

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**CARACTERIZAÇÃO DA MORTE NEURONAL APÓS O TRATAMENTO COM  
ÁCIDO FÓLICO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA  
NEONATAL**

Bruna Ferrary Deniz

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**CARACTERIZAÇÃO DA MORTE NEURONAL APÓS O TRATAMENTO COM  
ÁCIDO FÓLICO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA  
NEONATAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Bruna Ferrary Deniz  
Área de concentração: Fisiologia Geral  
Orientadora: Prof. Dra. Lenir Orlandi Pereira Silva

Porto Alegre

2011

## **AGRADECIMENTO**

A Prof. Lenir pela orientação, apoio e paciência, mas, principalmente, por ter me ensinado e mostrado um modelo pelo qual me apaixonei e defendo.

Ao melhor grupo de pesquisa: LG! Jaque, Josi, Cla, Ramiro, Paty e Lu, sem vocês esse trabalho jamais teria sido realizado e não seria tão bom e divertido trabalhar nos finais de semana.

A Prof. Maria Cristina pela ajuda e dedicação, por me mostrar e me contagiar com a microscopia eletrônica.

A Patrícia Nascimento não só pela disposição e participação no trabalho, mas também pela paciência e ensinamentos.

A Sílvia Barbosa, minha companheira, pelo auxílio e ajuda em várias etapas do trabalho, mas, também, por me ouvir desabafar e ter paciência com isso.

As minhas companheiras de faculdade, Mirian, Vanessa e Fernanda, que tornaram todos os dias mais fáceis e divertidos. Sem vocês não concluiria esse curso.

As minhas irmãs de coração, companheiras de vida: Gabi, Ula, Nina, Jéssica, Sandra (Japa) e Fabi! Vocês são as melhores!

Ao Daniel, meu companheiro e incentivador, por entender minhas ausências nos finais de semana, por me acompanhar várias vezes, me ajudar, apoiar, incentivar e acreditar em mim quando nem eu acredito. Obrigada meu amor!

Aos meus pais, Paulo e Sandra, os melhores! Obrigada por terem me ensinado tanta coisa, por me apoiarem sempre e pelo amor e dedicação incondicionais! Amo vocês e tudo isso só está acontecendo porque tenho vocês do meu lado, minha base, meu porto-seguro!

Por fim, a minha irmã, Desi, não só pelo interesse, companheirismo e apoio, mas, principalmente, por ser a minha melhor amiga e a pessoa que mais amo no mundo! Tu és meu exemplo!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Hipóxia-Isquemia Neonatal.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Apoptose.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Fase de Iniciação.....	12
1.2.2 Fase de Integração de Sinal.....	13
1.2.3 Fase de Execução.....	13
<b>1.3 Necrose.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Morte Neuronal na Hipóxia-Isquemia.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Ácido Fólico.....</b>	<b>18</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
<b>3 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>22</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>5 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Funcionamento da sinapse glutamatérgica.....	8
Figura 2 – Fontes formadoras de radicais livres durante a hipóxia-isquemia neonatal.....	9
Figura 3 – Mecanismos envolvidos na hipóxia-isquemia neonatal.....	10
Figura 4 – Representação esquemática das diferentes vias apoptóticas.....	14
Figura 5 – Imagens de microscopia eletrônica de linfócitos em diferentes estágios apoptóticos.....	15
Figura 6 – Imagem de microscopia eletrônica de neurônio cortical em processo de necrose.....	16
Figura 7 – Diferenças entre apoptose e necrose.....	16
Tabela 1 – Comparação entre apoptose e necrose.....	17

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	A-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol-propionato
Apaf	Fator Ativador da Protease Pró-Apoptótica
ATP	Adenosina Trifosfato
CA1	Subcampo 1 do Corno de Amon
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CAD	DNase Ativada por Caspase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HI	Hipóxia-isquemia
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
RL	Radicais Livres
RNA	Ácido Ribonucléico
TNF	Fator de Necrose Tumoral

## RESUMO

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) gera dano ao tecido nervoso com consequente alterações cognitivas e motoras que podem perdurar durante toda a vida. O folato, um nutriente essencial obtido através da dieta, tem sido relacionado com a prevenção de eventos isquêmicos e danos oxidativos. O objetivo deste estudo é caracterizar a morte celular no Corno de Amon (região CA1) do hipocampo dorsal ipsilateral de ratos submetidos à HI neonatal e verificar possíveis efeitos do tratamento agudo com ácido fólico (AF). Ratas wistar fêmeas foram submetidas ao procedimento de HI no 7º dia pós-natal (DPN), o qual consiste na oclusão permanente da artéria carótida comum direita com posterior exposição a ambiente hipóxico por 90 minutos. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=3/grupo): 1) controle tratado com solução salina 0,9% - veículo (CTV); 2) hipóxia-isquemia veículo (HIV); 3) HIAF. Uma dose intra peritonial de AF 0,011µM foi administrada 24 horas antes, imediatamente antes e 12 horas após a HI. Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos 24 horas após a HI e foi realizada a preparação histológica para análise em microscópio eletrônico. Nos animais HI tratados com salina foi verificada uma grande degeneração celular, em graus variados, com predominância de características de morte celular por necrose. Também foi verificada a existência de um “*continuum* apoptose-necrose”, ou seja, um mesmo neurônio apresentava tanto características apoptóticas quanto necróticas. Nos animais HI tratados com ácido fólico também foram encontradas células degeneradas em diversos níveis, porém foi visível a maior quantidade de células íntegras quando comparado com o grupo HIV. Com isso, é possível concluir que agudamente, após a HI neonatal, ocorre predomínio de necrose e que o tratamento com ácido fólico mostrou-se benéfico na diminuição da degeneração celular na região CA1 do hipocampo, ipsilateral à oclusão arterial.

