasculares, traumatismo crânio-encefálico, infecções, doenças hereditárias, e outros. Na maioria das vezes estas lesões deixam seqüelas, como déficits motores, cognitivos ou de memória, dependendo do local atingido e do tamanho da lesão (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; PULSINELLI, 1992).

Os acidentes cerebrovasculares podem ser divididos em duas categorias principais: hemorrágicos ou isquêmicos. Os acidentes isquêmicos são os mais comuns, cerca de 80%, e são definidas como falta ou diminuição do aporte de sangue para os tecidos, e, conseqüentemente, de oxigênio e nutrientes (McCULLOUGH *et al.*, 2001; SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; PULSINELLI, 1992).

As seqüelas surgem em decorrência da morte neuronal, e a gravidade da lesão é decorrente do grau e do tempo de duração da isquemia (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; PULSINELLI, 1992).

A isquemia pode ser classificada temporalmente em transitória ou perene e, topograficamente, em global, focal ou multifocal (tromboembólico). No que se refere ao grau de redução do fluxo sanguíneo, os modelos podem ser totais ou parciais (GINSBERG & BUSTO, 1989; HUNTER *et al.*, 1995; GINSBERG, 1997).

Os modelos de isquemia transitória são aqueles que apresentam um período de reperfusão, ou seja, aqueles em que o sangue torna a fluir no leito vascular. Nas isquemias perenes, por outro lado, o que leva ao estabelecimento de uma lesão do tipo infarto com pan-necrose (FAROOQUI *et al.*, 1995). O infarto cerebral, caracterizado pela morte de células neuronais e gliais, aparece cerca de 1 hora após o insulto isquêmico (PULSINELLI, 1992).

Em 1827, Stokes e Adams foram os primeiros a descrever clinicamente a interferência aguda da circulação na atividade cerebral. Estes autores descreveram uma série de pacientes com doenças cardíacas e vasculares, que apresentavam episódios de perda súbita de consciência. Esta síndrome é conhecida, atualmente, como Stokes-Adams. Segundo Dixon, observações clínicas realizadas, já em 1823, por León Rostan, apontaram a falta de aporte sangüíneo como causa de desorganização do tecido cerebral e causando problemas de memória (DIXON, 1965).

A vulnerabilidade de determinados grupos de neurônios no cérebro, cerebelo e núcleos da base a episódios isquêmicos foi determinada ainda nos anos 20 e 30. Spielmeier (1927) sugeriu que a vulnerabilidade seletiva ocorria em áreas pouco vascularizadas (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

O consumo de glicose pelo sistema nervoso central foi sugerido por Hirschberg e Winterstein (1917) em modelos utilizando preparações de medula espinhal de rãs. Em 1924, Winterstein observou, neste mesmo modelo, a produção de ácido láctico na ausência de oxigênio. Em 1951, Himwich demonstrou o consumo contínuo de oxigênio e glicose pelo SNC, pela aferição dos níveis arterial e venoso (DIXON, 1965).

Uma vez determinado que o metabolismo do SNC depende do constante aporte de oxigênio (O₂) e glicose, postulou-se, nos anos 40, que a morte das células

nervosas ocorria simplesmente por “falência energética” (KOGURE & KATO, 1993). De fato, o tecido cerebral possui apenas uma pequena reserva de energia e uma alta taxa metabólica sendo, assim, muito sensível à hipóxia-isquemia. Este pequeno estoque de energia é rapidamente consumido quando o aporte sistêmico falha, desencadeando uma série de alterações metabólicas que levam à morte celular (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; DUGAN & CHOI, 1999; INOUE *et al.*, 1992).

Durante a isquemia e a reperfusão ocorre uma liberação maciça de aminoácidos excitatórios, em especial de glutamato, uma sobrecarga intracelular de cálcio e um aumento de radicais livres, que marcam a fase denominada fase excitotóxica (BLOCK, 1999). O conceito de excitotoxicidade foi elaborado a partir de três evidências provindas de modelos experimentais de isquemia. A primeira delas foi a constatação de que há um aumento dos níveis extracelulares de glutamato durante a isquemia. A segunda, refere-se ao aumento da frequência de disparos que as células da região CA1 do hipocampo apresentam de 7-10 horas após a isquemia. E a terceira, consiste no fato que o bloqueio dos receptores N- metil-d-aspartato (NMDA) inibe os fenômenos decorrentes da descarga glutamatérgica (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Receptores metabotrópicos glutamatérgicos tipo 1 (mGlu1) parecem exercer um papel importante na morte celular pós-isquêmica, uma vez que a administração de antagonistas específicos destes receptores atenuam o dano neuronal induzido pela isquemia (PELLEGRINI-GIAMPIETRO *et al.*, 1999).

Imediatamente após a isquemia, uma descarga de glutamato provoca o influxo e liberação intracelular maciça de íons potencialmente letais para as células quando em grande quantidade, particularmente o sódio (Na^+) e o cálcio (Ca^{++}). O aumento sustentado do Ca^{++} intracelular (Ca^{++}_i) inicia uma "cascata tóxica" capaz de matar a

célula. Esta toxicidade pode ser exacerbada pela diminuição dos estoques de energia intracelular (DUGAN & CHOI, 1999). O glutamato causa o aumento de Ca^{++}_i por ativação dos canais de Ca^{++} associados aos receptores NMDA, e pela abertura dos canais de Ca^{++} voltagem-dependentes, via receptores para- α -amino-3hidroxil-5metilisoaxanol-propionato (AMPA). A ativação dos receptores metabotrópicos, ligados à hidrólise dos fosfoinosítídeos de membrana, aumenta os níveis citosólicos de Ca^{++} pela liberação das reservas intracelulares (FAROOQUI *et al.*, 1995).

Eimerl e Schramm (1994) observaram que a concentração de cálcio necessária para causar morte celular varia de acordo com a idade do tecido e que células mais jovens são mais tolerantes ao aumento na concentração de Ca^{++} intracelular.

A mitocôndria é um dos responsáveis pelo tamponamento do Ca^{++} intracelular. Contudo, o acúmulo anormal de Ca^{++}_i apresenta grande potencial deletério para a mitocôndria. Após a isquemia, nos primeiros 10 minutos de reperfusão, foi observado o maior aumento do conteúdo de Ca^{++} dentro da mitocôndria (ZAIDAN & SIMS, 1994), e edema com desintegração das cristas (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Zaidan e Sims (1994) observaram, também, uma segunda elevação do cálcio dentro da mitocôndria em um período mais tardio da reperfusão, de 6 a 24 horas, e este aumento está relacionado mais com a suscetibilidade regional ao dano isquêmico. Sims (1991) detectou um comprometimento generalizado da função mitocondrial após 24 horas de reperfusão.

Uma consequência especialmente importante da sobrecarga de cálcio é a formação de radicais livres de oxigênio, como o radical hidroxila (NAKASHIMA *et al.*, 1999). A ativação dos receptores NMDA desencadeia a produção Ca^{++} -dependente de radicais livres pela mitocôndria, que parece ser a principal fonte de radicais livres no

tecido cerebral sujeito à reperfusão pós-isquêmica. Concentrações elevadas de Ca^{++} e Na^+ , em consequência da falência de energia e da excitotoxicidade do glutamato, podem inibir o complexo 1 e causar a superprodução do ânion superóxido, culminando em um estresse oxidativo que inibe os componentes respiratórios mitocondriais, promovendo dano ao citoesqueleto e à membrana plasmática (DUGAN & CHOI, 1999).

A figura 1 resume os efeitos de um evento isquêmico.

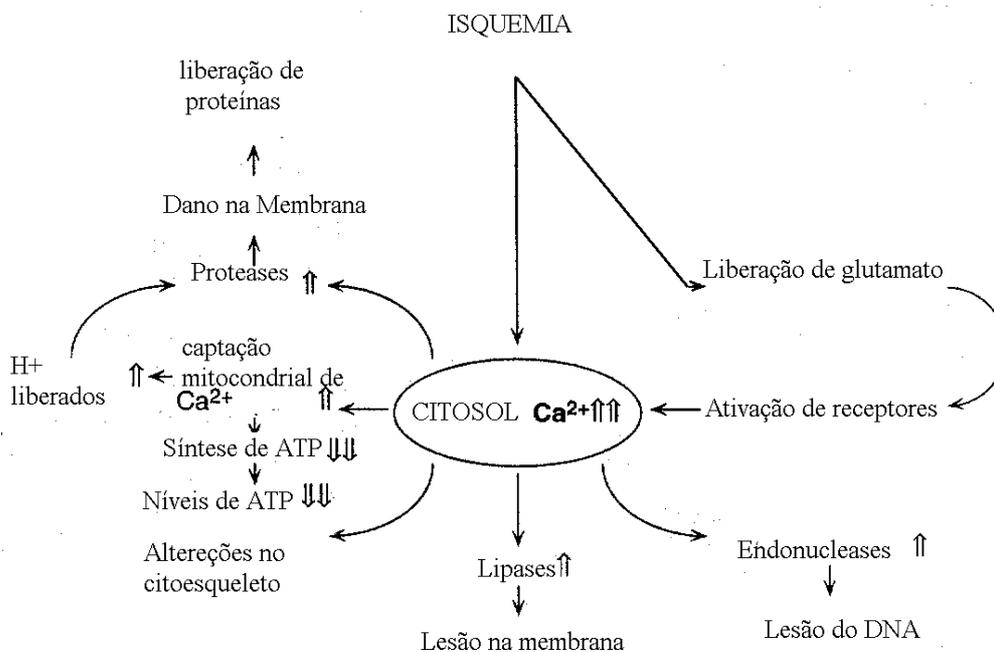


Figura 1. Efeitos deletérios da isquemia causando aumento secundário do Ca^{++} citossólico. O Ca^{++} ativa as proteases, lipases e endonucleases. A mitocôndria e o citoesqueleto sofrem modificações em sua estrutura (Erecinska & Silver, 1997).

1.2 VULNERABILIDADE SELETIVA

Vários pesquisadores têm demonstrado que a suscetibilidade do sistema nervoso central à isquemia não é homogênea. Os neurônios diferem em sua sensibilidade ao dano isquêmico e em sua capacidade de recuperação após a isquemia. Se o período de obstrução do aporte sanguíneo ao tecido nervoso for relativamente breve, regiões distintas do SNC apresentarão maior dano que outras. (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; DIXON, 1965). Algumas áreas apresentam maior vulnerabilidade, particularmente a região CA1 do hipocampo, onde se observa morte de quase todos os neurônios após uma breve interrupção do fluxo sanguíneo cerebral (PULSINELLI *et al.*, 1982; SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997).

Depois das células piramidais da região CA1 do hipocampo, as células mais sensíveis à isquemia são os neurônios da 3ª e 5ª camadas corticais, estriado, septo, CA3, tálamo-óptico, corpo geniculado medial e substância nigra sucessivamente (KOGURE & KATO, 1993; SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Em contraste, outros grupos de neurônios, como as células granulares do giro denteado e os astrócitos, possuem uma grande resistência ao insulto isquêmico (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Este fenômeno é multifatorial e ocorre pela convergência das propriedades bioquímicas de alguns grupos celulares, da severidade da isquemia e da região anatômica na qual estas células se encontram (PULSINELLI, 1997).

MacEwen (1994), sugeriu, em seu estudo, que a vulnerabilidade do hipocampo a eventos estressantes é devido à sua plasticidade. Ele observou que, enquanto os aminoácidos excitatórios estão envolvidos com a LTP (potencialização de

longa duração) e aprendizado, e agem sinergisticamente com os hormônios esteróides para regular diversas formas de plasticidade, tal como a sinaptogênese, tal interação entre estes agentes é capaz, também, de causar lesão hipocampal. A vulnerabilidade do hipocampo é aumentada quando altos níveis de glicocorticóides estão presentes, e outros hormônios, como estrógenos e hormônios da tireóide, também afetam a sensibilidade e a vulnerabilidade do hipocampo durante o desenvolvimento, ou na vida adulta (SLOVITER *et al.*, 1989; McEWEN & SAPOLSKY, 1995).

Em suma, o hipocampo é o sítio de predileção à lesão isquêmica caracterizando a vulnerabilidade seletiva. A região CA1 é sabidamente a mais sensível, enquanto os neurônios da região vizinha CA3 e do giro denteado são amplamente resistentes. Este fato cria uma situação completamente favorável para o estudo da seletividade em uma pequena área do SNC (SCHIMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

1.3 MODELO ANIMAL

Para o estudo sistemático da patofisiologia da isquemia cerebral é necessário que os efeitos da isquemia sejam controlados e reprodutíveis *in vivo*. Por isso utiliza-se modelos de isquemia em animais que podem ser mantidos em laboratório. Muitos são os animais usados nesta linha de pesquisa. Entre os mamíferos são utilizados o gato, cachorro, macaco e roedores tais como o rato albino, o gerbilo e o camundongo (GINSBERG, 1996).

Apesar da ampla gama de espécies animais que podem servir para o propósito de estudar os efeitos de um evento isquêmico, os roedores têm tido a preferência na grande maioria dos centros de pesquisa por uma série de razões: 1º) baixo custo para

manutenção em biotério e, por ser de pequeno porte, baixas doses de drogas, soluções ou reagentes são necessárias; 2º) relativa homogeneidade dentro das linhagens; 3º) semelhança em sua neuroanatomia e em sua vascularização cerebral, e alto grau de homologia genética com os mamíferos superiores; 4º) maior aceitabilidade na perspectiva ética e ecológica.

Mas este paradigma é válido? Muitos críticos argumentam que o modelo animal não é suficiente para simular a complexidade das lesões isquêmicas de humanos, no tocante à variabilidade, tamanho e locais das lesões, predisposições genéticas, aterosclerose multifocal, fatores de risco, etc. Porém, não podemos deixar de levar em consideração que, muito do nosso conhecimento atual sobre metabolismo energético, utilização de oxigênio e substratos, efeitos de anestésicos, atividade cerebral, estados patológicos, tais como epilepsia, hipóxia e isquemia, são derivados de estudos com roedores (GINSBERG, 1996).

Grotta (1996), também considerou o modelo animal como uma importante ferramenta na pesquisa de terapias trombolíticas e na determinação da "janela terapêutica" (tempo no qual se obtém os melhores resultados com a estratégia terapêutica) em acidentes vasculares cerebrais (AVC).

Apesar da grande contribuição dos modelos animais para o nosso conhecimento sobre os processos patofisiológicos e estratégias terapêuticas em lesões do SNC, os estudos experimentais devem ser conduzidos sob um objetivo crítico e rigorosa monitoração fisiológica, apropriada análise histológica e métodos bioestatísticos a fim de otimizar a interpretação dos dados obtidos. Respeitando estes princípios, os modelos experimentais com roedores continuarão a nos proporcionar valiosas informações acerca das lesões cerebrais (GINSBERG, 1996).

1.4 MODELO DE ISQUEMIA GLOBAL COM OCLUSÃO DE 4 VASOS

Vários modelos de isquemia vêm sendo utilizados pelos pesquisadores. Kirino (1982) utilizou um modelo de oclusão de 2 vasos em gerbilos para ocasionar isquemia global. Este modelo é perfeitamente viável nestes roedores, pois os gerbilos não apresentam conexão entre os sistemas arteriais basilar e carotídeo. Portanto a isquemia pode ser facilmente conseguida com a oclusão das artérias carótidas comuns (KATOH *et al.*, 1992).

Smith e col. (1984), utilizaram o modelo de oclusão de 2 vasos com hipotensão em ratos. Outros menos utilizados são a compressão dos vasos cardíacos causando uma parada cardíaca, ou aumentar a pressão intracraniana para diminuir o fluxo de sangue no encéfalo (BLOCK, 1999).

O modelo de isquemia global com oclusão de 4 vasos foi desenvolvido para o uso em ratos Wistar por Pulsinelli e Brierley em 1979. Primeiramente, são cauterizadas as artérias vertebrais, e subseqüentemente, é acoplado um laço contrátil de sílex em ambas as artérias carótidas comuns. Vinte e quatro horas após este procedimento, obtém-se a isquemia pela tração do laço previamente acoplado às artérias carótidas. Na fase de isquemia o animal não é anestesiado, estando vigíl durante o procedimento.

Do ponto de vista hemodinâmico, este modelo impõe uma redução global do fluxo de sangue ao prosencéfalo chegando a menos de 3% no neocórtex, 3-7% no hipocampo e 10-15% no cerebelo. Em contrapartida, 25-30% do fluxo é mantido no tronco cerebral garantindo a manutenção das funções vitais (GINSBERG & BUSTO, 1989). No início da reperfusão, há um período inicial de hiperemia seguido de

oligúemia com duração de aproximadamente 1 hora no hipocampo e estriado, chegando até 6 horas no neocórtex parietal (PULSINELLI *et al.*, 1982).

Em modelos de oclusão de 4 vasos, registros eletrocorticográficos (ECoG) na região CA1 do hipocampo, de animais em vigília, revelaram que, imediatamente após a oclusão das carótidas, ocorre a atenuação difusa dos ritmos de base. Entre 15 a 25 segundos de isquemia as células deixam de exibir atividade espontânea. Após 1 minuto não apresentam mais potenciais evocados. Em torno de 2-3 minutos após o início da isquemia global os registros do ECoG assumem um padrão isoelétrico. Este padrão persiste até que seja desfeita a oclusão carotídea, e retorne o fluxo sanguíneo (PULSINELLI & BRIERLEY, 1979; BUZSAKI *et al.*, 1989).

A despolarização irreversível dos neurônios durante uma isquemia é chamada de despolarização anóxica e ocorre precocemente na região CA1 (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

A atividade elétrica espontânea só é retomada aos 17 a 20 minutos de reperfusão, quando os níveis basais de Ca^{++} , K^+ , glutamato e aspartato estiverem restabelecidos (DIEMER *et al.*, 1987). Entretanto, a atividade elétrica permanece com amplitude e frequência anormais até cerca de 12 horas de reperfusão de uma isquemia letal (BUZSAKI *et al.*, 1989). Em CA1, os registros intracelulares e extracelulares mostram um aumento dos disparos espontâneos e redução da amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos no período entre 12 e 36 horas de reperfusão (KIRINO *et al.*, 1992; GAO & XU, 1996). Após o quarto dia não há registro de qualquer atividade elétrica em CA1 (BUZSAKI *et al.*, 1989).

Uma isquemia de 10-20 minutos provoca alterações patológicas nas zonas vulneráveis do hipocampo com o tempo de reperfusão de 48 horas, enquanto que no estriado são necessários 20-30 minutos de isquemia para ocorrer alterações semelhantes (PULSINELLI *et al.*, 1982).

Nos modelos de isquemia global, foram descritas alterações na barreira hemato-encefálica associadas ao edema vasogênico no hipocampo durante as primeiras horas de reperfusão, utilizando técnicas imuno-histoquímicas para proteínas séricas e marcadores intravasculares (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). A quebra da barreira hemato-encefálica ocorre somente após 15 minutos de isquemia global (NAGAHIRO *et al.*, 1994).

O exame histológico realizado neste modelo, com tempos de isquemia de 10-20 minutos, revela lesão seletiva nos neurônios hipocâmpais (PULSINELLI *et al.*, 1982), devido ao fenômeno denominado vulnerabilidade seletiva. As células piramidais do setor CA1 do hipocampo são as células mais vulneráveis em ratos e outros mamíferos, no entanto, foi observado em gerbilos que alguns interneurônios hipocâmpais apresentam-se igualmente vulneráveis (MATSUYAMA *et al.*, 1993; SUGIMOTO *et al.*, 1993). Apesar de variações interespecies, as alterações histológicas que caracterizam a morte celular só podem ser observadas após um período mínimo de reperfusão de 48 horas. Este fenômeno foi relatado inicialmente em gerbilos por Ito (1975) que o chamou de “fenômeno de maturação”, sendo mais tarde designado como “morte neuronal tardia” (KIRINO, 1982; PULSINELLI *et al.*, 1982). Animais com longos períodos de reperfusão preservam os terminais pré-sinápticos enquanto ocorre atrofia progressiva da região CA1 (KIRINO *et al.*, 1990).

1.5 MORTE NEURONAL TARDIA

Os fenômenos de seletividade e morte neuronal tardia observados no modelo de oclusão dos quatro vasos em ratos ocorre no hipocampo.

A microscopia óptica revela quatro fases de alterações patológicas na isquemia experimental. Inicialmente, ocorre a fase de (i) microvacuolização seguida pelas fases de (ii) mudança celular isquêmica, (iii) mudança celular isquêmica com incrustações, (iv) mudança celular homogenizadora, finalizando com o desaparecimento do neurônio (KIRINO, 1982; PULSINELLI, 1997).

