

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

EFEITOS DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA
SOBRE PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO
DE HIPOCAMPO DE RATOS

MARCIA MARIA CAMARGO DE MORAIS

ORIENTADORA: PROF^a. REGINA PESSOA PUREUR
CO-ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALEXANDRE NETTO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

1995

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Regina Pessoa Pureur, pelo grande aprendizado no ambiente de pesquisa e principalmente pela presença, carinho e apoio nos momentos de dificuldade, dentro e fora do laboratório.

Ao prof. Carlos Alexandre Netto (Alex), pela orientação sempre acompanhada de otimismo e entusiasmo.

A prof^a. Matilde Achaval Elena, pelas facilidades proporcionadas para frequentar o laboratório de Ciências Morfológicas e pelo auxílio inicial na obtenção e interpretação dos dados de histologia.

A Ângela de Mattos Dutra, Marta S. de Freitas e Nadja Schroder, pela amizade e solidariedade decisivas para a conclusão deste trabalho.

A Nice Arteni, Armando Barlem, Guilherme Zwetsch, Rejane Schierholt, Carlos Augusto Santos e Cristina Ruviaro, cujo profissionalismo e espírito de equipe tornaram possível a execução deste projeto.

A Carla Lisboa e Carina Zilles, pelo importante e fundamental auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do lab. 5: C.A., Lúcia Vinadé, Carmen, Christianne, Beth e Rodrigo, pelos empréstimos e contribuições para a superação dos problemas.

Aos meus pais e avó Lucy, pelo amor, força e dedicação em todos os momentos.

Ao meu tio "Fredinho", pelo carinho de pai.

Ao Marcos, pela paciência, carinho e incentivo.

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, foram presença importante para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO	I
I	INTRODUÇÃO	1
I.1	CITOESQUELETO.....	2
I.2	CITOESQUELETO DAS CÉLULAS NEURONAIS.....	10
I.3	FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	16
I.4	ISQUEMIA CEREBRAL.....	21
II	OBJETIVOS	29
III	MATERIAIS E MÉTODOS	31
III.1	ANIMAIS.....	32
III.2	PROCEDIMENTO DE ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA.....	32
III.3	HISTOLOGIA.....	35
III.4	INCORPORAÇÃO DE ¹⁴ C <i>IN VITRO</i> NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS.....	35
III.5	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100, NA PRESENÇA DE ALTA FORÇA IÔNICA.....	37
III.6	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100..	39
III.7	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	41
III.8	SECAGEM DOS GÉIS.....	42
III.9	DENSITOMETRIA.....	42
III.10	IMUNODETECÇÃO (IMMUNOBLOT) DAS SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS.....	43
III.11	INCORPORAÇÃO DE ³² P <i>IN VITRO</i> NAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO..	44

III.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
IV	RESULTADOS	47
IV.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	48
IV.2	OBTENÇÃO DO CITOESQUELETO DE CÉLULAS DE HIPOCAMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	53
IV.3	ESTUDO DOS EFEITOS DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE AS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI).....	56
IV.3.1	EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE O CONTEÚDO PROTÉICO DA FRAÇÃO FI.....	56
IV.3.2	EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE A INCORPORAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ¹⁴ C-LEUCINA NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO FI.....	58
IV.3.3	EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE O PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI) DE HIPOCAMPO.....	61
IV.3.3.1	ANÁLISE IMUNOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI) DE HIPOCAMPO.....	61

IV.3.4	EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DAS SUBUNIDADES DOS NEUROFILAMENTOS E DOS FILAMENTOS GLIAIS NA FRAÇÃO FI.....	63
IV.4	ESTUDO DOS EFEITOS DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE AS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA.....	68
IV.4.1	EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE O PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA.....	68
IV.4.2	EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE A INCORPORAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ³² P NA NF-M, NF-L, β-TUBULINA E UMA PROTEÍNA DE 85 kDa.....	69
V	DISCUSSÃO	75
VI	CONCLUSÕES	91
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

**SUMÁRIO DE FIGURAS
E TABELAS**

FIGURA 1 - ESQUEMA DE UMA SUBUNIDADE DE FILAMENTO INTERMEDIÁRIO... 8	8
FIGURA 2 - POLIMERIZAÇÃO DAS SUBUNIDADES PROTÉICAS DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI)9	9
FIGURA 3 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO TRIPLETE DOS NEUROFILAMENTOS.....13	13
FIGURA 4 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO PAPEL DA FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA MEDIAÇÃO DE ALGUNS DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE UMA VARIEDADE DE AGENTES REGULATÓRIOS.....18	18
FIGURA 5 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO HIPOCAMPO.....24	24
FIGURA 6 - ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA.....33	33
FIGURA 7 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100 ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI).....38	38
FIGURA 8 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100.....40	40
FIGURA 9 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DE HIPOCAMPOS DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA EM PONTOS REPRESENTATIVOS DO PERÍODO DE REPERFUSÃO ESTUDADO49	49
FIGURA 10 - GÉIS DE SDS-PAGE 10% DAS FRAÇÕES CITOESQUELÉTICAS OBTIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....55	55
FIGURA 11 - EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA SOBRE O CONTEÚDO PROTÉICO TOTAL DA FRAÇÃO FI DE HIPOCAMPO DE RATOS.....57	57
FIGURA 12 - EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA SOBRE A INCORPORAÇÃO DE ¹⁴ C-LEUCINA NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO FI DE HIPOCAMPO DE RATOS.....59	59
FIGURA 13 - SDS-PAGE 10% DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI) NOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO.....60	60
FIGURA 14 - IMUNODETECÇÃO DAS SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS NA FRAÇÃO FI.....62	62

FIGURA 15 - TRAÇADO DENSITOMÉTRICO DE UM GEL DE SDS-PAGE 10%, OBTIDO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI).....	64
FIGURA 16 - EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DAS SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE HIPOCAMPO DE RATOS.....	66
FIGURA 17 - SDS-PAGE 10% DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA NOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO.....	67
FIGURA 18 - AUTORADIOGRAFIA DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA DE HIPOCAMPO DE RATOS INCUBADA COM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP IN VITRO}$	70
FIGURA 19 - TRAÇADO DENSITOMÉTRICO DE UM GEL DE SDS-PAGE 10% OBTIDO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA.....	72
FIGURA 20 - EFEITO DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA SOBRE A INCORPORAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ^{32}P NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA DE HIPOCAMPO DE RATOS AO LONGO DO TEMPO DE REPERFUSÃO.....	73
TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) E SUAS ORIGENS CELULARES.....	7

RESUMO

A isquemia cerebral é caracterizada por uma redução severa ou por um completo bloqueio do fluxo sanguíneo ao cérebro. Sabe-se que este insulto causa um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, desencadeando numerosos processos bioquímicos, em particular a ativação de proteases dependentes de cálcio como a calpaína. Sabe-se também que as subunidades constituintes dos neurofilamentos (NF-H, NF-M, NF-L) são muito sensíveis à ação da calpaína.

O modelo experimental utilizado para induzir isquemia em ratos foi o método de oclusão dos quatro vasos. Este método consiste na obstrução, por eletrocoagulação, das artérias vertebrais e, após 24 horas, a oclusão das artérias carótidas comuns por ajustamento de fios de silicone, durante 20 minutos. Ao final da isquemia, os animais foram sacrificados em diferentes tempos de reperfusão: 0(imediato), 1, 2, 3, 7, 10 e 15 dias.

Neste trabalho estimamos, ao longo dos diferentes tempos de reperfusão, a concentração das subunidades dos neurofilamentos (NF-H, NF-M, NF-L) e dos filamentos gliais (GFAP), bem como a incorporação *in vitro* de ^{32}P em proteínas do citoesqueleto. Além disso, foi feito o estudo da incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina nas proteínas da fração FI.

Para a análise quantitativa e da incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina, foi utilizada a fração enriquecida em filamentos intermediários (fração FI), que é extraída em tampão de alta força iônica, na presença de Triton X-100. A fração FI foi quantificada, analisada por SDS-PAGE 10% e as subunidades dos filamentos intermediários foram quantificadas por densitometria.

Os resultados obtidos demonstraram que a isquemia cerebral transitória causou uma diminuição na concentração das subunidades dos filamentos intermediários presentes na fração FI até o 2º dia de reperfusão. Como não se detectou diminuição na síntese de proteínas totais da fração FI neste intervalo, é provável que a diminuição da concentração das subunidades dos filamentos intermediários não seja causada por uma diminuição de síntese.

O estudo da incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas citoesqueléticas teve o objetivo de verificar se o estado de fosforilação destas proteínas poderia estar relacionado à provável degradação sofrida pelas mesmas. Para a análise da incorporação de ^{32}P *in vitro*, foi utilizada a fração citoesquelética, obtida por extração na presença de Triton X-100.

A isquemia cerebral transitória causou uma diminuição da incorporação *in vitro* de ^{32}P na NF-M e NF-L até o 1º dia de reperfusão, sendo que os valores retornaram aos níveis do controle a partir do 2º dia. Sugerimos que a diminuição da fosforilação tenha tornado estas subunidades mais suscetíveis à proteólise dependente de cálcio.

A recuperação parcial da concentração das subunidades dos filamentos intermediários após o 3º dia de reperfusão foi acompanhada pela recuperação da fosforilação e pelo aumento da incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina nas proteínas do citoesqueleto. Possivelmente, a capacidade de recuperação apresentada é proveniente das células hipocâmpais que sobreviveram ao insulto isquêmico, sugerindo mecanismos regulatórios distintos nos diferentes setores do hipocampo.

I. INTRODUÇÃO

I.1 CITOESQUELETO

As primeiras observações da matriz celular datam de 1820, quando van Leeuwenhock descreveu uma matriz oticamente vazia. Até o século XIX, pensava-se que o citoplasma consistia de um fluido sem organização, onde localizavam-se ao acaso os demais constituintes celulares.

A partir de 1820, os primeiros observadores da matriz citoplasmática utilizaram microscópios ópticos e equipamentos muito simples, que normalmente geravam artefatos. Ainda assim, muitos pesquisadores defendiam a idéia de que o interior celular apresentava uma organização particular .

Neste contexto, Felix Dujardin (1801-1860), em 1835, caracterizou a matriz citoplasmática como uma substância clara, gelatinosa e transparente. Dujardin observou, ainda, que esta era insolúvel na água, contraída dentro de massas globulares, pegajosa (aderia às agulhas de dissecação), estirava-se como muco e ocorria em todas as células que ele havia examinado. Assim, gradualmente foi emergindo, através de observações e pensamentos de contemporâneos de Dujardin, a idéia de que o hialoplasma (nome dado ao citoplasma, na época) deveria ser altamente organizado.

A partir de 1910, observações em células intactas e a utilização de equipamentos mais aperfeiçoados permitiram aos pesquisadores a utilização de novas estratégias, como a observação do comportamento de substâncias injetadas na matriz. Baseado nestes ensaios e em muitos outros, Joseph Needham, em 1937, utilizaria o termo "esqueleto celular" pela primeira vez. Scarth (1942) sustentaria esta idéia, baseado nas suas

observações de polaridade, localização de substâncias e ordenação no arranjo de unidades do núcleo em ovos de animais marinhos.

A partir de 1945, o uso do microscópio eletrônico possibilitou maiores avanços no conhecimento do esqueleto celular, através de imagens mostrando arranjos filamentosos tridimensionais. Posteriormente, técnicas bioquímicas e imunológicas avançadas permitiram melhores explorações do interior celular. Várias das propriedades presentes nas células eucarióticas são devidas à presença do citoesqueleto que se estende por todo o citoplasma. Uma vez que o citoesqueleto está ausente nas bactérias, ele deve ser fator fundamental na evolução das células eucarióticas.

Atualmente, sabe-se que o esqueleto celular ou citoesqueleto é composto por uma rede proteica envolvida em muitas funções como divisão celular, aderência da célula a substratos (Bray e White, 1988), contração muscular (Cooke, 1986), movimento ativo de organelas no citoplasma (Birchmeier, 1984) e mudanças de forma de embriões de vertebrados em desenvolvimento (Albert et al., 1989).

O citoesqueleto é composto por três elementos morfológicos bem determinados: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos.

Os microtúbulos, com 25 nm de diâmetro, foram os primeiros componentes do citoesqueleto a serem caracterizados, em 1963, por Slautterback. Em 1974, Lazarides e Weber descreveram os microfilamentos, assim denominados devido ao pequeno diâmetro de seus filamentos (7nm). Osborn e colaboradores, em 1977, descreveram os filamentos intermediários, que receberam esta denominação pelo diâmetro intermediário entre as duas primeiras redes descritas (10nm).

Além destas três redes descritas, Wolosewick e Porter, em 1979, observaram uma malha tridimensional interconectando microfilamentos, filamentos intermediários, microtúbulos e organelas celulares. Os filamentos desta malha, que possuem diâmetro que varia entre 3 e 8 nm, com comprimento de 30 a 150 nm, foram denominados microtrabéculas (Porter e Kuruda, 1987). Todavia, a natureza bioquímica desta rede é desconhecida e alguns autores a consideram artefato de técnica, sendo sua existência no citoplasma ainda discutida.

Os microfilamentos são compostos por subunidades de actina monomérica, com peso molecular de 42 kDa, dispostas em homopolímeros lineares. Situam-se em regiões da célula sujeitas a estiramentos (Brabander, 1983) e associam-se a partir de subunidades solúveis, utilizando ATP como fonte de energia.

Os microtúbulos são formados de tubulina monomérica e assemelham-se a tubos ocos. A tubulina é um heterodímero formado por duas subunidades globulares associadas, chamadas alfa e beta-tubulina, com pesos moleculares de 56 kDa e 54 kDa, respectivamente. Ao polimerizar, a tubulina forma protofilamentos lineares, onde dispõem-se alternadamente as subunidades alfa e beta, ficando a subunidade alfa de um protofilamento em contato com a subunidade beta de outro. O microtúbulo completo possui 13 protofilamentos dispostos lado a lado, ao redor de um núcleo aparentemente vazio.

Os microtúbulos são estruturas polares, com um polo positivo de rápido crescimento, e um polo negativo de crescimento lento (Albert et al., 1989). Quando polimerizam para formar o microtúbulo, as subunidades alfa e beta hidrolisam uma

molécula de GTP (Weisenberg,1972).

A tubulina, assim como as outras proteínas do citoesqueleto, sofre modificações pós-traducionais. As mais importantes são a acetilação (Murata et al.,1986), a detirosinação (Barra et al.,1988) e a fosforilação (Wandossel et al.,1986). Embora não exista relação direta entre estas modificações e a associação dos microtúbulos, evidências sugerem que microtúbulos com tubulina acetilada e/ou detirosinada são mais estáveis (Gundersen et al.,1987).

Os microtúbulos são os constituintes do citoesqueleto mais estudados até hoje. Sabe-se que eles são indispensáveis em muitos processos dinâmicos, como sinaptogênese (Shelansky e Feit,1972) ou batimento de cílios e flagelos (Gibbon,1981).

Os filamentos intermediários são mais insolúveis que a maioria dos outros constituintes do citoesqueleto, formando o grupo mais estável e numeroso. Além disso, eles têm sido identificados em virtualmente todos os tipos celulares diferenciados. Os filamentos intermediários são agrupados em uma só categoria, devido a características comuns, e subdivididos em 5 grupos, de acordo com propriedades bioquímicas e imunológicas específicas (Tabela 1). Estas estruturas estão envolvidas em processos dinâmicos como mitose, citocinese, mudanças na forma celular, transporte celular e mecanismo de adesão, entre outros (Geiger,1987). Porém, sua principal função é a de integrador do espaço intracelular (Bloemendal e Pieper,1989).

As subunidades constituintes dos filamentos intermediários são monômeros com pesos moleculares que variam de 40 a 200 kDa, expressas por uma família multigênica extremamente complexa. São moléculas proteicas fibrosas com três regiões distintas em

sua estrutura: regiões central, carboxi-terminal e amino-terminal (Figura 1). A região central possui uma estrutura secundária rígida em alfa-hélice, interrompida por segmentos não helicoidais, apresentando comprimento e sequência de aminoácidos altamente conservados. As regiões amino e carboxi-terminal diferem no tamanho e sequência de aminoácidos, conferindo propriedades físico-químicas e imunológicas distintas para cada subunidade formadora dos filamentos intermediários (Bloemendal e Pieper, 1989), embora duas curtas sequências de resíduos carregados positiva e negativamente nas regiões carboxi e amino-terminal tenham revelado uma alta conservação entre os diferentes tipos de proteínas destes filamentos (Conway e Parry, 1988; Letai et al., 1992).

A polimerização dos filamentos intermediários envolve primeiramente a interação de dois monômeros, através da região central, para formar um dímero (Figura 2). A seguir, dois dímeros interagem de maneira antiparalela, formando um tetrâmero ou protofilamento (Geisler et al., 1985). Esta organização antiparalela nos tetrâmeros faz com que os filamentos intermediários sejam estruturas efetivamente apolares (Geisler et al., 1985), ao contrário dos microtúbulos e microfilamentos. Posteriormente, seis a oito protofilamentos associam-se para formar o filamento intermediário (Bloemendal e Piper, 1989).

Modificações pós-traducionais ocorrem em todas as proteínas dos filamentos intermediários, embora elas não sejam completamente compreendidas. Estas modificações incluem fosforilação (Nixon et al., 1987), proteólise ativada por cálcio (Zimmerman, 1982; Gallant et al., 1986) e, talvez, glicosilação (Vidrich et al., 1982). A maioria destas modificações ocorre nas extremidades amino e carboxi-terminal das

moléculas de filamento intermediário, onde as enzimas necessárias têm melhor acesso (Steinart e Roop, 1988) e, provavelmente, regulam as funções e dinâmica dos filamentos na célula.

Tabela1: Classificação dos filamentos intermediários (FI) e suas origens celulares (Bloemendal e Pieper, 1989).

Proteínas dos FI	Tipo celular	Massa molecular em kDa
Queratinas ácidas	Epitélio	40 - 70
Queratinas básicas		40 - 70
Vimentina	Células mesenquimais e maioria das células em cultura	57
Desmina	Células musculares	50
GFAP (Proteína Glial Fibrilar ácida)	Astrócitos	52
Neurofilamentos	Neurônios	68, 150, 200

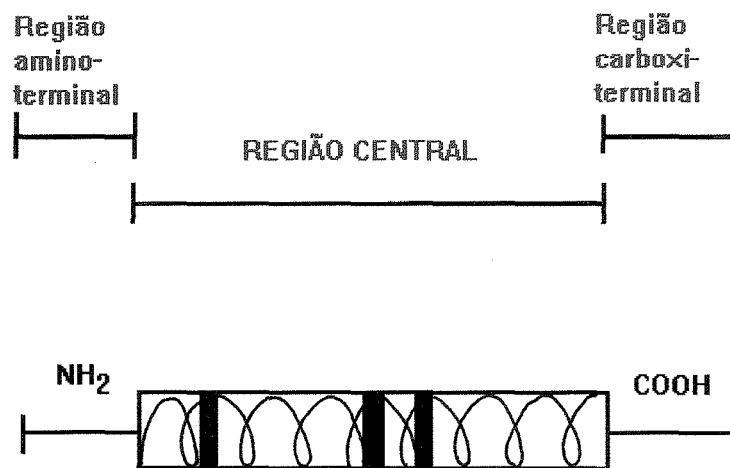


Fig. 1: Esquema de uma subunidade de filamento intermediário. (Bloemendal e Pieper, 1989).

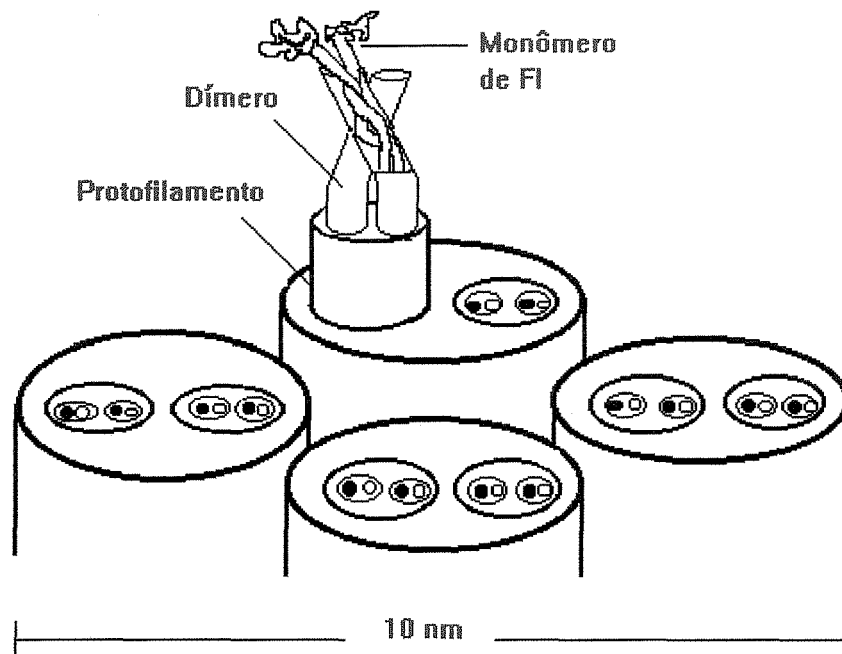


Fig.2: Polimerização das subunidades proteicas dos filamentos intermediários (FI). Dois monômeros de FI interagem formando um dímero; a seguir dois dímeros se combinam formando um protofilamento. Seis a oito protofilamentos se combinam e formam uma molécula de FI (Bloemendal e Pieper, 1989).

Muitas das funções biológicas dos microfilamentos , microtúbulos e filamentos intermediários dependem da existência de proteínas associadas, as quais desempenham funções diversas, como a ligação entre os filamentos ou a outros componentes celulares, como a membrana plasmática (Birchmeier, 1984; Georgatos e Marchesi, 1985; Granger e Lazarides, 1981). Podem, ainda, controlar a polimerização dos microfilamentos e microtúbulos, regulando sua velocidade e extensão ou interagir com filamentos para produzir movimentos, como a contração muscular e o batimento de cílios e flagelos.

I.2. CITOESQUELETO DAS CÉLULAS NEURONAIS

O citoesqueleto dos neurônios é composto principalmente por microfilamentos, microtúbulos e neurofilamentos.

Existe uma grande quantidade de actina nas células nervosas. No entanto, muito pouco é conhecido sobre sua localização ultraestrutural sob forma de microfilamentos. Alguns pesquisadores sugerem que os microfilamentos se apresentam como uma rede nos cones de crescimento (Yamada et al., 1971). Estudos com meromiosina marcada sugerem a presença de microfilamentos submembranosos em axônios e corpos celulares (Bray, 1977).

Os microtúbulos estão relacionados a inúmeros processos fisiológicos no sistema nervoso, como transporte axonal (Grafstein, 1980), liberação de neurotransmissores, crescimento de neuritos e sinaptogênese (Shelansky e Feit, 1972). Os microtúbulos

dispõem-se uniformemente nos dendritos (Wuerner e Kirkpatrick, 1982), mas nos axônios estão organizados em pequenos feixes longitudinais descontínuos, entrecruzados com os neurofilamentos (Schnapp e Reese, 1982). Existem várias proteínas associadas à microtúbulos, sendo as mais importantes as MAP-2 (microtubule associated protein -2) (Caceres et al., 1984; De Camilli et al., 1984; Huber e Matus, 1984), MAP-1b, MAP-3, MAP-60 kDa e as proteínas chamadas "tau factors" (Binder et al., 1985). Estas proteínas (MAPs e tau) parecem ter a função de promover a polimerização dos microtúbulos e a ligação entre microtúbulos e filamentos intermediários, desempenhando um importante papel na organização do citoesqueleto axonal (Fraser et al., 1987).

Tem sido demonstrado que os microtúbulos estão sujeitos à influência de fatores externos. Em córtex cerebral de ratos submetidos à desnutrição proteica pós-natal, foi detectado um aumento da fosforilação *in vitro* nas alfa e beta-tubulinas (Valente et al., 1992). No entanto, em cerebelo, a capacidade de incorporação de ^{32}P *in vitro* nas tubulinas parece não ser afetada pela desnutrição proteica pós-natal (Mattos et al., 1993). Alfa e beta-tubulinas também sofrem modificações ao longo do desenvolvimento, durante o qual ocorre um aumento nas concentrações destas subunidades, sendo este aumento afetado pela desnutrição protéica (Mattos et al., 1994).