**Palavras-chave:** Hipóxia-isquemia neonatal, ácido fólico, morte neuronal, apoptose, necrose, hipocampo, microscopia eletrônica.

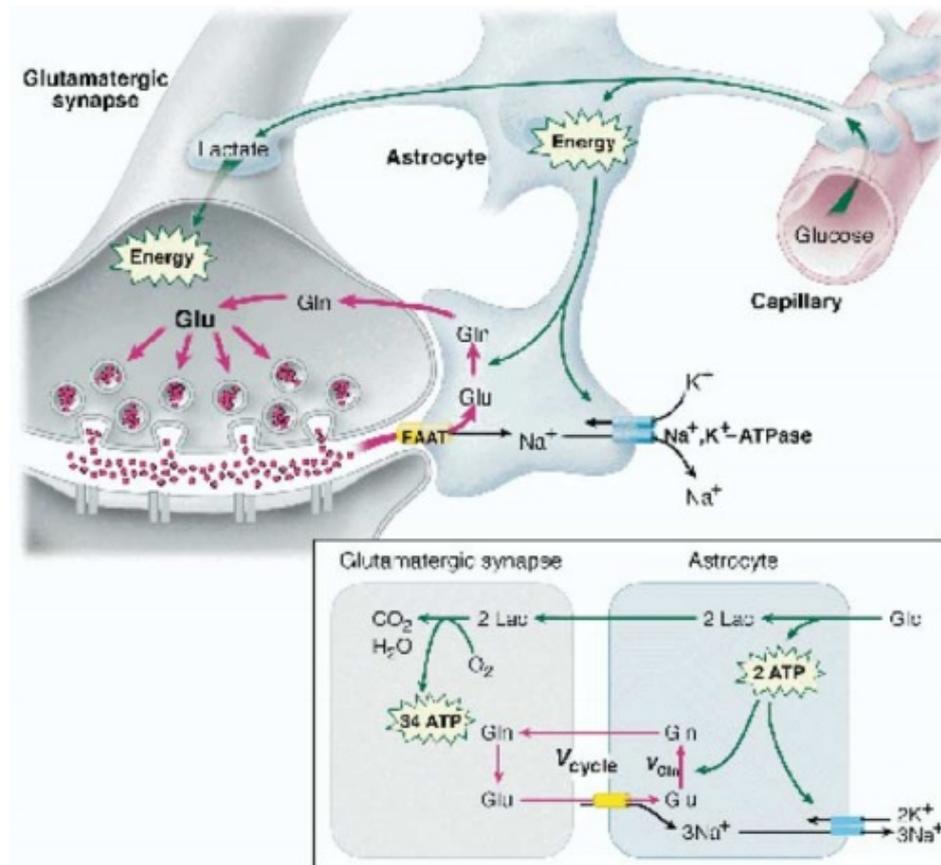
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Hipóxia-Isquemia Neonatal

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é o principal fator de risco de uma variedade de sérias desordens neurológicas em humanos como deficiências motoras e de aprendizado, paralisia cerebral, epilepsia, sendo também causa de morte (Hossain, 2008; Pereira *et al.*, 2008). De acordo com dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (2007), a incidência é de 4,05% de hipóxia intra-uterinas e asfixia ao nascer, sendo considerada relativamente alta ao comparar com países desenvolvidos, onde há 2 acometimentos para cada 1000 nascidos vivos (Hossain, 2008). Essa menor incidência deve-se, principalmente, a melhores condições de assistência pré-natal e peri-parto disponíveis. Dos neonatos afetados, 15-20% irá morrer no período pós-natal e, em torno de 25% terá seqüelas graves e permanentes (Nakajima *et al.*, 2000).

Dois principais fatores contribuem para a HI neonatal: a perda da autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral, com separação/ruptura placentária e/ou estrangulamento umbilical e complicações durante o nascimento (Gill & Perez-Polo, 2008). É proposto que o dano ao tecido cerebral é causado por vários eventos patofisiológicos interligados como a falência energética, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, inflamação, ativação de caspases e estresse oxidativo (McLean & Ferriero, 2004; Pereira *et al.*, 2008). Somando-se a isto, sabe-se ainda que o cérebro imaturo é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido as suas limitadas capacidades antioxidantes (Carlioni *et al.*, 2007).

Um dos primeiros mecanismos causadores de dano na HI neonatal provém da excitotoxicidade glutamérgica e a falência energética. A remoção do glutamato da fenda sináptica é realizada por transportadores presentes, principalmente, nos astrócitos que necessitam da maquinaria energética da célula para seu bom funcionamento (Figura 1). Os astrócitos convertem o glutamato em glutamina que é, então, devolvida aos neurônios para que novamente seja convertida em glutamato, podendo ser reutilizado na transmissão sináptica (Siegel, 2006).