Às 24 horas de reperfusão de uma isquemia letal são descritos, em CA1, neurônios com corpos celulares edemaciados e cromatina levemente grumosa (fase de microvacuolização). Após um período de reperfusão de 48 horas estas células começam a apresentar fendas citoplasmáticas, com a cromatina apresentando grumos mais evidentes (fase de mudança celular isquêmica). No 4º dia de reperfusão, as células piramidais perdem sua integridade, ocorrendo infiltração de células fagocitárias (mudança celular isquêmica com incrustações). Após 7 dias de reperfusão, ocorre fragmentação progressiva dos neurônios seguidas de proliferação glial (mudança celular homogenizadora e desaparecimento do neurônio) (KIRINO, 1982; PULSINELLI, 1997).

A análise ultraestrutural dos neurônios hipocampais, após a isquemia global de 10 minutos, revela condensação da cromatina em todas as células submetidas à isquemia (DIEMER *et al.*, 1987). Aos 15 minutos de reperfusão ocorre a agregação das vesículas sinápticas na região pré-sináptica (KIRINO, 1982) e desagregação dos

ribossomas (MUNEKATA & HOSSMANN, 1987). Aos 90 minutos de reperfusão ocorre uma redução das cisternas do aparato de Golgi (RAFOLS *et al.*, 1995).

A análise com microscopia eletrônica revela, às 24 horas de reperfusão, um discreto edema dos prolongamentos dos astrócitos e alterações no retículo endoplasmático, que se apresenta com cisternas aglomeradas (DESHPANDE *et al.*, 1992). Às 48 horas de reperfusão, são encontrados material eletro-denso no citoplasma, fragmentação dos vacúolos do retículo endoplasmático e desorganização do citoesqueleto. Ainda às 48 horas, é descrito edema e aumento da quantidade de glicogênio nos prolongamentos astrocitários. Este aumento de volume dos astrócitos comprime os neurônios adjacentes. Isto é observado também à microscopia óptica como impressões citoplasmáticas dos neurônios (KIRINO *et al.*, 1990; DESHPANDE *et al.*, 1992; RAFOLS *et al.*, 1995). Às 72 horas de reperfusão o núcleo apresenta ruptura de membranas e as mitocôndrias encontram-se gravemente alteradas (DESHPANDE *et al.*, 1992).

1.6 APOPTOSE E NECROSE

A morte celular no sistema nervoso pode ser desencadeada através de uma série de mecanismos, com a participação ativa ou passiva das células (CHARRIAUT-MARLANGUE, *et al.*, 1998). A morte celular fisiológica, ou morte programada, é um processo natural que desempenha um importante papel no crescimento e na diferenciação de órgãos e sistemas de vertebrados e invertebrados. Citando como exemplo o próprio sistema nervoso, cerca de 50% das células nervosas constantes ao nascimento morrem naturalmente durante o desenvolvimento. Outra forma de morte

celular é a patológica que resulta de lesões por hipóxia-isquemia, agentes tóxicos ou térmicos (MARTIN *et al.*, 1998).

Apoptose é uma morte celular programada e, como tal, é mediada por mecanismos intrínsecos que possuem contudo, uma modulação exógena. Em contraste, a morte celular patológica, designada como necrose, é o resultado de mecanismos extrínsecos que causam uma abrupta perturbação das condições fisiológicas (MARTIN *et al.*, 1998).

A natureza da morte celular tardia é motivo de discussão, uma vez que ela não segue os padrões morfológicos clássicos de necrose ou apoptose. A morte neuronal tardia não apresenta as mesmas alterações características encontradas na apoptose, uma vez que até o momento não foram descritas contração nuclear (picnose) e condensação da cromatina (DESHPANDE *et al.*, 1992; NITATORI *et al.*, 1995). Muitos autores apresentam evidências de que a morte neuronal tardia possui “natureza apoptótica” através da análise da marcação da atividade lisossomal, da atividade das endonucleases, da presença de vacúolos autofágicos e da marcação do padrão da quebra do DNA (HERON *et al.*, 1993; KIHARA *et al.*, 1994; VOLPE *et al.*, 1995).

A morte celular aguda ocorre por necrose, e, além dos neurônios, inclui a glia e células endoteliais, e é designada como área de infarto (NAKANO *et al.*, 1990). A área circunjacente possui células viáveis, que podem retomar seu metabolismo normal se o fluxo de sangue for prontamente restaurado, sendo ela chamada de área de penumbra (PULSINELLI, 1992).

Em modelos de isquemia focal, a apoptose tem sido descrita na zona de penumbra, enquanto a necrose predomina no centro isquêmico (FERRER *et al.*, 1995). Drogas inibidoras da síntese protéica, como a anisomicina e a cicloheximida foram

usadas na isquemia global com o intuito de inibir a apoptose (SHIGENO *et al.*, 1990). Tanto a anisomicina quanto a cicloheximida injetadas no hipocampo não foram efetivas no modelo de isquemia global. Entretanto, alguns resultados satisfatórios foram obtidos em modelos de isquemia focal, o que afasta a hipótese de que este fenômeno seja de natureza apoptótica (DESHPANDE *et al.*, 1992).

Fukuda e colaboradores (1999) descreveram um tipo de morte neuronal não-apoptótica em tecido cerebral, seguindo isquemia transitória em camundongos. No mesmo tecido eles encontraram apoptose típica e também um diferente tipo de degeneração onde os núcleos dos neurônios estavam reduzidos à metade apenas 3 horas após a isquemia. Nestas células, nem o núcleo nem os corpos celulares, estavam fragmentados. A análise ultraestrutural mostrou inúmeras partículas interligadas formando uma delicada rede dentro do núcleo. Esta estrutura é claramente distinta do modelo nuclear característico da apoptose. Este tipo de degeneração celular também difere da necrose, pois não apresenta lise celular e há preservação da membrana mitocondrial. Outra diferença encontrada pelos autores é o processo de reconhecimento e remoção rápidos na apoptose, e a fagocitose das células necróticas logo que a membrana é rompida. Este novo modelo parece ser silencioso por vários dias com lento processo de degradação, fazendo seu próprio processo de remoção.

Algumas evidências sugerem que a apoptose e a necrose representam as extremidades de um espectro das possibilidades de morte celular: drogas xenobióticas que induzem a apoptose, quando administradas em altas doses provocam necrose celular. Adicionalmente, a necrose celular segue à morte apoptótica em sistemas experimentais desprovidos de células fagocitárias (LEIST & NICOTERA, 1997).

Sendo assim, a morte neuronal tardia é um fenômeno morfológicamente bem definido, inclusive do ponto de vista ultraestrutural. Entretanto, sua fisiopatologia é complexa uma vez que há características em comum com os processos de necrose e apoptose (NITATORI *et al.*, 1995; LEIST & NICOTERA, 1997; MACMANUS & LINNIK, 1997).

1.7 A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

O termo formação hipocampal compreende 6 regiões citoarquiteticamente distintas, incluindo o giro denteado, hipocampo, dividido em CA1, CA2, CA3, subiculum, pré-subiculum, parasubiculum e córtex entorrinal, o qual contém duas ou mais divisões. A principal justificativa para incluir estas regiões sob o cunho de formação hipocampal é porque estão ligadas umas às outras por amplas projeções unidirecionais (AMARAL & WITTER, 1995).

A região hipocampal ocupa as paredes ventroposterior e ventrolateral do córtex cerebral. Todos os principais componentes podem ser vistos simultaneamente em secções obtidas no plano horizontal (BAYER, 1985).

O Corno de Ammon, como foi designado o hipocampo, devido à aparência com esta figura mitológica, tem a forma de U e contém uma estreita camada de células piramidais. Esta estende-se do *prosubiculum* ao hilo do giro denteado, e contém diferenças citoarquiteturais. Adjacente ao *prosubiculum* existe uma camada densa de células piramidais de tamanho médio. Lorente de Nó (1934), chamou esta região de CA1. Seguindo, há uma região menos densa, com células piramidais maiores que foi dividida em CA2 e CA3. CA2 ocupa uma estreita faixa adjacente a CA1, e pode ser

distinguida pois CA1 apresenta células menores e mais agrupadas. CA2 e CA3 não podem ser acuradamente separadas (BAYER, 1985).

Do córtex entorrinal partem projeções para o giro denteado, chamado via perforante. Não há reciprocidade, pois o giro denteado não projeta fibras de volta para o córtex entorrinal, como ocorre normalmente nas outras regiões do encéfalo. O giro denteado, então, lança suas projeções para a região CA3 do hipocampo. Modelo semelhante encontramos nas conexões entre CA3 que projeta fibras para CA1 e este projetando para o subiculum (AMARAL & WITTER, 1995).

As células piramidais de CA3 apresentam axônios altamente colateralizados que distribuem fibras dentro do hipocampo (CA1, CA2 e CA3) e para o hipocampo contralateral, a projeção comissural, e subcorticalmente para o núcleo septal lateral. Todas as células piramidais de CA3 e CA2 enviam projeções altamente divergentes para todas as porções do hipocampo. As projeções para CA3 e CA2 são tipicamente chamadas de conexões de associação, e as projeções de CA3 para CA1 são conhecidas como colaterais de Schaffer (AMARAL & WITTER, 1995) (Fig 2).

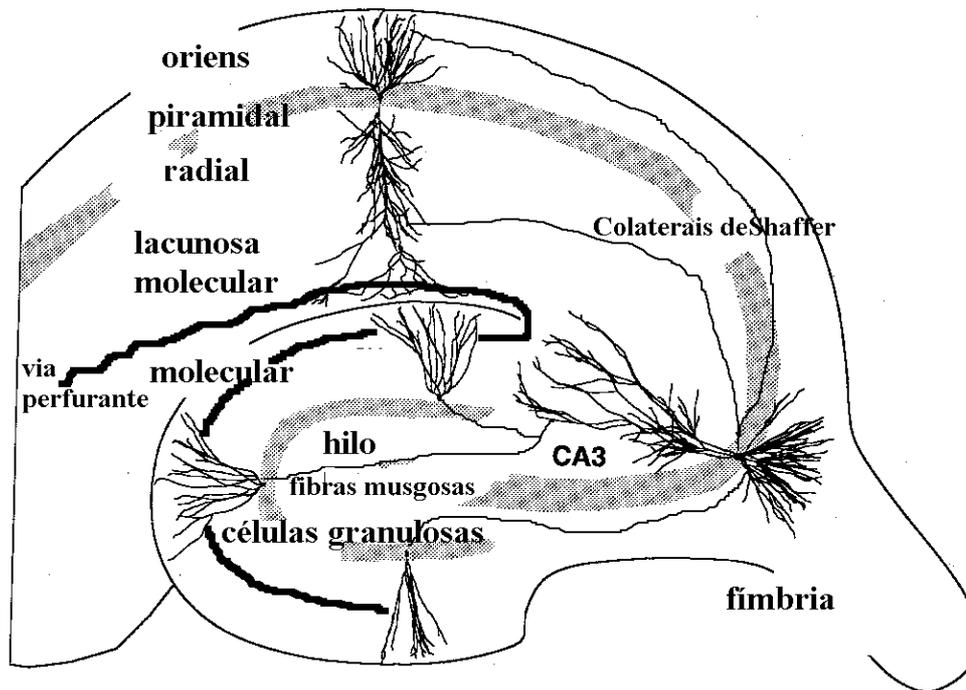


Figura 2. Diagrama esquemático das sub-regiões e estratificação laminar do hipocampo esquerdo em relação aos elementos da via trissináptica. A linha mais grossa representa a via perfurante. Esta inicia no córtex entorrinal, segue pelo estrato lacunoso-molecular até a camada molecular do giro dentado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

1.8 TOLERÂNCIA INDUZIDA À ISQUEMIA

A tolerância induzida é um fenômeno observado em células eucarióticas e em bactérias. Este fenômeno consiste na resistência adquirida a uma condição potencialmente letal pela exposição prévia ao mesmo agente, porém de forma subletal (KIRINO, 1997).

Um estudo importante de tolerância induzida à isquemia foi realizado por Murry (1986) em tecido cardíaco, que o denominou de pré-condicionamento isquêmico. Este efeito foi observado após o tecido cardíaco ter sido submetido a períodos de

isquemia sub-letais, ou seja, período de tempo em que a falta de aporte sanguíneo não produz morte celular.

Um estudo realizado com cães, que consistia em obstruir o fluxo de sangue ao miocárdio por quatro períodos de 5 minutos (pré-condicionamento), seguidos por 5 minutos de reperfusão entre eles, e após uma oclusão sustentada de 40 minutos, mostrou uma diminuição de 25% na área de infarto nos animais submetidos ao pré-condicionamento (MURRY *et al.*, 1986). No miocárdio, a tolerância à isquemia é observada já nos primeiros minutos (cerca de 1 a 60 minutos) após o pré-condicionamento, e se mantém por aproximadamente 3 horas, sugerindo um mecanismo de diminuição do metabolismo e da demanda energética. Entretanto, alguns casos apresentaram proteção até 24 horas após o pré-condicionamento. Este fato foi designado como "segunda janela de proteção", e foi atribuído à síntese de proteínas (REIMER *et al.*, 1994). Este modelo também foi usado em camundongos, com resultados semelhantes (GUO *et al.*, 1998).

No tecido cerebral de ratos, observou-se que a produção de isquemia global por 3 minutos, seguido de reperfusão, não foi suficiente para provocar morte celular em nenhuma estrutura. No entanto, quando a isquemia de 3 minutos foi repetida duas, três ou cinco vezes, após um tempo de 1 hora de reperfusão entre cada evento isquêmico, as regiões mais suscetíveis foram lesionadas, principalmente a região CA1 do hipocampo, seguido do córtex parietal e região CA4 do hipocampo (ou hilo do giro denteado), semelhante ao que ocorre após um único episódio de 10 minutos de isquemia (INOUE *et al.*, 1992). Kirino e colaboradores (1991) realizaram o pré-condicionamento isquêmico com gerbilos, provocando isquemia de 2 minutos de duração, tempo suficiente para desencadear os mecanismos de proteção celular contra um evento

isquêmico de 5 minutos. Os animais que não sofreram o pré-condicionamento apresentaram grande perda neuronal. Neste mesmo estudo, foi relatado que a proteção causada pelo evento isquêmico não-letal persistiu pelo menos por 4 dias.

A hipotermia tem sido empregada por décadas durante a realização de cirurgias cardíacas, e outras de grande porte, para promover proteção aos tecidos. Somente no final dos anos 80, contudo têm-se considerado que o resfriamento leve a moderado do tecido cerebral promova neuroproteção e, contrariamente, uma pequena elevação da temperatura no cérebro é capaz de piorar a lesão (GINSBERG, 1995). As estratégias que visam a redução do dano isquêmico baseadas na redução do metabolismo parecem só ser eficazes quando são instaladas previamente ao insulto isquêmico (SIMPSON & ISACSON, 1993; AMES *et al.*, 1995; RIEPE *et al.*, 1996; GINSBERG, 1997).

O estímulo pré-condicionante não necessariamente implica em um aumento de metabolismo. Alguns trabalhos têm evidenciado que a depressão alastrante atua também como estímulo pré-condicionante em modelos de isquemia focal (KOBAYASHI *et al.*, 1995; MATSUSHIMA *et al.*, 1996). Parece que os eventos vasculares que acompanham a depressão alastrante não influenciam no pré-condicionamento (MATSUSHIMA & HAKIM, 1995). Uma isquemia pode também desencadear o fenômeno da depressão alastrante (ROETTGER & LIPTON, 1996).

Chamam a atenção algumas características em comum da depressão alastrante e de um evento isquêmico subletal. O pré-condicionamento induzido tanto pela depressão alastrante quanto pela isquemia, necessita de um período de latência mínimo para que possa ser efetivo (MATSUSHIMA & HAKIM, 1995; KIRINO, 1997). Na depressão alastrante ocorre uma moderada entrada de Ca^{++} na célula através de canais

voltagem-dependentes (MATSUSHIMA *et al.*, 1996), de forma semelhante ao que ocorre em uma isquemia subletal (TAKIZAWA *et al.*, 1994).

Finalmente, ocorre que a depressão alastrante pode piorar a patologia de uma isquemia quando induzida fora dos limites temporais do pré-condicionamento (GINSBERG, 1995), de forma semelhante ao que ocorre em modelos de condicionamento rápido ou repetidos insultos subletais (YAMAUCHI *et al.*, 1991; INOUE *et al.*, 1992; PEREZ-PINZON *et al.*, 1997).

A tolerância induzida à isquemia cerebral em ratos e gerbilos é produzida por uma isquemia subletal com 2 minutos de duração, que precede um episódio de isquemia letal. A tolerância conferida pelo episódio subletal é somente observada em um intervalo de tempo entre 12 horas e 7 dias de reperfusão (KITAGAWA *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1992). Este protocolo é específico para as células piramidais de CA1, não preservando as células vulneráveis do hilo do giro denteado (KOGURE & KATO, 1993; SUGIMOTO *et al.*, 1993).

Em gerbilos, a eficiência máxima do pré-condicionamento é obtido aos 4 dias de reperfusão, enquanto no rato observam-se bons resultados com o tempo de 24 horas (KITAGAWA *et al.*, 1990). Não ocorre pré-condicionamento se o período de latência mínimo não for observado, ou se os animais forem expostos a múltiplos episódios de isquemia, sendo que nesta última condição ainda ocorre um maior dano tecidual (YAMAUCHI *et al.*, 1991; INOUE *et al.*, 1992; PEREZ-PINZON *et al.*, 1997 a; PEREZ-PINZON *et al.*, 1997 b).

Não foi observada diferença na quantidade de glutamato liberado na fenda sináptica entre uma isquemia letal e uma subletal. Entretanto, outros fatores

relacionados às células da região CA1 do hipocampo parecem ser determinantes neste condicionamento celular (NAKATA *et al.*, 1993).

O influxo inicial de Ca^{++} na célula parece exercer um papel importante no pré-condicionamento isquêmico, uma vez que a pré-administração do bloqueador dos receptores NMDA, MK801, impede a neuroproteção induzida pela isquemia pré-condicionante (KIRINO, 1997). Ohta e colaboradores (1996) concluíram, por meio de técnicas de microscopia eletrônica, que os animais pré-condicionados apresentam uma maior eficiência nos sistemas de mobilização de Ca^{++} intracelular, e maior atividade da Ca^{++} -ATPase da membrana (GASS *et al.*, 1997).

O receptor A1 da adenosina também parece possuir um papel de modulação no pré-condicionamento isquêmico e anóxico, uma vez que os agonistas deste receptor facilitam, e os antagonistas inibem, o pré-condicionamento (PEREZ-PINZON *et al.*, 1996). A imuno-histoquímica para as superóxido-dismutases (MnSOD e CuZnSOD) revelou que estas enzimas desaparecem nos animais submetidos à isquemia, voltando a ser expressa nos animais pré-condicionados às 48 horas de reperfusão (KATO *et al.*, 1995).

Algumas evidências indicam que as proteínas de resposta ao estresse possuem um papel importante no pré-condicionamento. Há uma maior expressão de c-jun pelas células piramidais em animais pré-condicionados, o que sugere uma participação dos genes de resposta precoce na tolerância induzida (GASS *et al.*, 1997). A utilização de anticorpos anti-proteínas de choque térmico (anti-hsp-70) bloqueia o processo do pré-condicionamento (KIRINO *et al.*, 1991; NISHI *et al.*, 1993). Da mesma forma, a administração de bloqueadores dos receptores para interleucinas 1α e β inibem a proteção induzida pela isquemia subletal (OHTSUKI *et al.*, 1996).

Não menos importante é o papel dos astrócitos no fenômeno de tolerância induzida. Estas células desempenham uma função importante de estabilização do meio extracelular para os neurônios, protegendo-os contra os efeitos danosos de aumentos excessivos de neurotransmissores ou íons. Em eventos isquêmicos, estas células também apresentam alterações. Em gerbilos, a isquemia letal provoca uma reação de hipertrofia e reatividade dos astrócitos, associada a uma ativação da micróglia, que é mais intensa no sétimo dia de reperfusão (ORDY *et al.*, 1993).

A isquemia subletal promove não somente uma ativação precoce do astrócito, evidenciada pelo aumento da imunoreatividade a GFAP, mas também da micróglia (INOUE *et al.*, 1992). Evidências de uma maior atividade da enzima citocromo oxidase no soma neuronal de neurônios do hipocampo, de ratos submetidos ao pré-condicionamento isquêmico, sugere que esta proteção envolva, também, mecanismos de alto gasto energético (ROSA NETO, 1998).

A avaliação neurológica motora dos animais submetidos ao pré-condicionamento mostrou menor grau de comprometimento, e as análises histológicas confirmaram os achados de proteção contra isquemia mostrando menor grau de morte celular nos encéfalos desses animais (BARONE *et al.*, 1998). Contudo, não há estudos avaliando as funções cognitivas.