Os filamentos intermediários dos neurônios são os neurofilamentos. Dentre os constituintes do citoesqueleto neuronal, os neurofilamentos são os mais abundantes, particularmente nos axônios (Hoffman et al., 1987). Os neurofilamentos são constituídos por um triplete de subunidades proteicas com pesos moleculares aproximados de 200 (NF-H), 150 (NF-M) e 68kDa (NF-L). A organização estrutural do neurofilamento foi

examinada utilizando-se anticorpos específicos para cada subunidade formadora do triplete (Figura 3). Os resultados demonstraram que cada componente do triplete origina primariamente os protofilamentos, os quais se associam através da região central para formar o neurofilamento completo. Assim, a subunidade de 68kDa forma o filamento propriamente dito, enquanto a subunidade de 150kDa enrola-se helicoidalmente ao redor deste corpo. A subunidade de 200kDa dispõe-se sobre a superfície desta estrutura, formando braços laterais a intervalos de 40-100nm (Hirokawa et al.,1984) que fazem conexão entre os filamentos e com outras estruturas celulares (Sharp et al.,1982; Tokutake et al.,1986). Embora todas as três subunidades contenham a região central em alfa-hélice, somente a NF-L se associa em filamentos de 10 nm de diâmetro *in vitro*. Experimentos feitos com NF-L recombinantes de camundongo revelaram que a associação *in vitro* do NF-L requer tanto a região amino-terminal quanto a carboxi-terminal. Enquanto a região amino-terminal promove a associação lateral de protofilamentos em protofibrilas, a região carboxi-terminal controla a associação dos protofilamentos até terminarem ao nível de 10 nm (Heins et al.,1993).

A região carboxi-terminal das subunidades NF-M e NF-H está relacionada à conexão de neurofilamentos entre si e com outros elementos do citoesqueleto (Sharp et al.,1982). Nos axônios, onde os neurofilamentos possuem uma disposição paralela e longitudinal, estas conexões são mais abundantes. No corpo celular, o número de conexões está reduzido a 40% em relação ao dos axônios, estando os neurofilamentos orientados ao acaso. Nos dendritos, embora haja uma organização paralela, o número de conexões é de 60% em relação ao dos axônios (Hisanaga e Hirokawa,1989). Os

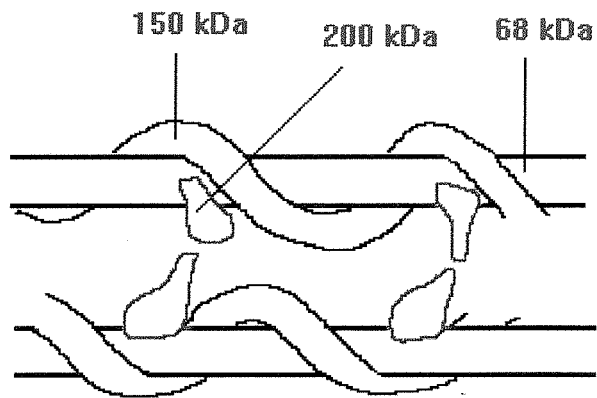


Fig.3: Esquema da organização dos componentes do triplete proteico dos neurofilamentos (Tokutake,1990).

neurofilamentos estão presentes em maior quantidade nos axônios do que no corpo celular (Drake e Lasek,1984), estando ausentes ou esparsamente distribuídos nos dendritos (Wuerner e Kirkpatrick,1972).

Alguns autores descreveram uma proteína de 66kDa como uma subunidade dos neurofilamentos e outros como uma proteína associada a NF (Liem et al.,1985), pois ela possui características comuns às subunidades de neurofilamentos. Dentre estas características, destacam-se composição de aminoácidos, massa molecular, ponto isoelétrico, especificidade antigênica, localização axonal e capacidade de associação *in vitro*, formando filamentos de 10 nm (Chiu et al.,1989).

Czosnek et al., (1980), utilizando medula espinhal de coelho, fizeram um estudo sobre a biossíntese dos neurofilamentos. Foi demonstrado que as subunidades do triplete são sintetizadas como tal, não se originando da degradação de um precursor maior.

Os neurofilamentos, segundo alguns autores, estão relacionados à função neuronal, contribuindo para a sustentação mecânica ao longo do axônio (Lasek et al.,1983) e manutenção e determinação do calibre axonal (Klymkoswky et al.,1989), sendo o diâmetro do axônio o principal fator determinante da velocidade de condução nas fibras nervosas.

A suscetibilidade dos neurofilamentos à fatores externos já é bem conhecida. Foi demonstrado que os neurofilamentos sofrem alteração na quantidade em condições de baixa temperatura (Piezzi e Cavicchia,1981), de aumento da atividade neuronal (Alvarez et al.,1982) e após axotomia (Dick et al.,1985) e administração de hormônios ou substâncias tóxicas (Griffin et al.,1983).

A distribuição dos neurofilamentos no axônio também é alterada pela ação de algumas substâncias químicas. Os compostos orgânicos n-hexano, metil n-butil cetona, 2,5-hexanediona, dissulfito de carbono e acrilamida causam acúmulo de neurofilamentos na porção distal do axônio (Sayre et al., 1985). Esta alteração morfológica também ocorre na neuropatia do axônio gigante (Pena, 1982; Monaco et al., 1985). Outras substâncias tóxicas como β , β' - iminodipropionitrilo (Clark et al., 1980) e alumínio causam acúmulo dos neurofilamentos na porção proximal dos axônios (Sayre et al., 1985).

Em nosso laboratório também foram demonstradas alterações na concentração dos neurofilamentos de diversas estruturas cerebrais submetidas a diferentes modelos experimentais. A desnutrição protéica pós-natal causou um aumento na concentração das subunidades de 150 e 68 kDa em córtex cerebral de ratos adultos reabilitados nutricionalmente (Paz et al., 1991), enquanto que em cerebelo de ratos jovens submetidos ao mesmo modelo experimental, houve um aumento na concentração das subunidades de 200 e 150 kDa, sendo este efeito ausente nos adultos (Mattos et al., 1993). Em ratos submetidos à fenilcetonúria, metilmalonicacidemia e hiperprolinemia experimentais, houve uma diminuição na concentração da subunidade de 200 kDa em córtex cerebral, sem ocorrência de alteração quantitativa nas subunidades dos neurofilamentos em cerebelo (Rubin et al., 1992).

I.3. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os sistemas de fosforilação de proteínas são formados por três componentes principais: proteínas quinases, substratos fosforiláveis e proteínas fosfatases (O' Callaghan, 1994).

As proteínas quinases são transferases que utilizam ATP como doador de grupos fosfato e, de um modo geral, dependem de Mg^{+2} como cofator (O' Callaghan, 1994; Lehninger, 1975). Os substratos protéicos fosforiláveis são o segundo componente destes sistemas, sendo os grupos fosfato incorporados nos resíduos de serina, treonina e tirosina destas moléculas (O' Callaghan, 1994).

Uma vez fosforilados, os substratos são sujeitos à desfosforilação, pela ação de proteínas fosfatases. As principais fosfatases nas células são as do tipo 1(PP1) e 2A (PP2A) (Sim et al., 1992). Além destas, são conhecidas as fosfatases dependentes de Ca^{+2} e Mg^{+2} , PP2B (calcineurina) e PP2C (Klee et al., 1988; Klee e Cohen, 1988; Merlevade, 1985).

As quinases e fosfatases estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central, sendo a fosforilação de proteínas um importante mecanismo molecular na mediação das diversas funções deste complexo sistema (O' Callaghan, 1994). Estas funções celulares incluem metabolismo, biossíntese e liberação de neurotransmissores, atividade de receptores, expressão gênica, transporte axonal, condutância de canais iônicos, forma e mobilidade neuronal, elaboração de processos dendríticos e axonais, bem como desenvolvimento e manutenção das características diferenciadas dos

neurônios (Nestler e Greengard, 1984; Wallas e Greengard, 1987). O fato de sistemas de fosforilação de proteínas serem muito mais ativos no tecido nervoso do que em outros tecidos enfatiza a importância deste tipo de modificação pós-traducional na regulação da função do sistema nervoso (Nestler et al., 1989). Atualmente, é de plena aceitação que este mecanismo representa a modificação pós-traducional dominante através da qual as células neuronais integram os efeitos de sinais extracelulares (Browning et al., 1985; Hemmings et al., 1989; Wallas e Greengard, 1991).

Atualmente, existem evidências de que uma grande variedade de agentes reguladores produzem diversos tipos de respostas biológicas, dentro e fora do sistema nervoso, através da regulação do estado de fosforilação de substratos protéicos específicos nos tecidos-alvo. Além disso, numerosas interações têm sido encontradas entre os vários sistemas de fosforilação de proteínas, indicando que as vias moleculares através das quais agentes reguladores produzem respostas biológicas específicas frequentemente convergem ao nível de fosforilação de proteínas (Nestler e Greengard, 1984). Muitos destes agentes regulam a fosforilação de proteínas pela alteração dos níveis intracelulares dos segundos mensageiros AMPc, GMPc ou cálcio. Outros parecem regular a fosforilação de proteínas através de mecanismos que não envolvem estes segundos mensageiros (Nestler e Greengard, 1984) (Fig.4).

No Sistema Nervoso Central, são conhecidas cinco classes de proteínas quinases: proteína quinase dependente de AMPc (PKA), proteína quinase dependente de GMPc (PKG), proteína quinase dependente de Ca^{+2} /Calmodulina (CaMK), proteína quinase dependente de Ca^{+2} /fosfolipídios (PKC) e proteína quinase tirosina-específica

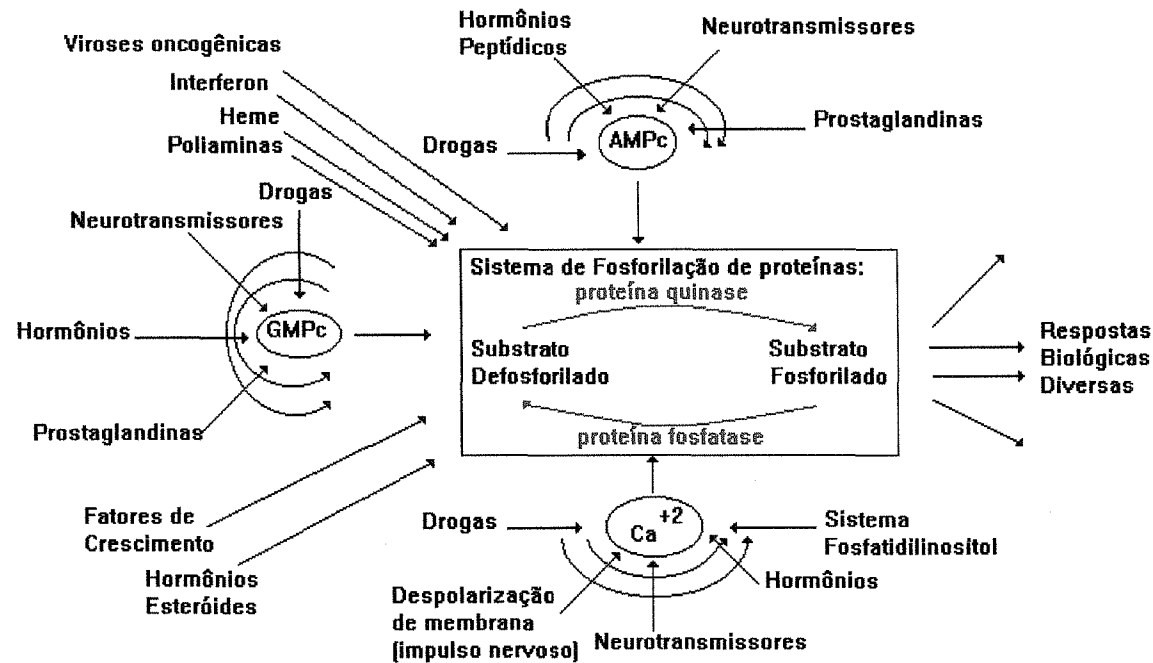


Fig.4: Diagrama esquemático do papel da fosforilação de proteínas na mediação de alguns dos efeitos biológicos de uma variedade de agentes regulatórios. Muitos destes agentes regulam a fosforilação de proteínas alterando os níveis intracelulares dos segundos mensageiros AMPc, GMPC ou Ca^{+2} . Outros agentes parecem regular a fosforilação de proteínas por mecanismos que não envolvem segundos mensageiros.

Adaptado de Nestler e Greengard (1984) Protein Phosphorylation in The Nervous System. John Wiley & Sons ed., Neurosciences Institute Publication, New York.

(PTK), independente de segundo mensageiro.(O' Callaghan,1994). No entanto, a regulação da fosforilação de proteínas não deve ser atribuída simplesmente à ação das cinco classes conhecidas de quinases, devendo-se considerar também a diversidade de substratos que são fosforilados por uma dada quinase (O'Callaghan,1994).

A atividade fisiológica de um substrato protéico depende de seu estado de fosforilação. Assim, as atividades relativas das proteínas quinases e das proteínas fosfatases determinam o estado de fosforilação e a atividade fisiológica do substrato.

Os neurofilamentos são os maiores constituintes do citoesqueleto e estão entre as proteínas neuronais mais altamente fosforiladas. Lazarides (1982) foi quem primeiro sugeriu que a função dos filamentos intermediários poderia ser regulada pela fosforilação. Sabe-se que as subunidades fosforiladas encontram-se principalmente no axônio, enquanto as não fosforiladas são detectadas no corpo celular e dendritos (Hisanaga et al.,1991). A fosforilação regula a capacidade de associação das três subunidades para formar o neurofilamento e modula as interações destas subunidades com outras proteínas citoesqueléticas (Julien e Mushinski,1982).

As subunidades dos neurofilamentos são fosforiladas nas extremidades carboxi e amino-terminal por diferentes quinases (Nixon e Sihag, 1991). A extremidade amino-terminal é alvo, *in vitro*, para proteínas quinases dependentes de segundo mensageiro, principalmente proteína quinase C (proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídios) e proteína quinase A (proteína quinase dependente de AMPc) (Nixon e Sihag,1991). A extremidade carboxi-terminal, por outro lado, é preferencialmente substrato para proteínas quinases independentes de segundo mensageiro, associadas à neurofilamentos (Nixon

e Sihag, 1991). Em nosso laboratório também foi detectada a fosforilação dos neurofilamentos pela proteína quinase dependente de Ca^{+2} /Calmodulina (CaMK) (resultados não publicados).

A fosforilação da extremidade amino-terminal está relacionada com a interação entre as diferentes subunidades dos neurofilamentos. Nas subunidades de 200 e 150 kDa, a fosforilação deste sítio permite o ancoramento à subunidade de 68 kDa, formando o filamento. Na extremidade carboxi-terminal, a fosforilação está relacionada com a interação entre os filamentos e destes com as demais estruturas celulares (Julien e Mushynski, 1983; Nixon e Sihag, 1991). Sabe-se que as subunidades dos neurofilamentos com alto peso molecular (NF-H e NF-M) possuem um grande número de grupos fosfato em sua região carboxi-terminal (Julien e Mushynski, 1983). A subunidade de 150 kDa possui de 7 a 26 grupos fosfato por molécula e a de 200 kDa possui de 19 a 104, enquanto a subunidade de 68 kDa contém somente de 1 a 5 grupos fosfato por molécula (Jones e William Jr, 1982; Sihag e Nixon, 1989).

A fosforilação dos neurofilamentos também pode ser alterada sob ação de drogas. Bizzi e Gambetti (1986) descreveram o aumento na fosforilação dos neurofilamentos na presença de β, β' - iminodipropionitrilo e o mesmo achado foi descrito por Eyer et al., (1989) na presença de alumínio. Também já foi determinada a diminuição da fosforilação dos neurofilamentos na presença de 2,5 - hexanediona (Lapadula et al., 1988). Abou-Donia et al. (1988) demonstraram que organofosforados causam hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto, incluindo as três subunidades dos neurofilamentos, β -tubulina e MAP-2, provavelmente pela ativação da CaMKII.

Há dados na literatura registrando que a fosforilação da α e da β -tubulinas (Wandossel et al., 1987; Ludueña et al., 1988) e a fosforilação de proteínas associadas aos microtúbulos (Margolis e Rauch, 1981) podem exercer papel importante na regulação da polimerização dos microtúbulos, sendo os resíduos de serina e tirosina os aceptores de fosfato. Estes resíduos estão preferencialmente localizados na região carboxi-terminal das duas subunidades de tubulina e sugere-se que esta região esteja envolvida na regulação da polimerização, sendo a fosforilação de diferentes sítios determinante de diferentes efeitos sobre a formação dos microtúbulos (Wandossel et al., 1987).

1.4 ISQUEMIA CEREBRAL

Lesões cerebrais de qualquer natureza têm consequências permanentes e podem resultar em sérias disfunções neurológicas. A isquemia constitui um mecanismo patofisiológico básico de lesão cerebral, sendo a recuperação neurológica dependente da severidade e duração da isquemia (Ogata et al., 1989).

A isquemia é caracterizada por uma redução severa ou por um completo bloqueio do fluxo sanguíneo ao cérebro (Siesjo, B.K., 1978). Assim, devido à própria natureza desta injúria, a lesão resultante é produto da combinação de vários fatores patofisiológicos que interagem de forma complexa.

São conhecidas várias formas clínicas de isquemia cerebral. A isquemia global transitória ocorre nos casos de parada cardíaca ou isquemia coronária severa. Já a forma

unifocal, praticamente irreversível, ocorre nos casos de acidentes vasculares trombóticos ou hemorrágicos. Existem ainda isquemia multifocal, quadros isquêmicos transitórios e isquemia secundária à hemorragia subaracnóide ou à traumatismo cerebral (Meldrum,1990). Estas diferentes síndromes podem ser modeladas em animais com razoável acurácia. Um modelo básico de isquemia requer a oclusão das quatro principais artérias extracraniais no rato (oclusão dos quatro vasos, 4-VO) (Pulsinelli e Brierley, 1979). O segundo modelo de isquemia combina oclusão bilateral das artérias carótidas comuns com redução da pressão arterial média (oclusão dos dois vasos, 2-VO) (Smith et al.,1984). Existem ainda outros modelos utilizados para induzir isquemia em ratos, como aumento artificial da pressão intracraniana (Ljunggren et al.,1974), parada cardíaca (Blomqvist e Wieloch,1985), oclusões vasculares intratorácicas (LeMay et al.,1988), compressão do pescoço (Diemer e Siemkowicz,1981) e decapitação (Ogata et al.,1989). Ratos submetidos a 2-VO e 4-VO apresentam morte neuronal importante na região CA1 hipocampal, com perda de até 90%, e lesões isquêmicas em CA3, bem como no estriado (Blomqvist e Wieloch,1985; Evans et al.,1987).

Embora os insultos isquêmicos apresentem esta característica complexidade de alterações patofisiológicas, classicamente dois fatores são foco de interesse para a compreensão da lesão isquêmica. O primeiro foco envolve a circulação cerebral e o metabolismo energético do cérebro pós-isquêmico, baseado em argumentos que suportam a teoria de que distúrbios do fluxo sanguíneo comprometem o suprimento adequado de energia para a recuperação cerebral (Pulsinelli et al., 1983;Zaidan e Sims, 1990; Jurkowitz-Alexander et al., 1992; Yamamoto et al, 1990; Sims e Pulsinelli, 1987).

Outro foco de interesse aborda fatores intrínsecos da organização neuronal, tais como o esqueleto celular, a conectividade anatômica e ação de neurotransmissores e receptores em regiões vulneráveis específicas do cérebro (Ogata et al., 1989; Schlaepfer et al., 1985; Baudry et al., 1981; Busija e Heistad, 1984; Lou et al., 1987; Rubio et al., 1991; Boakye et al., 1991; Raley-Susman e Lipton, 1990; Andiné et al., 1991).

Os neurônios diferem em sua sensibilidade ao insulto isquêmico e em sua habilidade para recuperar-se de tal injúria. Assim, distintas regiões do cérebro apresentam-se mais suscetíveis do que outras ao dano neuronal causado por um período isquêmico global relativamente curto. Este fenômeno clássico da neuropatologia é conhecido como "vulnerabilidade seletiva" e os possíveis fatores que o determinam têm sido amplamente estudados na tentativa de elucidá-lo. Pulsinelli et al. (1982a), comparando medidas do fluxo sanguíneo cerebral em ratos submetidos a isquemia, demonstraram que o neocórtex, hipocampo e estriado sofreram 95-98% de redução do fluxo, enquanto que no tálamo, cerebelo e tronco cerebral, o fluxo foi menos severamente reduzido.

O hipocampo é uma estrutura que caracteriza a vulnerabilidade seletiva ao insulto isquêmico (Schmidt- Kastner e Freund, 1991). Anatomicamente, o hipocampo é uma estrutura em forma de C, no sentido do polo temporobasal para o dorsoseptal. Num plano frontal típico, visualiza-se as porções superior e inferior do hipocampo dorsal (Figura 5). De acordo com a terminologia "CA" de Lorente de Nó (1934), o setor CA1 contém células piramidais cobrindo a região dorsal. Existe um final bem definido do CA1, onde as células piramidais tornam-se maiores, formando o setor CA2. A transição do setor CA2 para o

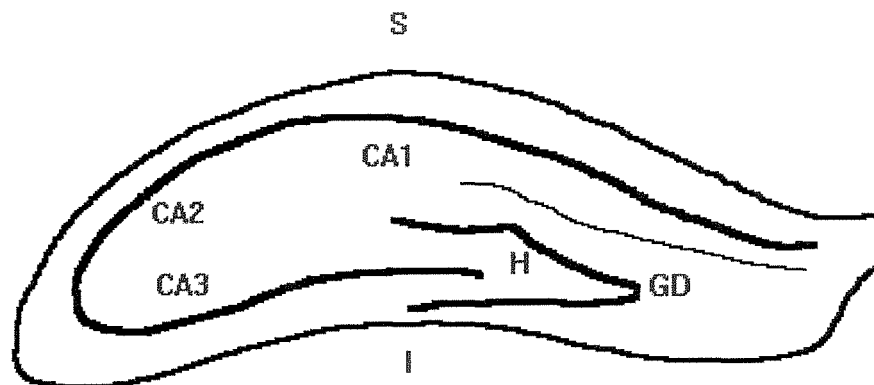


Fig.5: Diagrama esquemático do hipocampo. Anatomicamente, o hipocampo é uma estrutura em forma de C, no sentido do polo temporobasal para o dorsoseptal. Num plano frontal típico, visualiza-se as porções superior (S) e inferior (I) do hipocampo dorsal. O setor CA1 contém as células piramidais cobrindo a região dorsal. Ao final do CA1, as células piramidais tornam-se maiores, formando o setor CA2. A transição do setor CA2 para o CA3 ocorre na curvatura lateral. As células piramidais do setor CA3 correm para dentro do hilo (H) e giro denteado (GD).

CA3 ocorre em algum ponto da curvatura lateral, mas não detecta-se em materiais corados por técnicas de coloração convencionais. As células piramidais do setor CA3 correm para dentro do hilo do giro denteado.

O setor CA1 do hipocampo é grandemente afetado pelo insulto isquêmico, com morte de aproximadamente 90% das células piramidais desta região (Pulsinelli et al., 1982b), enquanto que o setor CA3 e o giro denteado são altamente resistentes. Caracteristicamente, os neurônios piramidais do CA1 apresentam morte celular tardia, entre dois e sete dias após o episódio isquêmico (Pulsinelli e Brierley, 1979; Crain et al., 1988). Pulsinelli et al. (1982b) descreveram um retardo no início da necrose neuronal e sua progressão até 72 horas após o insulto isquêmico. Estes mesmos autores observaram na região CA1 que, após 24 horas de reperfusão, a percentagem de neurônios mortos foi de aproximadamente 20%, enquanto que após 72 horas, este índice foi superior a 90%. A partir de 4 dias de reperfusão, Johansen et al. (1984) observaram que a camada de células piramidais do CA1 estava preenchida por restos celulares e haviam somente poucos dendritos intactos. Paralelamente à progressão da necrose neuronal ocorrem reações gliais, detectadas pelo aumento de células da glia após 1-2 dias de reperfusão, persistindo até 1 mês após o insulto isquêmico (Hatakeyama et al., 1988).

O hipocampo tem sido alvo de grande interesse nas pesquisas sobre mecanismos de memória (Squire, 1986). São conhecidos numerosos trabalhos sobre os distúrbios da memória após isquemia em ratos submetidos a várias situações comportamentais (C.A. Netto et al., 1993; Volpe et al., 1989; Davis et al., 1986 e 1987; Auer et al., 1989). Dos

exemplos relatados sobre lesões em cérebro de humanos, são conhecidos alguns casos onde lesões do hipocampo estão associadas a amnésia (Cummings et al., 1984; DeJong et al., 1969; Victor et al, 1961; Volpe e Petito, 1985).

Uma das hipóteses correntes para explicar a morte celular decorrente da isquemia cerebral é a da excitotoxicidade. Dois principais tipos de mecanismos excitotóxicos podem ser distinguidos (Siesjo e Bengtsson, 1989; Rothman e Olney, 1986). O primeiro mecanismo consiste em um edema celular agudo causado pelo influxo exagerado de íons e água nos neurônios, decorrente da abertura de canais iônicos pelos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato. O segundo é um mecanismo de ação tardia, mediado por altos níveis intracelulares de cálcio, o qual pode ativar vários processos bioquímicos que desencadeiam a morte celular.

Na isquemia, a hipótese excitotóxica é baseada em estudos que demonstram níveis extracelulares de glutamato aumentados durante o período isquêmico, e hiperatividade dos neurônios do CA1 7-10 horas após o insulto isquêmico. Corroboram esta hipótese os achados de alta concentração de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) na região CA1 e proteção dos neurônios do CA1 contra o dano isquêmico pelos antagonistas de receptores NMDA e por vários bloqueadores de canais iônicos (Wang et al., 1992; Raley-Susman e Lipton, 1990; Gill et al., 1987; Gill e Kemp, 1989; Izumiyama e Kogure, 1988; Rod e Auer, 1989).