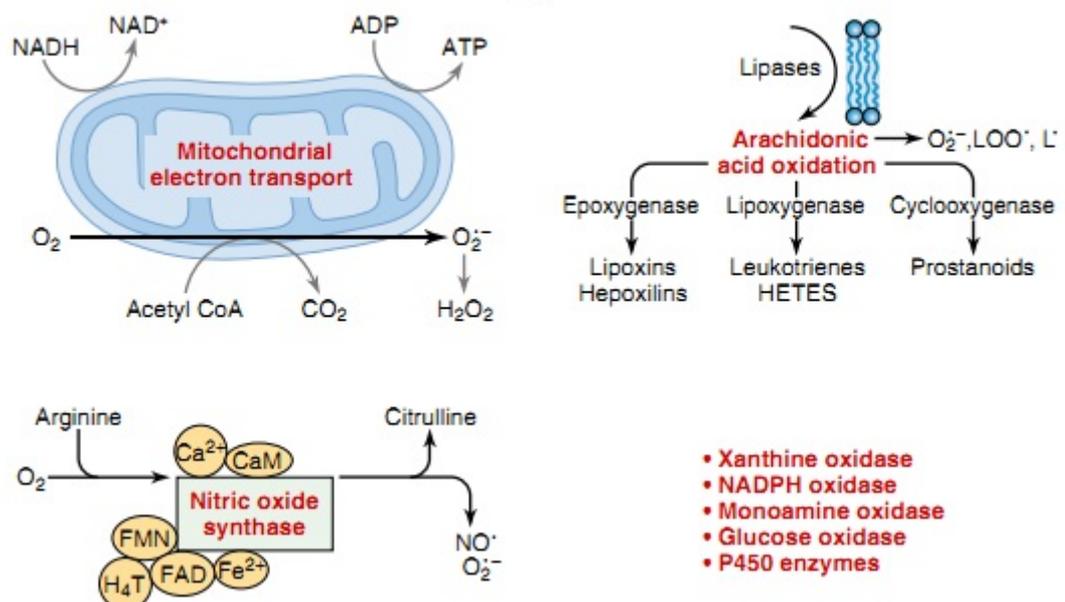
**Figura 1.** Funcionamento da sinapse glutamatérgica. Fonte: McLean & Ferriero, 2004.

Durante a isquemia, ocorre uma privação de glicose para o sistema nervoso central (SNC), o que gerará uma falência energética ao tecido devido à falta de adenosina trifosfato (ATP). A falha na função da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase causa despolarização dos neurônios que leva a um aumento intracelular de sódio e água, causando edema citotóxico e/ou lise celular seguida de reação inflamatória com liberação de citocinas. A despolarização neuronal também causa uma maior liberação de glutamato (Distefano & Praticò, 2010). Como os transportadores de glutamato que realizam a sua recaptação são dependentes de energia, eles sofrerão uma disfunção com diminuição da sua atividade após a isquemia. Com isso, ocorrerá um aumento da concentração do neurotransmissor na fenda sináptica que poderá ser prejudicial ao superestimular seus receptores pós-sinápticos, principalmente o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (McLean & Ferriero, 2004).

Durante o desenvolvimento, sabe-se que os receptores NMDA, responsáveis pelo influxo de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) estão superexpressos quando comparado com adultos e, segundo McLean & Ferriero (2004), as subunidades que os compõem nos neonatos permitem um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mais prolongado e

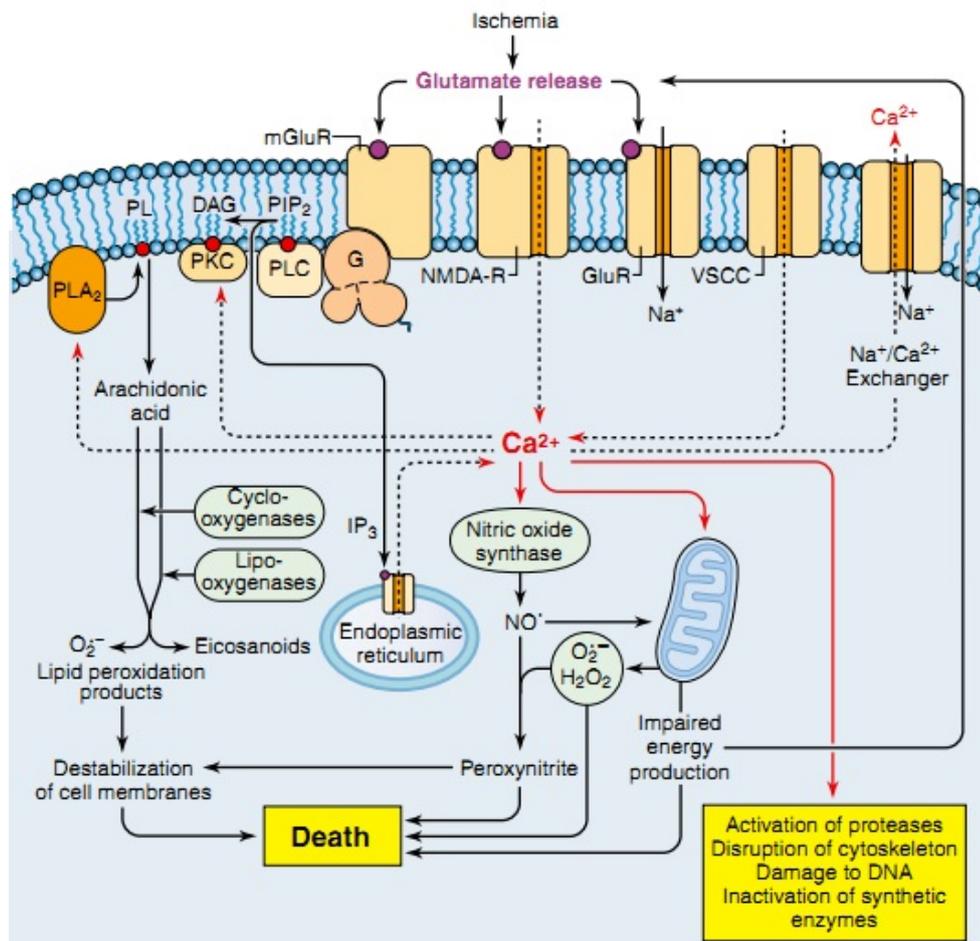
pronunciado. Com o aumento da concentração de glutamato, esses receptores são altamente estimulados o que gera uma série de danos a célula. (McLean & Ferriero, 2004; Siegel, 2006). O aumento excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular ativa várias enzimas endocelulares como proteases e fosfolipases. As proteases irão degradar os neurofilamentos, determinando a ruptura do citoesqueleto com desintegração do corpo celular. As fosfolipases irão hidrolisar os fosfolipídios, danificando as membranas das células e liberando ácido araquidônico, levando à produção de prostaglandinas vasodilatadoras que darão início a fase de reperfusão. Durante esses processos também poderá ocorrer liberação de enzimas degradativas que poderão ser tóxicas às células vizinhas, aumentando a morte e a perda do tecido cerebral (McLean & Ferriero, 2004; Distefano & Praticò, 2010).