1.9 APRENDIZADO E MEMÓRIA

Aprendizado consiste em mudanças adaptativas no comportamento diante de alterações ocorridas no ambiente, e estas modificações podem ser transitórias ou permanentes. O comportamento é mediado por vários componentes do sistema nervoso

central, os quais variam filogeneticamente, sendo os reflexos e os instintos indispensáveis para a sobrevivência dos invertebrados e dos vertebrados inferiores, enquanto a motivação é mais importante para organismos mais complexos (SHEPHERD, 1994). Memória é a denominação dada à capacidade de armazenar e evocar informações, sendo esta necessária para o aprendizado (LORENZINI *et al.*, 1999; IZQUIERDO, 1989; SHEPHERD, 1994). Embora não se possa medir o aprendizado e a memória de forma direta, é possível avaliar a memória pela evocação, assumindo que a evocação é função da memória, e esta do aprendizado. Sendo assim, nos animais, a evocação se expressa pela modificação do comportamento, e nos humanos, pelo reconhecimento de pessoas, fatos e lugares (IZQUIERDO, 1989).

Existem várias formas descritas de aprendizado e memória. A habituação é um tipo de aprendizado que consiste na diminuição da intensidade da resposta comportamental frente a um estímulo repetitivo (SHEPHERD, 1994). Aprendizado associativo ou condicionamento clássico refere-se àquele em que o animal faz a conexão entre o seu comportamento a um estímulo neutro com um segundo estímulo de recompensa ou punição. Em 1900, Ivan Pavlov descreveu este tipo de condicionamento. Seu estudo consistia em oferecer alimento a um cão após o toque de uma campainha (estímulo neutro). Sempre que o animal ouvia a campainha, este salivava esperando a comida (SHEPHERD, 1994).

No condicionamento operante, ao contrário do condicionamento clássico, o animal deve aprender uma tarefa para resolver um problema, como escapar de uma caixa, correr em um labirinto ou pressionar um botão para evitar uma punição ou receber uma recompensa.

O aprendizado complexo pode ser dividido em: a) intrínseco, no qual o animal mantém-se agrupado com seus semelhantes, através do reconhecimento de estímulos específicos como cor da pelagem, tipo de canto, etc, é um tipo de aprendizado essencial para muitas espécies; b) aprendizado latente, no qual o animal é colocado, por exemplo, em um ambiente experimental, como um labirinto, sem o intuito de treinamento, apenas para um reconhecimento. Quando este animal é colocado novamente neste labirinto para realizar uma tarefa específica, este apresenta melhor desempenho que outro que não tenha passado pelo labirinto anteriormente; c) aprendizado observacional é quando um animal aprende a realizar uma tarefa simplesmente observando outro realizá-la. É extremamente importante em humanos, e difícil de demonstrar em outros mamíferos. Não há evidências deste tipo de aprendizado em invertebrados ou vertebrados inferiores (SHEPHERD, 1994).

Quanto à memória, três classes podem ser definidas. A memória imediata é aquela em que as informações são necessárias apenas por alguns segundos, enquanto estão sendo utilizadas em alguma atividade mental. Memória recente é a capacidade de evocar informações recebidas após minutos, horas ou dias, contrastando com a memória remota, que traz à lembrança fatos acontecidos há meses ou mesmo anos (BROWN & HACHINSKI, 1994).

Engrama é utilizado como sinônimo de traço de memória. Lashley (1950), após vários estudos concluiu que o engrama não está localizado em uma estrutura particular no encéfalo, mas está difusamente distribuída no SNC.

O processo mnemônico ocorre em várias fases sequenciais, sendo que a primeira consiste em adquirir a informação (traço de memória ou engrama), e sucessivamente o engrama é consolidado, armazenado e evocado, sempre que

necessário. A fase de consolidação ocorre algum tempo após a aquisição e, neste período, a informação adquirida é vulnerável e pode ser alterada ou mesmo perdida (LORENZINI *et al.*, 1999).

A informação parece ser armazenada no cérebro como modificações na eficiência sináptica. Trens de impulsos de alta frequência estimulam vias excitatórias monossinápticas, causando um abrupto e sustentado aumento da eficiência da transmissão sináptica. Este fenômeno foi denominado potencialização de longa duração (LTP), e foi inicialmente descrito por Bliss em 1973 (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Contudo, a LTP está envolvida em algumas, mas não em todas formas de aprendizado (MORRIS *et al.*, 1986; IZQUIERDO & MEDINA, 1995).

McGaugh (2000), em sua revisão sobre a fase de consolidação da memória focaliza evidências sugerindo que o hipocampo é ativo na consolidação inicial da memória, e outras regiões do cérebro sofrem processos distintos, provavelmente envolvidos na consolidação tardia (dias, meses ou anos), sendo que nesta fase ocorre a síntese de proteínas. Não é possível demonstrar a localização isolada do engrama dentro do sistema nervoso. Regiões limitadas podem ser essenciais para o aprendizado ou retenção de uma atividade particular, mas dentro de tais regiões as partes são funcionalmente equivalentes (LASHLEY, 1950).

O processo de consolidação pode ser afetado, facilitado ou impedido, por vários fatores. Neurônios colinérgicos podem desempenhar um importante papel. Uma droga colinérgica facilita a consolidação do traço de memória e uma droga anticolinérgica impede o armazenamento da informação (BROWN & HACHINSKI, 1994); o eletro-choque, administrado em roedores, causa amnésia retrógrada (McGAUGH, 2000; LORENZINI, 1999).

Amnésia é o termo usado para designar uma desordem da memória caracterizada pela inabilidade de lembrar fatos passados ou aprender novas informações a despeito de um nível de consciência e atenção normais. Os lobos temporais estão claramente envolvidos na memória e, como regra geral, amnésia significativa ocorre somente após lesão bilateral dos lobos temporais mediais (BROWN & HACHINSKI, 1994).

A amnésia orgânica é causada por uma lesão não progressiva no cérebro, e pode se manifestar como amnésia retrógrada, caracterizada por não evocação de fatos passados; e amnésia anterógrada, caracterizada pela incapacidade de formar novas memórias. Pode ainda ser global, manifestando amnésia anterógrada e retrógrada, ou focal, manifestando apenas um tipo de amnésia (CIPOLOTTI *et al.*, 2001).

O hipocampo é uma importante estrutura relacionada com a memória tanto em animais como em humanos, todavia, outras evidências apontam também para as estruturas adjacentes e anatomicamente relacionadas com o córtex do lobo temporal medial, como os córtices parahipocampal, entorinal e peririnal (SQUIRE, 1992).

Scoville descreveu, em 1954, uma grave perda da memória recente em pacientes que haviam sofrido ressecção cirúrgica bilateral da parte medial do lobo temporal, com lesão do hipocampo, entre outras estruturas. Este era um tratamento utilizado para casos de epilepsia resistente a tratamentos conservadores e doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia (SCOVILLE *et al.*, 1957).

Scoville e Milner (1957) descreveram 10 casos de pacientes que foram submetidos a lobectomia temporal. O caso mais conhecido é, sem dúvida, do jovem H. M., que sofreu lobectomia temporal medial para tratamento de epilepsia. Após a cirurgia apresentou grave déficit de memória para fatos recentes, sem comprometimento

da inteligência e da memória para fatos remotos. Estes autores sugerem, com seus achados, que a região hipocampal é importante para o funcionamento normal da memória. A ressecção bilateral do lobo temporal medial em humanos resulta em um persistente déficit da memória recente, quando esta remoção é suficiente para danificar a região hipocampal.

Vários pesquisadores utilizaram o modelo de lesão hipocampal e estruturas adjacentes em ratos, e observaram o comprometimento na performance de várias tarefas como memória espacial, discriminação de odores e tarefas que requerem a relação entre estímulos. Ainda observaram que lesões no hipocampo ou em estruturas anatomicamente relacionadas causam comprometimento na memória, mas lesões na amígdala não produzem déficit de memória (SQUIRE, 1992). O mesmo autor atenta para o fato de o hipocampo participar na formação de um único tipo de memória, e esta consiste de diferentes sistemas que dependem da integridade das estruturas cerebrais. Esta idéia foi fortemente influenciada pelos estudos realizados com pacientes amnésicos.

2. OBJETIVOS

Na literatura, encontramos muitos estudos sobre neuroproteção induzida de diversas maneiras, tais como hipóxia-isquemia, agentes físicos (calor, frio) e vários tipos de fármacos. Os estudos histológicos comprovaram a resistência adquirida pelas células contra estes fatores após a exposição por tempo prolongado ou altas doses, entretanto, somente tendo sido submetidas por um breve período ou baixas doses destes agentes previamente.

Também há, na literatura, estudos comportamentais em animais que foram submetidos à isquemia sem neuroproteção, para avaliar os efeitos da falta do aporte sanguíneo ao cérebro sobre o aprendizado e memória deste animais. No entanto, não há trabalhos que correlacionem os achados da tolerância induzida à isquemia com testes comportamentais e estereologia.

O objetivos deste trabalho foram:

- 1) reproduzir o modelo de neuroproteção induzida por isquemia em ratos;
- 2) realizar testes comportamentais de aprendizado e memória no labirinto aquático de Morris, comparando o desempenho dos animais submetidos à neuroproteção com os animais controles e isquêmicos;
- 3) realizar estudo estereológico para determinar o volume da camada piramidal da região CA1 do hipocampo;
- 4) correlacionar o desempenho no labirinto aquático de Morris com o volume da camada piramidal da região CA1 hipocampal por grupo estudado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISQUEMIA

Foram utilizados 64 ratos Wistar machos, adultos, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Foram mantidos em caixas-moradia, em ambiente climatizado (25° C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e comida *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 4 grupos: a) grupo controle, com animais que não foram submetidos à cirurgia nem à isquemia, e controle-cirúrgico, com animais que foram submetidos apenas à cirurgia (n = 19); b) grupo isquêmico de 2 minutos, no qual os animais foram submetidos à isquemia de 2 minutos de duração (n = 15); c) grupo isquêmico de 10 minutos (n = 16); d) grupo isquêmico de 2+10 minutos, com animais que foram submetidos à isquemia de 2 minutos e 24 horas após sofreram isquemia por 10 minutos (n = 13) (NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997; KOGURE & KATO, 1993; SUGIMOTO *et al.*, 1993).

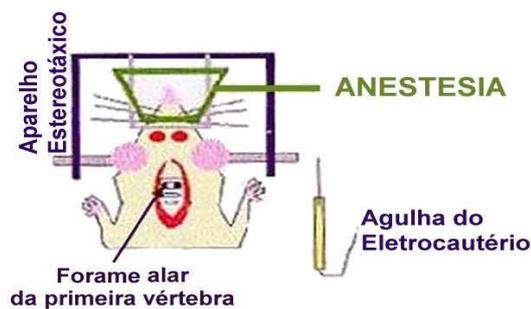
O modelo de isquemia utilizado foi o de isquemia global com oclusão de 4 vasos em animais não anestesiados desenvolvido por Pulsinelli e Brierley (1979), adaptado para o Laboratório de Hipóxia-isquemia do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS (NETTO *et al.*, 1993) (Fig. 3).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com halotano através de máscara facial e posicionados em decúbito ventral com aparelho estereotático. As artérias vertebrais foram cauterizadas atrás do forame alar, através de uma incisão mediana na região cervical. As artérias carótidas comuns foram abordadas por via anterior, com incisão medial, dissecadas cuidadosamente e isoladas do nervo vago. Um fio de silicone

foi, então, passado ao redor de cada artéria e por entre os orifícios de um botão de silicone e as extremidades amarradas com um nó.

Método de Oclusão dos 4 Vasos

1ª Fase: Electrocoagulação das Artérias Vertebrais



2ª Fase: Isolamento das Artérias Carótidas

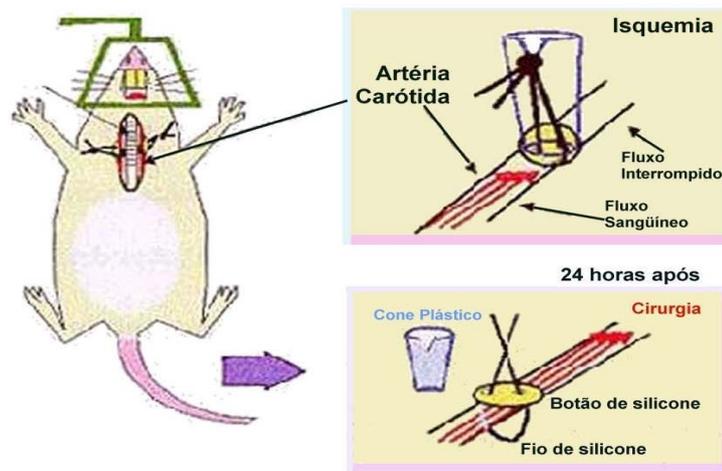


Figura 3: Ilustração resumindo os procedimentos cirúrgicos utilizados para a obtenção de isquemia global por oclusão de 4 vasos em ratos. Na primeira fase procede-se a electrocoagulação das artérias vertebrais ao nível do forame alar. Na segunda fase um fio e um botão de silicone são acooplados em volta das artérias carótidas comum de modo a formar um pequeno nó. A isquemia ocorre quando o fio é tracionado através de um cone plástico entre o botão e o nó do fio de silicone (ARTENI).

Após 24 horas de recuperação procedeu-se à oclusão das carótidas: um cone de plástico foi posto sobre o botão com o fio de silicone puxado dentro deste, prendendo-se

o nó na outra extremidade comprimindo, assim, as carótidas e impedindo o fluxo de sangue pelo tempo pré-determinado, 2 ou 10 minutos. Após este tempo, o fio foi afrouxado permitindo, então, a revascularização. O fio e o botão foram retirados, e a incisão suturada.

3.2 TESTE COMPORTAMENTAL

Para os testes comportamentais foi utilizado o labirinto aquático de Morris (Morris, 1984), que consta de um tanque circular com o fundo e as paredes pintados de preto. O tanque era preenchido com água na temperatura de 26°C (+/- 2° C) até uma altura de aproximadamente 30 centímetros da borda, turvava-se com leite para evitar que os animais visualizassem a plataforma de escape que ficava submersa (1cm). Através de linhas imaginárias, o tanque foi dividido em 4 quadrantes (1, 2, 3, 4), com 4 pontos de largada, que foram nomeados como N, S, L, O. A plataforma de escape era colocada em um dos quadrantes, a uma certa distância entre o centro e a parede do tanque (Fig. 4). Os testes foram divididos por fases, sendo que em cada uma delas a plataforma foi colocada em um dos quadrantes.

Os animais foram colocados no tanque com a face voltada para a parede em um dos quatro pontos (N-S-L-O), em uma seqüência de largada que será descrita mais adiante. O examinador colocava-se próximo ao ponto S. O tempo gasto pelo animal para achar a plataforma (latência) era cronometrado pelo examinador, que, ao final de 60 segundos, caso o rato avaliado não encontrasse a plataforma, o conduzia pela água até a mesma, permitindo que ali ficasse por 10 segundos para sua localização. Em um dia de treino eram realizadas 4 largadas, uma em cada ponto, com 10 minutos de

intervalo entre cada uma delas. Após cada largada, os animais eram retirados da água, enxugados com toalha e recolocados em suas caixas-moradia.

Na sala onde estava localizado o labirinto aquático, haviam pontos de referência em cada parede para a localização espacial. Um sistema de vídeo VHS conectado a um monitor permitiu filmar os testes e marcar os locais onde a plataforma havia sido colocada (Fig. 5).

Os testes iniciaram 3 semanas após a isquemia e constaram de 3 fases, conforme citado acima.

A fase 1 foi composta por 6 dias de treino (fase de aquisição), com plataforma colocada no quadrante 4. No primeiro dia a seqüência de largadas foi L-O-N-S. No segundo dia, N-L-S-O; no terceiro dia foi S-N-O-L; no quarto, O-S-L-N; no quinto, L-O-N-S; no sexto, L-O-N-S. Após 24 horas, foi realizado o teste, no qual a plataforma foi retirada, e foi feita apenas uma largada. O ponto escolhido foi o L (primeiro do último treino). Durante 60 segundos, foram contados quantas vezes o animal cruzou sobre o local onde a plataforma esteve durante os treinos, e quanto tempo este permaneceu no quadrante em questão. O teste foi filmado para facilitar a análise.

A fase 2 foi semelhante à fase 1, porém, foi composta por 4 dias de treino, com a plataforma localizada no quadrante 2. A seqüência de largada dos 4 dias foram, respectivamente: O-L-S-N; S-L-N-O; L-N-O-S, e N-O-S-L. Para a largada do teste foi utilizado o ponto N. As duas primeiras fases tinham o objetivo de avaliar a memória espacial.

Para determinar quantos dias de treino seria ideal para cada fase, foi calculada a média das latências de cada dia. Com a média dos controles próxima de 10 segundos, passava-se para o teste.

A fase 3 foi executada para avaliar a memória de trabalho, da seguinte maneira:

a) no primeiro dia a plataforma foi colocada entre os pontos O e N, sendo S-L-N-O a seqüência de largada; b) no segundo dia a plataforma estava entre os pontos L e N, com largadas nos pontos L-O-S-N; c) no terceiro dia a plataforma foi mudada para um local entre os pontos S e O, com largadas em O-S-N-L; d) no quarto e último dia a plataforma foi colocada entre S e L com largadas em O-N-S-L.

Um intervalo de 7 dias foi observado entre cada fase de treinamento.

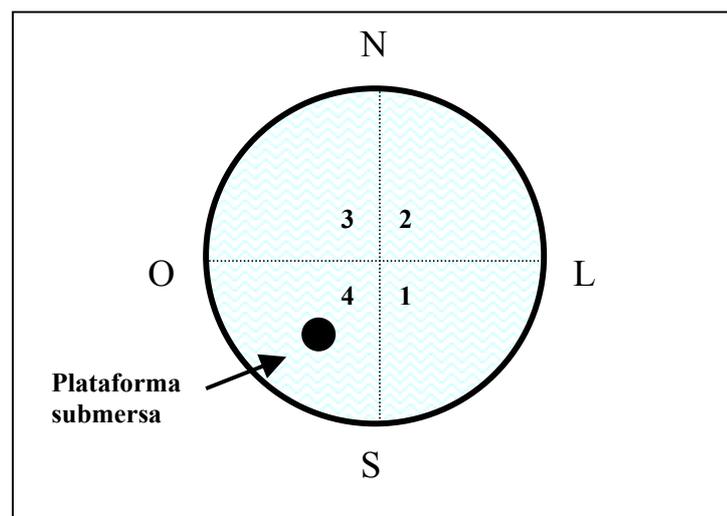


Figura 4: Desenho esquemático da piscina (Labirinto aquático de Morris) utilizada para os testes de aprendizagem e memória .

Sistema de filmagem VHS

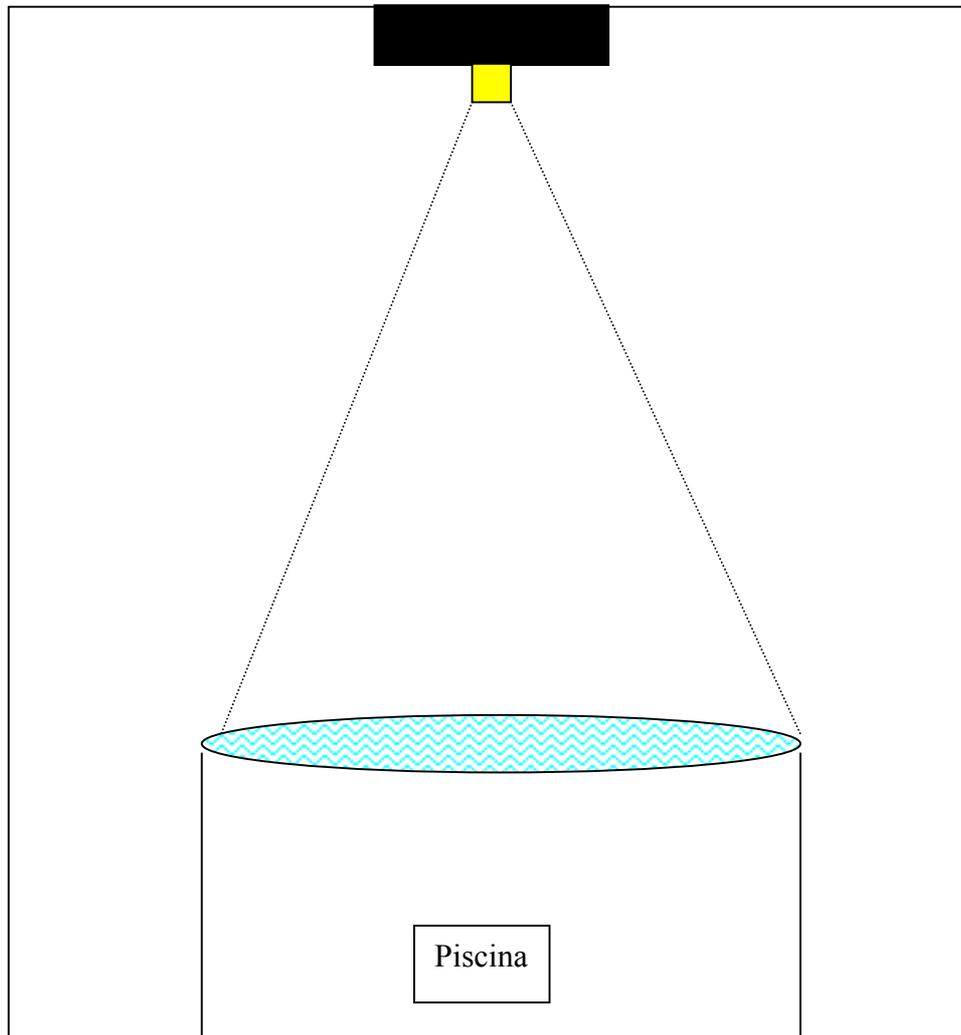


Figura 5: mostra um esquema do sistema de filmagens localizado no teto da sala de testes. A lente da câmara abrange toda a extensão da piscina.