Numerosos processos bioquímicos são ativados por altos níveis de cálcio intracelular (Siesjo e Bengtsson, 1989; Choi, 1987), em particular a degradação de proteínas do citoesqueleto mediada pela calpaína, uma protease cálcio-dependente

(Ogata et al.,1989; Schlaepfer et al., 1985; Baudry et al, 1981). Estudos anteriores demonstraram que a calpaína I é distribuída em grandes quantidades nas regiões conhecidamente vulneráveis à isquemia, tais como as células piramidais do hipocampo e neocórtex (Ogata et al., 1989). Lee et al. (1991) demonstraram que , em hipocampo de gerbilo submetido à isquemia, o tratamento prévio com leupeptina, um inibidor da calpaína, protege contra a sua ação proteolítica sobre a espectrina.

Assim como a espectrina, também outras proteínas do citoesqueleto, os neurofilamentos, são possivelmente alvo de ação da calpaína após isquemia. Ogata et al. (1989) descreveram a degradação seletiva das subunidades NF-H e NF-M após 10 e 15 min. de isquemia, respectivamente, enquanto que, após 20 min. de isquemia, não foram confirmadas a degradação da subunidade NF-L, da tubulina e da actina. Nakamura et al. (1992), utilizando anticorpos, descreveram uma alteração na distribuição da NF-L e NF-H em hipocampo de gerbilo após isquemia. Adicionalmente, Wang et al. (1991 e 1992) obtiveram evidências da degradação da NF-L e NF-H, bem como um aumento da GFAP após lesão excitotóxica por NMDA no hipocampo.

Em muitas doenças neurodegenerativas, ocorrem anormalidades na quantidade, distribuição ou constituição de proteínas citoesqueléticas (Goldman e Yen,1986). Na doença de Alzheimer, por exemplo, são observados acúmulos anormais de neurofilamentos em córtex e hipocampo (Hirano e Zimmerman,1962; Curcio e Kemper,1984). Em injúria experimental de medula espinhal também foi observada degradação dos componentes dos neurofilamentos (Banik et al.,1982). Os neurofilamentos desempenham papel importante não somente na manutenção da forma

celular, como também no sistema intracelular de transporte (Wuerker e Kirkpatrick, 1972; Grafstein e Forman, 1980). Assim, a degradação destas proteínas pode ser considerada uma das principais causas da morte neuronal (Nakamura et al., 1992).

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado alterações na fosforilação de substratos endógenos após isquemia, principalmente pela perda de atividade da PKC (proteína quinase C) e CaMKII (proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina), decorrente de proteólise e/ou inibição (Zivin et al., 1990; Crumrine et al., 1990; Domanska-Janik e Zalewska, 1992; Aronowski et al., 1992; Yamamoto et al., 1990). No entanto, é descrito que a PKA (proteína quinase A) não sofre alteração nestas condições (Zivin et al., 1990).

A síntese de proteínas após isquemia também tem sido alvo recente de pesquisa. Raley-Susman e Lipton (1990) encontraram uma diminuição na síntese de proteínas das células piramidais do CA1 e um aumento de síntese nas células da glia e endotélio. Widman et al. (1991), utilizando cérebro de gerbilo, demonstraram uma diminuição inicial na síntese protéica, com posterior aumento, seguido de nova queda e aumento, ao longo do tempo de reperusão após isquemia. O autor também relaciona este aumento posterior da síntese protéica à proliferação astrogliar e refere-se à oscilação descrita como um modo bifásico de injúria que pode estar relacionado à similares mudanças na homeostase do cálcio.

II. OBJETIVOS

A isquemia cerebral afeta seletivamente diferentes populações neuronais. O setor CA1 do hipocampo é o mais afetado, onde morrem aproximadamente 90% das células piramidais somente entre 2 e 7 dias após a isquemia. Estes dois fenômenos são conhecidos como "vulnerabilidade seletiva" e "morte celular tardia". No entanto, as causas destes fenômenos não são completamente compreendidas.

O presente trabalho foi realizado com a intenção de averiguar a existência de uma relação entre o insulto isquêmico seguido de reperfusão e prováveis alterações nas proteínas do citoesqueleto das células hipocampais.

Considerando que:

a) os neurofilamentos são sensíveis à proteólise dependente de Ca^{+2} mediada pela calpaína;

b) o insulto isquêmico é acompanhado de uma entrada acentuada de cálcio para o interior das células;

c) a fosforilação das subunidades dos neurofilamentos apresenta um efeito protetor contra a ação da calpaína, nossos objetivos foram:

- Verificar o efeito da isquemia cerebral transitória (20 min.) e de diferentes tempos de reperfusão (0,1,2,3,7,10 e 15 dias) sobre a concentração das subunidades dos filamentos intermediários (NF-H, NF-M, NF-L e GFAP) de hipocampo de ratos.

- Verificar o efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperfusão sobre o sistema fosforilante associado *in vitro* à fração citoesquelética.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, de ambos os sexos, pesando de 250 a 300g. Os animais foram alimentados com ração comercial (Germania) e tiveram livre acesso à comida e água. Todos os ratos foram mantidos em ambiente climatizado (25°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas.

III.2. PROCEDIMENTO DE ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA

Os animais foram submetidos ao método de oclusão dos quatro vasos com modificações, segundo C.A. Netto et al (1993). Este método reduz o fluxo sanguíneo cerebral para menos de 3% (Pulsinelli et al, 1982). O procedimento foi realizado em dois estágios (Fig. 6). No primeiro dia, o animal foi anestesiado com halotano 2-4% (em ar ambiente) e posicionado em aparelho estereotáxico, fazendo-se uma incisão na linha média da nuca, para se ter acesso ao forâmen alar, na primeira vértebra cervical. Através do forâmen alar, foi introduzida a agulha de um eletrocautério e aplicada uma corrente para eletrocoagular a artéria. Assim, o fluxo pelas artérias vertebrais ficou obstruído. Este processo é denominado eletrocoagulação. A seguir, foi feita uma incisão na linha média

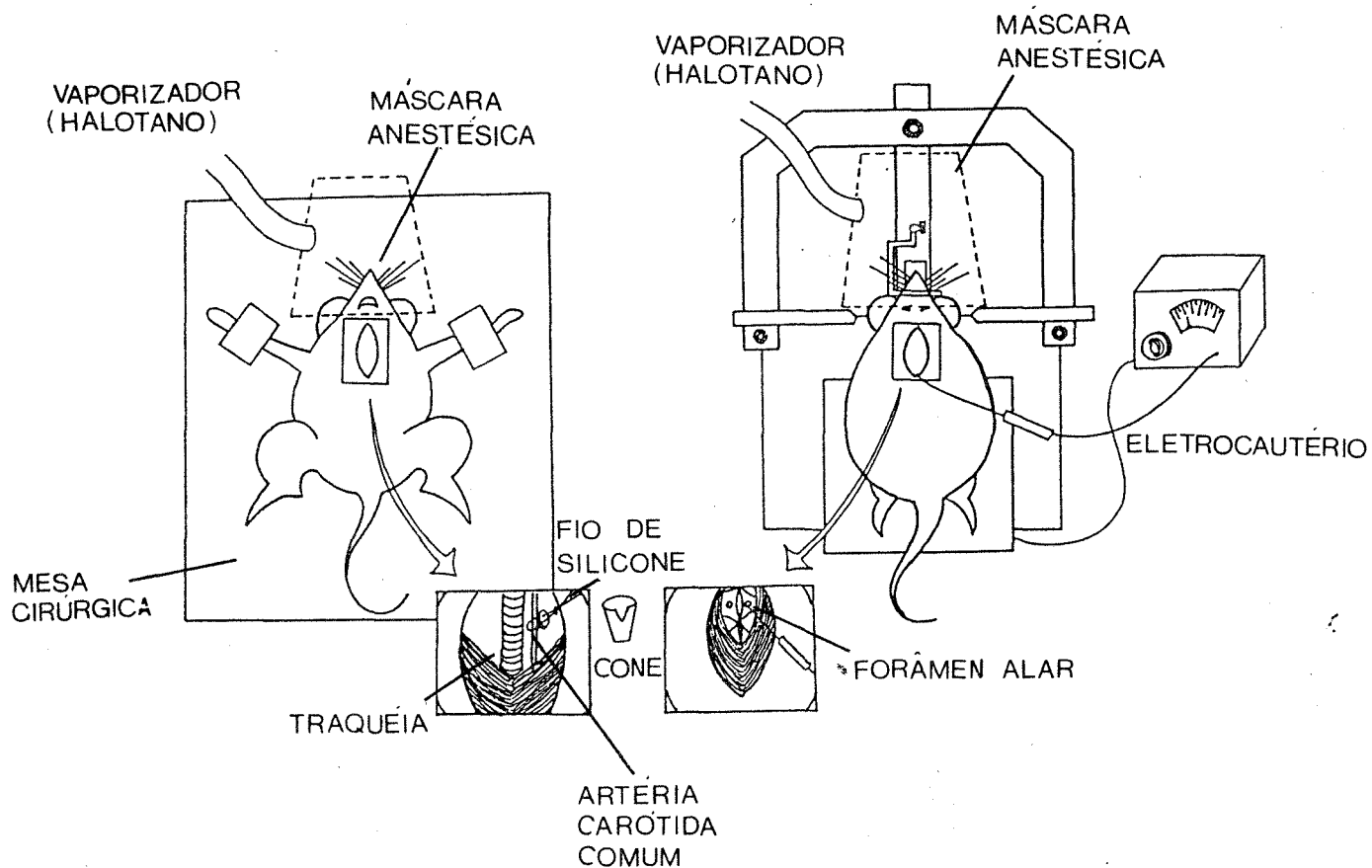


Fig. 6: Esquema do procedimento de isquemia cerebral transitória - método de oclusão dos quatro vasos, com modificações (C.A.Netto et al., 1993). No primeiro dia, sob anestesia com halotano, com o animal em aparelho estereotáxico, é feita a eletrocoagulação das artérias vertebrais, com o auxílio de um eletrocautério. A seguir é feito o isolamento das artérias carótidas, através da colocação de um fio de silicone acoplado a um botão. No dia seguinte, utilizando um cone plástico, o botão é comprimido contra as artérias vertebrais durante vinte minutos.

da face anterior do pescoço e as artérias carótidas foram isoladas. Este procedimento foi feito através da colocação, ao redor das carótidas comuns, de um fio de silicone acoplado a um botão de mesmo material, no qual foi dado um nó. No dia seguinte, os animais foram contidos manualmente, sem uso de fármacos, e pessoas treinadas fizeram a manobra de oclusão das carótidas. Para tanto, foi utilizado um cone plástico com uma ranhura na extremidade de maior diâmetro para comprimir, durante 20 minutos, o botão de silicone contra as artérias carótidas. Tipicamente, os animais perdiam o reflexo de endireitamento dentro de 2 minutos. Aqueles que não cumpriram este critério ou que apresentaram convulsão durante o período isquêmico ou de reperfusão foram descartados. Terminado o episódio isquêmico, os fios de silicone foram liberados. Alguns animais foram sacrificados imediatamente (sem reperfusão) e outros foram sacrificados após 1, 2, 3, 7, 10 ou 15 dias de reperfusão. Animais controle foram submetidos à procedimentos idênticos, exceto que os fios de silicone não foram apertados. Estudos prévios demonstraram que tais animais "sham-operados" não diferem dos controles não-operados (C.A. Netto et al.,1993). Neste trabalho, foram utilizados os dois tipos de controle.

Foram, assim, constituídos 8 grupos experimentais para o presente estudo: animais controle (C), animais com morte imediata após o término da isquemia (imediato ou tempo zero) e animais com diferentes períodos de reperfusão: 1,2,3,7,10 e 15 dias.

III.3. HISTOLOGIA

Aproximadamente 6 animais de cada grupo experimental foram utilizados para análise histológica. Os animais foram anestesiados com pentobarbital e foi feita perfusão transcardíaca com 200-300 ml de formaldeído 4% em solução salina. Os cérebros foram removidos e deixados em formol durante a noite. Após este período, foi feita a inclusão em parafina. Os cérebros foram posteriormente cortados em seções coronais de 7 μ m, em micrótomo rotatório do Departamento de Ciências Morfológicas, e montados em lâminas de vidro. Foi empregada a coloração de hematoxilina-eosina para identificação dos elementos celulares. As técnicas empregadas seguiram o protocolo de rotina empregado no Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS, sob orientação inicial da Prof^a. Dra. Matilde Achaval Elena.

III.4. INCORPORAÇÃO DE ^{14}C *IN VITRO* NAS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

O estudo da incorporação de ^{14}C *in vitro* nas proteínas da fração enriquecida em filamentos intermediários foi feito através da incorporação de L-[U- ^{14}C]leucina, segundo o modelo de Azzolin et al.(1991).

Os hipocampos foram extraídos e fatiados com bisturi. Em seguida, cada hipocampo foi incubado em tubos Eppendorf contendo 0,5 ml de Tampão Krebs-Ringer

bicarbonato (KH_2PO_4 1,18mM, NaHCO_3 24mM, NaCl 1,17mM, KCl 4,7mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5mM , leucina 1mM, glicose 5mM), em atmosfera de 95% O_2 e 5% CO_2 , durante 1 hora, à 30°C, em agitador metabólico Dubnoff, modelo 145 (FANEM,SP), na presença dos seguintes inibidores de proteases: Fenilmetil-sulfonilfluoreto (PMSF) 5mM, calpastatina 1mM, benzamidina 1,4mM, quimiostatina 1,4pM, pepstatina 1,4 μM , antipaína 1,4 μM e leupetina 2,0 μM (SIGMA Chemical Company). A reação foi interrompida com a adição de 1 ml do tampão de extração, descrito em III.5, gelado. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em um homogeneizador Tissue Tearor (BIOSPEC), à 8000 rpm, durante 30 segundos. Em seguida, as amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração descrito em III.5, para obtenção da fração enriquecida em filamentos intermediários. Uma alíquota de 40 μl foi retirada das amostras dissolvidas em SDS 1% e aplicada sobre papel filtro previamente embebido em TCA 20%. Depois de secos, os papéis foram colocados em líquido de cintilação e contados no cintilador líquido LKB-Wallac, modelo 1209. Outra alíquota das mesmas amostras foi dosada pelo método de Lowry (1951). Os valores obtidos pela contagem no cintilador líquido foram relacionados aos valores resultantes da dosagem e assim foi possível estabelecer a relação cpm/mg de proteína.

III.5. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON X-100, NA PRESENÇA DE ALTA FORÇA IÔNICA

A fração enriquecida nas subunidades constituintes dos neurofilamentos foi obtida através do método descrito por Paz et al. (1991). Conforme esquematizado na Figura 7, partiu-se de um "pool" dos dois hipocampus do mesmo animal. O tecido foi homogeneizado com homogeneizador Potter Elvehjem e êmbolo de Teflon a uma velocidade de 4000 rpm, por 30 segundos, à 4°C, em 20 volumes de tampão de alta força iônica: KH_2PO_4 5mM, KCl 600 mM, MgCl_2 10 mM, EGTA 2mM, EDTA 1mM, TRITON X-100 1%, PMSF 1mM, benzamidina 1mM e uma mistura de inibidores de proteases contendo leupeptina 1 μM , antipaína 0,7 μM , pepstatina 0,7 μM , quimiostatina 0,7 pM. O homogeneizado do tecido foi centrifugado durante 10 minutos a 17300 x g, a 4°C, numa centrífuga Sorvall rotor SS-34 e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi novamente homogeneizado em 20 volumes de tampão de alta força iônica e submetido a nova centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente. O precipitado resultante, solúvel em alta força iônica e pH 7.1, correspondia à fração enriquecida em filamentos intermediários (Fração FI). As proteínas da fração enriquecida (FI) foram precipitadas com ácido tricloroacético 5% à frio e lavadas duas vezes com etanol e uma vez com acetona. Após a completa evaporação da acetona, as proteínas foram dissolvidas em SDS 1% e armazenadas à - 20°C para posterior utilização.

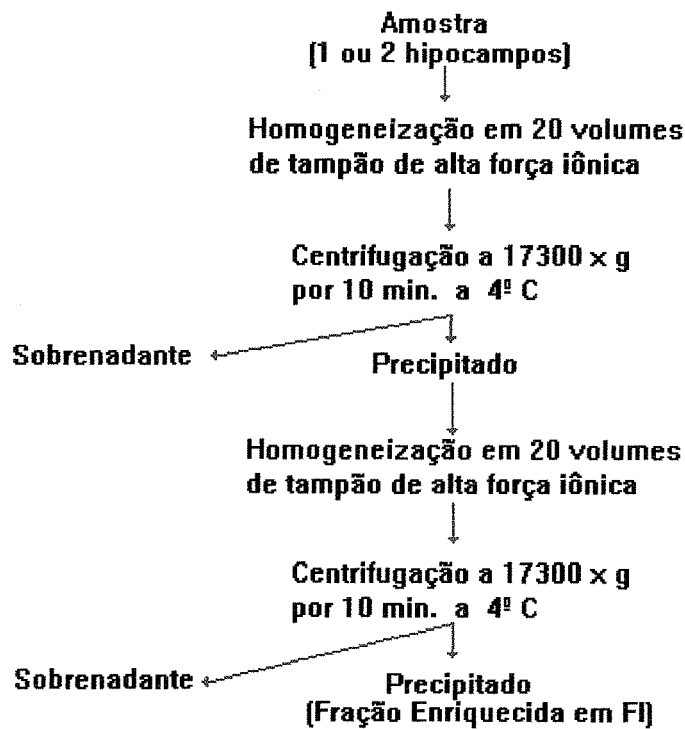


Fig. 7: Esquema de obtenção da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 enriquecida em filamentos intermediários (fração FI).

III.6. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA INSOLÚVEL EM TRITON

X-100

Para a obtenção da fração citoesquelética das células de hipocampo para os experimentos de incorporação de ^{32}P *in vitro* foi utilizada a técnica descrita por Sihag e Nixon (1989), com algumas modificações (Fig 8). Partindo de um hipocampo de rato adulto, foi feita a homogeneização do tecido em tampão A (Tris-HCl 50mM, EGTA 5mM, PMSF 1mM, Triton X-100 1%, Benzamidina 1mM, pH 6,8), com os seguintes inibidores de proteases: leupeptina 1 μM , antipaína 0,7 μM , pepstatina 0,7 μM , e quimiostatina 0,7 pM. A homogeneização foi feita na razão de 8mg de tecido/ml de tampão, em homogeneizador Potter Elvehjem e êmbolo de teflon, na velocidade de 4000 rpm, por 30 segundos. O tecido homogeneizado foi centrifugado em centrífuga Sorvall rotor SS-34 a 13000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado insolúvel foi dissolvido em tampão B (Tampão A contendo sacarose 0,85M) e novamente centrifugado nas mesmas condições. As proteínas insolúveis obtidas correspondiam à fração citoesquelética. O precipitado foi dissolvido em tampão MES (2[N-morpholino] ethanesulfonic Acid)(SIGMA) 50mM pH 6,5, MgCl_2 10 mM (Mattos et al., 1994) e foi feita a dosagem das proteínas de acordo com o método de Bradford (1977). Uma alíquota contendo 10 μg de proteína foi utilizada para o estudo da fosforilação e o restante foi precipitado em ácido tricloroacético (TCA) 5% à frio, lavado 2 vezes com etanol e 1 vez com acetona. Após a evaporação da acetona, foi feita a dissolução em SDS (lauril sulfato de sódio) 1% e a proteína foi dosada pelo método de Lowry (1951). A seguir, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE e

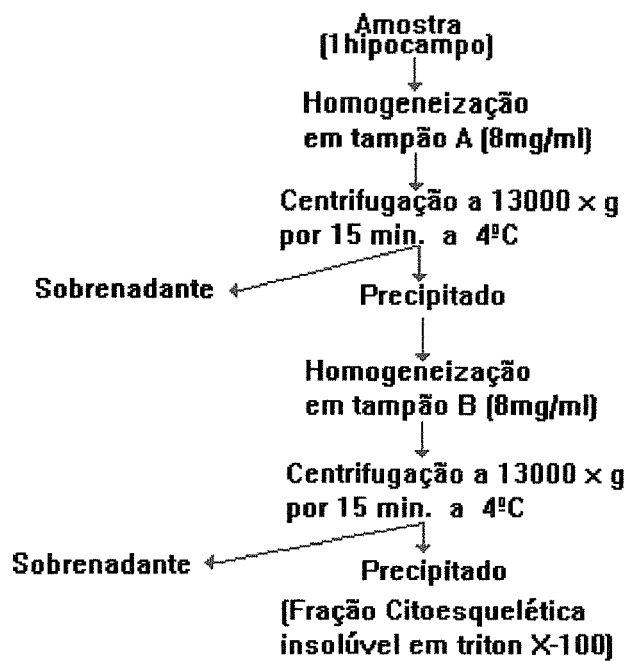


Fig.8: Esquema de extração da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100.

quantificadas por densitometria, com descrito em III.7 e III.9.

III.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As amostras, dosadas previamente, foram diluídas em tampão contendo Tris-HCl 65mM, glicerol 10%, SDS 3%, β -mercaptoetanol 5%, pH 6,8 (Laemmli,1970) até uma concentração protéica final de 2mg/ml. A seguir, foram fervidas por três minutos e analisadas em SDS-PAGE à 10%, em placas com dimensões de 17x17x1 cm (Laemmli,1970). Foi utilizado como padrão de peso molecular o 'KIT MW-SDS 200 (6H)' (SIGMA), com as seguintes proteínas: anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (45 kDa), albumina bovina (66 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), galactosidase (116 kDa) e miosina (205 kDa). A corrente elétrica foi gerada por uma fonte de marca Shandon Southern, com corrente inicial de 60V e 12mA por placa, passando a 100V e 50 mA após 90 minutos do início da migração. A duração média de cada corrida foi de 7 horas, sendo a migração acompanhada com o corante azul de bromofenol 2% em água. Ao término da migração, o gel foi corado com Comassie-Blue R-250 (SIGMA) 0,2%, metanol 50% e ácido acético 10% durante 3 horas. A seguir, o gel foi descorado através de sucessivas lavagens em solução contendo metanol 20% e ácido acético 7%, até a descoloração completa do fundo.

III.8. SECAGEM DOS GÉIS

Após a descoloração, os géis foram embebidos em solução de secagem (metanol 50% e glicerol 1%) durante 1 hora. Em seguida, cada gel foi colocado entre duas folhas de papel celofane previamente banhadas na mesma solução e o conjunto foi firmemente adaptado a uma placa de vidro. A secagem foi feita com o auxílio de uma lâmpada de raios infra-vermelhos (INFRAPHIL), a uma distância de 40 cm da placa, durante 2 horas.

III.9. DENSITOMETRIA

A análise quantitativa das proteínas constituintes dos filamentos intermediários foi feita pelo método densitométrico (Rubin et,al.,1992), utilizando géis de SDS-PAGE secos. Para isso, foi utilizado um densitômetro Hoefer Scientific Instruments GS 300 Transmittance/Reflectance Scanning Densitometer, o qual representa de forma gráfica a intensidade de cada banda lida no gel. Os picos resultantes da leitura das bandas correspondiam às proteínas presentes na fração enriquecida em filamentos intermediários. Cada pico foi cuidadosamente recortado e pesado em balança analítica da marca Mettler. Conhecido o peso do pico, foi possível estabelecer a percentagem de cada uma das proteínas contidas na fração analisada. O cálculo da quantidade absoluta de cada proteína foi feito considerando-se que a quantidade total de proteína, dosada

pelo método de Lowry, correspondia a 100%.

III.10. IMUNODETECÇÃO (IMMUNOBLOTTING) DAS SUBUNIDADES DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS

Este método foi utilizado para caracterização das subunidades dos neurofilamentos e da GFAP presentes na fração citoesquelética obtida pelo processo de extração descrito em III.5. Esta fração foi submetida a SDS-PAGE, como descrito em III.7. A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi feita usando o sistema "semidry electroblotting", como descrito por Svoboda et al.(1985), utilizando tampão Tris 48mM, glicina 39mM, SDS 1,3 mM, metanol 20% (v/v)(Bjerrum e Schaefer-Nielsen,1986) com uma densidade de corrente de 1,2mA /cm², durante 60 minutos. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão TBS (NaCl 0,5M , Tris 20mM pH 7,5) por 10 minutos e foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos na nitrocelulose, através de incubação com o tampão TBS contendo leite desnatado 5% (solução bloqueadora) durante 2 horas, à temperatura ambiente. Feito o bloqueio, foram realizadas duas lavagens com tampão TBS contendo Tween 20 0,05% (SIGMA)(T-TBS). Cada lavagem teve a duração de 5 minutos. Após, a membrana de nitrocelulose foi incubada durante a noite, sob agitação, à temperatura ambiente com os anticorpos monoclonais anti-NF-L (N-5139, clone NR4), diluído 1:100, anti-NF-M (N-5264, clone NN18), diluído 1:50, anti-NF-H (N-5389, clone NE14), diluído 1:100 e anti-GFAP (G-3863,

clone G-A-5), diluído 1:500. Todos os anticorpos foram obtidos da SIGMA. As diluições foram feitas em solução bloqueadora. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com T-TBS e efetuou-se a reação com o conjugado anti-IgG obtido de rato, marcado com peroxidase (SIGMA), diluído 1:4000 em solução bloqueadora. Esta incubação foi feita sob agitação, durante duas horas à temperatura ambiente e, ao final, foram feitas duas lavagens com tampão T-TBS durante 5 minutos.