A formação excessiva de radicais livres (RL) após a hipóxia-isquemia neonatal causa estresse oxidativo às células, sendo que o encéfalo dos neonatos é muito mais suscetível a esse dano devido há uma maior concentração de lipídios polinsaturados (facilmente oxidáveis), ferro livre e defesas antioxidantes imaturas. Apesar de haver certa produção de RL durante a isquemia, é durante a fase de reperfusão (quando há a reintrodução de oxigênio) que há um aumento excessivo e danoso dessas espécies (McLean & Ferriero, 2004; Siegel, 2006). Na figura abaixo podemos visualizar algumas das fontes formadoras de radicais livres durante a hipóxia-isquemia neonatal.



**Figura 2.** Fontes formadoras de radicais livres durante a hipóxia-isquemia neonatal. Fonte: Siegel, 2006.

Esses radicais levam à peroxidação de lipídeos de membrana e disfunção de canais iônicos. Ao mesmo tempo, ocorre dano às junções de oclusão que causam ruptura na integridade da barreira hematoencefálica, levando a um edema intersticial-vasogênico que piora o dano cerebral (Distefano & Praticò, 2010). Os radicais livres também ativam as células endoteliais, induzindo à liberação de adesinas e quimiocinas, gerando um acúmulo de neutrófilos e plaquetas nas artérias, alterando o fluxo sanguíneo cerebral e causando um segundo processo de necrose isquêmica. Os radicais livres também levam à ativação do sistema enzimático de caspases, resultando na liberação do citocromo c, devido ao dano oxidativo mitocondrial, e indução de genes pró-apoptóticos (Distefano & Praticò, 2010). Ainda, o óxido nítrico, um dos radicais livres produzidos durante a HI, pode modificar os receptores NMDA de glutamato, facilitando a entrada de cálcio e aumentando a excitotoxicidade (McLean & Ferriero, 2004). Podemos ver um resumo dos mecanismos envolvendo a hipóxia-isquemia neonatal na figura abaixo.



**Figura 3.** Mecanismos envolvidos na hipóxia-isquemia neonatal. Fonte: Siegel, 2006.

Resultados de estudos morfológicos, histoquímicos e moleculares indicam que mecanismos apoptóticos e necróticos levam à morte neuronal após a hipóxia-isquemia encefálica em diferentes modelos animais de neonatos (Nakajima *et al.*, 2000).

## 1.2 Apoptose

O termo “morte celular propagada” surgiu em 1964 para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Porém, foi apenas em 1972 que surgiu o termo “apoptose” para indicar esse mesmo tipo de morte celular (Kerr *et al.*, 1972). A apoptose ocorre em diversas situações, como na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes tóxicos (Grivicich *et al.*, 2007).

A apoptose é caracterizada por uma seqüência de eventos dependentes de energia regulada por meio da qual uma célula se autodestrói. Ocorre retração da célula, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. A membrana celular forma bolhas (extrusões) e a célula se quebra em vesículas circundadas por membranas (corpos apoptóticos), contendo quantidades variadas de citoplasma, organelas e fragmentos de ácido desoxirribonucléico (DNA) (figura 5). A fosfatidilserina, um lipídio da camada interna da membrana celular, é exposta na camada externa como um marcador da apoptose para que macrófagos e outras células fagocíticas reconheçam esse sinal e engolfem os corpos apoptóticos sem causar inflamação do tecido (Robbins, 2008; Marks, 2009).

As características bioquímicas da apoptose abrangem:

- Degradação de proteínas por caspases que pertencem a uma família de proteases. Essas também podem ativar as DNases que degradam o DNA nuclear;
- Clivagem internucleossomal do DNA em fragmentos múltiplos de 200 pares de bases;
- Alterações da membrana plasmática, como a exposição da fosfatidilserina na camada externa (Robbin, 1995; Elmore, 2007).

O processo de apoptose pode ser dividido em 3 fases: (1) fase de iniciação, que pode ocorrer devido a sinais externos por meio de receptores de morte (como o fator de necrose tumoral – TNF) e/ou por diminuição de hormônios do crescimento,

ou por eventos intracelulares que afetam a integridade da mitocôndria (ex.: falta de oxigênio, radiação) e quando o DNA é lesado de forma irreparável; (2) fase de integração de sinal, quando os sinais apoptóticos são balanceados com os antiapoptóticos por diversas rotas, como por membros da família de proteínas Bcl-2; (3) fase de execução, realizadas pelas proteínas proteolíticas denominadas caspases (Marks, 2009).

### 1.2.1 Fase de Iniciação

#### *Via Extrínseca (morte iniciada por receptor):*

Os receptores de morte são membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), como os receptores TNF do tipo 1 e Fas, que contêm um domínio de morte citoplasmático envolvida nas interações proteína-proteína. A reação cruzada com seu ligante faz com que esses receptores se unam para formar um local de ligação para uma proteína adaptadora que, por sua vez, aproxima várias moléculas caspase-8 inativas. A atividade enzimática de baixo nível dessas pró-caspases cliva uma delas, ativando-a. Essa caspase ativa, por sua vez, cliva e ativa outra pró-caspase, desencadeando rapidamente uma cascata de ativação de caspases (Elmore, 2007; Robbins, 2008). A caspase-8 também cliva uma proteína, Bid, em uma forma que ativa a rota de integridade mitocondrial para apoptose (Marks, 2009).