3.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral a 35% (MERCK), perfundidos por via transcardíaca com solução salina 0,9% heparinizada, e fixados com solução de formol 10%. Os cérebros foram cuidadosamente retirados da caixa craniana e armazenados em formol 10%.

Foram selecionados 23 cérebros aleatoriamente. Os cérebros foram cortados em vibrátomo (LEICA), em fatias de 40 μm de espessura, sendo recolhido em lâmina histológica 1 corte a cada 5 fatias (200 μm), em toda a extensão do hipocampo. Os cortes foram corados com violeta de cresil (técnica de Nissl), desidratados, clareados e cobertos com resina Damar e lamínulas (MANUAL, 1966).

A região CA1 do hipocampo foi escolhida para ser avaliada por ser a mais vulnerável à isquemia. Os limites entre CA1 e CA2 não são precisos, porém, em CA1 a camada piramidal é bastante compacta, com somas neuronais pequenos, enquanto que na região CA2 os somas são maiores e mais esparsos.

A determinação do volume da camada piramidal da região CA1 do hipocampo foi baseado no Princípio de Cavalieri. Este cálculo foi obtido pela soma das áreas multiplicadas pela extensão que separa estas áreas: $V = (T.A_1) + (T.A_2) + (T.A_3) + \dots + (T.A_n)$.

Simplificando $V = T \cdot \sum A_i$. Onde: V = volume da estrutura (l^3), A = área da estrutura (l^2), T = distância entre as área. Para calcular a área de um quadrado basta utilizar a fórmula $A = l^2$ (l = lado), mas para uma estrutura irregular isto não é possível. O método de Cavalieri é uma importante ferramenta para estes casos.

O Princípio de Cavalieri utiliza uma fórmula matemática para uma eficiente e rápida determinação do volume das estruturas cerebrais, pois não é necessário a

utilização de todos os cortes do tecido. Importante, porém, é saber a distância entre estes cortes, e obter uma boa amostragem para calcular com maior exatidão o volume total da estrutura estudada (GUNDERSEN *et al.*, 1988).

Para determinar a área da camada piramidal da região CA1 de cada corte as lâminas foram observadas ao microscópio óptico (Nikon eclipse E-600) acoplado a um sistema de análise de imagens (Image-Pro Plus 4.1). Este sistema permite capturar a imagem do microscópio e sobrepor a ela uma planilha de cruces (fig. 6). Cada cruz representa um quadrado com área definida, por isso apenas um ângulo da cruz é escolhido para ser contado e foram contadas todas as cruces cujo ângulo escolhido sobrepunham-se à camada piramidal da região CA1 (GUNDERSEN *et al.*, 1988). A área total da estrutura é calculada multiplicando-se a área do quadrado formado pelas cruces pelo número de cruces contadas.

O volume foi calculado multiplicando-se a área total pela distância entre os cortes (200 μm). Os hemisférios direito e esquerdo foram calculados separadamente.

O teste estatístico utilizado foi a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido, quando indicado, pelo teste de Duncan. O programa SPSS para Windows 8.0 foi utilizado para as análises estatísticas.

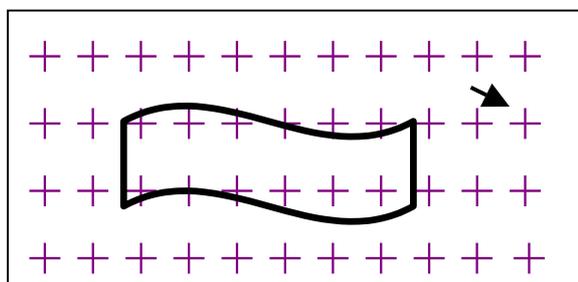


Figura 6: Desenho esquemático de uma estrutura de bordos irregulares sobreposta pela planilha de cruces. A flexa mostra um ângulo escolhido.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO COMPORTAMENTAL EM LABIRINTO AQUÁTICO

4.1.1 Fase 1 : A fase 1 do teste de comportamento no labirinto aquático de Morris foi composto por seis dias de treino consecutivos, sendo que, em cada dia foram realizadas 4 largadas de pontos diferentes. A média do tempo utilizado para encontrar a plataforma foi calculado para cada dia. No primeiro dia de treino, as latências para encontrar a plataforma submersa foram maiores, como era esperado, pois os animais estavam se familiarizando com o novo ambiente.

Os animais controle apresentaram uma média de latência, para encontrar a plataforma, de aproximadamente 40 segundos no primeiro dia de treino. No segundo dia, observou-se uma diminuição de quase 20 segundos. No terceiro dia houve um declínio mais sutil, e nos dias 4, 5 e 6 a média ficou em torno 10 segundos.

Os animais que sofreram 2 minutos de isquemia apresentaram resultados semelhantes aos controle nos 6 dias de treino, iniciando com aproximadamente 40 segundos de latência, com uma queda para 20 segundos nos 2º e 3º dias, e mantendo uma latência de cerca de 10 segundos nos dias subseqüentes.

Os animais com isquemia de 10 minutos diferem dos animais descritos acima apenas no 2º dia, quando apresentaram uma latência de quase 30 segundos para encontrar a plataforma. Entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Nos dias seguintes as médias diminuíram, estabilizando-se em cerca de 10 segundos.

Os animais submetidos à neuroproteção isquêmica (isquemia de 2+10 minutos), apresentaram, no 1º dia, uma latência um pouco menor que 40 segundos, sem

significado estatístico, contudo, nos outros dias, os resultados foram semelhantes àqueles já descritos (Fig. 7).

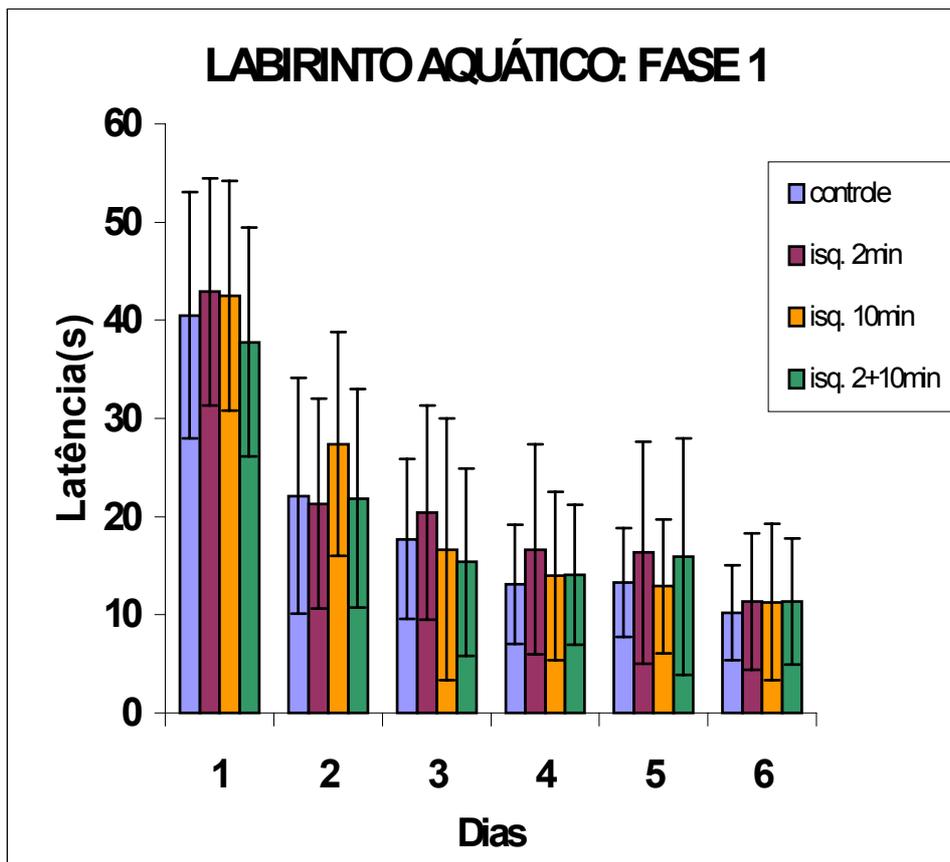


Figura 7: O gráfico mostra a média das latências de cada grupo por dia de treino. O teste estatístico realizado foi ANOVA de uma via. Considerado significativo um $p \leq 0,05$.

Tabela 1: Estudo da fase 1

	controle	Isq. 2 min.	Isq. 10 min.	Isq. 2+10 min.
Treino 1	40,49 (12,53)	42,92 (11,58)	42,52 (11,71)	37,77 (11,63)
Treino 2	22,12 (12,02)	21,33 (10,68)	27,38 (11,39)	21,85 (11,12)
Treino 3	17,72 (8,16)	20,43 (10,93)	16,64 (13,34)	15,38 (9,53)
Treino 4	13,11(6,10)	16,67 (10,69)	13,97 (8,56)	14,06 (7,12)
Treino 5	13,28 (5,53)	16,32 (11,28)	12,92 (6,83)	15,92 (12,06)
Treino 6	10,18 (4,84)	11,32 (6,95)	11,28 (7,96)	11,35 (6,41)

Todos os valores estão expressos pela média e desvio padrão.

4.1.2 Teste da fase 1:

- **Número de Cruzamentos:** O teste foi realizado sem a plataforma e foram contados quantas vezes cada animal cruzou sobre o local onde a plataforma estava localizada.

Os animais controle apresentaram uma média de três cruzamentos sobre o local onde a plataforma estivera durante os treinos (3,3 cruzam., desvio padrão = 1,02). Os animais isquêmicos de 2 minutos tiveram um desempenho similar, com a média de cruzamentos em torno de três (3,47 cruzam., desvio padrão = 1,36).

Os ratos com isquemia de 10 minutos, semelhantemente aos grupos anteriores, obtiveram uma média de três cruzamentos sobre o local da plataforma na fase 1 (3,44 cruzam., desvio padrão = 1,79)

Os animais do grupo submetido à isquemia de 2 + 10 minutos tiveram uma média de cruzamentos um pouco superior aos demais grupos na fase 1 (3,85 cruzam., com desvio padrão = 2,08), entretanto, não foi estatisticamente diferente dos demais (Fig. 8).

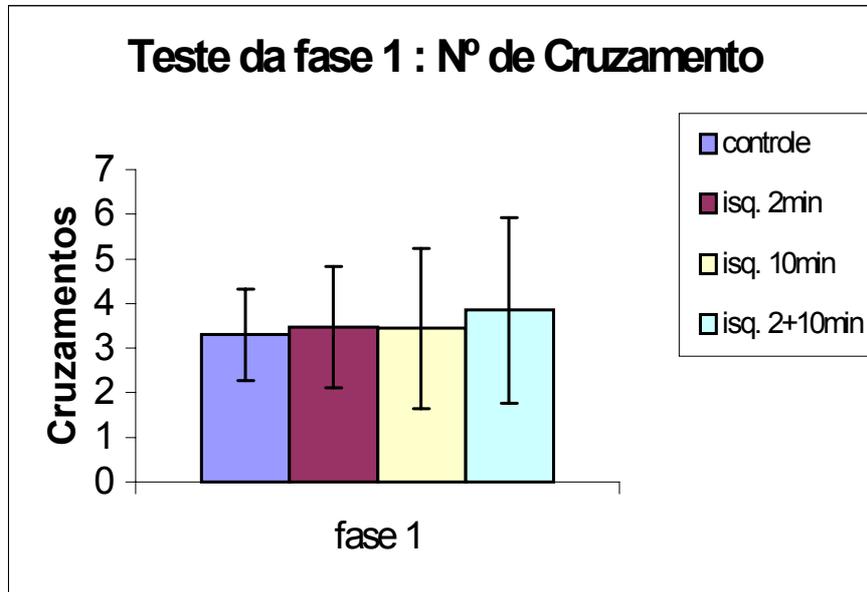


Figura 8: Este gráfico mostra a média de cruzamentos, de cada grupo testado, sobre o local da plataforma na fase 1. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA de uma via, o foi considerado significativo um $p \leq 0,05$.

- **Tempo no quadrante alvo:** Um outro elemento do teste da fase 1 foi o tempo que os animais permaneceram nadando no quadrante alvo. Foi possível observar que os animais controle despenderam um tempo substancial no quadrante alvo procurando a plataforma (27,48 seg., desvio padrão = 9,29) nesta primeira fase.

O grupo isquêmico de 2 minutos apresentou resultados semelhantes aos controles (27,8 seg., desvio padrão = 7,03).

O grupo de animais submetidos a 10 minutos de isquemia permaneceu mais tempo no quadrante alvo (29,63 seg., desvio padrão = 6,79). Contudo, a análise estatística não mostrou diferença significativa. Os animais que sofreram neuroproteção isquêmica + isquemia de 10 min., também obtiveram resultados similares (27,92 seg.,

desvio padrão = 7,74). Neste teste também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e isquêmicos (Fig. 9).

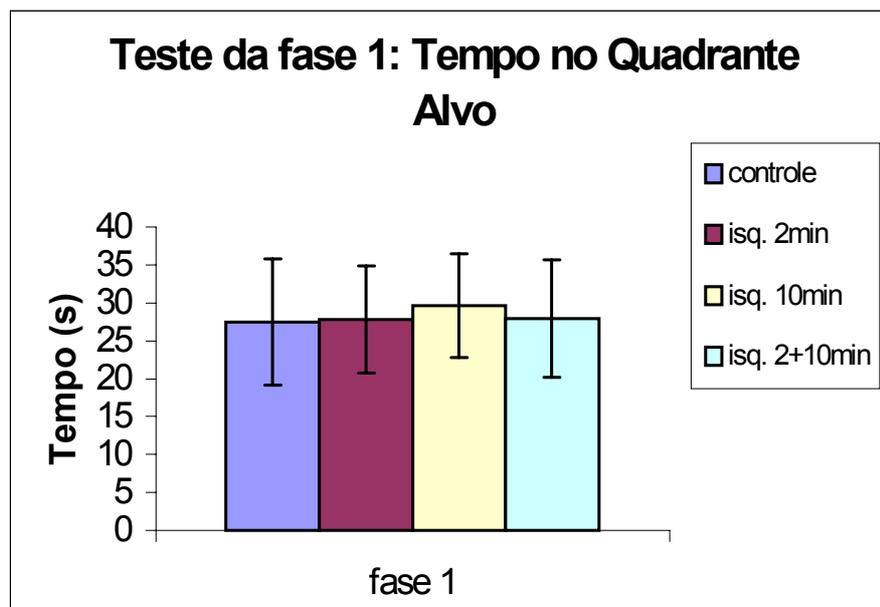


Figura 9: Este gráfico mostra a média do tempo utilizado no quadrante alvo para cada grupo testado, na fase 1. O teste utilizado foi ANOVA de uma via, e foi considerado significativo um $p \leq 0,05$.

4.1.3 Fase 2: Na fase 2 do estudo de aprendizado e memória a plataforma foi transferida para o quadrante oposto ao da fase 1, e foram realizados 4 dias de treino. O tempo utilizado para alcançar a plataforma foi de aproximadamente 20 segundos, em todos os grupos. Observou-se que as latências do primeiro dia da fase 2 foram semelhantes às do 2º dia de treino da primeira fase.

Os animais controle apresentaram uma média de 19 segundos no primeiro dia, diminuindo até próximo de 10 segundos nos dias 2 e 3, e até cerca de 5 segundos no 4º dia.

Os animais que sofreram isquemia de 2 minutos, mostraram um desempenho similar aos controles, com a média de tempo diminuindo gradativamente do primeiro ao quarto dia de treino. Da mesma forma, os animais com isquemia de 10 minutos, obtiveram o mesmo desempenho que os anteriormente descritos. Embora sem significância estatística, a média alcançada por este grupo no terceiro dia foi menor que 10 seg, mantendo este resultado no último dia.

Os ratos submetidos à neuroproteção apresentaram resultados semelhantes aos controles, com a latência final em torno de 5 segundos (Fig. 10).

Os animais que apresentaram alterações motoras em qualquer dia de treino foram descartados.

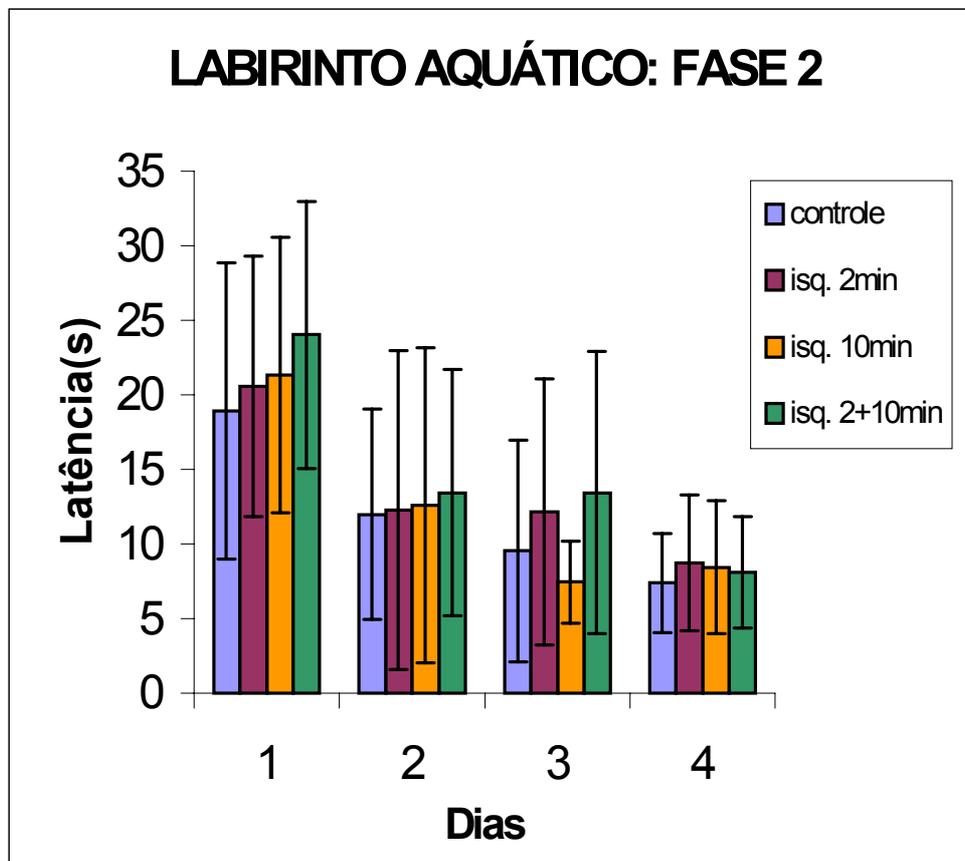


Figura 10: No gráfico 2 os valores estão representados pelas médias das latências por dia de treino. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA. Considerado significativo $p \leq 0,05$.

Tabela 2: Estudo da fase 2

	controle	Isq. 2 min.	Isq. 10 min.	Isq. 2+ 10 min.
treino 1	18,90 (9,94)	20,57 (8,74)	21,33 (9,26)	24,02 (8,95)
treino 2	11,99 (7,07)	12,28 (10,67)	12,58 (10,58)	13,44 (8,24)
treino 3	9,55 (7,43)	12,17 (8,92)	7,44 (2,75)	13,44 (9,44)
treino 4	7,39 (3,32)	8,75 (4,57)	8,44 (4,46)	8,08 (3,74)

Todos os valores estão representados pela média e desvio padrão.

4.1.4 Teste da fase 2:

- **Número de Cruzamentos:** Os animais controle apresentaram uma média de três cruzamentos sobre o local onde a plataforma estivera durante os treinos na fase 2 (2,96 cruzam., desvio padrão = 1,46).

Os animais com 2 minutos de isquemia também tiveram uma média de cruzamentos em torno de três (2,93 cruzam., desvio padrão =1,22). Não houve diferença nos resultados obtidos pelos animais com 10 minutos de isquemia (3,25 cruzam., desvio padrão = 1,81).

No grupo submetido à isquemia de 2 + 10 minutos observou-se uma média de cruzamentos semelhante (3,15 cruzam., desvio padrão = 1,41), portanto, não houve diferença estatística entre os grupos controle e isquêmicos (Fig. 11).