A reação imunológica foi revelada com 4-cloro-1-naftol (INLAB) 0,6mg/ml em TBS contendo 0,01% (v/v) H₂O₂ 30%, segundo Hawkes et al.(1982).

III.11. INCORPORAÇÃO DE ³²P *IN VITRO* NAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO

A fração citoesquelética preparada como descrito em III.6 serviu como fonte de substrato e do sistema fosforilante para os experimentos de incorporação de ³²P *in vitro*.

A incorporação de ³²P *in vitro* nas proteínas do citoesqueleto foi feita numa alíquota de 10 µg de proteína, em 60 µl de tampão MES 50 mM, pH 6,5, ATP 25 µM, MgCl₂ 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 2µCi [³²P]-ATP (5pM γ³²-ATP)(5,5 x 10⁻¹⁰ Bq)(16,6 x 10⁻¹⁰ Bq/mmol)(ICN Radiochemicals, Irwine, CA) à cada amostra (2µCi/10µg de proteína). Este sistema foi incubado a 30°C, durante 5 minutos. Terminado o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de tampão de amostra

concentrado (Glicerol, β -mercaptoetanol, SDS 10%, na proporção de 2:1:3 e 20 μ l de NaOH) 20% (v/v)(Laemmli, 1970), seguida de fervura em banho-maria durante 3 minutos. Estas amostras foram submetidas à SDS-PAGE e, após o término da migração, os géis foram secos e expostos a filmes de auto-radiografia (KODAK X-Omat K) a -70°C, durante 2 horas e 30 min. Os géis secos foram sobrepostos aos filmes de auto-radiografia e as bandas correspondentes às proteínas que apresentaram incorporação de ^{32}P foram cortadas e dissolvidas por incubação em 0.5 ml de H_2O_2 30% (Merck) a 60°C, durante a noite (Garner, 1988). Três mililitros de líquido de cintilação (Tolueno-538 ml/l, Triton X-100 345 ml/l, etanol 177 ml/l, PPO ([2,5'-Difeniloxazol])(Vetec) 2,75 g/l, POPOP ([2,2'-Fenilenbis(5-Feniloxazol)])(Vetec) 0,21 g/l) foram adicionados nas amostras e a radioatividade incorporada foi contada no cintilador líquido. Os valores (cpm) obtidos pela contagem no cintilador líquido foram relacionados aos valores resultantes da quantificação densitométrica de cada proteína (μg) e, assim, foi possível estabelecer a relação cpm/ μg de proteína.

III.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através de análise de variância de uma via (one way ANOVA), seguida de teste de raio múltiplo de Duncan, quando indicado.

Os dados expressos em percentagem do controle foram analisados através do "teste t" de Student.

As diferenças foram consideradas significativas sempre que $p \leq 0,05$.

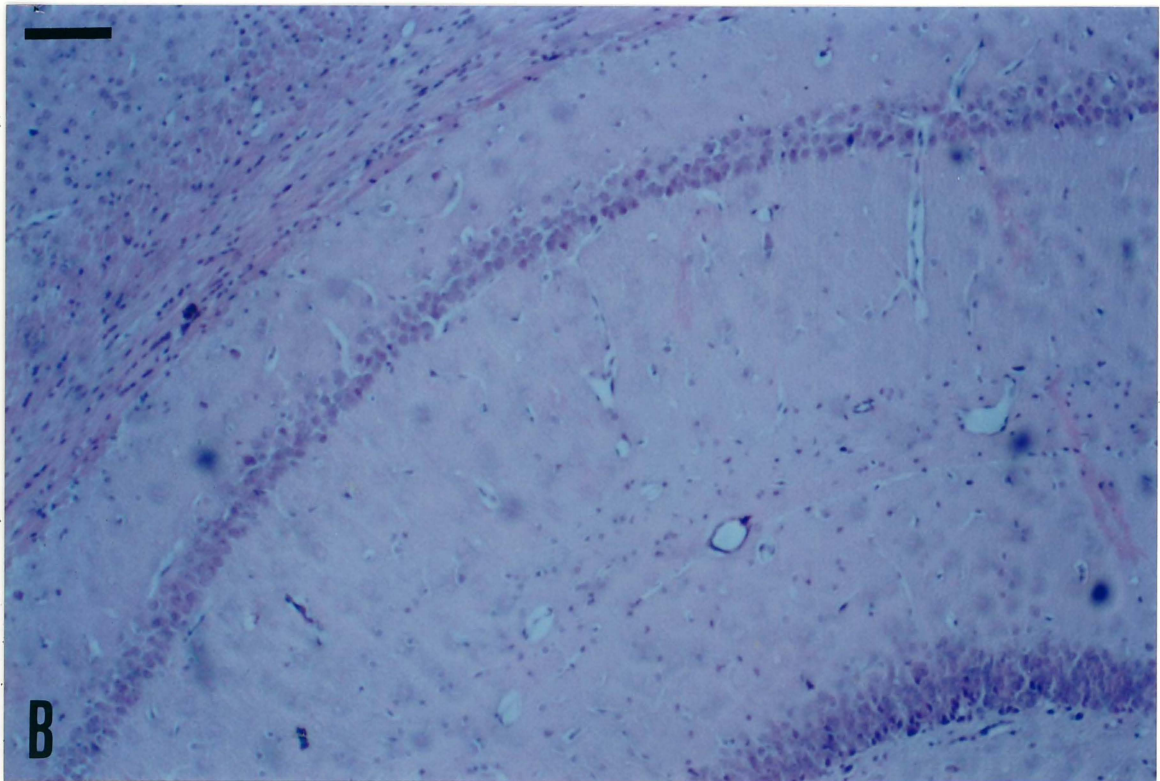
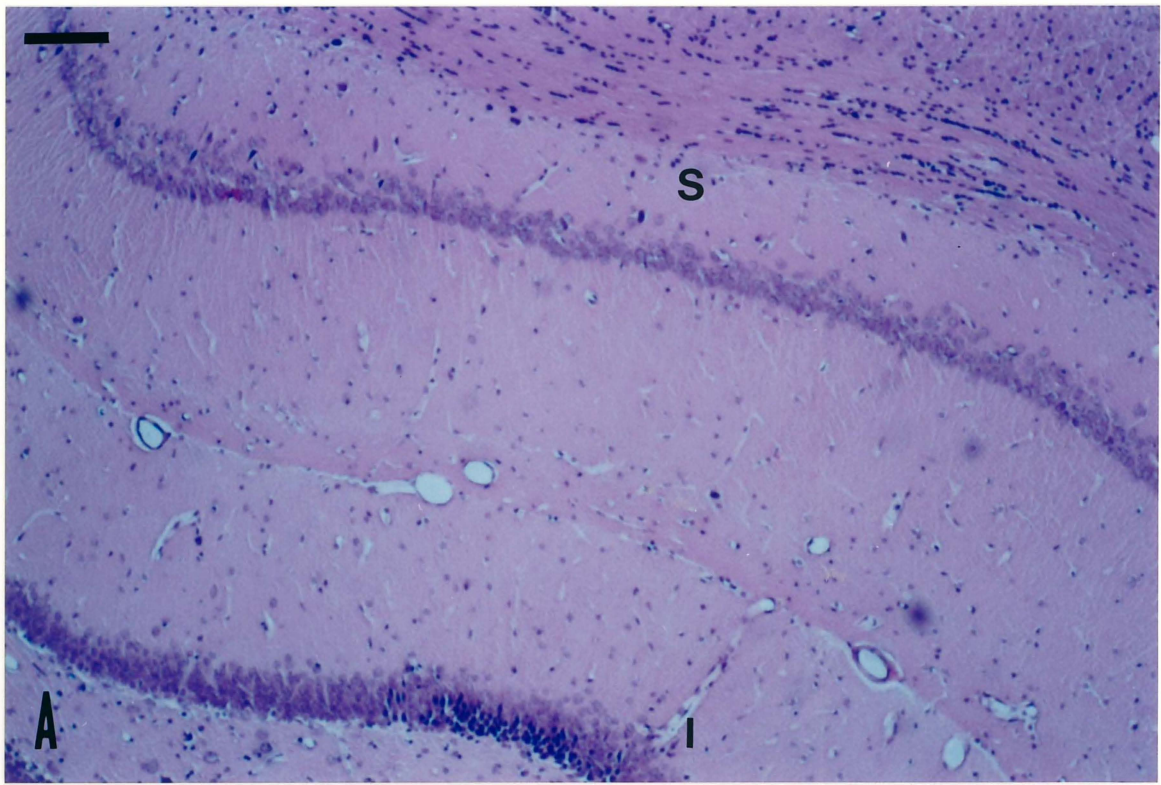
Todas as análises foram feitas usando o programa SPSS, em um computador IBM-PC compatível.

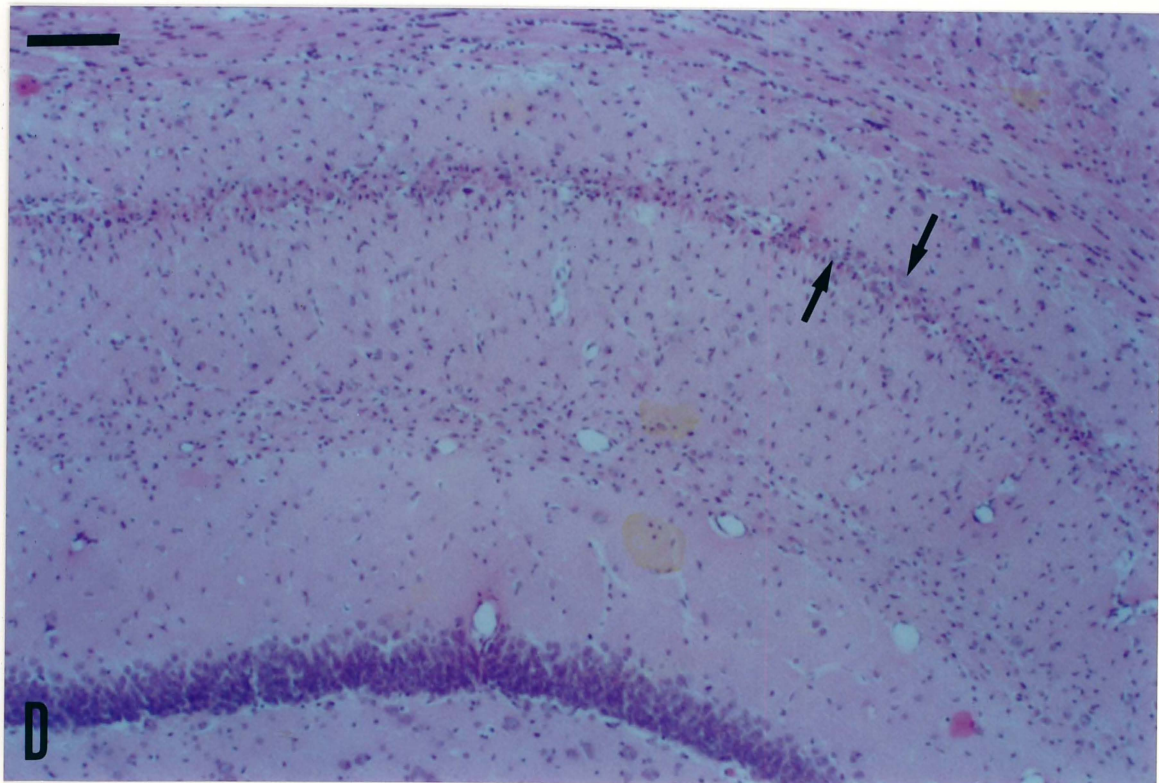
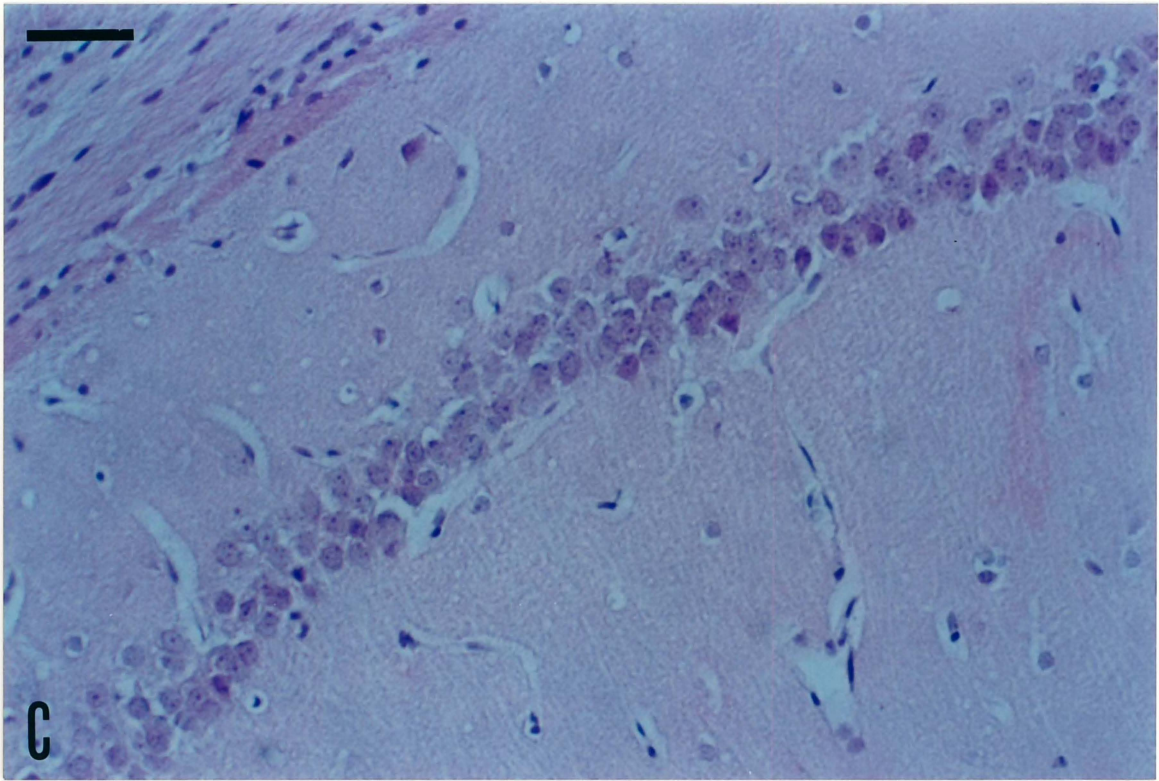
IV.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

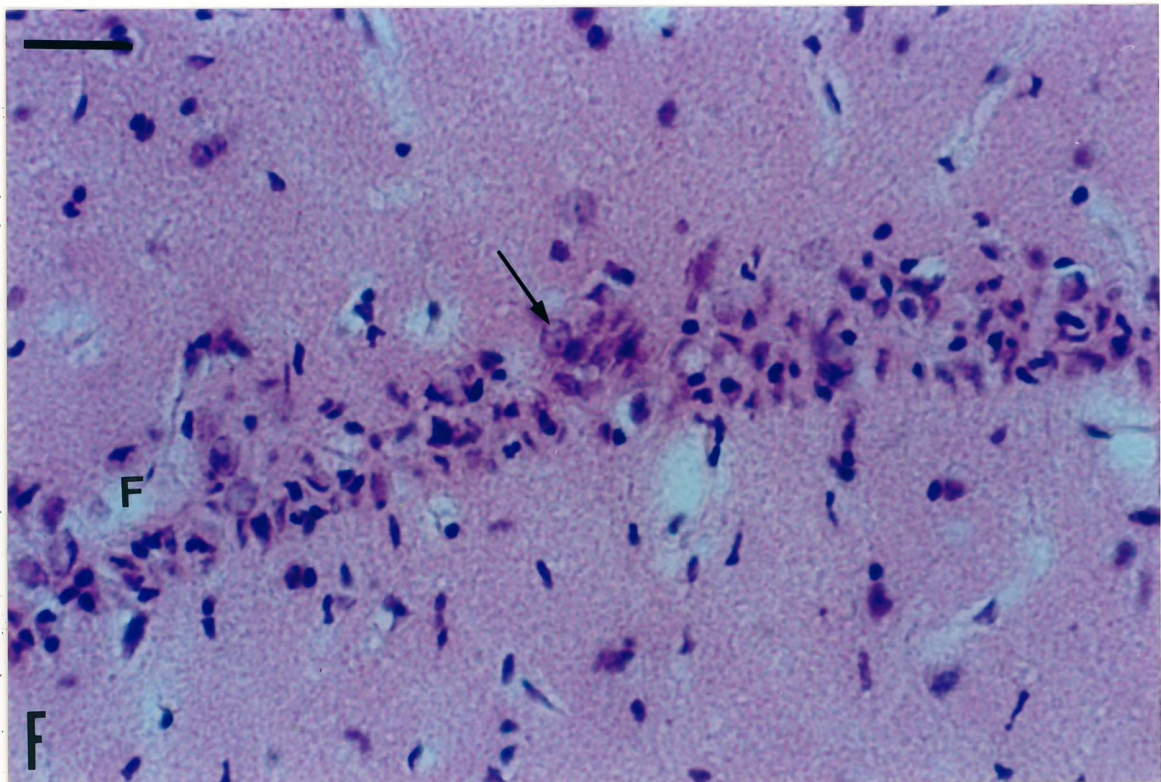
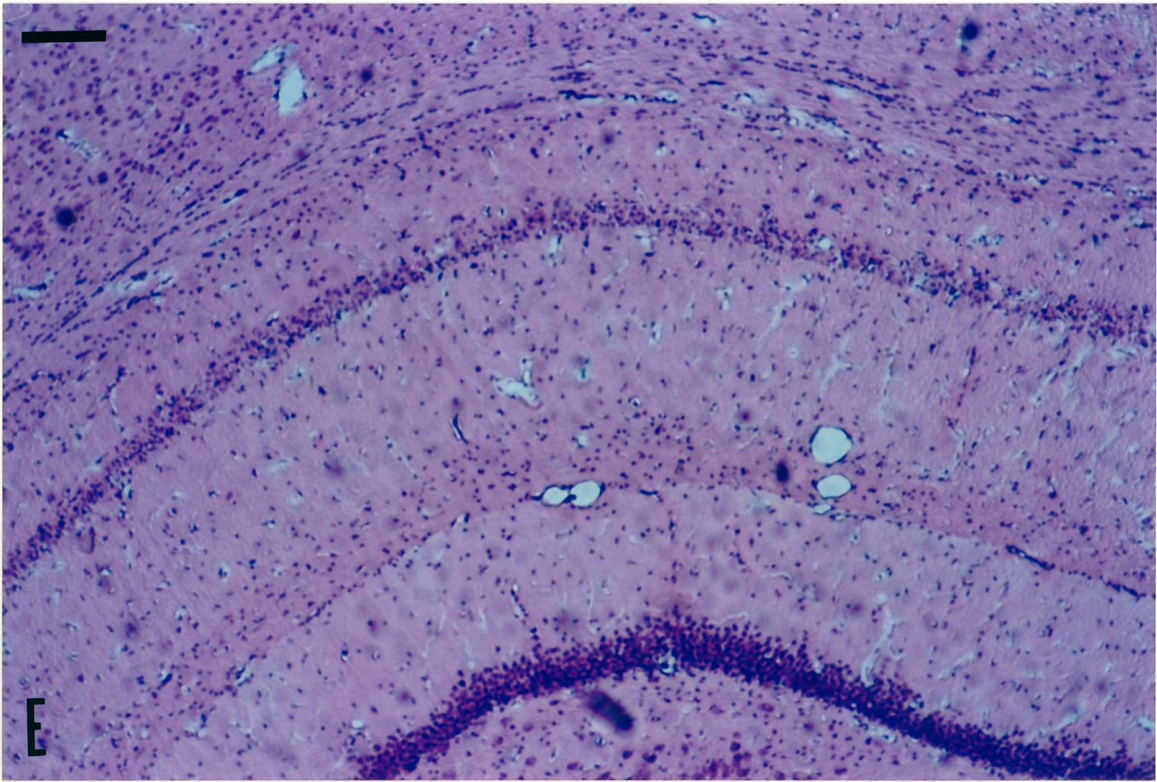
Na Figura 9A é apresentada uma secção coronal, num plano frontal típico, de um hipocampo de rato controle. As Figuras 9B a 9H referem-se a hipocampos de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória em pontos representativos do período de reperfusão estudado. A técnica de coloração empregada foi hematoxilina/eosina, como decrito em materiais e métodos, seção III.3.

Como podemos observar na Figura 9A, visualiza-se as regiões superior (S) e inferior (I) do hipocampo dorsal. Esta estrutura é dividida em setores, nomeados de acordo com o tipo celular predominante. O setor CA1 (mostrado nas fotos) contém células piramidais dispostas em duas ou três camadas. Nota-se que as células apresentam-se íntegras, de formato arredondado e com núcleo bem aparente. Após 1 dia do insulto isquêmico (Figs. 9B e 9C), este perfil se mantém, não se detectando alteração visível ou qualquer indício de morte neuronal. Na Fig. 9B observa-se a presença bem definida do setor CA1. A Fig. 9C mostra claramente, em detalhe, a integridade dos neurônios do setor CA1 após 1 dia de reperfusão. Este mesmo perfil ainda é observado após dois dias de reperfusão.

A Fig. 9D apresenta o setor CA1 após 3 dias de reperfusão. Neste período, podemos observar o desaparecimento quase completo das células piramidais e a invasão do setor por células da glia. Note-se a presença de raras células com aspecto normal (setas) e a abundância de restos celulares.







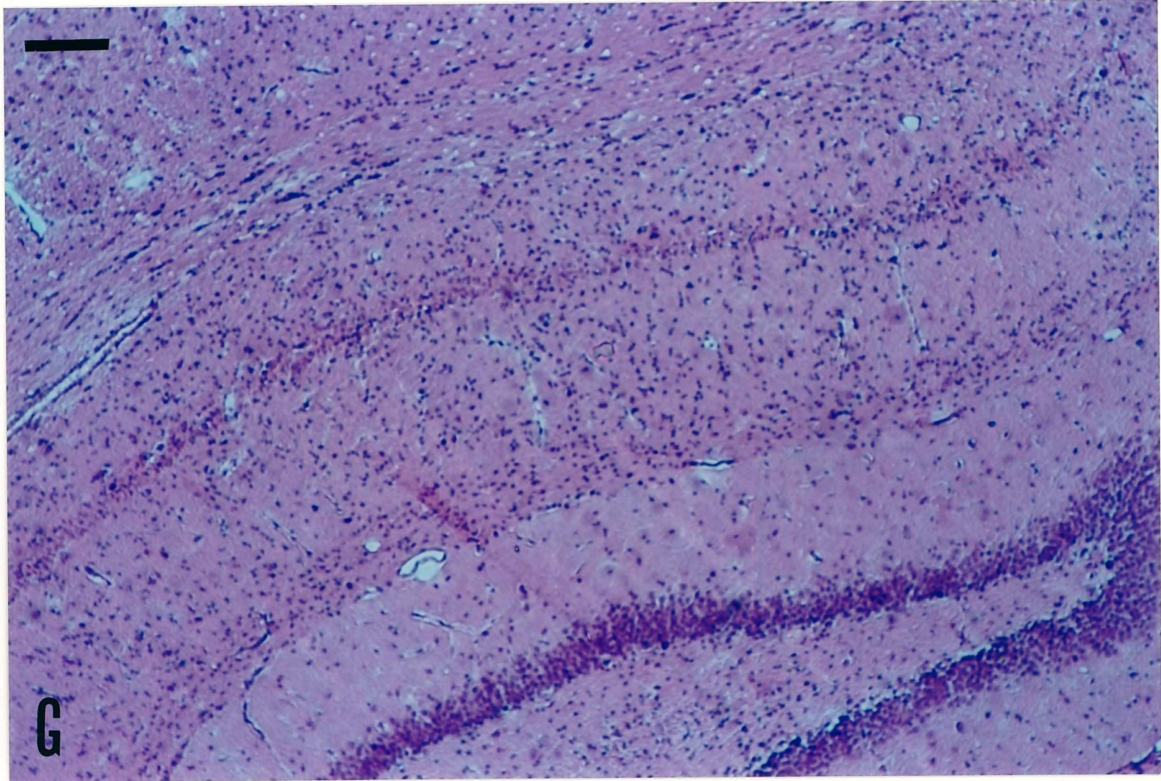


Fig. 9: Análise histológica de hipocampos de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória em pontos representativos do período de reperfusão estudado. Nas fotos, visualiza-se o setor CA1, na porção dorsal do hipocampo. **A**: hipocampo de animais controle. Visualiza-se as regiões superior (S) e inferior (I) do hipocampo dorsal, com células piramidais íntegras, de núcleo bem aparente. **B** e **C**: hipocampo após 1 dia de reperfusão. Não se detecta alteração visível ou qualquer indício de morte neuronal. **D**: hipocampo após 3 dias de reperfusão. Observa-se o desaparecimento quase completo das células piramidais e a invasão do setor por células da glia. Note-se a presença de raras células com aspecto normal (setas) e a abundância de restos celulares. **E** e **F**: hipocampo após 7 dias de reperfusão. A necrose neuronal é muito acentuada. As células do setor CA1 desapareceram, permanecendo apenas restos celulares e os espaços vazios deixados pelos neurônios que morreram, denominados "fantasmas" (F). A seta indica uma célula aparentemente íntegra. **G**: hipocampo após 15 dias de reperfusão. Note-se o desaparecimento completo das células piramidais. Os restos celulares sumiram, dando lugar às células da glia, muito numerosas. Foi empregada a coloração de hematoxilina/eosina. A, B, D, E e G: pequeno aumento (barra de calibração-100 μ m); C e F: maior aumento (barra de calibração-50 μ m).