#### *Via Intrínseca (mitocondrial):*

Em diversos eventos lesivos a permeabilidade mitocondrial aumenta e são liberadas moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, sem a participação de receptores de morte. Todos esses tratamentos ou alterações levam à liberação de citocromo c pela mitocôndria, que é um componente protéico necessário na cadeia transportadora de elétrons, estando frouxamente ligado ao lado externo da membrana interna da mitocôndria. A partir da sua liberação inicia-se a apoptose. Quando no citosol, o citocromo c se liga a Apaf (fator ativador da protease pró-apoptótica), formando um complexo que se liga à caspase 9 (caspase iniciadora). Esse novo complexo ativo é chamado de apoptossomo, que é responsável pela ativação de caspases de execução por quebra de zimogênio (Elmore, 2007; Robbins, 2008; Marks, 2009).

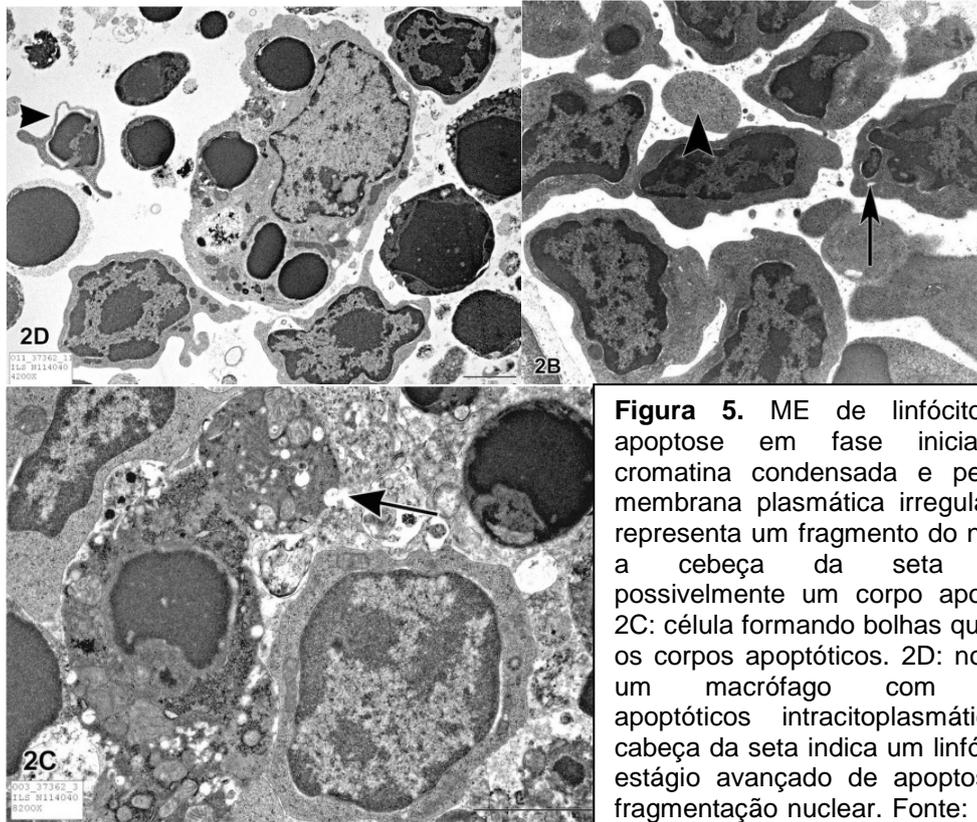
### 1.2.2 Fase de Integração de Sinal

Mais de 20 proteínas da família da proteína Bcl-2 têm a função de regular a apoptose. As proteínas antiapoptóticas (ex.: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-wL) tentam antagonizar os sinais de morte inserindo-se na membrana mitocondrial externa para diminuir a liberação de citocromo c ou ligando-se à Apaf citoplasmática para que ela não forme o apoptossomo. Existem 2 tipos de proteínas pró-apoptóticas: os membros formadores de canais iônicos e os membros BH3-único. As primeiras (ex.:Bax) são muito similares aos membros antiapoptóticos, exceto por não conterem domínio de ligação com Apaf. Porém, possuem outros domínios estruturais e quando dimerizam com as BH3-únicas na membrana externa da mitocôndria formam um canal iônico que permite a passagem do citocromo c. As últimas (ex.:Bim e Bid) possuem apenas um domínio estrutural que permite que se liguem a outros membros da família Bcl-2 e não contêm domínios para ligação com a membrana ou a formação de canais iônicos. Sua ligação ativa os membros pró-apoptóticos e inativa os antiapoptóticos. Quando as células são privadas dos sinais de sobrevivência ou expostas a estresse, elas perdem a Bcl-2 e/ou Bcl-x da membrana mitocondrial e são substituídas por membros pró-apoptóticos da família, como Bak, Bax e Bim. Quando os níveis de Bcl-2/Bcl-x diminuem, a permeabilidade da membrana mitocondrial aumenta e várias proteínas que podem ativar caspases extravasam. A essência dessa via está no equilíbrio entre as moléculas pró-apoptóticas e protetoras que regulam a permeabilidade mitocondrial (Robbins, 2008; Marks, 2009).