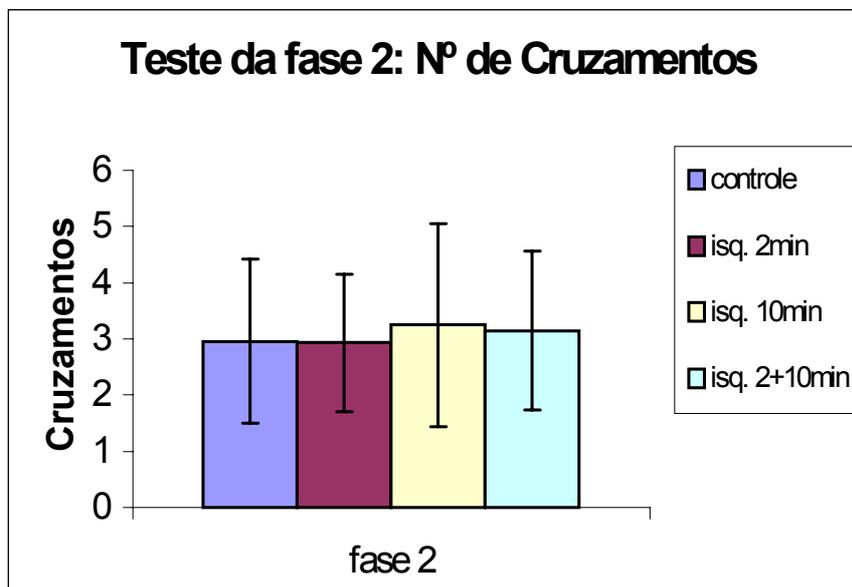


Figura 11: O gráfico mostra as médias do nº de cruzamentos de cada grupo na fase 2. O teste estatístico utilizado foi ANOVA, e foi considerado significativo $p \leq 0,05$.

- **Tempo no quadrante alvo:** Este teste avaliou o tempo que os animais permaneceram nadando no quadrante alvo.

Nesta fase os animais controles permaneceram cerca de um terço do tempo nadando no quadrante alvo (22,39 seg., desvio padrão = 6,79). O grupo isquêmico de 2 minutos apresentou resultados semelhantes aos controles (23,60 seg., desvio padrão = 6,06).

O grupo com animais submetidos a 10 minutos de isquemia permaneceu mais tempo no quadrante alvo (26,19 seg., desvio padrão = 6,67). Entretanto, não foi estatisticamente significativo. Os animais que sofreram neuroproteção isquêmica mais isquemia de 10 minutos também mostraram resultados similares (22,46 seg. com desvio padrão = 4,16). Neste teste também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e isquêmicos (Fig. 12).

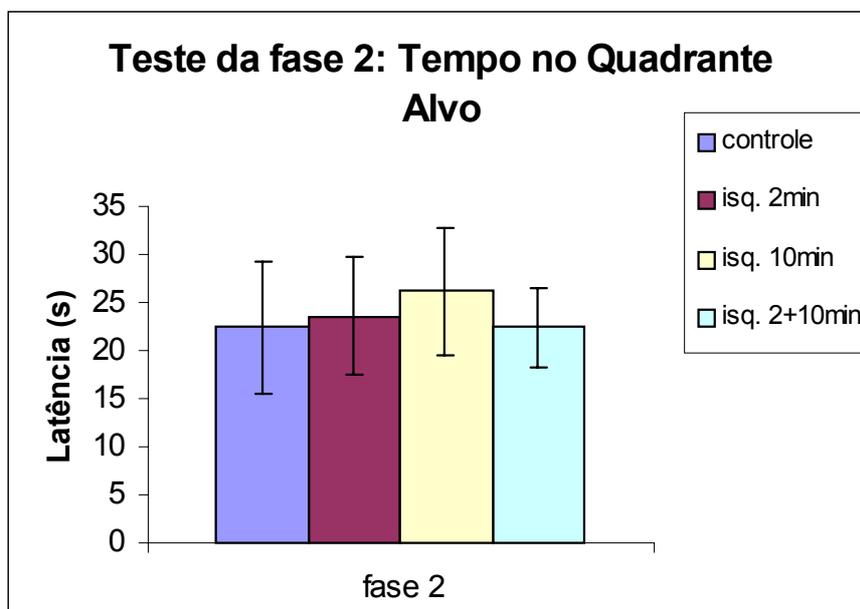
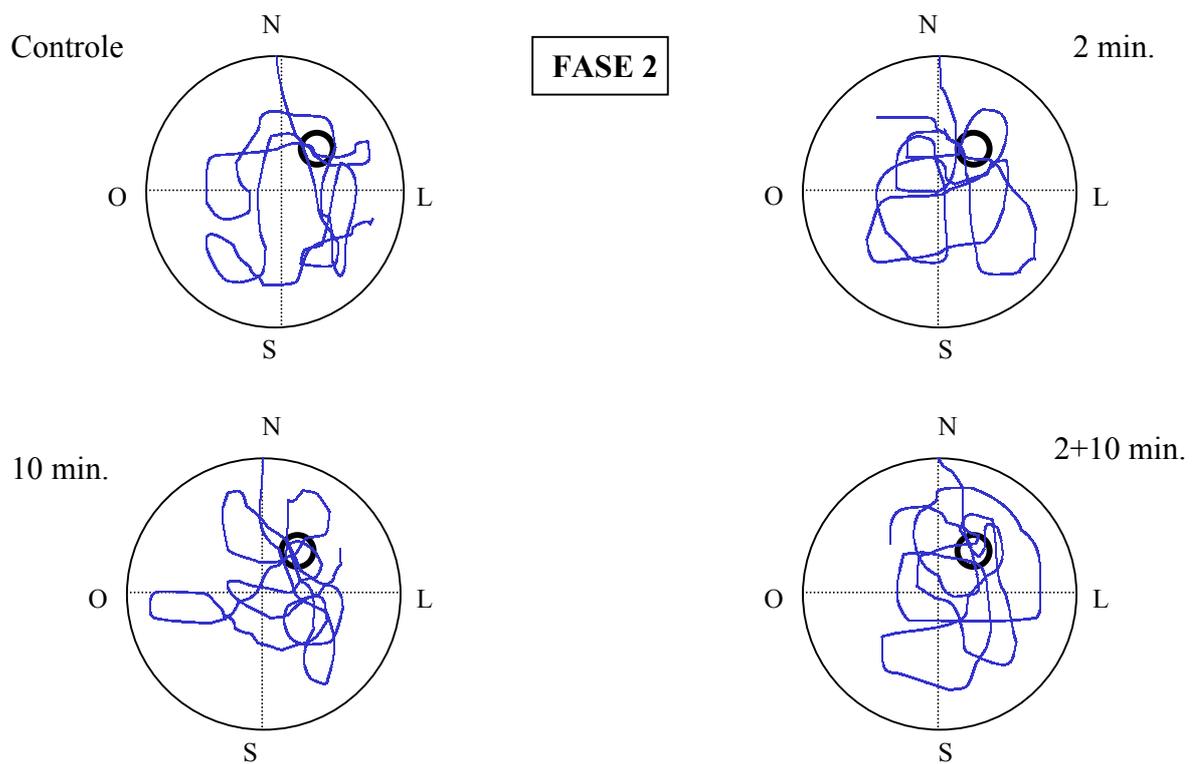
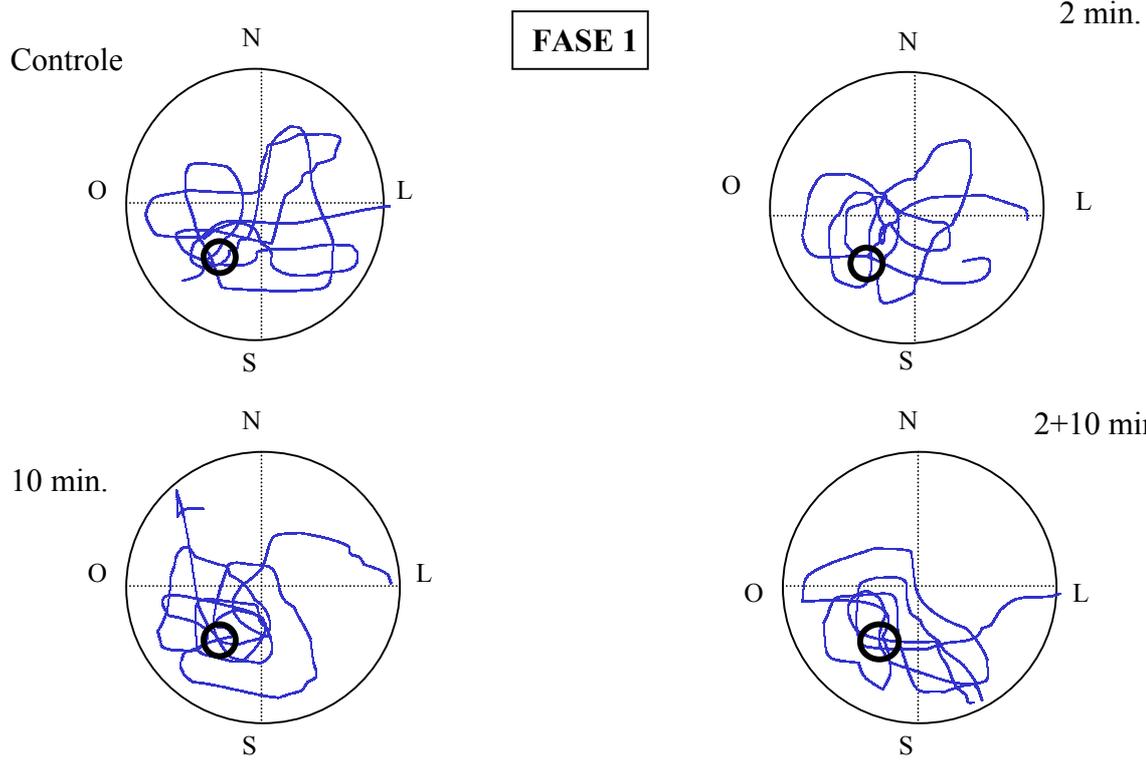


Figura 12: O gráfico está representado pela média e desvio padrão. O teste estatístico utilizado foi ANOVA. Considerado significativo $p \leq 0,05$.



4.1.5 Memória de Trabalho: Na última etapa do estudo comportamental foi testada a memória de trabalho, com a plataforma, sendo esta trocada de lugar a cada dia. Para este teste calculou-se a média das latências das 4 primeiras largadas, uma a cada dia, das 4 segundas largadas e assim sucessivamente.

Observou-se, no grupo controle, uma média de 35,2 segundos para encontrar a plataforma na primeira largada de cada dia de teste (desvio padrão = 9,72). Na segunda largada a média foi de 11,89 segundos, semelhante ao resultado da terceira saída, de 10,80 segundos (desvio padrão = 6,26 e 5,88, respectivamente). A média dos valores da quarta largada de cada dia foi 7,42 seg. (desvio padrão = 4,68), .

O grupo de 2 minutos de isquemia apresentou uma média de 37,52 seg. na primeira largada (desvio padrão = 11,16), diminuindo para 19,23 seg. na segunda, e mantendo em torno de 13 seg. nas 3^a e 4^a largadas (desvio padrão = 8,58; 7,11; 8,61 respectivamente).

Os ratos com 10 minutos de isquemia também iniciaram com médias mais altas, 34,64 seg. na primeira e 19,61 seg. na segunda largada (desvio padrão = 9,95 e 8,34, em ordem), diminuindo para 11,83 seg. e 10,73 seg., nas duas últimas (desvio padrão = 5,86 e 5,35, em ordem).

No grupo submetido à indução de tolerância à isquemia foi possível observar um padrão semelhante de comportamento aos outros grupos isquêmicos. A média da primeira saída foi 33,11 seg. (desvio padrão = 11,00); da segunda foi 19,75 seg. (desvio padrão = 12,67), da terceira, 16,20 seg. (desvio padrão = 10,80) e da quarta largada foi 13,02 seg. (desvio padrão = 6,06).

Nesta etapa do estudo do comportamento no labirinto aquático de Morris, observou-se uma queda progressiva das latências a cada largada. Houve diferença

estatisticamente significativa na segunda largada comparando os grupos isquêmicos com o controle (Fig. 14). Não houve diferença entre os grupos isquêmicos.

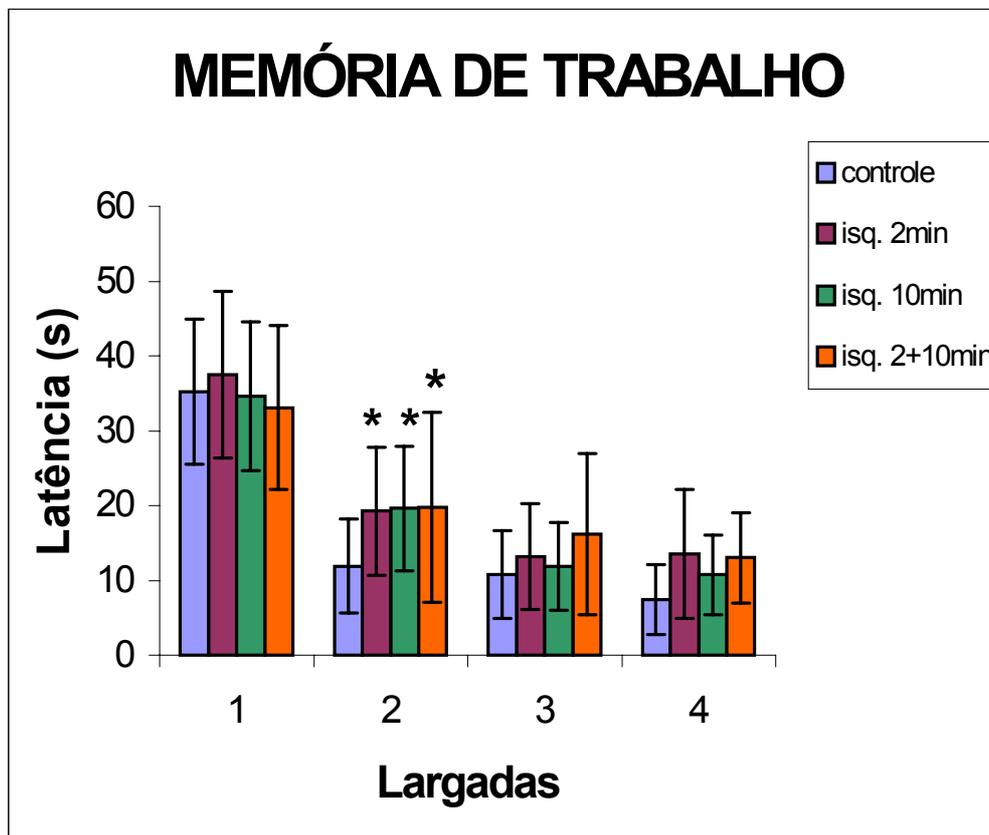


Figura 14: Este gráfico mostra a média das latências (s) de cada largada. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido pelo teste Duncan. Foi considerado significativo um $p < 0.05$ (*).

Tabela 3: Estudo da memória de trabalho

	controle	Isq. 2 min.	Isq. 10 min.	Isq. 2+10 min.
Largada 1	35,20 (9,72)	37,52 (11,16)	34,64 (9,95)	33,11 (11,00)
Largada 2	11,89 (6,26)	19,23* (8,58)	19,61* (8,34)	19,75* (12,67)
Largada 3	10,80 (5,88)	13,16 (7,11)	11,83 (5,86)	16,20 (10,80)
Largada 4	7,42 (4,68)	13,53 (8,61)	10,73 (5,35)	13,02 (6,06)

Todos os resultados estão representados pela média e desvio padrão.

Diferença estatisticamente significativa comparando com os demais grupos: * $p < 0.05$.

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO HIPOCAMPO

▪ Animais controles

O hipocampo dos animais controle, estudado com o procedimento de Nissl, mostrou a organização lamelar dos diferentes sub-campos do corno de Ammon assim como as três camadas do giro denteado. Foram facilmente identificados, entre os componentes hipocampais, as camadas piramidal e granulosa, pelo grande número de células nervosas. O corno de Ammon é formado pelo estrato lacunoso-molecular, que é separado do giro denteado pelo terceiro ventrículo, onde se destacam vasos de calibre grande, o estrato radiatum, o estrato piramidal, o estrato oriens, sendo o mais dorsal o alveus.

No estrato piramidal do hipocampo os somas das células piramidais estão muito próximos, e mostram um aspecto arredondado. No entanto, esta camada não se mostrou homogênea, e destacaram-se duas regiões paralelas ao alveus. Uma mais ventral, onde os somas piramidais estão densamente apertados e a outra, mais dorsal, onde os corpos neuronais distribuem-se menos compactamente. Os núcleos piramidais no sub-campo CA1 medem 12 μm . No núcleo destes neurônios identificavam-se um ou dois nucléolos. Através do soma neuronal ocorriam estruturas intensamente basófilas que correspondem aos corpúsculos de Nissl. Da zona ventral do estrato piramidal identificavam-se os dendritos apicais de fino diâmetro e que percorriam a porção dorsal do estrato radiatum. Entre os corpos das células piramidais observaram-se núcleos claros e de menor tamanho que correspondem aos astrócitos, assim como capilares sangüíneos.

As outras camadas do sub-campo CA1 mostraram menor densidade neuronal, numerosas células gliais e capilares, sendo o neuropilo muito desenvolvido (Figs. 15 e 16).

▪ **Análise dos cérebros de animais submetidos a isquemia de 2 minutos**

Os animais submetidos a 2 minutos de isquemia mostraram a camada piramidal de CA1 com células nervosas de aspecto semelhante às presentes nos animais controles. No entanto, às vezes visualizavam-se alguns neurônios de contornos irregulares. No giro denteado não foram identificadas alterações ao microscópio óptico (Figs. 17 e 18).

▪ **Análise dos cérebros de animais submetidos a isquemia de 10 minutos**

Após o insulto isquêmico de 10 minutos observaram-se diferentes alterações no estrato piramidal de CA1. A densa distribuição dos neurônios piramidais, bem como as duas sub-camadas que se detectaram nos animais controles, foram substituídas por um frouxa camada de células com muitos espaços entre si, deixados pela morte neuronal provocada pela isquemia, assim como pela diminuição de sua espessura. Identificaram-se neurônios enrugados de formas angulosas, irregulares, mostrando muitas vezes núcleos heterocromáticos. Às vezes, detectaram-se restos neuronais com intensa basofilia. Também foi observado material arredondado intensamente basófilo entre os restos neuronais. Os dendritos apicais eram facilmente observados e caracterizavam-se pelo aumento de diâmetro. Entremeados a estas figuras de degeneração neuronal encontravam-se neurônios de aspecto normal. As células gliais foram mais facilmente encontradas tanto na camada piramidal como nos outros estratos de CA1 (Figs. 19 e 20).

- **Análise dos cérebros de animais submetidos ao pré-tratamento (2 min de isquemia) e isquemia de 10 minutos**

Os animais protegidos antes do tratamento isquêmico de 10 minutos mostraram poucas modificações comparados com os animais controles. Na sub-região CA1 evidenciaram-se novamente as duas sub-camadas do estrato piramidal, contendo neurônios com características normais, mostrando núcleo pálido com um ou dois nucléolos e grumos de Nissl distribuídos em todo o citoplasma do soma neuronal. Às vezes, detectavam-se corpos heterocromáticos arredondados, que poderiam corresponder a algum resto celular. O número de células gliais está diminuído se comparado com os animais tratados com 10 minutos de isquemia (Figs. 21 e 22).

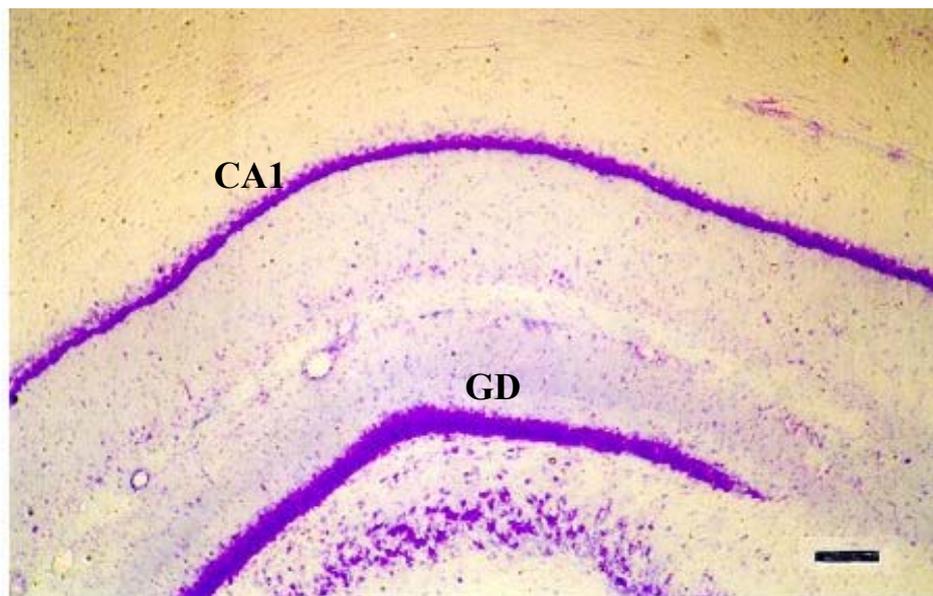


Figura 15: Fotomicrografia da região CA1 e giro denteado (GD) de um animal representativo do grupo controle (coloração de Nissl). Observar a espessura normal da camada piramidal de CA1. Barra =100 μ m.