Após 7 dias de reperfusão (Figs. 9E e 9F), a necrose neuronal na região CA1 é muito acentuada. Observa-se na Fig. 9E que as células do setor CA1 desapareceram, permanecendo apenas restos celulares, corados intensamente. Neste momento, nota-se uma gliose acentuada característica, em resposta à perda celular. Na Fig. 9F são mostrados, em maior detalhe, os restos celulares e os espaços vazios denominados "fantasmas" (F), deixados pelos neurônios que morreram, os quais ainda não foram preenchidos por tecido conjuntivo. Podemos também observar a distinção de uma célula aparentemente íntegra entre os restos celulares das demais (seta).

Após 10 dias de reperfusão, os restos celulares desaparecem, ocorrendo um aumento do número de células gliais.

Aos 15 dias de reperfusão (Fig. 9G) nota-se o completo desaparecimento das células piramidais do setor CA1, com uma gliose muito intensa. Observa-se que os restos celulares sumiram, dando lugar às células da glia, muito numerosas.

IV.2. OBTENÇÃO DO CITOESQUELETO DE CÉLULAS DE HIPOCAMPO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Neste trabalho, os experimentos bioquímicos foram realizados em duas frações citoesqueléticas distintas, que foram aqui denominadas fração citoesquelética e fração enriquecida em filamentos intermediários (fração FI). A fração citoesquelética contém as proteínas insolúveis na presença de 1% Triton X-100 que, por definição, constituem as

proteínas do citoesqueleto. Esta fração contém proteínas do citoesqueleto na forma insolúvel e ainda uma grande variedade de proteínas associadas e enzimas relacionadas com as funções do citoesqueleto *in vivo*. A fração citoesquelética foi utilizada para os experimentos de incorporação de ^{32}P *in vitro*.

A fração FI é uma fração citoesquelética extraída em tampão de alta força iônica, na presença de 1% Triton X-100. Nestas condições, os filamentos intermediários são mantidos na sua forma polimerizada durante o processo de extração, sendo recuperados na fração insolúvel, enquanto que as subunidades constituintes de outros tipos de filamentos, enzimas e proteínas associadas são em grande parte solubilizadas, permanecendo no sobrenadante após centrifugação. Deste modo, a fração enriquecida em filamentos intermediários é representativa do conteúdo total de filamentos intermediários presentes na forma polimerizada dentro da célula, sendo adequada para o estudo quantitativo destes filamentos sob o efeito de nossas condições experimentais. No entanto, o estudo bioquímico sobre a capacidade de incorporação de ^{32}P *in vitro* em proteínas do citoesqueleto foi realizado na fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100.

A Figura 10 mostra o perfil eletroforético das frações citoesqueléticas obtidas nos diferentes tempos de reperfusão após a isquemia. Podemos observar que na fração FI (Fig.10A) há um grande número de bandas relacionadas às proteínas constituintes dos filamentos intermediários. Nesta fração identificam-se 7 bandas principais cujos pesos moleculares correspondem aos descritos na literatura para os filamentos intermediários (Lazarides, 1982; Quinlan et al., 1985): as subunidades dos neurofilamentos, com 200 (NF-

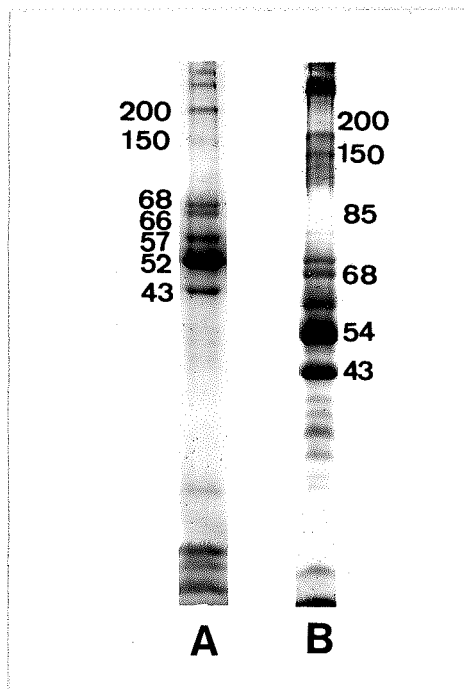


Fig.10: Géis de SDS-PAGE 10% das frações citoesqueléticas obtidas por diferentes métodos de extração. **A:** fração enriquecida em filamentos intermediários (fração FI), extraída com tampão de alta força iônica (600 mM KCl) na presença de 1% Triton X-100. À esquerda estão indicados os pesos moleculares correspondentes às sete bandas principais identificadas nesta fração: NF-H (200 kDa), NF-M (150 kDa), NF-L (68 kDa), uma proteína associada aos neurofilamentos (66 kDa), vimentina (57 kDa), GFAP (52 kDa) e actina (43 kDa). **B:** fração citoesquelética, extraída na presença de Triton X-100. À direita estão indicados os pesos moleculares correspondentes às bandas identificadas nesta fração: NF-H (200 kDa), NF-M (150 kDa), NF-L (68 kDa), uma proteína citoesquelética associada (85 kDa), β -tubulina (54 kDa) e actina (43 kDa). Os géis representam duas corridas diferentes e foram corados com Comassie blue.

H), 150 (NF-M) e 68 (NF-L) kDa, uma proteína associada aos neurofilamentos com 66 kDa (Chiu et al., 1989), vimentina, com 57 kDa e GFAP (proteína glial fibrilar ácida), subunidade dos filamentos gliais, com 52 kDa. Observa-se ainda a presença de uma banda de 43 kDa, peso molecular da actina, subunidade constituinte dos microfilamentos. Embora as propriedades de solubilidade da actina sejam diferentes daquelas dos filamentos intermediários, sabe-se que uma parcela destas estruturas está associada *in vivo* aos filamentos intermediários, sendo isoladas com estes durante o processo de extração.

Na fração citoesquelética (Fig 10B) detectamos um número maior de bandas, devido a menor seletividade das condições de extração desta fração, ou seja, um grande número de proteínas associadas ao citoesqueleto é extraído através deste método. Podemos identificar, entre outras, as subunidades dos neurofilamentos com 200 (NF-H), 150 (NF-M) e 68 (NF-L) kDa, uma banda de 54 kDa identificada previamente em nosso laboratório como a β -tubulina, uma banda de 85 kDa de identidade desconhecida e uma banda de 43 kDa com peso molecular correspondente ao da actina.

IV.3. ESTUDO DOS EFEITOS DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE AS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FRAÇÃO FI)

IV.3.1. Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de

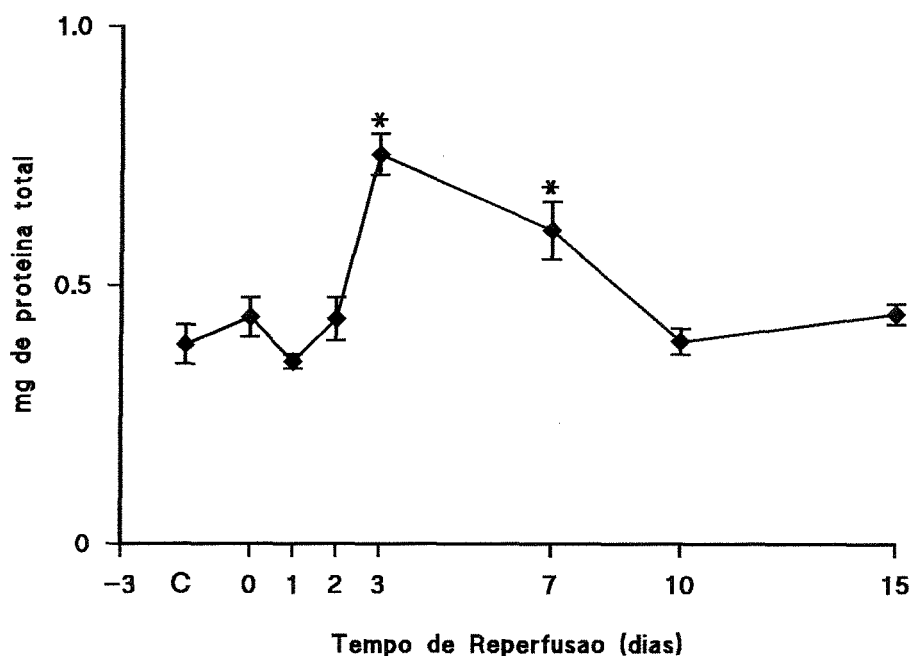


Fig. 11: Efeito da isquemia cerebral transitória sobre o conteúdo protéico total da fração FI de hipocampo de ratos. Amostras representativas de cada ponto estudado (controle e 0,1,2,3,7,10,15 dias de reperfusão) foram dosadas de acordo com o método de Lowry (1951). C refere-se ao controle. Dados (\pm erro-padrão) foram expressos em mg de proteína total da fração FI e representam a média de 8-10 experimentos. Diferenças foram consideradas significativas sempre que $p \leq 0,05$, de acordo com a análise de variância de uma via (ONE WAY ANOVA).

reperfusão sobre o conteúdo protéico da fração FI.

A Figura 11 representa os resultados obtidos a partir da dosagem do conteúdo protéico total na fração FI dos grupos controle e isquêmico, nos diferentes tempos de reperfusão. Estes dados foram expressos em mg de proteína total da fração FI. Os resultados demonstraram que o conteúdo protéico não foi alterado até o 2º dia de reperfusão após o insulto isquêmico, porém houve um aumento significativo no conteúdo destas proteínas a partir do 3º dia de reperfusão, permanecendo aumentado até o 7º dia e retornando aos níveis normais após 10 e 15 dias.

IV.3.2. Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperfusão sobre a incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina nas proteínas da fração FI

O estudo da incorporação de ^{14}C -leucina nas proteínas da fração enriquecida em filamentos intermediários foi realizado com o objetivo de verificar se o aumento do conteúdo protéico desta fração poderia ser relacionado com alteração de síntese das proteínas nos diferentes intervalos após o insulto isquêmico.

A Figura 12 apresenta os resultados referentes à incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina nas proteínas da fração FI. Os resultados foram obtidos em cpm/mg de proteína da fração e expressos em percentagem do controle. Nesta figura, observa-se que, até o 2º dia de reperfusão, houve uma oscilação da incorporação de ^{14}C -leucina nestas proteínas em torno dos valores normais, apresentando um aumento significativo no 3º dia

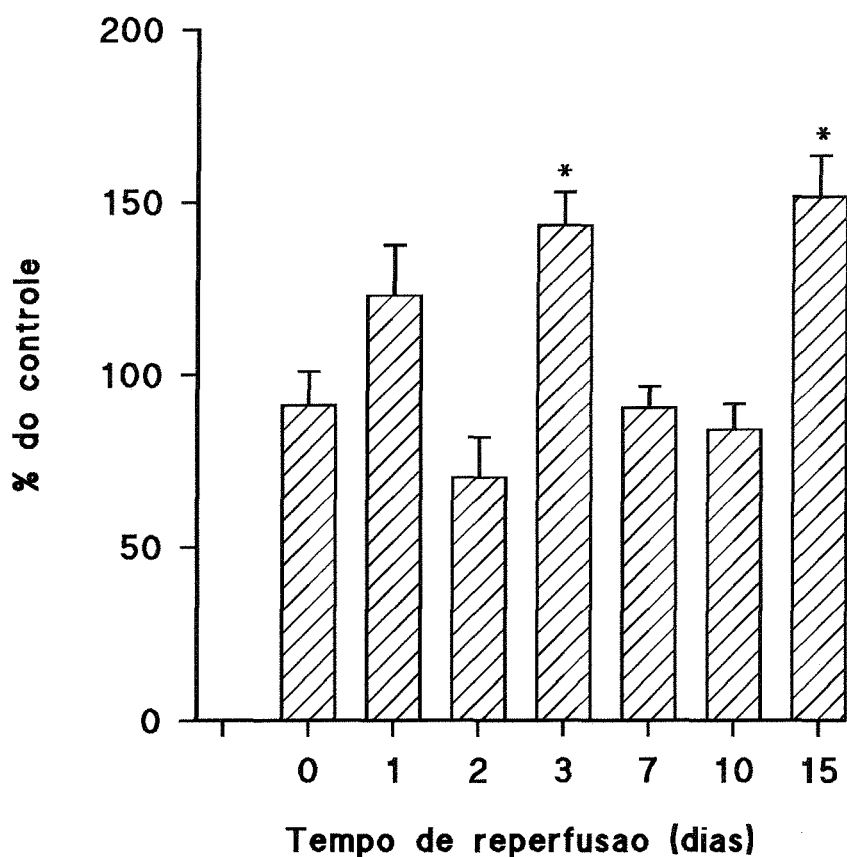


Fig. 12: Efeito da isquemia cerebral transitória sobre a incorporação de ^{14}C -leucina nas proteínas da fração FI de hipocampo de ratos. Fatias de hipocampus de cada modelo experimental (controle e 0,1,2,3,7,10,15 dias de reperusão) foram incubadas em meio Krebs-Ringer com ^{14}C -leucina durante 1 hora a 30°C . As proteínas foram extraídas em tampão de alta força iônica, precipitadas com TCA 5% e dissolvidas em SDS 1%. A radioatividade incorporada foi contada em cintilador líquido. Os resultados foram obtidos em cpm/mg de proteína total e expressos em % do controle. Dados (\pm erro-padrão) representam média de 6-8 experimentos. As diferenças foram consideradas significativas sempre que $p \leq 0,05$, de acordo com o teste "t pareado" de Student.

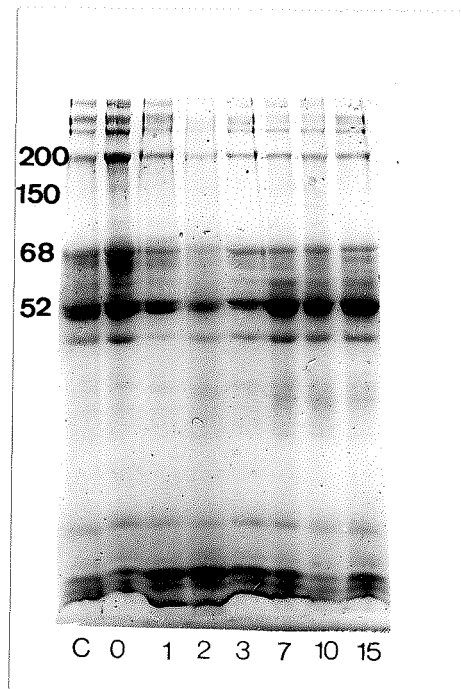


Fig. 13: SDS-PAGE 10% da fração enriquecida em filamentos intermediários (fração FI) nos diferentes tempos de reperfusão. À esquerda estão indicados os pesos moleculares das subunidades dos neurofilamentos (NF-H: 200 kDa, NF-M: 150 kDa, NF-L: 68 kDa) e dos filamentos gliais (GFAP: 52 kDa). Na 1ª linha, C refere-se ao controle. Nas demais, os números indicam os diferentes tempos de reperfusão, em dias. O gel foi corado com Comassie blue.

de reperfusão, coincidindo com o aumento do conteúdo protéico da fração (Fig.11). A incorporação de ^{14}C -leucina voltou aos valores normais aos 7 e 10 dias, acompanhando a volta do conteúdo protéico a valores normais. No entanto, a incorporação de ^{14}C -leucina sofreu novo aumento aos 15 dias de reperfusão, o qual não foi acompanhado pelo aumento do conteúdo protéico.

IV.3.3. Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperfusão sobre o perfil eletroforético das proteínas da fração enriquecida em filamentos intermediários (fração FI) de hipocampo

O perfil eletroforético apresentado na Figura 13 corresponde às proteínas da fração FI analisadas em SDS-PAGE. O gel apresenta uma curva de reperfusão, onde foram aplicadas amostras representativas dos diferentes tempos estudados: 0,1,2,3,7,10 e 15 dias de reperfusão.

A análise dos perfis eletroforéticos comparados ao perfil da fração FI dos animais controles mostra a presença das subunidades NF-H, NF-M e NF-L dos NFs, bem como a GFAP, ao longo de todos os tempos estudados. Por este método não identificamos alterações nos perfis eletroforéticos, decorrentes da presença de produtos de degradação destas proteínas.

IV.3.3.1. Análise imunológica das proteínas da fração enriquecida em filamentos

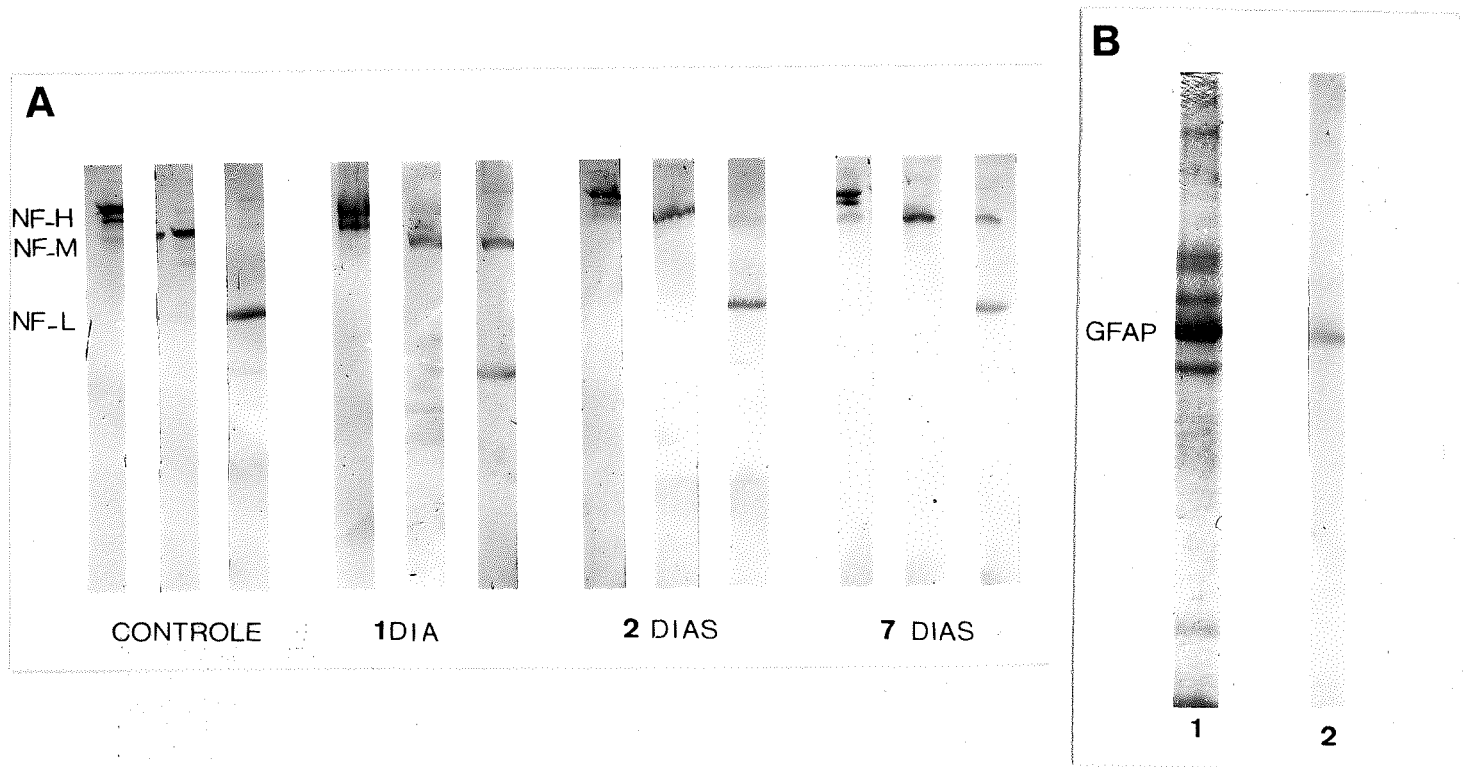


Fig.14: Imunodeteccção das subunidades dos filamentos intermediários na fração FI. Membranas de celulose contendo a fração FI foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-NF-H, anti-NF-M, anti-NF-L e anti-GFAP. A imunodeteccção foi feita através do conjugado anti-IgG de rato, marcado com peroxidase e revelada com 4-cloro-1-naftol. **A:** imunodeteccção das subunidades dos neurofilamentos de animais controle e de pontos representativos da curva de reperusão estudada (1,2 e 7 dias). **B:** identificação da GFAP no perfil densitométrico da fração FI (linha 1) através de imunodeteccção (linha 2). O gel na linha 1 foi corado com Comassie blue.

intermediários (fração FI).

Na Figura 14, as subunidades da fração enriquecida em filamentos intermediários foram submetidas à análise imunológica por "immunoblotting", utilizando-se os anticorpos monoclonais anti-NF-H, anti-NF-M, anti-NF-L e anti-GFAP, descritos em Materiais e Métodos, seção III.10. O estudo imunológico (Fig.14A) foi feito na fração FI dos animais controle e em pontos representativos da curva de reperfusão (1, 2 e 7 dias de reperfusão). Observou-se que, em todos estes intervalos, foram detectadas a presença das subunidades NF-H, NF-M e NF-L dos neurofilamentos. Podemos ainda observar o não aparecimento de produtos de degradação detectáveis imunologicamente. A presença de duas bandas detectadas pelo anticorpo anti-NF-H deve-se provavelmente a presença desta subunidade em dois níveis de fosforilação. Realizamos também a imunodeteccção da banda de 52 kDa, identificada como sendo a subunidade dos filamentos gliais, através da utilização de anticorpo monoclinal anti-GFAP. A Figura 14B apresenta na linha 1 o perfil eletroforético corado com coomassie blue R-250 e na linha 2 a imunodeteccção da GFAP.

IV.3.4. Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperfusão sobre a concentração das subunidades dos neurofilamentos e dos filamentos gliais na fração FI.

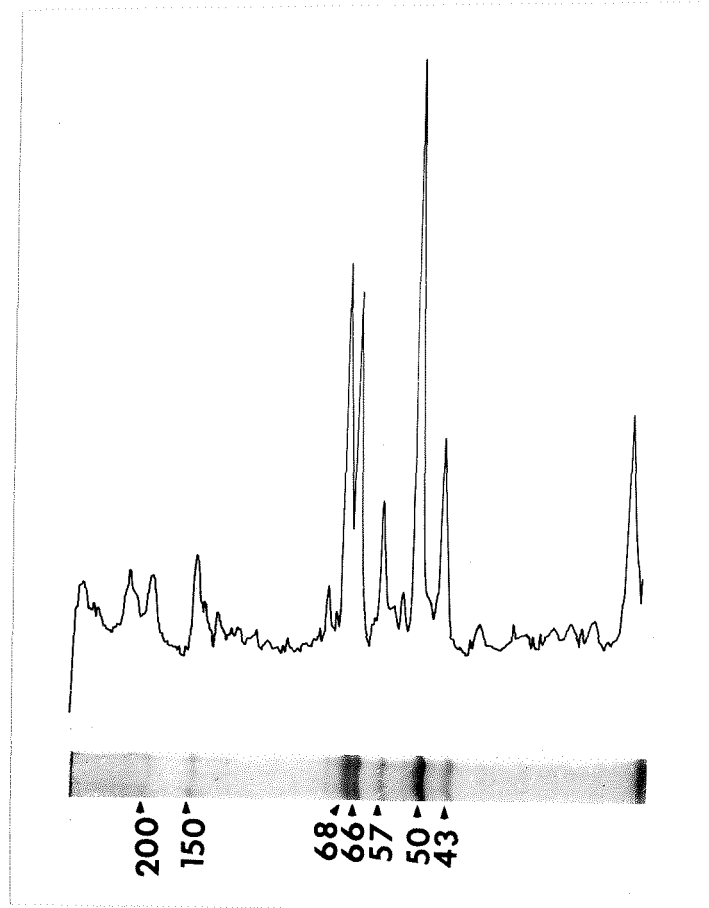


Fig.15: Traçado densitométrico de um gel de SDS-PAGE 10%, obtido da fração enriquecida em filamentos intermediários (fração FI), representativo do método de quantificação utilizado. Abaixo estão indicados os pesos moleculares das subunidades dos filamentos intermediários (NF-H, NF-M, NF-L, GFAP) e da actina.