### 1.2.3 Fase de Execução

As caspases proteolíticas que medeiam a fase de iniciação são altamente conservadas entre as espécies. No termo caspase, o “c” refere-se a uma enzima que possui uma cisteína em seu sítio ativo e “aspase” refere-se a habilidade dessa enzima de clivar os resíduos de ácido aspártico. Existem na forma de pró-enzimas inativas e devem sofrer uma clivagem para serem ativadas, sendo que os locais de clivagem podem ser tanto hidrolisados por outras caspases quanto autocataliticamente. São divididas em dois grupos: as iniciadoras e as efetoras. As primeiras clivam especificamente outras caspases, sendo ativadas pelas vias intrínseca e extrínseca da fase de iniciação e incluem a caspase-8 e a caspase-9. As caspases de execução são responsáveis pela clivagem de outras proteínas





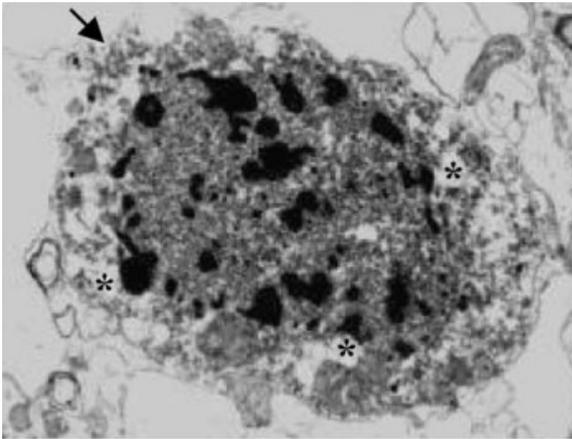
**Figura 5.** ME de linfócitos. 2B: apoptose em fase inicial com cromatina condensada e periférica, membrana plasmática irregular, seta representa um fragmento do núcleo e a cabeça da seta indica, possivelmente um corpo apoptótico. 2C: célula formando bolhas que serão os corpos apoptóticos. 2D: no centro um macrófago com corpos apoptóticos intracitoplasmáticos, a cabeça da seta indica um linfócito em estágio avançado de apoptose com fragmentação nuclear. Fonte: Elmore, 2007.

### 1.3 Necrose

O processo necrótico ocorre quando há uma perturbação abrupta do ambiente celular (Pagnussat, 2007) de forma passiva e caótica, não sendo específica nem dirigida. Envolve a perda da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e enzimas associadas (ex.:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase) com rápido aumento dos níveis intracelulares de íons, como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Na}^+$ , e água, dano mitocondrial e colapso energético que culminarão na desintegração celular (Pagnussat, 2007; Northington *et al.*, 2011).

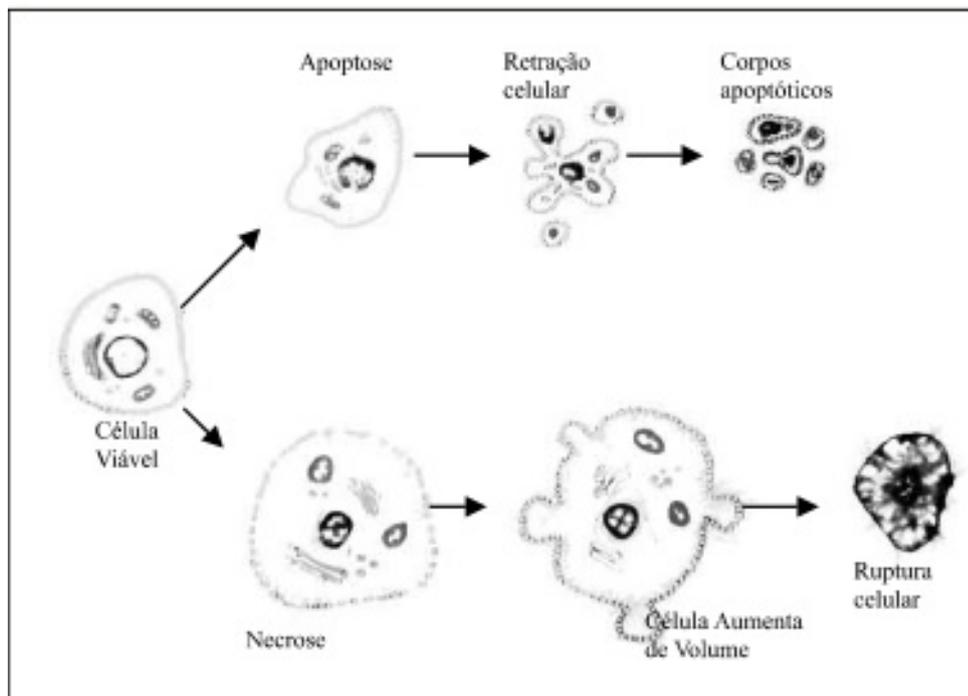
As células necróticas são mais eosinofílicas que as células normais pela coloração de hematoxilina e eosina, possuem uma aparência “vítrea” causada pela perda dos grânulos de glicogênio (Robbins, 2008). Há um aumento no volume celular e as membranas celulares são fragmentadas (figura 6), permitindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático que é seguido pela inflamação do tecido adjacente. O núcleo sofre uma série de alterações como a picnose (intensa condensação da cromatina), a coriorrexe (fragmentação do núcleo) e a cariólise (núcleo dissolvido). Na mitocôndria pode ocorrer a contração ou a condensação da

membrana interna, lise das cristas e desintegração. Há um aumento dos ribossomos livres no citoplasma (aparência densa e granular) devido à dissociação dos polirribossomos e o desprendimento dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso. Este, por sua vez, pode sofrer dilatação, fragmentação ou vesiculação de suas cisternas, bem como as cisternas do aparato de Golgi. Pode ocorrer o processo de *blebbing* na membrana plasmática, que são como dilatações em forma de bolhas (Pagnussat, 2007; Robbins, 2008).



**Figura 6.** neurônio cortical apresentando os primeiros sinais de necrose: aumento do volume citoplasmático, ruptura das organelas, formação de vacúolos (asteriscos) e deterioração da membrana (seta). Fonte: Wei *et al.*, 2004.

As principais diferenças morfológicas entre a morte celular programada e a necrose podem ser observadas na figura 7. A tabela 1 lista essas diferenças.