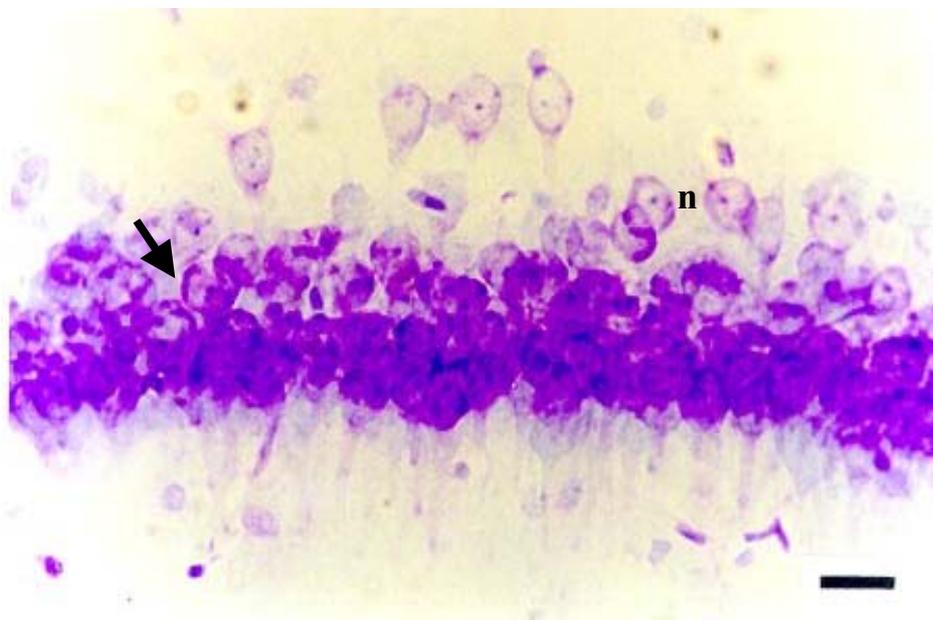


Figura 16: Fotomicrografia da camada piramidal de CA1 de um animal controle. Observar a grande quantidade de células densamente agrupadas, com somas arredondados, onde percebemos estruturas intensamente basófilas, os corpúsculos de Nissl (seta). O núcleo é pálido com 1 ou 2 nucléolos bem evidentes (n). Barra =20 μ m.

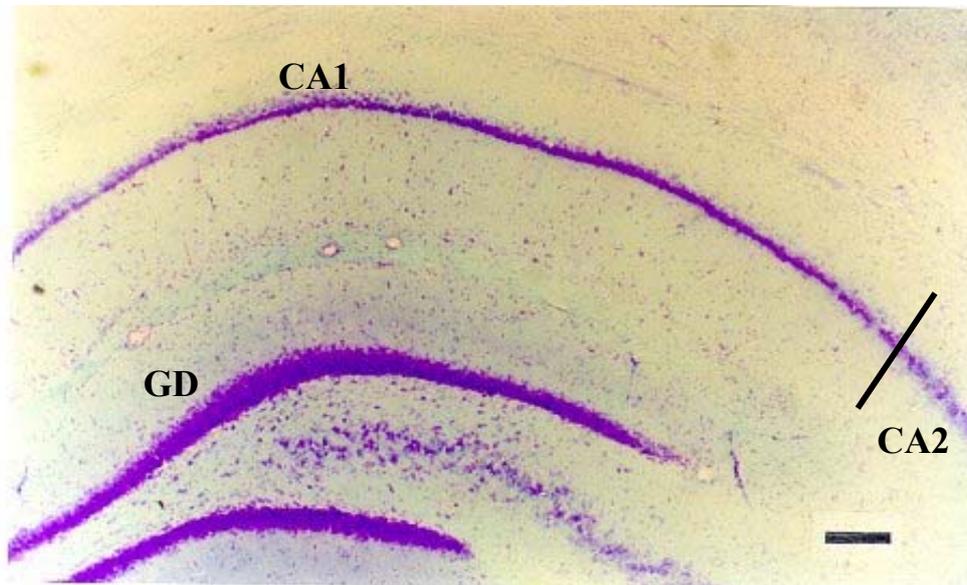


Figura 17: Fotomicrografia da região CA1, CA2 e giro denteado (GD) de um animal representativo do grupo isquêmico 2 min. (coloração de Nissl). Notar que em CA1 as células estão mais compactas, e em CA2 as células estão mais esparsas. Observar a espessura da camada piramidal de CA1. Barra =100 μ m.

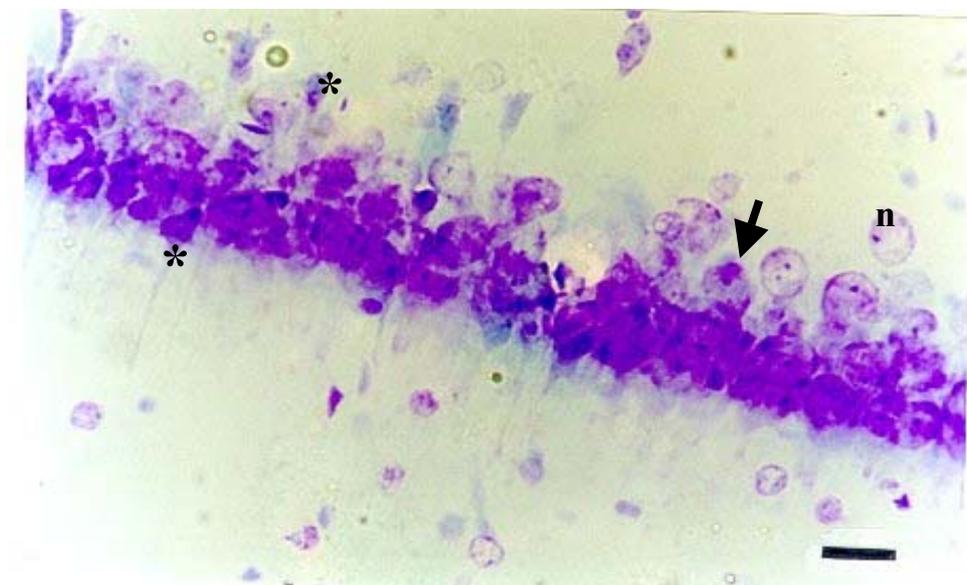


Figura 18: Fotomicrografia da camada piramidal de CA1 de um animal com 2min. de isquemia. Observar a camada piramidal densa, grande número de células, com somas arredondados, corpúsculos de Nissl bem evidentes (seta). Os núcleos são pálidos com 1 ou 2 nucléolos (n). Neste corte podemos observar alguns poucos neurônios de contornos irregulares(*). Barra =20 μ m.

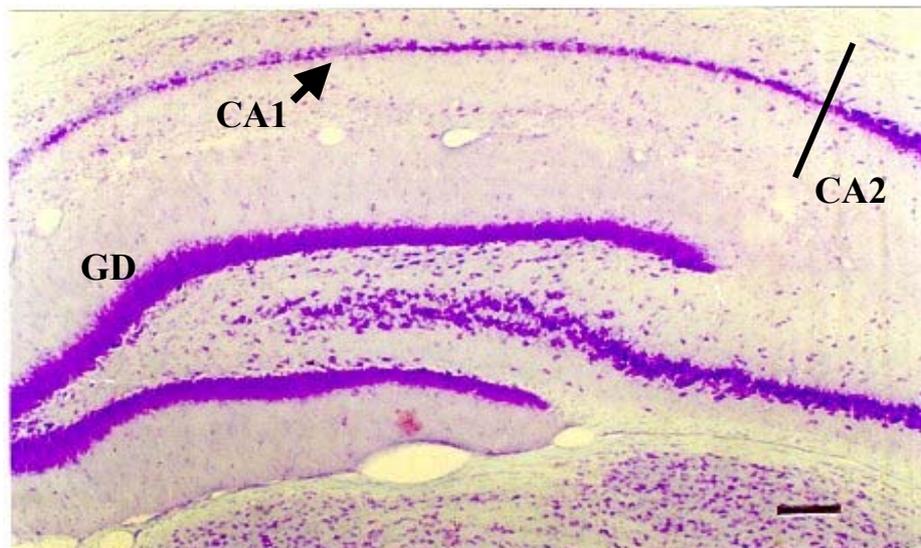


Figura 19: Fotomicrografia da região CA1, CA2 e giro denteado (GD) de um animal representativo do grupo isquêmico 10 min. (coloração de Nissl). Notar que a camada piramidal de CA1 está menos compacta, com um menor número de células, e em CA2 as células estão mais esparsas, mas com espessura normal. Barra =100 μ m.

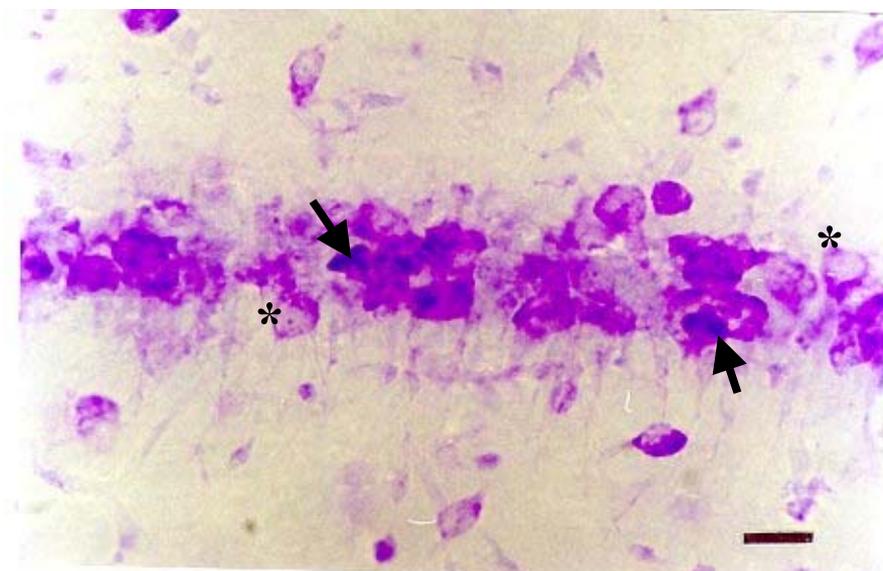


Figura 20: Fotomicrografia da camada piramidal de CA1 de um animal com 10min. de isquemia. Notar a diminuição da espessura da camada piramidal, vários neurônios com somas irregulares e restos celulares com intensa basofilia (seta). Algumas células de aspecto normal podem ser vistas (*). Barra =20 μ m.

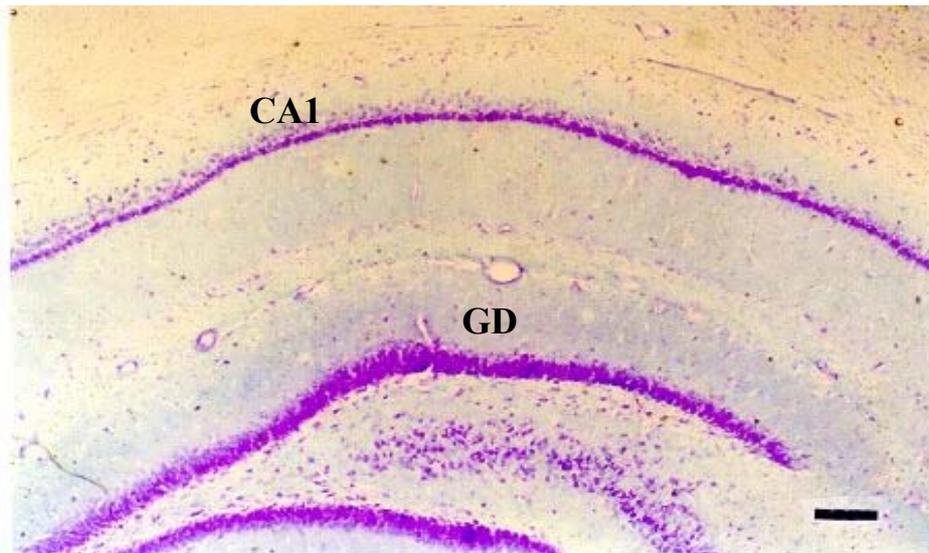


Figura 21: Fotomicrografia da região CA1 e giro denteado (GD) de um animal representativo do grupo com neuroproteção + isquemia de 10 min. (coloração de Nissl). Observar a espessura normal da camada piramidal de CA1, com células densamente agrupadas. O GD também apresenta aspecto normal. Barra =100 μ m.

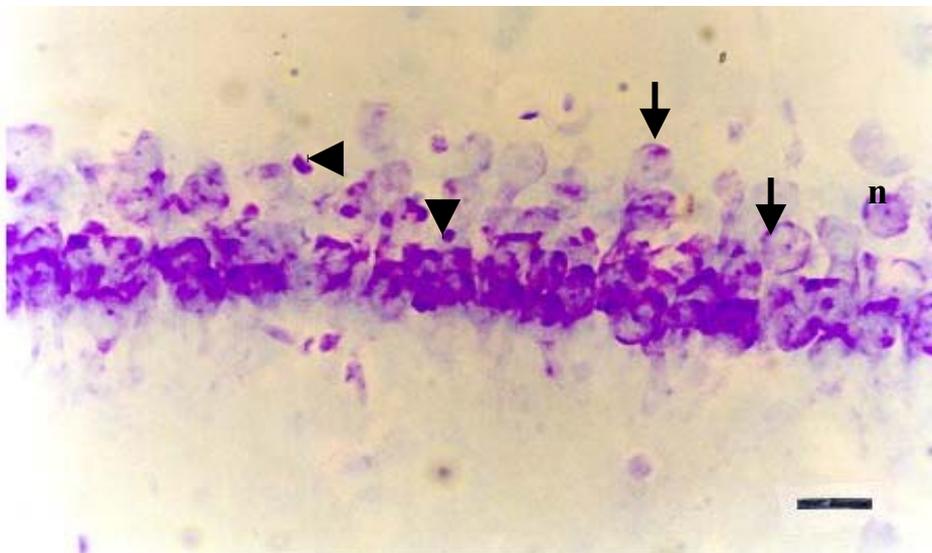


Figura 22: Fotomicrografia da camada piramidal de CA1 de um animal com neuroproteção + 10 min. de isquemia. Notar a camada piramidal densa, grande número de células com aspecto normal, somas arredondados, corpúsculos de Nissl bem evidentes (seta). Os núcleos são pálidos com 1 ou 2 nucléolos (n). Pode-se observar alguns neurônios de contornos irregulares e corpos heterocromáticos arredondados, sugerindo restos celulares (cabeça de seta). Barra =20 μ m.

4.3 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA:

O método de Cavalieri foi utilizado para medir o volume da região CA1 do hipocampo. Os hemisférios direito e esquerdo foram analisados separadamente para verificar se isquemia foi efetiva em ambos (Tabela 4). Na análise do volume houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo isquêmico (10 min.) e os grupos controle e neuroprotegidos ($p < 0,05$), com redução de 20% no volume total. Não houve diferença significativa entre CA1 direito e esquerdo (Fig. 22).

Tabela 4 : Volume da camada piramidal da região CA1 hipocampal (mm^3)

	CA1 direito	CA1 esquerdo
Controle (n=6)	0,7840 (0,1093)	0,8105 (0,1252)
Isq. 2min. (n=6)	0,8265 (0,0891)	0,8385 (0,1154)
Isq. 10min. (n=6)	0,6370 * (0,1121)	0,6400 * (0,1362)
Isq. 2+10min. (n=5)	0,7789 (0,1376)	0,7346 (0,1221)

Todos os valores são expressos como média e desvio padrão.

Diferença estatisticamente significativa comparando com os demais grupos: * $p < 0,05$.

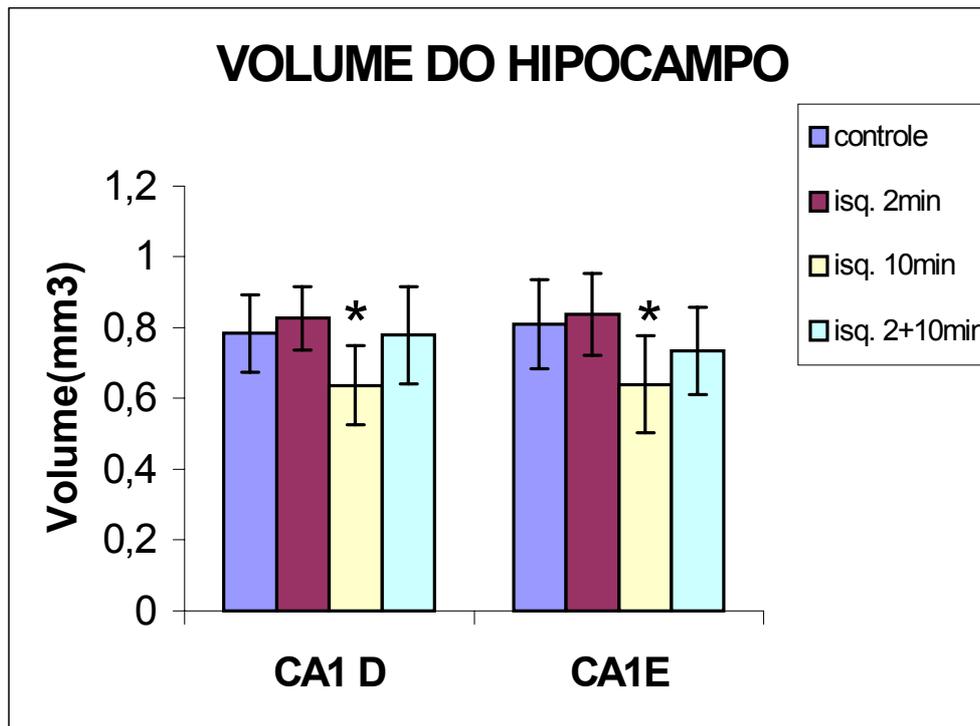


Figura 23: Os valores estão representados pela média e desvio padrão. O volume é dado em mm^3 . O teste estatístico usado foi ANOVA de uma via seguido pelo teste Duncan. Considerado significativo $p < 0.05$ *.

5. DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO COMPORTAMENTAL

Os resultados obtidos no estudo comportamental no labirinto aquático de Morris foram diferentes daqueles encontrados pela maioria dos autores citados na literatura. Inúmeros autores têm apontado alterações no aprendizado e memória em humanos e animais com lesão hipocampal após isquemia (SCOVILLE *et al.*, 1957; MORRIS, 1984; SQUIRE, 1992; NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997). Vários aparatos e testes são utilizados para esta averiguação em animais, entre eles, o labirinto radial, labirinto aquático e esquiva ativa (BLOCK, 1999).

No primeiro dia de treino, as latências foram mais elevadas em todos os grupos. O comportamento dos ratos foi mais exploratório, permanecendo grande parte do tempo junto às paredes da piscina ou mesmo mergulhando. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pois todos os animais estavam em uma mesma situação, a de reconhecimento de um novo ambiente.

Morris (1984), já descreveu o comportamento dos ratos de iniciar a exploração da piscina (labirinto aquático) junto às paredes, por este motivo a plataforma de escape foi colocada em um ponto intermediário entre o centro e a parede da piscina. Estes animais são nadadores naturais, não necessitando de outra motivação para realizarem a tarefa.

No segundo dia de treino houve diminuição das latências em todos os grupos. Duas hipóteses foram sugeridas para estes resultados: 1) a familiarização com a piscina aumenta as chances de encontrar a plataforma pois os animais cruzam mais o labirinto e não ficam explorando tanto as bordas; 2) houve um aprendizado real da tarefa (MORRIS, 1984).

Nos dias subseqüentes (3º, 4º, 5º, 6º dias), houve uma diminuição acentuada das latências, que foi uniforme em todos os grupos, sugerindo que todos os animais aprenderam a tarefa de forma eficaz, ou que os animais isquêmicos tenham se guiado pelo odor dos animais que perfizeram o trajeto antes, visto que os animais controle realizaram o treino sempre antes dos demais.