A Figura 15 é representativa de um perfil densitométrico correspondente à fração enriquecida em filamentos intermediários. A partir de perfis densitométricos semelhantes, as bandas NF-H, NF-M, NF-L e GFAP foram quantificadas.

A Figura 16 representa as concentrações das subunidades NF-H, NF-M, NF-L e GFAP na fração FI, nos diferentes tempos de reperfusão. Os dados foram expressos em µg de proteína/ mg de proteína total da fração.

Os resultados obtidos demonstraram um comportamento geral semelhante para as quatro proteínas, caracterizado por um declínio de suas concentrações no início do período de reperfusão (0 a 2 dias), seguido de um aumento gradual tendendo à recuperação. No entanto, após observação mais detalhada, pode-se constatar que, individualmente, estas proteínas apresentaram comportamentos próprios em relação ao tempo de reperfusão.

A concentração da subunidade NF-L caiu bruscamente logo após o final do insulto isquêmico (imediate ou tempo zero) para 35% dos valores controle, apresentando uma recuperação parcial do 1º dia de reperfusão até o 7º dia. Aos 10 dias, a concentração atingiu valores normais mas voltou a decair após 15 dias de reperfusão. A concentração da subunidade NF-M apresentou-se significativamente diminuída somente após 1 dia de reperfusão (69% dos valores normais), mantendo-se diminuída até o 2º dia. Após este período, nota-se uma oscilação em torno dos níveis normais (aos 3,7 e 10 dias), com posterior declínio aos 15 dias. A subunidade NF-H teve sua concentração diminuída apenas a partir do 2º dia de reperfusão. Ao contrário das demais subunidades, a concentração da NF-H manteve-se significativamente diminuída ao longo de todo o

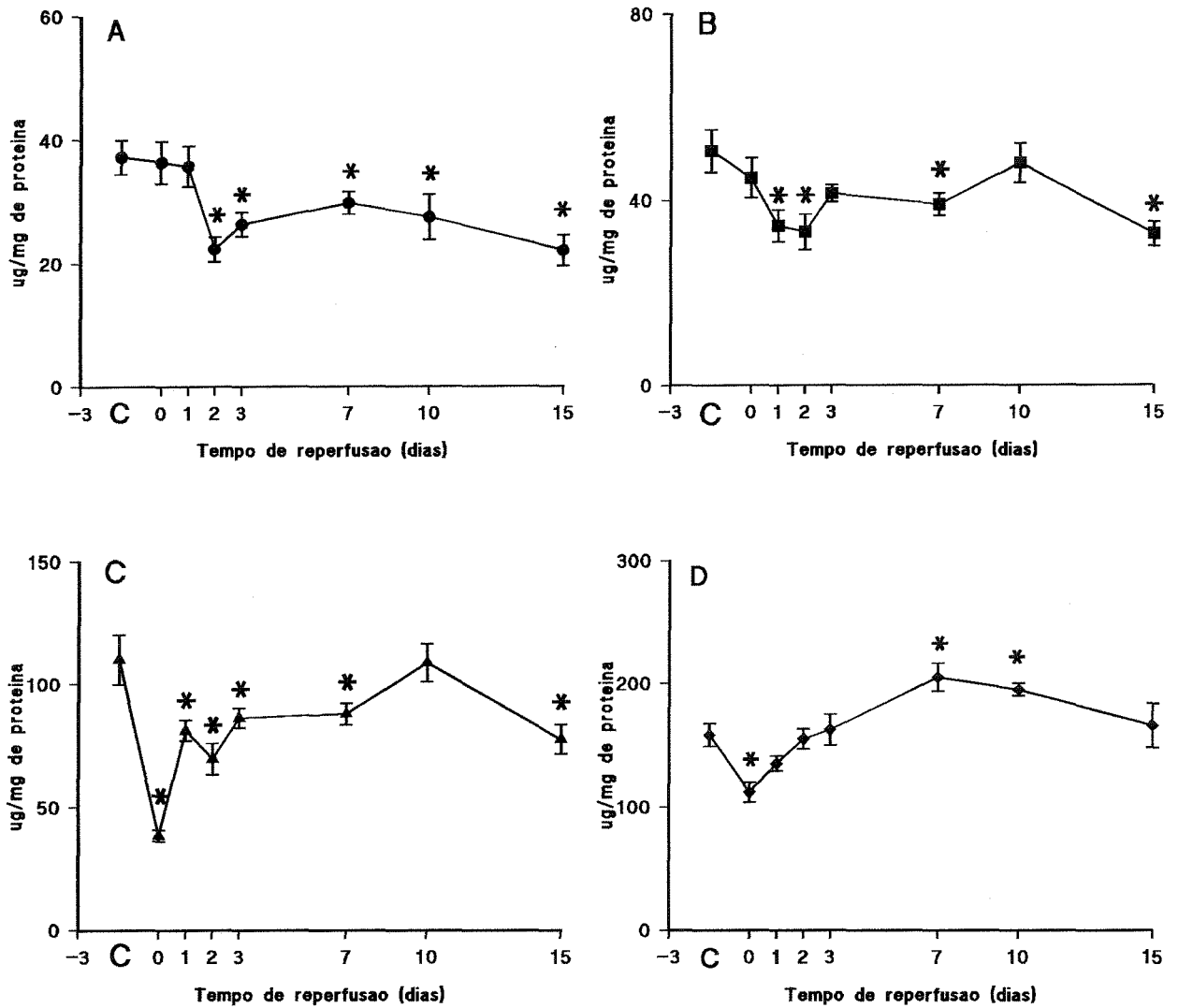


Fig.16: Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperusão sobre a concentração das subunidades dos filamentos intermediários de hipocampo de ratos. C refere-se ao controle de cada experimento. **A:** NF-H, **B:** NF-M, **C:** NF-L, **D:** GFAP. Resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total da fração. Dados (\pm erro-padrão) representam média de 12 experimentos. As diferenças foram consideradas significativas sempre que $p \leq 0,05$, de acordo com a análise de variância de uma via (ONE WAY ANOVA).

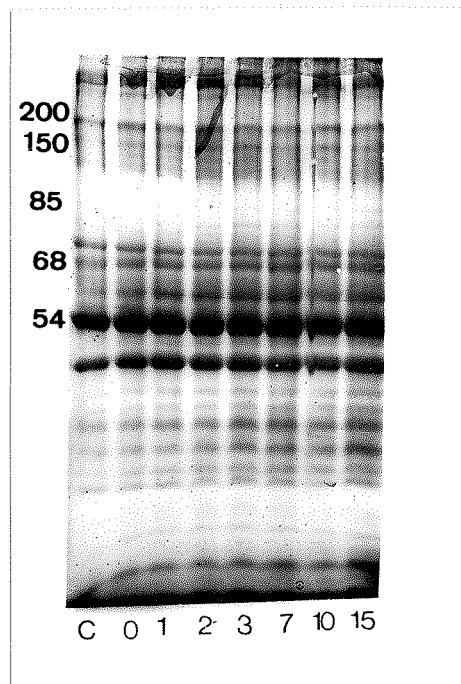


Fig.17: SDS-PAGE 10% da fração citoesquelética nos diferentes tempos de reperfusão. À esquerda estão indicados os pesos moleculares das subunidades dos neurofilamentos (NF-H: 200 kDa, NF-M: 150 kDa, NF-L: 68 kDa), da proteína de 85 kDa e da β -tubulina (54 kDa). Na 1ª linha, C refere-se ao controle. Nas demais, os números indicam os diferentes tempos de reperfusão estudados, em dias. Os géis foram corados com Comassie blue.

período de reperfusão estudado. A concentração da GFAP, assim como a da NF-L, também apresentou-se diminuída imediatamente após a isquemia (tempo zero), porém com um declínio menos acentuado (71% do controle). Em seguida, houve uma recuperação até valores superiores aos do controle, em 7 e 10 dias, retornando a níveis normais aos 15 dias de reperfusão.

IV.4. ESTUDO DOS EFEITOS DA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA E DOS DIFERENTES TEMPOS DE REPERFUSÃO SOBRE AS PROTEÍNAS DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA

Como foi mencionado anteriormente, esta fração foi utilizada para o estudo dos efeitos do nosso modelo experimental sobre o sistema fosforilante associado à fração insolúvel em Triton X-100.

IV.4.1. Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperfusão sobre o perfil eletroforético das proteínas da fração citoesquelética

A Figura 17 apresenta um gel de SDS-PAGE contendo as proteínas da fração

citoesquelética de hipocampo nos diferentes tempos de reperfusão após o insulto isquêmico. A análise do perfil eletroforético desta fração mostra a presença das três subunidades dos neurofilamentos ao longo de todo o período estudado, bem como da β -tubulina e da proteína de 85 kDa. Nesta fração também não detectamos alteração do perfil eletroforético decorrente da presença de produtos de degradação das proteínas.

IV.4.2. Efeito da isquemia cerebral transitória e dos diferentes tempos de reperfusão sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P na NF-M, NF-L, β -tubulina e numa proteína de 85 kDa.

A fração enriquecida em filamentos intermediários não foi utilizada para os estudos de incorporação de ^{32}P pois foi descrito por Toru-Delbauffe e Pierre (1983) que as quinases endógenas associadas ao citoesqueleto são solúveis na presença de tampão de alta força iônica.

A Figura 18 mostra uma autoradiografia contendo o perfil eletroforético das proteínas fosforiladas da fração citoesquelética de hipocampo. A incorporação de ^{32}P foi analisada nas subunidades NF-M e NF-L dos neurofilamentos, na subunidade β -tubulina dos microtúbulos e na proteína de 85 kDa, pois foram, nas nossas condições

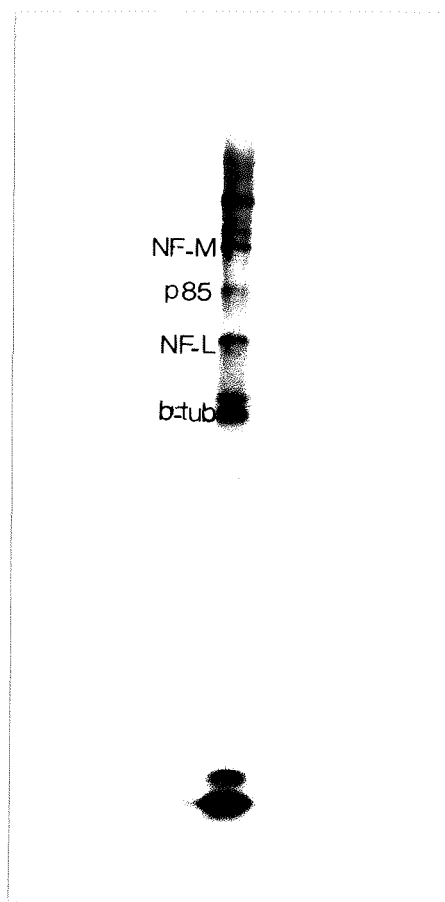


Fig. 18: Autoradiografia da fração citoesquelética de hipocampo de ratos incubada com [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP *in vitro* ($2\mu\text{Ci}/10\mu\text{g}$ de proteína). À esquerda estão indicadas as subunidades NF-M e NF-L dos neurofilamentos, a proteína citoesquelética de 85 kDa (p85) e a β -tubulina (b-tub).

experimentais, as proteínas mais marcadamente fosforiladas.

Os dados foram obtidos em cpm/ μ g de proteína e expressos em percentagem do controle. Para obter as medidas em cpm/ μ g, as proteínas foram quantificadas por método densitométrico, como descrito anteriormente. O perfil densitométrico representativo da fração citoesquelética está demonstrado na Figura 19.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos de fosforilação *in vitro* estão representados na Figura 20. Os painéis A, B, C e D ilustram os perfis de fosforilação da NF-M, NF-L, β -tubulina e da proteína de 85 kDa, respectivamente, durante o período de reperfusão. Observa-se que, com exceção da β -tubulina, as demais proteínas apresentaram uma diminuição significativa na incorporação de ^{32}P *in vitro* imediatamente após a isquemia (tempo zero). Nota-se ainda que todas as proteínas apresentaram uma diminuição máxima na incorporação *in vitro* de ^{32}P após 1 dia de reperfusão. Estes resultados também demonstraram diferentes respostas individuais destas proteínas. No 1º dia de reperfusão, a subunidade NF-M demonstrou uma diminuição mais severa e pronunciada para 7,5% do controle. A incorporação na subunidade NF-L diminuiu para 22%, na β -tubulina para 44% e na proteína de 85 kDa para 17%. Após a diminuição inicial, observa-se que houve um aumento da incorporação de ^{32}P *in vitro* até níveis normais (aos 2 e 3 dias), seguido de uma oscilação própria para cada proteína entre os 7 e 15 dias de reperfusão. A subunidade NF-M e a proteína de 85 kDa apresentaram um aumento significativo no 7º dia de reperfusão, com um retorno aos níveis normais após 10 e 15 dias. Já a subunidade NF-L e a β -tubulina apresentaram níveis normais de incorporação de ^{32}P após 7 dias de reperfusão, atingindo níveis significativamente

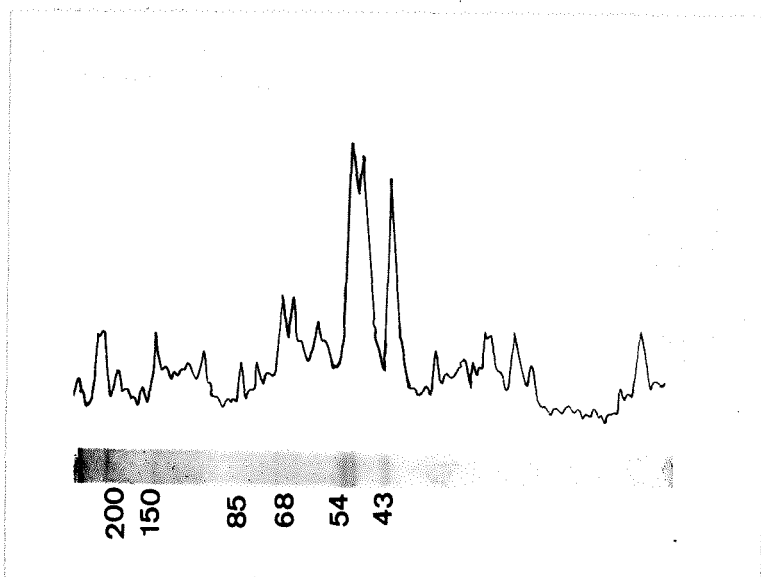


Fig.19: Traçado densitométrico de um gel de SDS-PAGE 10% obtido da fração citoesquelética, representativo do método de quantificação utilizado. Abaixo estão indicados os pesos moleculares das subunidades NF-H, NF-M e NF-L dos neurofilamentos, da proteína citoesquelética de 85 kDa , da β -tubulina e actina .

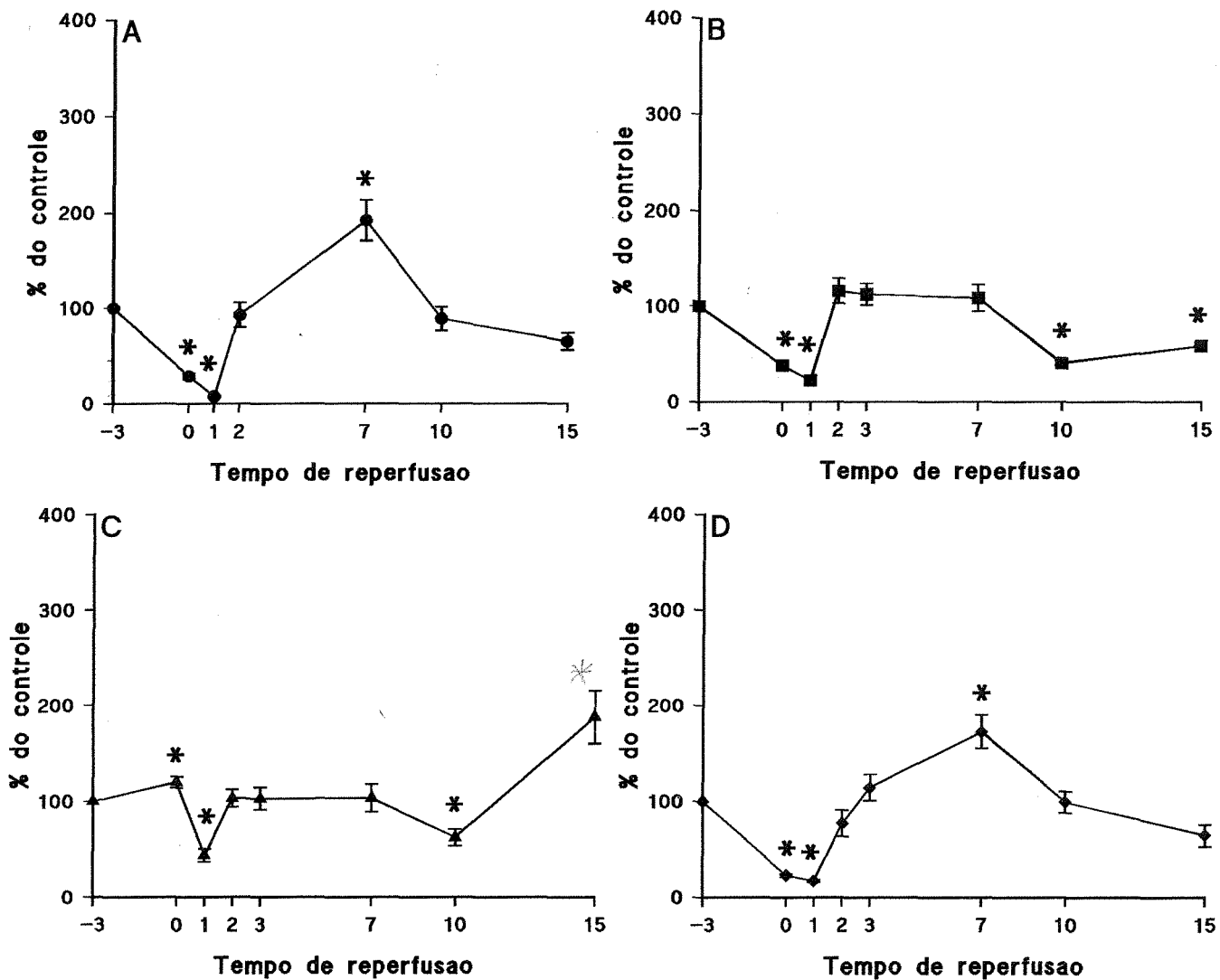


Fig.20: Efeito da isquemia cerebral transitória sobre a incorporação *in vitro* de ^{32}P nas proteínas da fração citoesquelética de hipocampo de ratos ao longo do tempo de reperusão. As bandas foram cortadas do gel e a radioatividade foi contada em cintilador líquido. Os valores obtidos foram relacionados aos valores da quantificação densitométrica. Os resultados foram obtidos em cpm/ μg de proteína e expressos em % do controle. **A:** NF-M, **B:** NF-L, **C:** β -tubulina, **D:** p85. Dados (\pm erro-padrão) representam média de 4-6 experimentos. As diferenças foram consideradas significativas sempre que $p \leq 0,05$, de acordo com o teste "t pareado" de Student.

diminuíos após 10 dias de reperfusão. No 15º dia, a incorporação de ^{32}P na subunidade NF-L manteve-se diminuída, ao contrário da β -tubulina, que apresentou uma tendência ao aumento, embora este não tenha sido estatisticamente significativo.

A subunidade NF-H dos neurofilamentos não pôde ser analisada, pois nas nossas condições experimentais, a incorporação de ^{32}P *in vitro* nesta proteína é muito pequena.

V. DISCUSSÃO

O método para produzir uma isquemia cerebral profunda e bem caracterizada deve seguir estratégias de oclusão dos vasos que sejam adequadas à anatomia vascular do modelo animal experimental (Schmidt-Kastner e Freund, 1991). O cérebro é alimentado basicamente por duas artérias carótidas e duas artérias vertebrais, às quais pode-se ter acesso cirúrgico antes de penetrarem no crânio. Devido a sua ampla utilização em pesquisas de neurobiologia básica, o rato é bastante usado para estudos de isquemia cerebral (Pulsinelli e Duffy, 1983; C.A. Netto et al., 1993).

Um modelo muito usado de isquemia cerebral requer a oclusão das quatro principais artérias extracraniais no rato, chamado "modelo de oclusão dos quatro vasos" (Pulsinelli e Brierly., 1979). Este modelo, que foi por nós utilizado, consiste em ocluir por eletrocoagulação as artérias vertebrais e, após 24 horas, obstruir por um determinado período as artérias carótidas. A obstrução é feita por ajustamento de fios de silicone ao redor das artérias. Este ajustamento é feito de acordo com o tempo desejado para a duração do insulto isquêmico que foi, na nossa condição experimental, vinte minutos. Somente animais com manifestação comportamental isquêmica (ver Mat. e Mét., seção III.2) devem ser selecionados.

Como já foi descrito anteriormente (Pulsinelli et al, 1982b), o insulto isquêmico afeta seletivamente o setor CA1 do hipocampo, onde morrem aproximadamente 90% das células piramidais entre 2 e 7 dias após a isquemia, caracterizando dois fenômenos clássicos associados a este insulto, que são a "vulnerabilidade seletiva" e a "morte celular tardia". Neste modelo de isquemia experimental, os dois fenômenos foram fielmente observados através da análise histológica, comprovando a eficácia do método utilizado.

Pela análise histológica, nós observamos uma importante morte celular no setor CA1, vista em menor extensão no setor CA2. Não observamos necrose no giro denteado nem no setor CA3 no período descrito (dados não mostrados). Em relação à morte celular tardia, ficou bem evidente que até 2 dias após a isquemia, as células piramidais do setor CA1 são morfologicamente íntegras. Apenas 3 dias após o evento, a necrose se estabelece (Fig. 9D). A morte celular atinge o limite 7 dias após o insulto isquêmico. Posteriormente, a lesão evolui pelo aumento continuado da gliose reativa (7-15 dias) (Fig. 9E,G).

Estabelecendo-se um paralelo entre as alterações morfológicas e bioquímicas detectadas após o insulto isquêmico, pudemos observar que a diminuição da concentração das subunidades dos neurofilamentos (NF-H, NF-M, NF-L) e dos filamentos gliais (GFAP) ocorreu entre 0 e 2 dias após a isquemia, quando a fosforilação de proteínas citoesqueléticas também estava diminuída. Porém, a necrose no setor CA1 só ocorreu 3 dias após o insulto (Fig. 9D). Neste intervalo, quando já verificamos acentuada morte celular no CA1, a concentração das subunidades dos neurofilamentos tendeu a aumentar para níveis mais próximos dos normais. Paralelamente, a fosforilação de proteínas do citoesqueleto também ficou normal. Contudo, a concentração da GFAP apresentou-se no nível do controle após 1 dia de reperfusão. Após 7 dias, a concentração desta proteína aumentou para níveis acima dos controles, acompanhando a acentuada gliose reativa observada neste período (Fig. 9E e F). Neste mesmo intervalo (3-7 dias de reperfusão), houve um aumento na síntese e concentração das proteínas totais dos filamentos intermediários. Após 10 e 15 dias, quando observou-se a gliose reativa e

morte celular intensas no CA1, os níveis ainda altos da GFAP tenderam a normalizar, enquanto a concentração das subunidades dos neurofilamentos permaneceu diminuída, porém em níveis mais próximos dos normais.

O insulto isquêmico resulta numa prolongada elevação da concentração de Ca^{+2} intracelular (Yamamoto et al.,1992). Este fenômeno pode ser desencadeado por diferentes mecanismos, tais como inibição da bomba de extrusão Ca^{+2} -ATPase (Kass e Lipton,1986), influxo de Ca^{+2} extracelular através de canais voltagem-dependentes ou de canais operados por receptores (Choi e Rothman,1990) e/ou liberação de cálcio dos depósitos intracelulares (Yamamoto et al.,1992). Estudos anteriores têm demonstrado que o alto nível de cálcio intracelular é um evento importante no desencadeamento da lesão celular irreversível durante a reperfusão e na morte celular tardia (Choi, 1990). Muitos estudos demonstraram que a entrada de cálcio nas células hipocâmpais ocorre durante ou logo após a isquemia. Num breve período de reperfusão, o nível de cálcio intracelular poderia normalizar, mas no período de sobrevivência mais tardio, foi observado um aumento secundário de Ca^{+2} no setor CA1, precedendo o aparecimento morfológico da lesão nesta região (Siesjo e Bengtsson,1989). Os altos níveis de cálcio causam ativação de vários mecanismos sensíveis a este íon, dentre eles a ativação das proteases cálcio-dependentes (Yamamoto et al.,1992).