**Figura 7.** Diferenças entre apoptose e necrose. Fonte: Grivicich, 2007.

**Tabela 1.** Comparação entre apoptose e necrose. Fonte: Elmore, 2007.

Apoptosis	Necrosis
Single cells or small clusters of cells	Often contiguous cells
Cell shrinkage and convolution	Cell swelling
Pyknosis and karyorrhexis	Karyolysis, pyknosis, and karyorrhexis
Intact cell membrane	Disrupted cell membrane
Cytoplasm retained in apoptotic bodies	Cytoplasm released
No inflammation	Inflammation usually present

#### 1.4 Morte Neuronal na Hipóxia-Isquemia

Sabe-se que a maturidade do encéfalo, os subtipos de receptores de glutamato e o modelo aplicado influenciam o modo e a velocidade da morte celular (Sheldon *et al.*, 2001; Northington *et al.*, 2011). Muitos autores afirmam que inicialmente ocorre uma morte celular por necrose na região central da isquemia e que há uma morte tardia por apoptose na região de penumbra (Nakajima *et al.*, 2000; Sheldon *et al.*, 2001; Northington *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2003; Ferrer & Planas, 2003; Hossain, 2008). Em seu estudo, Ferrer (2003) classifica a região de penumbra como a área hipo-perfundida envolta da região isquêmica, onde a circulação sangüínea é muito baixa para manter a atividade elétrica, mas é suficiente para preservar os canais iônicos. Essas células estariam sujeitas a diversos fatores deletérios produzidos pelas células vizinhas que gerariam excitotoxicidade. Nesse trabalho foi verificado que as vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose ocorrem concomitantemente na região de penumbra.

Estudos utilizando Microscopia Eletrônica descrevem, normalmente células que apresentam tanto características quanto necróticas quanto apoptóticas que foram classificadas com um “*continuum* apoptose-necrose” ou “parapoptose” (Sheldon *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Esse processo pode ocorrer devido à falência energética inicial da hipóxia-isquemia que levaria a uma morte por necrose, porém com a recuperação energética a célula poderia iniciar um processo de apoptose (Liu *et al.*, 2004). Outros autores classificam essas células como necrose “secundária”, pois acreditam que as células necróticas podem induzir a morte por apoptose nas células vizinhas, o que explicaria o mecanismo de morte neuronal tardia (Sheldon *et al.*, 2001). A perda das conectividades e a diminuição de fatores tróficos explicariam, também, a morte neuronal tardia, principalmente em regiões distantes do foco isquêmico e teriam características apoptóticas e/ou a forma híbrida de apoptose-necrose (Northington *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Liu e colaboradores (2004) descreveram as células com características do tipo quimérico de morte neuronal

(“parapoptose”) encontradas em seu estudo: citoplasma e núcleo retraídos, organelas altamente vacuolizadas, embora algumas mitocôndrias ainda estivessem reconhecíveis no citoplasma e cromatina condensada em grumos irregulares. Esse “*continuum*” é característico na isquemia em neonatos, não sendo tão encontrado em adultos. Nakajima e colaboradores (2000) apontam que a excitotoxicidade glutamatérgica pode ser uma das grandes causas desse fenótipo de morte neuronal. Também demonstram em seu estudo a coexistência de apoptose e necrose, mostrando que uma não exclui a outra e que possivelmente há uma sinalização comum no microambiente extracelular para ativar esses dois tipos de morte celular.

Nakajima e colaboradores (2000) concordam com os demais autores descrevendo que no centro da lesão ocorre necrose, porém acreditam (de acordo com seus resultados) que também há apoptose na área isquêmica só que devido a sua meia-vida menor ela é subestimada. Como a apoptose segue por vários dias no córtex, estriado e região CA1 do hipocampo, ela pode servir como busca de estratégias neuroprotetoras devido a sua maior “janela terapêutica” quando comparada com a necrose (Nakajima *et al.*, 2000; Hossain, 2008).

Estratégias tanto farmacológicas quanto não farmacológicas têm sido propostas para reduzir os danos causados pela HI. No primeiro grupo encontra-se, dentre outros, o ácido ascórbico (Miura *et al.*, 2009) e no segundo grupo o enriquecimento ambiental (Pereira *et al.*, 2007).

## 1.5 Ácido Fólico

O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, recebendo essa nomenclatura quando em sua forma natural e denominado ácido fólico quando se tratar da forma sintética. Entre as suas funções, encontram-se: síntese de DNA, RNA transportador (tRNA) e aminoácidos (Féliz, 2002; Oliveira, 2008). Foi encontrado pela primeira vez em alimentos com fungos, sendo relacionado com a cura de anemia megaloblástica. É um nutriente essencial da dieta não sintetizado pelos humanos, por isso deve ser adquirido através da dieta com o consumo de, principalmente, vegetais de folhas verdes, frutas cítricas, carne de fígado e rim. O cozimento dos alimentos pode reduzir em até 30% a quantidade de folato encontrada, sendo termo-sensível e pouco resistente ao contato com luz e oxigênio (Féliz, 2002; Ferreira, 2005).

O forma natural é composta por um anel pteridínico, PABA (ácido para amino benzóico) e uma cauda com 1 a 6 moléculas de ácido glutâmico. Quanto maior for a quantidade de ácido glutâmico na cauda, menor é a disponibilidade do nutriente, pois tem que ser hidrolizado a monoglutamato para ser transportado (Féliz, 2002; Blom & Smulders, 2011) . A forma sintética é monoglutâmica, possuindo melhor absorção que o folato. Ao ser absorvido é reduzido a tetrahidrofolato (THF) que é o composto ativo encontrado no soro e nos tecidos (Féliz, 2002). Envolvido na biossíntese de DNA (guanina, adenina e timina), essencial na divisão celular e na metilação (metabolismo de um carbono), fornecendo grupos metil para metiltransferases celulares (Féliz, 2002). Também protege contra substâncias de ação teratogênica, ajuda a produção normal de hemácias e a maturação de magaloblastos em normoblastos (Ferreira, 2005).