Morris (1984), descreveu alguns testes realizados no labirinto aquático, chamando a atenção para o fato de que a água controla o fator olfativo, e também que o aprendizado se deve a memorização de sinais extra-labirinto. Portanto, podemos desconsiderar a hipótese que os ratos submetidos à isquemia tenham se utilizado da olfação para seguir os rastros de odor dos outros animais. Além disso, as lesões hipocâmpais não só comprometem a memória espacial, como também a discriminação olfativa, entre outras (SQUIRE, 1992).

Na fase 2 (com a plataforma colocada no lado oposto à fase 1), também não houve diferença estatisticamente significativa, sugerindo que os ratos, sete dias após, lembravam da tarefa anterior e foram capazes de aprender a nova localização da plataforma de escape com grande rapidez. É provável que o teste realizado sem a plataforma, 24 horas após o término da fase 1, possa ter colaborado com a maior rapidez no aprendizado na fase seguinte, pois a última memória que estes animais tiveram em relação ao labirinto aquático foi a de não encontrar a plataforma no local em que esteve durante os treinos, e, como havia uma plataforma, seria razoável procurar em outro local na piscina.

O teste realizado sem a plataforma para averiguar o número de cruzamentos, e o tempo que os animais permaneceram no quadrante alvo, também não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo isquêmico de 10 minutos e os

outros grupos, tanto na fase 1 quanto na fase 2. Este resultado não surpreende, posto que os resultados anteriores falharam em mostrar tal diferença, e o teste é apenas um reflexo do desempenho demonstrado nos treinos. Kiyota e col. (1991), relataram que os animais controles permaneciam mais tempo explorando o local onde a plataforma estava, enquanto os ratos isquêmicos exploravam mais próximos da parede, entretanto, o número de cruzamentos sobre o local da plataforma não diferiram. Estes achados sugerem que os animais isquêmicos podem encontrar a plataforma utilizando uma estratégia diferente.

O aprendizado consiste em responder de uma determinada maneira frente a um determinado estímulo. A extinção é um tipo de aprendizado em que se deixa de responder a um estímulo específico quando este não vem mais acompanhado de outro que, anteriormente poderia ter sido fonte de prazer ou medo. Este tipo de aprendizado, em que um estímulo vem acompanhado de outro é chamado condicionamento clássico (IZQUIERDO, 1989). O teste sem a plataforma pode ter provocado o aprendizado de extinção, pois, ao seguir os sinais extra-labirinto (estímulo 1), não foi possível encontrar a plataforma (estímulo 2). Esta situação repetiu-se no primeiro dia de treino da fase 2, pois a plataforma de escape havia sido transferida para o quadrante oposto, reforçando este aprendizado. No mesmo modelo experimental, Rodrigues (2001) estudou a extinção de tarefas espaciais em labirinto aquático em ratos Wistar submetidos à 10 minutos de isquemia e observou que estes animais tinham uma resistência à extinção, mas esta resistência não foi encontrada nos animais que sofreram 20 minutos de isquemia.

Um estudo utilizando o labirinto aquático para avaliar função do hipocampo, com animais submetidos a 15 minutos de isquemia por oclusão de 4 vasos, com perda

neuronal de 80 a 85% na região CA1, mostrou que não houve comprometimento do aprendizado na fase de retenção padrão (realizada logo após a fase de aquisição). Foi observado um pior desempenho, dos animais isquêmicos, na fase de retenção, com um regime de treino modificado e na fase reversa com a plataforma no lado oposto à da fase anterior. Estes resultados foram comparados com animais submetidos à isquemia e transplante de tecido hipocampal fetal, os quais obtiveram melhores resultados em todos os testes (NETTO *et al.*, 1993). Estes autores realizaram várias fases de teste, enquanto que no nosso trabalho utilizamos apenas duas (fase de aquisição e fase reversa), e não encontramos diferença estatisticamente significativa nas latências entre os grupos. Como os resultados citados referem-se a animais com tempos de isquemia diferentes (15 e 10 min., respectivamente), poderíamos sugerir que os ratos com 15 min. de isquemia necessitam de um maior número de sessões de treino para aprender esta tarefa.

Block e Schwarz (1997) relataram que animais isquêmicos apresentam um déficit de aprendizado no início dos testes comportamentais e que este déficit diminui com o aumento do número de treinos.

A isquemia global por 5 minutos em gerbilos foi suficiente para comprometer o aprendizado espacial destes animais no labirinto de Morris (IQBAL *et al.*, 2001).

Utilizando o modelo de isquemia global transitória por oclusão de 4 vasos em ratos, e por oclusão de 2 vasos em gerbilos, vários autores descreveram um déficit de aprendizado no labirinto aquático. Os autores que não descreveram o déficit, iniciaram os testes com um tempo maior de reperfusão. Todos os trabalhos diferem na metodologia, como tempo de isquemia e reperfusão, número de treinos, temperatura da água, tamanho da piscina, e também na porcentagem de perda neuronal em CA1 (BLOCK, 1999). Green e colaboradores (1992) estudaram ratos com 12,5 minutos de

isquemia por oclusão de 4 vasos associado à hipotensão resultando em 90% de perda neuronal em CA1, 5 semanas após a reperfusão, em uma piscina com água a 21°C, com um total de 40 treinos, não encontrando diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Block e Schwarz (1997) utilizaram ratos com 20 minutos de isquemia por oclusão de 4 vasos com dano neuronal na região CA1 de 90 a 100%, testando-os, no labirinto aquático, 1 semana após a reperfusão. A piscina continha água a 26°C e foram realizados 20 treinos. Neste estudo, houve um comprometimento do aprendizado e memória dos animais submetidos à isquemia comparados com os controles.

Kiyota e colaboradores (1991), estudaram o comportamento de ratos submetidos à isquemia de 5 e 20 minutos, após 6 semanas de reperfusão, no labirinto radial de 8 braços, e no labirinto aquático de Morris após 13 semanas, observando que os animais isquêmicos apresentaram um desempenho tão bom quanto os animais controles em ambos os testes. Em seu estudo piloto, eles evidenciaram um comprometimento na tarefa de escape na água nos animais submetidos a 20 minutos de isquemia, com 1-2 semanas de reperfusão, porém, com melhora após 4 semanas, sugerindo, então, que o déficit observado pode ser devido mais a um distúrbio funcional transitório do cérebro, e menos relacionada com o dano do hipocampo. Gionet e colaboradores (1991), também não observaram diferença estatisticamente significativa em tarefa de aprendizado e memória em labirinto aquático. Estes autores realizaram isquemia por oclusão de 2 vasos com hipotensão em ratas Sprague-Dawley.

No presente trabalho utilizamos ratos Wistar submetidos à 10 minutos de isquemia global. Estes ratos foram testados em piscina com água a 26°C após 3 a 4 semanas de reperfusão, em duas fases totalizando 10 sessões de treino. Não houve

déficit no aprendizado. A metodologia e os resultados são condizentes com os encontrados por Kiyota e col. (1991) e Green e col. (1992).

Os experimentos citados acima sugerem que algumas variáveis podem interferir com os resultados, como o tempo de reperfusão e o grau de lesão no hipocampo.

O evento isquêmico desencadeia uma cascata de processos patofisiológicos que culminam com a morte celular (BLOCK, 1999). Após 7 dias de reperfusão, ocorre progressiva fragmentação dos neurônios seguidas de proliferação glial (KIRINO, 1982; PULSINELLI, 1997). É importante salientar que, 1 semana após a isquemia ainda estão ocorrendo alterações celulares nas regiões mais vulneráveis do encéfalo, fato este, que pode justificar o pior desempenho dos animais com isquemia quando testados neste período de tempo. É provável que as células hipocampais sobreviventes, após ter passado a primeira semana de alterações patofisiológicas, iniciem um processo de plasticidade, e/ ou sejam suficientes para manter as funções do hipocampo, ao menos neste modelo animal. Isto pode explicar o desempenho idêntico entre os animais isquêmicos e os controles nas tarefas de aprendizado espacial.

Neste experimento também foi testado a memória de trabalho, em que os animais tinham que achar a plataforma de escape em um local diferente a cada dia, e observou-se que os animais controle obtiveram melhor desempenho na segunda e na quarta largadas. Os animais dos grupos isquêmicos de 2 e 10 minutos e os do grupo neuroprotegido (2 + 10 min.) tiveram um pior desempenho quando comparados com os controles, mas não houve diferença quando comparados entre eles. Ratos submetidos a isquemia global de 12,5 minutos a uma temperatura de 37°C, exibiram grave perda neuronal em CA1 e comprometimento significativo no teste de memória de trabalho

quando comparados a ratos que sofreram isquemia a uma temperatura de 30°C (hipotermia) (GREEN *et al.*, 1992).

As memórias de trabalho e de referência, testadas no labirinto radial de 8 braços, mostrou o comprometimento no aprendizado dos animais isquêmicos, embora de difícil explicação, os ratos isquêmicos mostraram maior déficit na memória de trabalho que na de referência (KIYOTA *et al.*, 1991).

Analisando os resultados obtidos no teste de memória de trabalho, observamos que os animais controles apresentaram um melhor desempenho, porém os outros animais dos grupos isquêmicos mostraram um desempenho semelhante àqueles obtidos nas fases 1 e 2, sugerindo que não houve piora do desempenho destes animais, e sim, uma melhor realização do teste por parte dos controles.

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA:

O hipocampo dos animais controles e dos submetidos à isquemia de 2 minutos, corados com violeta cresil, mostraram uma organização lamelar normal, os somas das células da camada piramidal muito próximos e com aspecto arredondado, com núcleo pálido, 1 ou 2 nucléolos, e estruturas intensamente basófilas que ocorriam através de todo o citoplasma (substância de Nissl). Algumas células gliais também puderam ser visualizadas. Segundo Eke e colaboradores (1990), estas células apresentam-se com aspecto normal, pois os núcleos podem ser prontamente diferenciados do citoplasma circundante.

Os animais controles e aqueles submetidos à isquemia sub-letal tampouco apresentaram morte neuronal (KIRINO *et al.*, 1991; GREEN *et al.*, 1992; NETTO *et al.*, 1993; GIONET *et al.*, 1991).

Diferentemente, os animais que sofreram isquemia de 10 minutos mostraram uma distribuição mais frouxa dos somas neuronais, com muitos espaços entre as células decorrentes da morte neuronal. Muitos neurônios de aspecto irregular foram visualizados, e, às vezes, restos neuronais com basofilia intensa. As células gliais foram mais facilmente visualizadas, assim como vários neurônios de aspecto normal. Não houve perda maciça dos neurônios de CA1.

Os neurônios em degeneração apresentam-se com aumento da densidade citoplasmática, e com o núcleo em desintegração, não sendo possível a diferenciação. O tamanho e a forma das células também estão alterados (EKE *et al.*, 1990). Gionet e colaboradores (1991), observaram densa acidofilia em secções de hipocampo corados com azul celestina e fucsina ácida, obtidos de ratos que sofreram 10 minutos de isquemia. Estes autores encontraram 100% de perda neuronal na camada piramidal da região CA1 hipocampal do cérebro de ratos. Perda neuronal de cerca de 80% foi também descrito no modelo de isquemia global em ratos (NETTO *et al.*, 1993). Ginsberg e Busto (1989) mostraram dano neuronal de 40% e 85% em 10 minutos e 20 minutos de isquemia, respectivamente.

Os animais submetidos à neuroproteção (2 minutos de isquemia) e isquemia de 10 minutos mantiveram as características celulares normais, semelhante aos controles, com poucos corpos heterocromáticos, sugestivos de algum resto celular. Estes resultados demonstram que a tolerância induzida à isquemia protege as células contra um evento isquêmico letal. Estes resultados são compatíveis com os encontrados na literatura sobre neuroproteção por evento isquêmico (NETTO *et al.*, 1993; KIRINO *et al.*, 1991), por hipotermia (GREEN *et al.*, 1992; COLBOURNE & CORBETT, 1994), ou por fármacos (IQBAL *et al.*, 2001; TUOR, 1997).

5.3 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA :

Através do método de Cavalieri, foi avaliado o volume do subcampo CA1 do hipocampo, em ambos os hemisférios cerebrais. Os resultados obtidos mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nos animais isquêmicos comparados com os animais controles, isquemia 2 minutos e com os submetidos a neuroproteção (2+10 min.). Não houve diferença entre os dois hemisférios. A diminuição do volume de CA1 foi de aproximadamente 20% nos animais isquêmicos sem neuroproteção.

Maier e West (2001) determinaram o volume da região CA1 do hipocampo de ratos Sprague-Dawley com 10 dias de vida pós-natal, encontrando um valor médio de 2 mm³ (+/- 0.1) nos animais controles. Utilizando ratos Wistar adultos, Rodrigues (2001) calculou um volume médio em torno de 2.45 mm³ para os controles e 1.8 mm³ para os animais sujeitos à 10 minutos de isquemia. Na nossa análise, encontramos um volume médio de 1.59 mm³ para os controles e 1.27 mm³ para os isquêmicos. Estes resultados são distintos daqueles mencionados acima, mesmo deste último que utilizou uma metodologia semelhante.

Estas diferenças não podem ser facilmente explicadas, pois não há outros trabalhos sobre volume da região CA1 hipocampal em ratos Wistar. Uma hipótese seria diferenças na preparação do encéfalo, como a coloração, por exemplo (HE, Nissl), e outra seria causada por diferenças na aferição.

Na literatura, encontramos dados referindo perda neuronal total ou quase total na região CA1 do hipocampo após 20, 15 ou 10 min. de isquemia (NETTO *et al.*, 1993; BLOCK & SCHWARZ, 1997). Como a análise histológica utilizada não é a mesma, não se pode comparar diretamente estes dados de perda neuronal com os da redução do

volume. Entretanto, pode-se afirmar que não ocorreu morte celular total após 10 min. de obstrução ao fluxo de sangue cerebral, com base no volume e na análise morfológica. Todos os pesquisadores que observaram um pior desempenho em estudos de aprendizado e memória em ratos submetidos à isquemia, também relatam grande perda neuronal no hipocampo (SQUIRE, 1992; NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997, BLOCK, 1999). Olsen e colaboradores (1994), demonstraram que animais com uma lesão total da região ântero-dorsal de CA1, apresentaram um comprometimento nas tarefas de memória, enquanto que os animais com lesão parcial, circunscritas à região ântero-dorsal de CA1, não mostraram déficit significativo, sugerindo uma relação linear entre o número de células viáveis na região CA1 do Corno de Ammon e o déficit no desempenho em labirinto aquático.

Os efeitos da indução de tolerância à isquemia foram reproduzidos neste estudo, submetendo os ratos a 2 minutos de isquemia global transitória, seguido por uma isquemia de 10 minutos, após 24 horas. A tolerância conferida pelo episódio subletal é somente observada em um intervalo de tempo entre 12 horas e 7 dias de reperfusão (KITAGAWA *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1992). Este protocolo é específico para as células piramidais de CA1, e não protege as células vulneráveis do hilo do giro denteado (KOGURE e KATO, 1993; SUGIMOTO *et al.*, 1993).

As estratégias que visam a redução do dano isquêmico parecem só ser eficazes quando são instaladas previamente ao insulto (SIMPSON e ISACSON, 1993; AMES *et al.*, 1995; RIEPE *et al.*, 1996; GINSBERG, 1997).

A hipotermia é outra importante estratégia empregada para promover proteção aos tecidos. Desde o final dos anos 80, têm-se observado que o resfriamento leve a moderado do tecido cerebral promove neuroproteção, e, contrariamente, pequena

elevação da temperatura no cérebro é capaz de piorar a lesão (GINSBERG, 1995 b). Doze horas de hipotermia pós-isquêmica, reduziu significativamente a perda neuronal na região CA1 hipocampal, contra uma isquemia de 5 minutos (COLBOURNE & CORBETT, 1994; COLBOURNE et al., 1998). Green e colaboradores (1992), também demonstraram a proteção conferida aos neurônios contra uma isquemia de 12,5 minutos, com hipotermia intra-isquêmica. Esta proteção manteve intacta a função do hipocampo, que pode ser visto através dos resultados dos testes comportamentais.

O estresse prolongado também é um fator prejudicial para as funções cognitivas, tanto em humanos quanto em animais. O estresse provoca uma resposta de liberação de catecolaminas e glicocorticóides, que em níveis moderados e breves causa alterações reversíveis nas células mais vulneráveis do hipocampo e do córtex, porém em níveis mais elevados e por tempo prolongado causa alterações irreversíveis de perda neuronal, particularmente em animais mais velhos (McEWEN & SAPOLSKY, 1995). Entretanto, foi demonstrado que doses de dexametasona administrado, no mínimo 3-4 horas antes de um insulto hipóxico-isquêmico, causa proteção em animais jovens, mas não nos mais velhos (TUOR, 1997).

A revisão da literatura mostrou resultados similares aos obtidos neste experimento (GREEN *et al.*, 1992; KIYOTA *et al.*, 1991), entretanto, outros autores obtiveram resultados diferentes (SQUIRE, 1992; NETTO *et al.*, 1993; NELSON *et al.*, 1997). Resumindo, não é possível fazer uma correlação direta dos resultados obtidos neste estudo com os da literatura, devido às diferentes técnicas e metodologias empregadas. No entanto, podemos inferir que, uma diminuição de 20% no volume da camada piramidal de CA1 não é suficiente para provocar déficit de aprendizado no

labirinto aquático de Morris, ou, que o tempo de reperfusão tenha permitido adaptações plásticas no hipocampo destes animais.

6. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho podemos concluir que:

- 1) O modelo de tolerância induzida à isquemia foi reproduzido submetendo um grupo de animais à 2 min de isquemia e, 24 horas após, a uma isquemia de 10 min. Não houve diferença estatisticamente significativa no volume calculado da região CA1 do hipocampo destes animais comparados com os animais controle e com os animais que sofreram apenas uma isquemia de 2 min. Este resultado demonstra que a isquemia de 2 minutos desencadeou fatores de proteção celular contra uma isquemia mais prolongada (10 min.).
- 2) Os animais submetidos à neuroproteção mais isquemia de 10 minutos não tiveram déficit de aprendizado no labirinto aquático de Morris, em todas as tarefas, quando comparados com os grupos controle, isquemia de 2 min. e isquemia de 10 min. Os animais submetidos à isquemia de 10 min. também não apresentaram déficit nestas tarefas
- 3) O volume da camada piramidal da região CA1 do hipocampo dos grupos controle, isquemia 2 minutos e isquemia 2+10 min foram semelhantes entre si. O grupo isquêmico de 10 min. apresentou um valor 20% inferior aos demais. Este valor é estatisticamente significativo, confirmando que 10 minutos de isquemia global provoca morte celular.

4) Não houve déficit de aprendizado em nenhum dos grupos estudados: a) no grupo controle não era esperado comprometimento pois não há lesão; b) no grupo isquêmico de 2 minutos também não há déficit, pois este tempo de isquemia não provoca morte neuronal, como foi confirmado com o volume; c) o grupo submetido à neuroproteção também não apresentou comprometimento de aprendizado, sugerindo que houve proteção tanto morfológica quanto funcional; d) o grupo que sofreu 10 min. de isquemia também não apresentou déficit de aprendizado embora tenha apresentado morte neuronal (diminuição de volume), sugerindo que a perda neuronal observada não foi suficiente para provocar comprometimento do aprendizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D. G. & WITTER, M.P., W. Hippocampal formation: *The Rat Nervous System*. G. Paxinos. Sidney, Academic Press. 21: 46-55, 1995.
- AMES, A., 3RD, MAYNARD, K. I. & KAPLAN, S. Protection against CNS ischemia by temporary interruption of function- related processes of neurons. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 15: 433-9, 1995.
- ASBURY, A. K. *Diseases of the nervous system: clinical neurobiology*. A. K. Asbury, G. M. McKhann and I. W. McDonald. Philadelphia, W.B. Saunders. 1, 1992.
- BARONE, F.C.; WHITE, R.F.; SPERA, P.A.; ELLISON, J.; CURRIE, R.W.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G.Z. Ischemic preconditioning and brain tolerance: Temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. **Stroke**, 29: 1937-1951, 1998.
- BAYER, S. A. Hippocampal region: *The Rat Nervous Sistem*. G. Paxinos. Academic Press Australia, 1985.
- BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361: 31-39, 1993.
- BLOCK, F. Global ischemia and behavioural deficits. **Progr. in Neurobiol.**, 58: 279-295, 1999.
- BLOCK, F.; SCHWARZ, M. Correlation between hippocampal neuronal damage spatial learning deficit due to global ischemia. **Pharmacol. Biochem. and Behaviour**, 56: 755-761, 1997.
- BROWN, M.M.; HACHINSKI, V.C. *In: ISSELBACHER, K.J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; FAUCI, A.S.; KASPER, D.L. (eds.) Harrison's principles of internal medicine*, 30th Ed., Vol. 1, New York, McGraw-hill, 1994.
- BUZSAKI, G., FREUND, T. F., BAYARDO, F. & SOMOGYI, P. Ischemia-induced changes in the electrical activity of the hippocampus. **Exp. Brain Res.**, 78: 268-78, 1989.
- CIPOLOTTI, L.; SHALLICE, T.; CHAN, D.; FOX, N.; SCAHILL, R.; HARRISON, G.; STEVENS, J.; RUDGE, P. Long-term retrograde amnesia- the crucial role of the hippocampus. **Neuropsychol.**, 39: 151-172, 2001.

- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; REMOLLEAU, S.; AGGOUN-ZOUAOU, D.; BEN-ARI, Y. Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia. **Biomed and Pharmacoter.**,52:264-269, 1998.
- CHEN, J.; SIMON, R. Ischemic tolerance in the brain. **Neurology**, 48:306-311, 1997.
- COLBOURNE, F., CORBETT, D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbils. **Brain Res.**, 654:265-272, 1994.
- COLBOURNE, F.; AUER, R.N.; SUTHERLAND, G.R. Caracterização of postischemic behavioural deficits in gerbils with and without hypothermic neuroprotection. **Brain Res.**, 803:69-78, 1998.
- DESHPANDE, J., BERGSTEDT, K., LINDEN, T., KALIMO, H. & WIELOCH, T. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. **Exp. Brain Res.**, 88: 91-105, 1992.
- DIEMER, N. H., JORGENSEN, M. B. & JOHANSEN, J. F. Significance of Intra- and Postischemic Pathophysiological Processes for Development of Ischemic Nerve Cell Loss. New York, Raven Press, 1987.
- DIXON, K. C. Ischaemia and the neuron. **Neurohistochemistry**. C. W. M. Adams. Amsterdam, Elsevier, 558-598, 1965.
- DUGAN, L.L.; CHOI, D.W. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. *In*: SIEGEL, G.J. *et al.* (eds), **Basic Neurochemistry**, 6th Ed., New York, Raven Press, 1999.
- EIMERL, S. & SCHRAMM, M. The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. **J. Neurochem.**, 62: 1223-1226, 1994.
- EKE, A.; CONGER, K. A.; ANDERSON, M.; GARCIA, J. H. Histologic assessment of neurons in rat models of cerebral ischemia. **Stroke**, 21:299-304, 1990.
- ERECINSKA, M. & SILVER, I. A. Loss of neuronal Calcium homeostasis in ischemia. **Primer on Cerebrovascular Diseases**. K. M. A. Welch, I. R. Caplan, D. J. Reis, B. K. Siesjö and B. Weir. New York, Academic Press: 178-183, 1997.
- FAROOQUI, A. A., HAUND, S. E. & HORROCKS, L. A. Ischemia and Hypoxia. **Basic Neurochemistry**. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers and P. B. Mollinoff. New York, Raven Press: 867-883, 1995.

- FERRER, I., MARTIN, F., SERRANO, T., REIRIZ, J., PEREZ-NAVARRO, E., ALBERCH, J., MACAYA, A. & PLANAS, A. M. Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. **Acta Neuropathol.**, 90: 504-10, 1995.
- FUKUDA, T.; WANG, H.; NAKANISHI, H.; YAMAMOTO, K.; KOSOKA, T. Novel non-apoptotic morphological changes in neurons of the mouse hippocampus following transient hypoxic-ischemia. **Neurosci. Res.**, 33: 49-55, 1999.
- GAO, T. M. & XU, Z. C. In vivo intracellular demonstration of an ischemia-induced postsynaptic potential from CA1 pyramidal neurons in rat hippocampus. **Neurosci.**, 75: 665-9, 1996.
- GASS, P., SOMMER, C. & KIESSLING, M. Immediate-early genes expression after global cerebral ischemia and ischemia tolerance induction. **Primer on Cerebrovascular Diseases**. K. M. A. Welch, I. R. Caplan, D. J. Reis, B. K. Siesjö and B. Weir. New York, Academic Press: 230-234, 1997.
- GINSBERG, M. D. & BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**, 20: 1627-42, 1989.
- GINSBERG, M.D. Animal models of global and focal cerebral ischemia. In: WELCH, K.M.A.; REIS, D.J.; CAPLAN, L.R.; SIESJÖ, B.K.; WEIR, B. (eds.), **Primer on cerebrovascular diseases**. San Diego, California, Academic Press, 1997.
- GINSBERG, M.D. The validity of rodent brain-ischemia models is self-evident. **Arch. Neurology**, 53: 1065-1067, 1996.
- GINSBERG, M.D. Neuroprotection in brain ischemia: An Update (Part I). **The Neurosci.**, 1: 95-103, 1995 a.
- GINSBERG, M.D. Neuroprotection in brain ischemia: An Update (Part II). **The Neurosci.**, 1: 164-175, 1995 b.
- GIONET, T. X., THOMAS, J. D., WARNER, D. S., GOODLETT, C.R., WASSERMAN, E. A., WEST, J. R. Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats. **Stroke**, 22:1040-1047, 1991.
- GREEN, E.J., DIETRICH, W. D., van DIJK, F., BUSTO, R., MARKGRAF, C. G., McCABE, P. M., GINSBERG, M. D., SCHNEIDERMAN, N. Protective effects of brain hypothermia on behaviour and histopathology following global cerebral ischemia in rats. **Brain Res.**, 580: 197-204, 1992.
- GROTTA, J. Rodent models of stroke limitations: what can we learn from recent clinical trial of thrombolysis. **Arch. Neurol.**, 53: 1067-1069, 1996.

- GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NIENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. Some news, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, 96:379-394, 1988.
- GUO, Y.; WU, WJ.; QIU, Y.; TANG, XL.; YANG, Z.; BOLLI, R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. **AJP- Heart and Circul. Physiol.**, 275:1375-1387, 1998.
- HERON, A., POLLARD, H., DESSI, F., MOREAU, J., LASBENNES, F., BENARI, Y. & CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. **J. Neurochem.**, 61: 1973-6, 1993.
- 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: 123-8, 1995.
- INOUE, T.; KATO,H.; ARAKI,T.; KOGURE, K. Emphasized selective vulnerability after repeated nonlethal cerebral ischemic insults in rats. **Stroke**, 23:739-745, 1992.
- IZQUIERDO, I. Aprendizaje y memoria. *In*: HOUSSAI, B.A. (eds.), **Fisiologia Humana**. Buenos Aires, El Ateneo, 1989.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 63: 19-32, 1995.
- JOHANSEN, F. Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia: morphometric, functional, and therapeutic investigations. **Acta Neurol Scand.**, 88: 1-32,1993.
- JØRGENSEN, M.B. The role of signal transduction in the delayed necrosis of the hippocampal CA1 pyramidal cells following transient ischemia. **Acta Neurol. Scand.**, 87: 1-20, 1993.
- KATOH, A.; ISHIBASHI, C.; SHIOMI, T.; TAKAHARA, Y.; EIGYO, M. Ischemia-induced irreversible deficit of memory function in gerbils. **Brain Res.**, 577: 57-63, 1992.
- KATO, H., KOGURE, K., LIU, Y., ARAKI, T. & ITOYAMA, Y. Induction of NADPH-diaphorase activity in the hippocampus in a rat model of cerebral ischemia and ischemic tolerance. **Brain Res.**, 652: 71-5, 1994.

- KATO, H., KOGURE, K., ARAKI, T., LIU, X. H., KATO, K. & ITOYAMA, Y. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the hippocampus following ischemia in a gerbil model of ischemic tolerance. **J Cereb Blood Flow Metab.**, 15: 60-70, 1995.
- KIHARA, S., SHIRAISHI, T., NAKAGAWA, S., TODA, K. & TABUCHI, K. Visualization of DNA double strand breaks in the gerbil hippocampal CA1 following transient ischemia. **Neurosci. Lett.**, 175: 133-6, 1994.
- KIYOTA, Y., MIYAMOTO, M., NAGAOKA, A. Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia. **Brain Res.**, 538:295-302, 1991.
- KIRINO, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. **Brain Res.**, 239: 57-69, 1982.
- KIRINO, T., TAMURA, A. & SANO, K. Chronic maintenance of presynaptic terminals in gliotic hippocampus following ischemia. **Brain Res.**, 510: 17-25, 1990.
- KIRINO, T., TSUJITA, Y. & TAMURA, A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 11: 299-307, 1991.
- KIRINO, T., ROBINSON, H. P., MIWA, A., TAMURA, A. & KAWAI, N. Disturbance of membrane function preceding ischemic delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 12: 408-17, 1992.
- KIRINO, T. Ischemic tolerance. *In*: WELCH, K.M.A.; REIS, D.J.; CAPLAN, L.R.; SIESJÖ, B.K.; WEIR, B. (eds.), **Primer on cerebrovascular diseases**. San Diego, California, Academic Press, 1997.
- KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; TAGAYA, M.; HATA, R.; UEDA, H.; NIINOBE, M.; HANDA, N.; FUKUNAGA, R.; KIMURA, K.; MIKOSHIBA, K.; KAMADA, T. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain. **Brain Res.**, 528: 21-24, 1990.
- KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; OHTSUKI, T.; KUABARA, K.; MABUCHI, T.; YAGITA, Y.; HORI, M.; YANAGIHARA, T. Extended neuronal protection induced after sublethal ischemia adjacent to the area with delayed neuronal death. **Neurosci.**, 96: 141-146, 2000.
- KITAGAWA, K.; MATSUMOTO, M.; MABUCHI, T.; YAGITA, Y.; MANDAI, K.; MATSUSHITA, K.; HORI, M.; YANAGIHARA, T. Ischemic tolerance in hippocampal CA1 neurons studied using contralateral controls. **Neurosci.**, 81: 989-998, 1997.

- KOBAYASHI, S., HARRIS, V. A. & WELSH, F. A. Spreading depression induces tolerance of cortical neurons to ischemia in rat brain. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 15: 721-7, 1995.
- KOGURE, K. & KATO, H. Neurochemistry of Stroke. **Stroke: Pathophysiology, diagnosis and management**. H. J. M. Barnett, E. M. Stein and J. P. Mohr. New York, Churchill Livingstone: 69-99, 1993.
- KOPKIN, I. J. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. **Basic Neurochemistry**. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers and P. B. Mollinoff. New York, Raven Press: 899-918, 1995.
- LASHLEY, K. S. In search of the engram. **Symp. Soc. Experim. Biol.**, 4: 454-482, 1950.
- LEIST, N. & NICOTERA, P. Cell Death: Apoptosis Versus Necrosis. **Primer on Cerebrovascular Diseases**. K. M. A. Welch, I. R. Caplan, D. J. Reis, B. K. Siesjö and B. Weir. New York, Academic Press: 167-190, 1997.
- LIU, Y., KATO, H., NAKATA, N. & KOGURE, K. Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. **Brain Res.**, 586: 121-4, 1992.
- LORENZINI, C.G.A.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; SACCHETTI, B.; TASSONI, G. Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 71: 1-18, 1999.
- McGAUGH, J. L. Memory- a century of consolidation. **Science**, 287: 248-250, 2000.
- MACMANUS, J. P. & LINNIK, M. D. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 17: 815-32, 1997.
- MAIER, S. E. & WEST, J.R. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in rat. **Alcohol**, 23:49-57, 2001.
- MANUAL of histologic and special staining technics, 2th Ed., New York, McGraw-Hill, 1960, 207p.
- 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. Bul.**, 46: 281-309, 1998.

- MATSUSHIMA, K. & HAKIM, A. M. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. **Stroke**, 26: 1047-52, 1995.
- MATSUSHIMA, K., HOGAN, M. J. & HAKIM, A. M. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 16: 221-6, 1996.
- MATSUYAMA, T., TSUCHIYAMA, M., NAKAMURA, H., MATSUMOTO, M. & SUGITA, M. Hilar somatostatin neurons are more vulnerable to an ischemic insult than CA1 pyramidal neurons. **J. Cereb Blood Flow Metab.**, 13: 229-34, 1993.
- McCULLOUGH, L.D.; BEAUCHAMP, N.B.; WITYK, R. Recent advances in the diagnosis and treatment of stroke. **Survey of Ophthalmol.**, 45: 317-330, 2001.
- McEWEN, B. S. The plasticity of the hippocampus in the reason for its vulnerability. **Sem. in the Neurosci.**, 6: 239-246, 1994.
- McEWEN, B. S. & SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Cur. Opinion in Neurobiol.**, 5: 205-216, 1995.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, 11: 47-60, 1984.
- MORRIS, R.G.M.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, 319: 774-776, 1986.
- MULLER, M., RIETSCHIN, L., GROGG, F., STREIT, P. & GAHWILER, B. H. Selective degeneration of CA1 pyramidal cells by chronic application of bismuth. **Hippocampus**, 4: 204-9, 1994.
- MUNEKATA, K. & HOSSMANN, K. A. Effect of 5-minute ischemia on regional pH and energy state of the gerbil brain: relation to selective vulnerability of the hippocampus. **Stroke**, 18: 412-7, 1987.
- MURRY, C.E.; JENNINGS, R.B.; REIMER, K.A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, 74: 1124-1136, 1986.
- NAGAIRO, S., GOTO, S., KOREMATSU, K., SUMI, M., TAKAHASHI, M. & USHIO, Y. Disruption of the blood-cerebrospinal fluid barrier by transient cerebral ischemia. **Brain Res.**, 633: 305-11, 1994.
- NAKANO, S.; KOGURE, K.; FUGIKURA, H. Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain. **Neurosci.**, 38: 115-124, 1990.

- NAKASHIMA, M.; NIWA, M.; IWAI, T.; UEMATSU, T. Involvement of free radicals in cerebral vascular reperfusion injury evaluated in a transient focal cerebral ischemia model of rat. **Free Radical Biol. and Med.**, 26: 722-729, 1999.
- NAKATA, N., KATO, H. & KOGURE, K. Effects of repeated cerebral ischemia on extracellular amino acid concentrations measured with intracerebral microdialysis in the gerbil hippocampus. **Stroke**, 24: 458-64, 1993.
- NELSON, A.; SOWISKI, P.; HODGES, H. Differential effects of global ischemia on delayed matching-and no matching-to-position task in the water maze and skinner box. **Neurobiol. Learn. Mem.**, 67: 228-247, 1997.
- NETTO, C.A.; HODGES, H.; SINDEN, J.D.; LE PEILLET, E.; KERSHAW, T.; SOWINSKI, P.; MELDRUM, B.S.; GRAY, J.A. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neurosci.**, 54:69-92, 1993.
- NISHI, S., TAKI, W., UEMURA, Y., HIGASHI, T., KIKUCHI, H., KUDOH, H., SATOH, M. & NAGATA, K. Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. **Brain Res.**, 615: 281-8, 1993.
- NITATORI, T., SATO, N., WAGURI, S., KARASAWA, Y., ARAKI, H., SHIBANAI, K., KOMINAMI, E. & UCHIYAMA, Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. **J. Neurosci.**, 15: 1001-11, 1995.
- OHTA, S., FURUTA, S., MATSUBARA, I., KOHNO, K., KUMON, Y. & SAKAKI, S. Calcium movement in ischemia-tolerant hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia in gerbils. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 16: 915-22, 1996.
- OHTSUKI, T., RUETZLER, C. A., TASAKI, K. & HALLENBECK, J. M. Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 16: 1137-42, 1996.
- OLSEN, G. M., SCHEEL-KRÜGER, J., JENSEN, L. H. Does neuronal damage of CA1 relate to spatial memory performance of rats subjected to transient forebrain ischemia? **Acta Neurol. Scand.**, 89:204-209, 1994.
- ORDY, J. M.; WENGENACK, T. M.; BIALOBOK, P.; COLEMAN, P. D.; RODIER, P.; BAGGS, R. B.; DUNLAP, W. P.; KATES, 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: 128-39, 1993.

- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E.; PERUGINELLI, F.; MELI, E.; COZZI, A.; ALBANI-TORREGROSSA, S.; PELLICCIARI, R.; MORONI, F. Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. **Neuropharmacol.**, 38: 1607-1619, 1999.
- PEREZ-PINZON, M. A., XU, G. P., DIETRICH, W. D., ROSENTHAL, M. & SICK, T. J. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, 17: 175-82, 1997 a.
- PEREZ-PINZON, M. A., XU, G. P., MUMFORD, P. L., DIETRICH, W. D., ROSENTHAL, M. & SICK, T. J. Rapid ischemic preconditioning protects rats from cerebral anoxia/ischemia. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 428: 155-61, 1997 b.
- PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke**, 10: 267-72, 1979.
- PULSINELLI, W.A. Selective neuronal vulnerability and infarction in cerebrovascular disease. *In*: WELCH, K.M.A.; REIS, D.J.; CAPLAN, L.R.; SIESJÖ, B.K.; WEIR, B. (eds.), **Primer on cerebrovascular diseases**. San Diego, California, Academic Press, 1997.
- PULSINELLI, W.A. Pathophysiology of acute ischemic stroke. **Lancet**, 339:533-536, 1992.
- 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.
- RAFOLS, J. A., DAYA, A. M., O'NEIL, B. J., KRAUSE, G. S., NEUMAR, R. W. & WHITE, B. C. Global brain ischemia and reperfusion: Golgi apparatus ultrastructure in neurons selectively vulnerable to death. **Acta Neuropathol.** 90: 17-30, 1995.
- REIMER, K.A.; HEIDE, R.S.V.; JENNINGS, R.B. Ischemic preconditioning slows ischemic metabolism and limits myocardial infarct size. **An. N.Y. Acad. Sci.**, 100-115, 1994.
- RIEPE, M. W., NIEMI, W. N., MEGOW, D., LUDOLPH, A. C. & CARPENTER, D. O. Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase. **Exp Neurol**, 138: 15-21, 1996.
- RODRIGUES, L. P. *Efeito da isquemia cerebral global transitória sobre o aprendizado, a memória e a extinção de tarefas espaciais no labirinto*

- aquático de Morris*. Porto Alegre: CPG Neurociências, UFRGS, 2001. Dissertação de Mestrado, 99p.
- ROETTGER, V. & LIPTON, P. Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during in vitro ischemia. **Neurosci.**, 75: 677-85, 1996.
- ROSA NETO, P. *Efeitos da isquemia e do pré-condicionamento isquêmico sobre a atividade das enzimas glicogênio fosforilase ativa (EC 2.4.1.1) e citocromo oxidase (EC 1.9.3.1) no hipocampo de rato*. Porto Alegre: CPG Bioquímica, UFRGS, 1998. Dissertação de Mestrado, 155p.
- SCHIMIDT-KASTNER, R.; FREUND, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neurosci.**, 40: 599-636, 1991.
- SCOVILLE, W.B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J. Neurol., Neurosur., Psychiat.**, 20: 141-154, 1957.
- SHEPHERD, G.M. Learning and Memory: in *Neurobiology* 3th, Oxford University Press, 1994.
- SHIGENO, T., YAMASAKI, Y., KATO, G., KUSAKA, K., MIMA, T., TAKAKURA, K., GRAHAM, D. I. & FURUKAWA, S. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. **Neurosci. Lett.**, 120: 117-9, 1990.
- SIMPSON, J. R. & ISACSON, O. Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA- mediated neuronal death in the striatum. **Exp. Neurol.**, 121: 57-64, 1993.
- SIMS, N. R. Selective impairment of respiration in mitochondria isolated from brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. **J. Neurochem.**, 56: 1836-44, 1991.
- SLOVITER, R. S., VALIQUETTE, G., ABRAMS, G. M., RONK, E. C., SOLLAS, A. L., PAUL, L. A. & NEUBORT, S. Selective loss of hippocampal granule cells in the mature rat brain after adrenalectomy. **Science**, 243: 535-8, 1989.
- SMITH, M. L.; AUER, R. N.; SIESJÖ, B. K. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 10 min. of forebrain ischemia. **Acta Neuropathol.**, 64: 319-332, 1984.
- SQUIRE, L.R. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychol. Rev.**, 99: 195-231, 1992.
- SUGIMOTO, A., SHOZUHARA, H., KOGURE, K. & ONODERA, H. Exposure to sub-lethal ischemia failed to prevent subsequent ischemic death

of dentate hilar neurons, as estimated by laminin immunohistochemistry. **Brain Res.**, 629: 159-62, 1993.

TAKIZAWA, S., HOGAN, M. J., BUCHAN, A. M. & HAKIM, A. M. In vivo binding of [3H]nimodipine in rat brain after transient forebrain ischemia. **J. Cereb Blood Flow Metab.**, 14: 397-405, 1994.

TUOR, U. I. Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. **Neurosci. Biobehavi. Rev.**, 21: 175-179, 1997.

VOLPE, B. T., WESSEL, T. C., MUKHERJEE, B. & FEDEROFF, H. J. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. **Neurosci. Lett.**, 186: 157-60, 1995.

YAMAUCHI, Y., KATO, H. & KOGURE, K. Hippocampal damage following repeated brief hypotensive episodes in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab** 11: 974-8, 1991.

ZAIDAN, E. & SIMS, N. R. The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat. **J. Neurochem.**, 63: 1812-1819, 1994.

ZENG, Y. & XU, Z.C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neurosci. Res.**, 37: 113-125, 2000.