Calpaína é uma protease ativada por cálcio, presente em altas concentrações no cérebro, que degrada neurofilamentos *in vivo* e *in vitro* (Greenwood et al.,1993). Estudos anteriores demonstraram que a calpaína I está presente em grandes quantidades nas regiões conhecidamente vulneráveis à isquemia, tais como as células piramidais do

hipocampo e neocórtex (Ogata et al., 1989).

Este trabalho foi desenvolvido em duas frações proteicas insolúveis na presença de Triton X-100, que por definição constituem frações citoesqueléticas. Porém, a fração FI, ao contrário da fração denominada citoesquelética, foi extraída em tampão de alta força iônica, condição que a torna mais seletiva para os filamentos intermediários, pois estas estruturas são insolúveis nestas condições, enquanto outros componentes do citoesqueleto são solubilizados, permanecendo no sobrenadante. Assim, as determinações quantitativas das proteínas dos filamentos intermediários foram feitas na fração FI. É importante salientar que a obtenção de ambas as frações foi feita na presença de vários inibidores de proteases, para evitar degradação das mesmas durante o processo de extração. Considerando que outros autores haviam demonstrado efeitos da isquemia em uma grande variedade de proteínas do citoesqueleto, como MAPs, espectrina e neurofilamentos (Aray et al., 1991; Lee et al., 1991; Nakamura et al., 1992; Ogata et al., 1989), e considerando-se também que os neurofilamentos são extremamente sensíveis à ação da calpaína, nosso objetivo foi verificar o efeito do insulto isquêmico sobre a concentração das três subunidades dos neurofilamentos e da GFAP.

O aumento do conteúdo protéico total da fração FI observado entre o 3º e 7º dias de reperfusão provavelmente reflete o balanço global da degradação e síntese de todas as proteínas desta fração após a isquemia. Para verificar se este aumento do conteúdo protéico poderia ser relacionado a um aumento de síntese destas proteínas, foi feito o estudo da incorporação de ¹⁴C-leucina nesta fração. Os resultados desta análise mostraram que a síntese proteica não foi alterada até o 3º dia de reperfusão. No entanto,

após este período, houve um aumento da incorporação de ^{14}C -leucina, sugerindo que o aumento na quantidade de proteínas desta fração poderia estar relacionado com um aumento de síntese. Raley-Susman e Lipton (1990) descreveram uma diminuição da síntese de proteínas totais dos neurônios do setor CA1, porém os mesmos autores observaram um aumento de síntese de proteínas das células da glia e células endoteliais após isquemia *in vitro*. O aumento da síntese proteica nas células gliais está provavelmente relacionado com a gliose reativa ao insulto isquêmico (Schmidt-Kastner et al., 1990) que inicia após 3-7 dias de reperfusão, podendo ser claramente observada pela análise histológica (Fig 9). Conseqüentemente, o aumento da concentração da GFAP, subunidade constituinte dos filamentos gliais, após o 3º dia de reperfusão (Fig.16D) provavelmente contribui para o aumento da síntese detectada na fração FI.

O estudo da concentração das subunidades individuais dos neurofilamentos (NF-H, NF-M e NF-L) e da subunidade dos filamentos gliais (GFAP) demonstrou uma diminuição da NF-H, NF-M e NF-L, bem como da GFAP, até 2 dias após a isquemia. Estes resultados poderiam sugerir uma diminuição inicial na síntese destas proteínas ou um aumento na degradação. No entanto, como foi dito anteriormente, a incorporação de ^{14}C -leucina neste período não foi diminuída, sugerindo que provavelmente este não foi um fator predominante para o decréscimo na concentração destas subunidades dos filamentos intermediários. Assim, é possível que a diminuição na concentração destas subunidades tenha sido devida a uma ativação da protease cálcio-dependente, calpaína. Esta hipótese é baseada na conhecida suscetibilidade das subunidades dos filamentos intermediários à ação da calpaína (Pant, 1988), e nas evidências de que outros substratos

da calpaína, como espectrina (Seuber et al.,1989) e MAP2 (Kitagawa et al.,1989) são diminuídos após isquemia *in vivo*. Os níveis de espectrina também são diminuídos após hipoxia *in vitro* (Arai et al.,1991). Observa-se que a isquemia resultou em diferentes padrões de decréscimo das concentrações destas proteínas, sugerindo a existência de diferentes mecanismos individuais de modulação da atividade da protease, provavelmente relacionados às características moleculares de cada subunidade. A NF-H pareceu ser a mais resistente à ação proteolítica, permanecendo em níveis normais até dois dias de reperfusão. A NF-M foi um pouco menos suscetível, demonstrando uma pequena diminuição já logo após a isquemia, mas atingindo valores mínimos após um e dois dias de reperfusão, correspondendo a 68% dos níveis normais. Já a NF-L pareceu ser a mais suscetível aos efeitos da isquemia, tendo sua concentração diminuída drasticamente para 35% dos níveis controles imediatamente após o insulto isquêmico. Estes achados estão de acordo com os de Nakamura et al.(1992), que demonstrou por análise imunohistoquímica uma diminuição da reatividade da NF-L e NF-H após um e dois dias de reperfusão.

A GFAP, assim como a NF-L, demonstrou ser bastante suscetível aos efeitos da isquemia logo após o insulto, mas, ao contrário das subunidades dos neurofilamentos, a diminuição inicial da concentração foi seguida de um aumento para níveis superiores aos do controle após 7-10 dias de reperfusão. Posteriormente, houve um retorno aos níveis normais. Este resultado, como foi dito anteriormente, vai de encontro à gliose observada por análise histológica, que inicia aos três dias de reperfusão, aumentando consideravelmente a partir de sete dias.

Ogata et al. (1989) descreveram uma degradação seletiva da NF-H e NF-M após 10 e 15 minutos de isquemia sem reperfusão, detectada pelo completo desaparecimento da reatividade imunológica destas proteínas. No entanto, os autores utilizaram apenas um inibidor de protease no tampão de extração, condição insuficiente para proteger estas proteínas altamente sensíveis contra a proteólise durante o processo de obtenção da fração citoesquelética. Este fato não os permite assegurar que a degradação observada tenha ocorrido *in vivo*, como consequência da isquemia, e não durante a extração das proteínas do citoesqueleto. Devido às precauções tomadas por nós para evitar a proteólise durante a extração, sugerimos que a diminuição na concentração das subunidades dos neurofilamentos observada em nossos resultados seja devida à ação proteolítica ocorrida *in vivo*. Esta degradação pareceu ser menos severa do que a descrita por Ogata et al.(1989), uma vez que estas proteínas, bem como a GFAP, quando analisadas em SDS-PAGE estavam presentes ao longo de todo o período de reperfusão estudado. Além disso, não se detectou modificação no perfil eletroforético, decorrente da presença de possíveis produtos de degradação. Através da análise imunológica, as subunidades NF-H, NF-M e NF-L foram detectadas ao longo de todo o período de reperfusão. O mesmo foi observado no perfil eletroforético da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 (utilizada para os experimentos de incorporação de ³²P-ATP), com a presença das proteínas ao longo de todo o período de reperfusão analisado. Estes resultados devem-se, provavelmente, ao fato de que a proteólise destas proteínas não foi suficientemente intensa para que os produtos de degradação fossem identificados por coloração dos géis de SDS-PAGE com comassie. Além disso, os

produtos de degradação aparentemente não foram reconhecidos pelos anticorpos monoclonais utilizados por não possuírem epitopos específicos. Podemos também supor que os produtos de degradação não sejam capazes de sedimentar por centrifugação nas condições utilizadas por nós, permanecendo na fração solúvel.

É interessante notar que as subunidades dos neurofilamentos, após o decréscimo inicial acentuado de suas concentrações, apresentaram tardiamente níveis mais próximos dos normais, atingindo estes valores em alguns pontos, como pode ser visto para a NF-M e NF-L. A NF-H, embora também tenha apresentado esta tendência à recuperação, continuou significativamente diminuída ao longo de todo o tempo de reperfusão estudado.

Estes resultados podem estar aparentemente demonstrando o balanço geral das respostas ao insulto isquêmico pelas diferentes populações neuronais do hipocampo. Sabe-se que após isquemia de 5 a 30 minutos em ratos, o padrão de lesão característico mostra necrose nos setores CA1 e CA2, bem como no hilo, e preservação do setor CA3 e giro denteado (Schmidt-Kastner e Freund, 1991). Assim, esta recuperação parcial das concentrações das subunidades dos neurofilamentos observada entre 3 e 10 dias de reperfusão provavelmente é decorrente da contribuição das populações neuronais menos afetadas, talvez com uma contribuição muito pequena das células do CA1, uma vez que neste período aproximadamente 90% destas células degeneraram.

Estudos prévios têm demonstrado que a degradação destas proteínas está relacionada aos seus estados de fosforilação. Greenwood et al. (1993) descreveram que a fosforilação modula a interação da calpaína com a subunidade NF-H. Já Pant (1988) observou que a desfosforilação dos neurofilamentos aparentemente aumentou a

suscetibilidade das três subunidades à proteólise mediada pela calpaína. A calpaína necessita, para início da indução à clivagem, de um sítio de reconhecimento em seus substratos. Estes sítios são enriquecidos em resíduos de prolina, ácido glutâmico, ácido aspártico, serina e treonina, sendo chamados regiões "PEST" (Wang et al.,1989). Aparentemente, a necessidade destas duas condições para a proteólise mediada pela calpaína - um sítio de reconhecimento e um sítio suscetível à clivagem bem próximos um ao outro - poderia explicar por que a calpaína geralmente catalisa clivagens limitadas de seus substratos (Greenwood et al.,1993). Serina e treonina também são alvos para interação de proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros, as quais catalisam a fosforilação de um grande número de substratos no cérebro (O' Callaghan,1994), incluindo neurofilamentos. Assim, a fosforilação na região "PEST" pode impedir a interação do substrato com a calpaína (Greenwood,1993).

O estudo da fosforilação das proteínas citoesqueléticas teve o objetivo de averiguar se o estado de fosforilação destas proteínas poderia estar relacionado à provável degradação por elas sofrida, detectando-se assim os efeitos da isquemia cerebral transitória sobre o sistema fosforilante associado a fração citoesquelética. Para tanto, não foi possível utilizar a fração F1 uma vez que, sob condições de alta força iônica, aproximadamente 80% das quinases endógenas associadas solubilizam-se (Toru-Delbauffe e Pierre,1983). Por esta razão, a fração citoesquelética, obtida na presença de Triton X-100, foi utilizada para estes experimentos. A fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 caracteriza-se por uma menor seletividade para os F1, obtendo-se também outras proteínas citoesqueléticas como tubulina e uma proteína de 85 kDa, de identidade

desconhecida. Estas proteínas, diferentemente das presentes na fração FI, não estão necessariamente no estado polimerizado, mas também são extraídas como pequenos agregados oligoméricos ou em associação com outras estruturas insolúveis. Assim, a inespecificidade desta fração a tornou inadequada para estudos da concentração das subunidades provenientes dos filamentos intermediários pré-existentes *in vivo*. Além disso, como esta fração não é seletiva para as subunidades polimerizadas, incorporadas na rede citoesquelética, os resultados obtidos por análise da concentração destas proteínas não seriam adequados para retratar o perfil do que estaria ocorrendo ao citoesqueleto das células hipocâmpais após a isquemia.

A fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 possui uma atividade quinásica endógena associada, capaz de incorporar ^{32}P *in vitro*, quando se adiciona ^{32}P -ATP ao meio de incubação. Nas nossas condições experimentais, os substratos endógenos para esta atividade são as subunidades NF-M e NF-L dos neurofilamentos, a β -tubulina e uma proteína de 85 kDa não identificada.

Sabe-se que as subunidades dos neurofilamentos são fosforiladas em suas extremidades amino-terminal e carboxi-terminal por diferentes quinases (Nixon e Sihag, 1991). A fosforilação do domínio carboxi-terminal é mediada por quinases independentes de segundos mensageiros. Sabe-se que estas quinases fosforilam resíduos de tirosina (O'Callaghan, 1994) e são consideradas responsáveis pelas interconexões dos neurofilamentos e estabilização do citoesqueleto axonal (Nixon e Sihag, 1991). A fosforilação na região amino-terminal é mediada por proteínas quinases dependentes de segundos mensageiros, como a proteína quinase C, proteína quinase

A e proteína quinase Ca^{+2} /calmodulina-dependente. A fosforilação nesta extremidade é provavelmente responsável pela polimerização dos neurofilamentos (Nixon e Sihag, 1991). As subunidades α e β -tubulina sofrem fosforilação nos resíduos de serina e tirosina, preferencialmente localizados na região carboxi-terminal das duas subunidades. Sugere-se que estas regiões regulem a polimerização, determinando diferentes efeitos sobre a formação dos microtúbulos (Wandossel et al., 1987). O sistema fosforilante associado à fração citoesquelética foi identificado recentemente em nosso laboratório, a partir de córtex cerebral de ratos, demonstrando a presença de uma quinase dependente de AMPc (PKA) e de outra dependente de Ca^{+2} /Calmodulina (CaMK), além da proteína fosfatase 1 (PP1) (resultados não publicados). Nossos dados demonstraram que no intervalo entre zero (imediate) e um dia de reperfusão, o insulto isquêmico induziu uma acentuada diminuição na incorporação de ^{32}P -ATP *in vitro* nas subunidades NF-M e NF-L dos neurofilamentos e na proteína de 85 kDa. O perfil de fosforilação da β -tubulina demonstrou ser diferente das demais proteínas analisadas. Este resultado sugere que as atividades quinásicas associadas à tubulina aparentemente sofrem uma regulação diferenciada das associadas à NF-M, NF-L e à proteína de 85 kDa. Yamamoto et al (1992) descreveram que a atividade da quinase dependente de Ca^{+2} /calmodulina diminuiu após isquemia, provavelmente por proteólise induzida por cálcio. No entanto, a atividade da proteína quinase dependente de AMPc não é afetada. Este fato pode ser relacionado ao achado de Garritsen et al. (1992), que demonstraram que a elevação de Ca^{+2} citosólico inibe a acumulação de AMPc. Assim, com a manutenção dos níveis de AMPc normais, não deveria haver alteração na atividade da PKA. Contudo, não podemos atribuir o

reduzido nível de fosforilação observado logo após a isquemia somente à diminuição da atividade quinásica dependente de Ca^{+2} /calmodulina, uma vez que pelo menos para neurofilamentos, sua capacidade de fosforilação é baixa quando comparada à das proteínas quinases independentes de segundo mensageiro (Sihag e Nixon, 1989). Sabe-se também que a isquemia diminui a atividade da PKC (Crumrine et al., 1990), provavelmente porque esta quinase é conhecido substrato para a calpaína. No entanto, ao menos em córtex cerebral, esta quinase não foi identificada na nossa fração citoesquelética. Assim, nós poderíamos sugerir que, pelo menos para NF-M e NF-L, o reduzido nível de fosforilação deixou os substratos mais suscetíveis à ação da calpaína, através da exposição dos resíduos de serina e treonina. O efeito protetor da fosforilação contra a proteólise mediada pela calpaína poderia explicar o aparecimento mais tardio dos efeitos da proteólise sobre a NF-H e NF-M, quando comparadas à NF-L. Isto se deve ao fato de que a NF-H possui de 19 a 104 mols de fosfato por molécula, enquanto a NF-M possui de 7 a 26 e a NF-L somente de 1 a 5 mols de fosfato por molécula (Jones e William Jr., 1982; Sihag e Nixon, 1989). Assim, NF-H e NF-M precisariam de um período de tempo mais longo do que a NF-L para apresentar um nível adequado de desfosforilação, expondo seus sítios de reconhecimento à ação da calpaína. A oscilação inicial na fosforilação da tubulina poderia refletir alterações na estabilidade dos microtúbulos após isquemia, pois é descrito que a fosforilação nas tubulinas está relacionada a sua capacidade de polimerização (Wandossel et al., 1986; Wandossel et al., 1987). Este fato também foi descrito por Serrano et al. (1987), os quais demonstraram que a fosforilação da β -tubulina poderia estar relacionada à associação dos microtúbulos.

Além disso, Yamamoto et al.(1986), utilizando métodos imunológicos, demonstraram a dissociação dos microtúbulos na região CA1 após isquemia. Também foram observadas por Hatakeyama et al.(1988) alterações na imunocoloração da tubulina após isquemia, que persistiram até a morte celular tardia.

A proteína de 85 kDa apresenta um perfil de fosforilação semelhante aos das demais proteínas. Sabe-se que ela é fosforilada pelas mesmas quinases (dados não mostrados), sofrendo assim, provavelmente, o mesmo tipo de regulação. Além disso, a presença da proteína de 85 kDa no perfil eletroforético dos animais controles descarta a possibilidade desta ser um produto de degradação. É importante considerar que a diminuição observada na fosforilação *in vitro* destas proteínas poderia ser consequência de uma ativação de fosfatases endógenas associadas, decorrente do aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} . Porém, na nossa fração citoesquelética, foi identificada a fosfatase PP1, independente de Ca^{+2} . Ao contrário, a presença da proteína fosfatase 2B (PP2B), conhecidamente dependente de Ca^{+2} /Calmodulina e Mg^{+2} (Sim, A.T.R., 1991), não foi detectada nesta fração. Desta forma, podemos sugerir que a diminuição da fosforilação *in vitro* das proteínas da fração citoesquelética provavelmente não é devida à ativação das fosfatases endógenas dependentes de cálcio.

Podemos observar que após dois dias de reperfusão, os níveis de fosforilação das proteínas estudadas tenderam a retornar ao normal, oscilando para valores superiores ou inferiores somente em alguns pontos para cada proteína. Porém, a concentração das subunidades dos neurofilamentos tendeu a retornar ao normal somente após três dias de reperfusão. Paralelamente, a síntese das proteínas totais da fração FI

aumentou três dias após a isquemia. Estes resultados poderiam sugerir que o sistema de fosforilação recupera-se do insulto isquêmico antes do complexo de síntese proteica. Assim, após dois dias de reperfusão, as subunidades dos NF, ainda em concentrações baixas, já estariam sendo normalmente fosforiladas, tornando-se mais protegidas contra a proteólise. Este fato, juntamente com a recuperação da síntese proteica contribuiriam para a recuperação parcial das concentrações destas subunidades.

Finalmente, a recuperação parcial da fosforilação e das concentrações das subunidades dos neurofilamentos, com o aumento paralelo da síntese proteica da fração FI, em períodos mais tardios após o insulto isquêmico, poderiam estar contribuindo para o retorno das concentrações destas proteínas à níveis compatíveis com a sobrevivência da estrutura e manutenção de algumas de suas funções. Este retorno tardio poderia ainda constituir uma contribuição importante para a discreta apresentação de deficiências cognitivas após a isquemia, só detectadas por testes comportamentais sensíveis (C.A. Netto et al., 1993; Davis e Volpe, 1991; Volpe et al., 1985). Além disso, a gliose poderia estar contribuindo para este efeito, pois sabe-se que os astrócitos fornecem fatores tróficos para o neurônio, podendo assim auxiliar na sua sobrevivência (Gage et al., 1988).

A partir dos resultados observados, é importante destacar que o retorno a níveis adequados à sobrevivência da estrutura estaria ocorrendo a partir de períodos onde a morte celular do setor CA1 já é quase completa. Assim, podemos supor que a recuperação da fosforilação e da concentração das subunidades dos neurofilamentos, bem como da síntese das proteínas da fração FI, seja proveniente das células

hipocampais que sobreviveram ao insulto, sugerindo a existência de mecanismos regulatórios diferenciados nas células provenientes das distintas regiões do hipocampo. Isto significaria que a morte celular no setor CA1 poderia estar relacionada à incapacidade destas células de reagirem como as demais células hipocampais ao insulto isquêmico.

VI. CONCLUSÕES

O modelo de isquemia cerebral transitória utilizado comprovou ser eficaz, causando os efeitos classicamente descritos de morte celular intensa e seletiva no setor CA1 do hipocampo entre 3 e 7 dias, acompanhada de uma gliose reativa progressiva.

A isquemia cerebral transitória causou uma diminuição significativa na concentração das subunidades dos filamentos intermediários presentes na fração insolúvel até o 2º dia de reperfusão, sendo que estas concentrações retornaram a valores próximos dos normais a partir do 3º dia de reperfusão.

Houve uma diminuição significativa na incorporação *in vitro* de ^{32}P nas subunidades NF-M e NF-L até o 1º dia de reperfusão, retornando a valores normais a partir do 2º dia de reperfusão.

Uma vez que a incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina nas proteínas da fração citoesquelética se manteve normal até o 2º dia de reperfusão, é provável que a diminuição da concentração das subunidades dos filamentos intermediários na fração insolúvel não seja devida a uma diminuição de síntese.

Tendo em vista que a fosforilação exerce um efeito protetor contra a ação proteolítica da calpaína, é provável que a diminuição de fosforilação *in vitro* da NF-M e NF-L até o 1º dia de reperfusão tenha tornado estas proteínas mais vulneráveis à proteólise dependente de cálcio.

Houve uma recuperação parcial da concentração das subunidades dos filamentos intermediários a partir do 3º dia de reperfusão. Esta recuperação seguiu-se a um retorno da fosforilação a níveis normais, sugerindo um aumento do efeito protetor contra a

proteólise. Paralelamente, observou-se um aumento da incorporação *in vitro* de ^{14}C -leucina nas proteínas do citoesqueleto, sugerindo uma reativação do complexo de síntese protéica.

A partir dos nossos resultados, concluímos que a capacidade de recuperação da fosforilação e da concentração das subunidades dos neurofilamentos seja proveniente das células hipocâmpais que sobreviveram ao insulto, sugerindo a existência de mecanismos regulatórios diferenciados nas células provenientes das distintas regiões do hipocampo.

**VII. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Abou-Donia M.B., Lapadula D.M., Suwita E. (1988) Cytoskeletal proteins as targets for organophosphorus compound and aliphatic hexacarbon-induced neurotoxicity. **Toxicology**, 49: 469-477.

Albert B., Bray D., Lewis J., Raft M., Roberts K., Watson J.D. (1989) The cytoskeleton. In **Molecular Biology of the Cell**. 2nd ed. New York and London; Garland Publishing, Inc.: 613-680.

Alvarez J., Arredondo F., Espejo F., Williams V. (1982) Regulation of axonal microtubules. Effects of sympathetic hiperactivity elicited by reserpine. **Neuroscience**, 7: 2551-2559.

Aronowsky J., Grotta J.C., Neal Waxman M. (1992) Ischemia-induced translocation of Ca⁺²/calmodulin -dependent protein kinase II: Potential role in neuronal damage. **Journal of Neurochemistry**, 58: 1743-1753.

Auer R.N., Jensen M.L., Whishaw I.Q. (1989) Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, 9: 1641-1647.

Azzolin I.R., Bernard E.A., Trindade V.M., Gamallo J.L., Perry M.L.S. (1991) Effect of protein malnutrition on glycoprotein, protein and lipid synthesis in rat cerebellum during the period of brain growth spurt. **Annals of Nutrition and Metabolism**, **35**: 82-88.

Andiné P., Orwar O., Jacobson I., Sandberg M., Hagberg H. (1991) Changes in extracellular amino acids and spontaneous neuronal activity during ischemia and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, **57**, nº1: 222-229.

Banik N.L., Hogan E.L., Powers J.M., Whetstone L.J. (1982) Degradation of cytoskeletal proteins in experimental spinal cord injury. **Neurochemistry Research**, **7**: 1465-1475.

Baudry M., Bundman M., Smith E., Lynch G. (1981) Micromolecular levels of calcium stimulate proteolytic activity and glutamate receptor binding in rat brain synaptic membranes. **Science**, **212**: 937-938.

Barra H.S., Arce C.A., Argana C.E. (1988) Postranslational tyrosination of tubulin. **Molecular Neurobiology**, **2**: 133-153.

Binder L.I., Frankfurter R., Rebhum L.I. (1985) The distribution of tau in mamalian central nervous system. **The Journal of Cell Biology**, 101: 1371-1378.

Birchmeier W. (1984) Cytoskeleton, structure and function. **Trends in Biological Sciences**, april: 192-195.

Bizzi A., Gambetti P. (1986) Phosphorylation of neurofilaments is altered in aluminium intoxication. **Acta Neuropathologic** (Berl.), 71: 154-158.

Bjerrum O.J., Schafer-Nielsen C. (1986) Buffer system and transfer parameters of semidry eletroblotting with an horizontal apparatus. In: **Eletrophoresis**, 86, Dunn M.J., Ed. VHC Publishers, Weinheim, 1986, 315.

Black M.M., Baas P.W., Humphries S. (1989) Dynamics of alpha tubulin deacetylation in intact neurons. **Journal of Neuroscience**, 9, n°1: 358-368.

Bloemendal H., Pieper F.R. (1989) Intermediate filaments: known structure, unknown function. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1007: 245-253.

Blomqvist P., Wieloch T. (1985) Ischemic brain damage in rats following cardiac arrest using a long-term recovery model. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, 5: 420-431.

Boakye P., White E.J., Clark J.B. (1991) Protection of ischaemic synaptosomes from calcium overload by addition of exogenous lactate. **Journal of Neurochemistry**, 57, n°1: 88-94.

Brabander M.J. (1983) Le cytoesquelette et la vie cellulaire. **La Recherche**, 14: 810-820.

Bradford M.M. (1977) A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, 72: 248-254.

Bray D. (1977) Actin and miosin in neurons: a first review. **Biochemie**, 59: 1-6.

Bray D., White J.G. (1988) Cortical flow in animal cells. **Science**, 239: 883-888.

Brow A., Brierley J. (1968) The nature, distribution and earliess stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. **British Journal of Experimental Pathology**, 49: 87-106.

Brown A., Brierley J. (1973) The earliest alterations in rat neurons and astrocytes after anoxia-ischemia. **Acta Neuropathologic (Berl)**, 23: 9-22.

Browning M.D., Huganir R., Greengard P. (1985) Protein phosphorylation and neuronal function. **Journal of Neurochemistry**, 45: 11-23.

Bruke C. (1861) Wiener Stiz. Berlin: XLIV.

Busija D.W., Heistad D.D. (1984) Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac.*, 101: 161-211.

Caceres A., Binder L.I., Payne M.R., Bender P., Rebhum L., Stewart O.S. (1984) Differential subcellular localization of tubulin and the MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry. **Developmental Brain Research**, 13: 314-318.

Chiu F.C., Barnes E.A., Das K., Haley J., Socolov P., Macaluso F.P., Fant J. (1989) Characterization of a novel 66kDa subunit of mammalian neurofilaments. **Neuron**, 2: 1435-1445.

Choi D.W. (1987) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends in Neuroscience**, 11: 465-469.

Clark R.W., Griffin J.W., Prince D.L. (1980) The axonal pathology in chronic IDPN intoxication. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 39, n°1: 42-55.

Conway J.F., Parry D.A.P. (1988) Intermediate filament structure: 3. Analysis of sequence homologies. **International Journal of Biological Macromolecules**, 10: 79-98.

Cooke R. (1986) The mechanism of muscle contraction. **CRC Critical Review in Biochemistry**, 21: 53-118.

Crain B.J., Westerman W.D., Harrison A.H., Nadler J.V. (1988) Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: a silver impregnation study. **Neuroscience**, 27, n°2: 387-402.

Crumrine C.R., Dubyak G., LaManna J.C. (1990) Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in the adult rat. **Journal of Neurochemistry**, 55: 2001-2007.

Cummings J.L., Tomiyasu U., Read S., Benson D.F. (1984) Amnesia with hippocampal lesions after cardiopulmonary arrest. **Neurology**, 34: 679-681.

Curcio C.A., Kemper T. (1984) Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density. **Journal of Neuropathological Experimental Neurology**, 43: 359-368.

Czosneck H., Soifer D., Wisniewski H. (1980) Studies on the biosynthesis of neurofilament proteins. **The Journal of Cell Biology**, 85: 726-734.

Davis H.P., Tribuna J., Pulsinelli W.A., Volpe B.T. (1986) Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. **Physiological Behavior**, 37: 387-389

Davis H.P., Baranowski J.R., Pulsinelli W.A., Volpe B.T. (1987) Retention of reference memory following ischemic hippocampal damage. **Physiological Behavior**, 39: 783-786.

De Camilli P., Miller D., Navove F.D., Thewkauf W.E., Valle R.B. (1984) Distribution of microtubule associated protein 2 (MAP2) in the nervous system of rats studies by immunofluorescence. **Neuroscience**, 4:151-160.

DeJong R.N., Itabashi H.H., Olson J.R. (1969) Memory loss due to hippocampal lesions. **Archives in Neurology**, 20: 339-348.

Dick P.J., Lais A., Karnes J., Sparks M., Dick P.J.B. (1985) Peripheral axotomy induces neurofilaments decrease, atrophy, demyelination and degeneration of root and fasciculus gracilis fibers. **Brain Research**, 340: 19-36.

Diemer N.H., Siemkowicz E. (1981) Regional neurone damage after cerebral ischaemia in the normo- and hypoglycaemic rat. **Neuropathological Applications in Neurobiology**, 7: 217-227.

Domanska-Janick K., Zalewska T. (1992) Effect of brain ischemia on protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**, 58: 1432-1439.

Drake P., Lasek R.J. (1984) Regional differences in the neuronal cytoskeleton. **Journal of Neuroscience**, 4: 1173-1186.

Dujardin F. (1835) Recherches sur les organismes inférieurs. **Annual National Zoology and Biology Animal**, 4: 343-377.

Evans M.C., Swan J.H., Meldrum B.S. (1987) An adenosine analogue, 2-chloroadenosine, protects against long-term development of ischaemic cell loss in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, 83: 287-292.

Eyer J., McLean W.G., Letierrier J.F. (1989) Effect of a single dose of β - β - iminodipropionitrile addes directly to neurofilaments *in vitro*. **Journal of Neurochemistry**, 52: 1759-1765.

Fraser R.B., Steinert P.M., Stevens R.C. (1987) Focus on intermediate filaments. **Trends in Biological Sciences**, 12: 43-45.

Gage F.H., Olejniczack P., Armstrong D.M. (1988) Astrocytes are important for sprouting in the septohippocampal circuit. **Experimental Neurology**, 102: 2-13.

Gallant P.E., Harish C.P., Pruss R.M., Gainer H. (1986) Calcium-activated proteolysis of neurofilament proteins in the squid giant neuron. **Journal of Neurochemistry**, 46: 1573-1581.

Garritsen A., Zhang Y., Firestone J.A., Browning M.D., Cooper D.M.F. (1992) Inhibition of cyclic AMP accumulation in intact NCB-20 cells as a direct result of elevation of cytosolic Ca^{+2} . **Journal of Neurochemistry**, 59: 1630-1639.

Geiger B. (1987) Intermediate filaments: looking for a function. **Nature**, 329: 392-393.

Geisler N., Kaufmann E., Weber K. (1985) Antiparalled orientation of two double-stranded coiled-coils in tetrameric protofilaments units of intermediate filaments. **Journal of Molecular Biology**, 182: 173-177.

Georgatos S.D., Marchesi V.T. (1985) The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a modern system for the study of intermediate filament-membrane interactions. **The Journal of Cell Biology**, 100: 1955-1961.

Gibbon S.I.R. (1981) Cilia and flagella of eucariotes. **The Journal of Cell Biology**, 91: 107s-124s.

Gill R., Foster A.C., Woodruff G.N. (1987) Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. **Journal of Neuroscience**, 7: 3343-3349.

Gill R., Kemp J.A. (1989) Protection of CA1 pyramidal cell function by MK-801 following ischaemia in the gerbil. **Neuroscience Letters**, 105: 101-106.

Goldman J.E., Yen S-H. (1986) Cytoskeletal protein abnormalities in neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, 19: 209-223.

Grafstein B., Forman D.S. (1980) Intracellular transport in neurons. **Physiological Reviews**, 60: 1167-1283.

Granger B.L., Lazarides E. (1981) Synemin: A new high molecular weight protein associated with desmin and vimentin filaments in muscle. **Cell**, 22, nº3: 727-738.

Greenwood J.A., Troncoso J.C., Costello A.C., Johnson G.V. (1993) Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of 200 kDa and 160 kDa neurofilament proteins. **Journal of Neurochemistry**, 61: 191-199.

Griffin J.W., Fanhstock K.E., Prince D.L., Hoffman P.N. (1983) Microtubules-neurofilament segregation produced by β - β iminodipropionitrile: evidence for the association of fast axonal transport with microtubules. **Journal of Neuroscience**, 3: 557-566.

Gundersen G.G., Khawaja Bulinski J.C. (1987) Postpolymerization detyrosination of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. **The Journal of Cell Biology**, 105: 251-264.

Hatakeyama T., Matsumoto M., Brengman J.M., Yanagihara T. (1988) Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils. **Stroke**, 19: 1526-1534.

Heins S., Wong P.C., Muller S., Goldie K., Cleveland D.W., Aebi U. (1993) The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. **The Journal of Cell Biology**, 123, n°6, part 1: 1517-1533.

Hemmings H.C.Jr., Nairn A.C., McGuinness T.L., Greengard P. (1989) Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. **FASEB Journal**, 3: 1583-1592.

Hirano A., Zimmerman H.M. (1962) Alzheimer's neurofibrillary changes: a topographic study. **Archives in Neurology**, 7: 73-88.

Hirokawa N., Glicksman M.A., Willard M.B. (1984) Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. **The Journal of Cell Biology**, 98: 1523-1536.

Hisanaga S., Hirokawa N. (1989) The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. **Journal of Neuroscience**, 9: 959-966.

Hoffman P.N., Cleveland D.W., Griffin J.W., Landes P.W., Cowan N.J., Prince D.L. (1987) Neurofilaments gene expression: A major determinant of axonal caliber. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 84: 3472-3476.

Huber G., Matus A. (1984) Differences in the cellular distribution of two microtubule-associated proteins, MAP-1 and MAP-2, in rat brain. **Journal of Neuroscience**, 4: 151-160.

Izumiyama K., Kogure K. (1988) Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by ion channel blockers. **Stroke**, 19: 1003-1007.

Jensen K.F., Lapadula D.M., Anderson J.K., Haykal-Coates N., Abou-Donia M.B. (1992) Anomalous phosphorylated neurofilaments aggregations in central and peripheral axons of hens treated with tri-ortho-cresyl phosphate (TOCP). **Journal of Neuroscience Research**, 33: 455-460.

Jones S.M., Williams Jr. R.C. (1982) Phosphate content of mammalian neurofilaments. **The Journal of Biological Chemistry**, 257, n°17: 9902-9905.

Julien J.P., Mushynski W.E. (1983) The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. **The Journal of Biological Chemistry**, 258: 4019-4025.

Jurkowitz-Alexander M.S., Altschuld R.A., Hohl C.M., Johnson J.D., McDonald J.S., Simmons T.D., Horrocks L.A. (1992) Cell swelling, blebbing and death are dependent on ATP depletion and independent of calcium during chemical hypoxia in a glial cell line (ROC-1). **Journal of Neurochemistry**, 59,nº1: 344-352.

Kitagawa K., Matsumoto M., Niinobe M., Mikoshiba K., Hata R., Veda H., Handa N., Fukunaga R., Isaka Y., Kimura K., Kamada T. (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage-immunohistochemical investigation of dendritic damage. **Neuroscience**, 31: 401-411.

Klymkowski M.W., Bachant J.B., Domingo A. (1989) Functions of intermediate filaments. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, 14: 309-331.

Laemmly U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.

Lapadula D.M., Suwita E., Abou-Donia M.B. (1988) Evidence for multiple mechanisms for 2,5-hexanedione induces neuropathy. **Brain Research**, 458: 123-131.

Lasek K.R.J., Oblinger M.M., Drake P.F. (1983) Molecular biology of neuronal geometry. Expression of neurofilament genes influences axonal diameter. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology**, 48: 731-744.

Lazarides E., Weber K. (1974) Actin antibody: The specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, 71, n°6: 2268-2273.

Lazarides E. (1982) Intermediate filaments: A chemical heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. **Annual Reviews of Biochemistry**, 51: 219-250.

Lee K.S., Frank S., Vanderklish P., Arai A., Lynch G. (1992) Differential distribution of 68kDa and 200kDa neurofilament proteins in the gerbil hippocampus and their early distributional changes following transient forebrain ischemia. **Experimental Brain Research**, 89: 31-39.

LeMay D.R., Gehua L., Zelenock G.B., D'Alcay L.G. (1988) Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. **Stroke**, 19: 1411-1419.

Letai A., Coulombe P., Fuchs E. (1992) Do the ends justify the mean ? Proline mutations at the ends of the keratin coiled-coil rod segment are more disruptive than internal mutation. **The Journal of Cell Biology**, 116:1181-1195.

Liem R.K.H., Patcher J.S., Napolitano E.W., Chin S.S.M., Morari E., Humann R. (1985) Associated proteins as possible cross-linkers in the neuronal cytoskeleton. **Annals of New York Academy of Sciences**, 455: 492-508.

Ljunggren B., Ratcheson R.A., Siesjo B.K. (1974) Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. **Brain Research**, 73: 291-307.

Lorente de Nó R. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. **Journal of Psychological Neurology**, 46: 113-177.

Lou H.C., Edvinsson L., Mackenzie E.T. (1987) The concept of coupling blood flow to brain function: revision required ? **Annals of Neurology**, 22: 289-297.

Lowry O.H., Rosenrough R.L., Farr R.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275.

Ludueña R.F., Zimmerman H.P., Little M. (1988) Identification of the phosphorylated beta-tubulin isotypes in differentiated neuroblastoma cells. **Federation of European Biochemical Societies**, 230: 142-146.

Margolis R.L., Rauch C.T. (1981) Characterization of rat brain crude extract microtubule assembly: correlation of cold stability with the phosphorylation state of a microtubule-associated 64kDa protein. **Biochemistry**, 20: 4451-4458.

Mattos A.G., Camargo M.M., Freitas M.S., Pessoa-Pureur R. (1993) Malnutrition increases neurofilament subunits concentration in rat cerebellum. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 4: 644-650.

Mattos A.G., Freitas M.S., Camargo M.M., Pessoa-Pureur R. (1994) Triton-insoluble tubulin concentration in normal and malnourished rats during development. **Medical Science Research**, 22: 7-8.

Meldrum B.S. (1990) In: Meldrum B.S. & Williams M (eds). **Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety, and Stroke Therapy**. Wiley-Liss, New York.

Monaco S., Autilio-Gambetti L., Zabel D. (1985) Giant axonal neuropathy: Acceleration of neurofilament transport in optic axons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 82: 920-924.

Murata H., Geer K., Rosenbaum J.L. (1986) The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. **The Journal of Cell Biology**, 103: 571-579.

Needham, J. (1937) Chemical aspects of morphometric fields. In **Perspectives In Biochemistry**. Needham and Green, editors. Cambridge University Press: 68-80.

Nestler E.J., Greengard P. (1984) **Protein Phosphorylation in the Nervous System**, John Wiley & Sons ed., Neurosciences Institute Publications, New York.

Netto C.A., Hodges H., Sinden J.D., Le Peillet E., Kershaw T., Sowinski P., Meldrum B.S., Gray, G.A. (1993) Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neuroscience**, 54, n°1: 69-92.

Nixon R.A., Lewis S. E., Marotta C.A. (1987) Post-translational modification of neurofilament proteins by phosphate during axoplasmic transport in retinal ganglion cell neurons. **Journal of Neuroscience**, 7: 1145- 1158.

Nixon R.A., Sihag R.K. (1991) Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function . **Transplantation In the Nervous System**, 14, n°11.

O'Callaghan J.P. (1994) A potential role for altered protein phosphorylation in the mediation of developmental neurotoxicity. **Neurotoxicology**, 15, n°1: 29-40.

O'Farrel P.H. (1975) High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 250: 4007-4021.

Ogata N., Yonekawa Y., Taki W., Kannagi R., Murachi T., Hamakubo T., Kikuchi H. (1989) Degradation of neurofilament protein in cerebral ischemia. **Journal of Neurosurgery**, 70: 103-107.

Osborn M., Franke W.W., Weber K. (1977) Visualization of a system of filaments 7-10 nm thick in culture cells of an epithelioid line (pt K2) by immunofluorescence microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 74: 2490-2494.

Pant H.C. (1988) Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. **Biochemical Journal**, 256: 665-668.

Paz M.M., Valente G.B., Tasca C.I., de Mattos, A.G., Pessoa-Pureur R. (1991) Malnutrition induces an increase in intermediate filament protein of rat cerebral cortex. **Journal of Nutrition**, 121: 1349-1354.

Pekiner C., McLean W.G. (1991) Neurofilament protein phosphorylation in spinal cord of experimental diabetic rat. **Journal of Neurochemistry**, 56, n°4: 1362-1367.

- Pena S.D.J. (1982) Giant axonal neuropathy: an inborn error of organization of intermediate filaments. **Muscle & Nerve**, 5: 166-172.
- Piezzi R.S., Cavicchia J. (1981) Effects of cold and melatonin on microtubules of the toad (*Bufo arenarum*) sciatic nerve. **The Anatomical Record**, 200: 115-120.
- Porter K.R., Kuruda M. (1987) Cytoskeleton *in vitro*: preparation of isolated cytoskeletons with three-dimensional architecture. **Journal of Biochemistry**, 101: 1413-1427.
- Pulsinelli W.A., Brierly J.B. (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke**, 10: 267-272.
- Pulsinelli W., Levy D., Duffy T. (1982a) Regional cerebral blood and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. **Annals of Neurology**, 11: 499-509.
- Pulsinelli W., Brierley J., Plum F. (1982b) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Annals of Neurology**, 11: 491-498.
- Pulsinelli W., Duffy T.E. (1983) Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. **Journal of Neurochemistry**, 40: 1500-1503.

Raley-Susman K.M., Lipton P. (1990) *In vitro* ischemia and protein synthesis in the rat hippocampal slices: the role of calcium and NMDA receptor activation. **Brain Research**, 515: 27-38.

Rod M.R., Auer R.N. (1989) Pre- and post-ischemic administration of dizocilpine (MK-801) reduces cerebral necrosis in the rat. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, 16: 340-344.

Rothman S.M., Olney J.W. (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. **Annals of Neurology**, 19: 105-111.

Rubin M.A., Wannmacher C.M.D., Valente G.B., Camargo M.M., Pessoa-Pureur (1992) Diminished concentration of the NF-H subunit of neurofilaments in cerebral cortex of rats chronically treated with proline, methylmalonate and phenylalanine plus alpha-methylphenylalanine. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 15: 252-260.

Rubio I., Torres M., Miras-Portugal M.T., Sanchez-Prieto J. (1991) Ca^{+2} independent release of glutamate during *in vitro* anoxia in isolated nerve terminals. **Journal of Neurochemistry**, 57, nº4: 1159-1164.

Sayre L.M., Autilio-Gambetti L., Gambetti P. (1985) Pathogenesis of experimental giant neurofilaments axonopathies: A unified hypothesis based on chemical modification on neurofilaments. **Brain Research Reviews**, 10: 69-83.

Scarth G.W. (1942) Structural differentiation of cytoplasm. In **The Structure of Protoplasm: A monograph of the American Society of Plant Physiologists**. W.Seifriz, editor. Iowa State College Press, Ames, Iowa: 99-107.

Schlaepfer W.W., Lee C., Lee V.M.-Y., Zimmerman U. -J. P. (1985) An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis. **Journal of Neurochemistry**, 44: 502-509.

Schmidt-Kastner R., Szymas J. (1990) Immunohistochemistry of glial fibrillary acid protein, vimentin and S-100 protein for study of astrocytes in hippocampus of rat. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 3: 179-192.

Schmidt-Kastner R., Szymas J., Hossman K. -A. (1990) Immunohistochemical study of glial reaction and serum-protein extravasion in relation to neuronal damage in rat hippocampus after ischemia. **Neuroscience**, 38: 527-540.

Schmidt-Kastner R., Freund T.F. (1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, 40, n°3: 599-636.

Schnapp B.J., Reese T.S. (1982) Cytoplasmic structure in rapid frozen axons. **The Journal of Cell Biology**, 94: 667-679.

Serrano L., Díaz-Nido J., Wandossel F., Ávila J. (1987) Tubulin phosphorylation by casein kinase II is similar to that found in vivo. **The Journal of Cell Biology**, 105: 1731-1739.

Sharp G.A., Shaw G., Weber K. (1982) Immunoelectron microscopical localization of the three neurofilament triplet proteins along neurofilament of culture dorsal root ganglion neurons. **Experimental Cell Research**, 137: 403-413.

Shaw G., Weber K. (1982) Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. **Nature**, 298: 277-279.

Shelansky M.L., Feit H. (1972) In G. H. Bourne (ed.) **The structure and function of the nervous tissue**. Vol.6. Academic Press, New York: 47-80.

Siesjo B.K. (1978) **Brain Energy Metabolism**, John Wiley ed., New York.

Siesjo B.K., Bengtsson F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression: a unifying hypothesis. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, 9: 127-140.

Sihag R.K., Nixon R.A. (1989) In vivo phosphorylation of distinct domains of the 70 kDa neurofilament subunit involves different protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, 264, n°1:457-464.

Sims N.R., Pulsinelli W.A. (1987) Altered mitochondrial respiration in selectively vulnerable brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. **Journal of Neurochemistry**, 49: 1367-1374.

Slautterback D.B. (1963) Cytoplasmic microtubules. **The Journal of Cell Biology**, 18: 367-388.

Smith M. -L., Bendek G., Dahlgren N., Rosén I., Wieloch T., Siesjo B.K. (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. **Acta Neurologica Scandinavia**, 69: 385-401.

Squire L.R. (1986) Mechanisms of memory. **Science**, 232: 1612-1619.

Steinart P.M., Roop D.S. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. **Annual Review of Biochemistry**, 57: 593-625.

- Svoboda M., Meuris S., Robin C., Christophe J. (1985) Rapid eletrotransfer of proteins from polyacrilamide to nitrocellulose membrane using surface-conductive glass as anode. **Analytical Biochemistry**, 151: 16-23.
- Tokutake S., Satoshi S. (1990) On the assembly mechanism of neurofilaments. **Internatinal Journal of Biochemistry**, 22, nº 1: 1-6.
- Toru-Delbauffe M., Pierre M. (1983) A rat brain protein kinase phosphorylating specifically neurofilaments. **Federation of European Biochemical Societies**, 162,nº2: 230-234.
- Valente G.B., Mattos A.G., Paz M.M., Tasca C.I. (1992) Malnutrition increases insoluble-to soluble tubulin ratio and in vitro incorporation of 32ATP in rat cerebral cortex. **Neurochemistry Internatinal**, 21, nº4: 595-603.
- Victor M., Angevine J.B., Mancall E.L., Fisher C.M. (1961) Memory loss with lesions of hippocampal formation. **Archives in Neurology**, 5: 244-263.
- Vidrich A., Gilmartin M., Zimmerman J., Freedberg I.M. (1982) Glicosylation of the keratin intermediate filaments of ME-180. **The Journal of Cell Biology**, 96 (2, pt2): 237a.
- Volpe B.T., Petito C.K. (1985) Dementia with bilateral medial temporal lobe ischemia. **Neurology**, 35: 1793-1797.

- Volpe B.T., Davis H.P., Colombo P.J. (1989) Preoperative training modifies radial maze performance in rats with ischemic hippocampal injury. **Stroke**, 20: 1700-1706.
- Wallas S.I., Greengard P. (1987) Phosphorylation of brain proteins. In **The Enzymes**, vol. XVIII: 285-317 ed. by P.D. Boyer and E.G. Krebs, Academic Press, Orlando, F.L.
- Wallas S.I., Greengard P. (1991) Protein phosphorylation and neuronal function. **Pharmacological Reviews**, 43: 299-349.
- Wandossel F., Serrano L., Hernandez M.A., Ávila J. (1986) Phosphorylation of tubulin by a calmodulin-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, 261: 10332- 10339.
- Wang S., Lee G.J., Rosengren L.E., Karlsson J.E., Hamberger A., Haglid K.G. (1991) The effect of a NMDA lesion in the hippocampus on glial and neuronal marker proteins. **Brain Research**, 541: 334-341.
- Wang S., Lees G.J., Rosengren L.E., Karlsson J.E., Hamberger A., Haglid K.G. (1992) Proteolysis of filament proteins in glial and neuronal cells after in vivo stimulation of hippocampal NMDA receptors. **Neurochemical Research**, 17: 1005-1009.

Weisenberg R.C. (1972) Microtubule formation *in vitro* in solution containing low calcium concentration. **Sciences**, 177: 1104-1105.

Windman R., Kuroiwa T., Bonnekoh P., Hossmann K. -A. (1991) [¹⁴C]Leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, 56: 789-796.

Wolosewick J.J., Porter K.R. (1979) The microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance: artifact or reality. **The Journal of Cell Biology**, 82: 114-139.

Wuerker R.B., Kirkpatrick J.B. (1972) Neuronal microtubules, neurofilaments and microfilaments. **International Reviews of Cytology**, 33: 45-76

Yamada K.M., Spooner B.S., Wessels N.K. (1971) Ultrastructure and function of growth and axonal of culture nerve cells. **The Journal of Cell Biology**, 49: 614-635.

Yamamoto K., Morimoto K., Yanagihara T. (1986) Cerebral ischemia in the gerbil: transmission electron microscopic and immunoelectron microscopic investigation. **Brain Research**, 384: 1-10.

Yamamoto M., Hamasaki N., Maruta Y., Tomonaga M. (1990) Fructose 2-6-biphosphate changes in rat brain during ischemia. **Journal of Neurochemistry**, 54, n°2: 592-597.

Zaidan E., Sims N.R. (1990) Alterations in the production of CO₂ and [14C]acetylcholine from [U-¹⁴C]glucose in brain subregions following transient forebrain ischemia in the rat. **Journal of Neurochemistry**, 55, n°6: 1882-1889.

Zimmerman U.P., Schlaepfer W. (1982) Characterization of a brain calcium-activated protease that degrades neurofilament proteins. **Biochemistry**, 21: 3977-3983.

Zivin J.A., Kochhar A., Saitoh T. (1990) Protein phosphorylation during ischemia. **Stroke**, 21 (suppl. III): III-117 - III-121.