A absorção do folato se dá, principalmente no primeiro terço do intestino delgado por processo ativo saturável, dependente de pH e sódio. Não há um grande reserva desse nutriente no organismo, sendo esta de 5 a 10mg, metade encontrada no fígado na forma de poliglutamato. A excreção, tanto das formas metabolicamente ativas quanto as inativas, se dá pelas vias urinárias e biliares (Ferreira, 2005). O transporte do folato através das membranas se dá por 3 diferentes sistemas: carregador de folato reduzido, endocitose por receptores de folato e exportação celular ativa (Hyland, 2010).

A deficiência de folato é fortemente relacionada com defeitos na formação do tubo neural, por isso a RDA (Recommended Dietary Allowances) determina a ingestão de 400µg/dia antes da gestação e até o 3º mês. O mecanismo de como o ácido fólico inibe os defeitos na formação do tubo neural ainda é desconhecido. A prevenção pode ser feita através da dieta, suplementação com polivitamínicos e fortificação de alimentos (Ferreira, 2005; Oliveira, 2008). Em 1998, o FDA (Food and Drug Administration) determinou o enriquecimento de cereais e todas as farinhas com 140µg de ácido fólico/ 100g de farinha de trigo. Somente em 2002, através da resolução RDC 344, que o governo brasileiro obrigou todos os fabricantes de farinha de trigo e milho a adicionarem ferro e ácido fólico numa concentração mínima de 150µg de ácido fólico por 100g de farinha. Os rótulos dos produtos devem conter a expressão: enriquecido, fortificado ou rico em ácido fólico (Ferreira, 2005).

A deficiência de folato também já foi correlacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e doença vascular cerebral e cardíaca (Barp, 2007), prevenção de

eventos isquêmicos (Assaneli *et al.*, 2004), doença de Alzheimer (Mattson & Shea, 2003) e danos oxidativos causados pela homocisteinemia (Matté *et al.*, 2007).

Até o momento, não há dados publicados relacionando os possíveis efeitos do tratamento com ácido fólico na hipóxia-isquemia neonatal. Em estudos preliminares do nosso grupo, observamos melhora na memória aversiva associada à reversão da inibição da enzima Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase no córtex e estriado de ratos submetidos à HI neonatal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo é averiguar os efeitos do tratamento com ácido fólico na caracterização da morte celular em animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Caracterizar e avaliar, por microscopia eletrônica, a presença ou não de apoptose e necrose nos neurônios da região CA1 do hipocampo, ipsilateral à oclusão arterial, de ratos, vinte e quatro horas após do procedimento de hipóxia-isquemia neonatal, comparando-os com os animais controles.

Verificar os possíveis efeitos do ácido fólico na morte celular desses animais.

### **3 TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **CARACTERIZAÇÃO DA MORTE NEURONAL APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO FÓLICO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL**

Bruna Ferrary Deniz, Jaqueline Vieira Carletti, Luisa Martinato, Maria Cristina  
Faccioni-Heuser, Lenir Orlandi Pereira

**Periódico: Journal of Anatomy**

## RESUMO

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) gera dano ao tecido nervoso com conseqüentes alterações cognitivas e motoras que podem perdurar durante toda a vida. O folato, um nutriente essencial obtido através da dieta, tem sido relacionado com a prevenção de eventos isquêmicos e danos oxidativos. O objetivo deste estudo é caracterizar a morte celular no Corno de Amon (região CA1) do hipocampo dorsal ipsilateral de ratos submetidos à HI neonatal e verificar possíveis efeitos do tratamento agudo com ácido fólico (AF). Ratas wistar fêmeas foram submetidas ao procedimento de HI no 7º dia pós-natal (DPN), o qual consiste na oclusão permanente da artéria carótida comum direita com posterior exposição a ambiente hipóxico por 90 minutos. Os animais foram divididos em 3 grupos (n=3/grupo): 1) controle tratado com solução salina 0,9% - veículo (CTV); 2) hipóxia-isquemia veículo (HIV); 3) HIAF. Uma dose intra peritonial de AF 0,011µM foi administrada 24 horas antes, imediatamente antes e 12 horas após a HI. Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos 24 horas após a HI e foi realizada a preparação histológica para análise em microscópio eletrônico. Nos animais HI tratados com salina foi verificada uma grande degeneração celular, em graus variados, com predominância de características de morte celular por necrose. Também foi verificada a existência de um “*continuum* apoptose-necrose”, ou seja, um mesmo neurônio apresentava tanto características apoptóticas quanto necróticas. Nos animais HI tratados com ácido fólico também foram encontradas células degeneradas em diversos níveis, porém foi visível a maior quantidade de células íntegras quando comparado com o grupo HIV. Com isso, é possível concluir que agudamente, após a HI neonatal, ocorre predomínio de necrose e que o tratamento com ácido fólico mostrou-se benéfico na diminuição da degeneração celular na região CA1 do hipocampo, ipsilateral à oclusão arterial.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia neonatal, ácido fólico, morte neuronal, apoptose, necrose, hipocampo, microscopia eletrônica.

## INTRODUÇÃO

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é o principal fator de risco de uma variedade de sérias desordens neurológicas em humanos como deficiências motoras e de aprendizado, paralisia cerebral, epilepsia, sendo também causa de morte (Hossain, 2008; Pereira *et al.*, 2008). De acordo com dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (2007), a incidência é de 4,05% de hipóxia intra-uterinas e asfixia ao nascer. Dos neonatos afetados, 15-20% irá morrer no período pós-natal e, em torno de 25% terá seqüelas graves e permanentes (Nakajima *et al.*, 2000).

Dois principais fatores contribuem para a HI neonatal: a perda da autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral, com separação/ruptura placentária e/ou estrangulamento umbilical e complicações durante o nascimento (Gill & Perez-Polo, 2008). É proposto que o dano ao tecido cerebral é causado por vários eventos patofisiológicos interligados como a falência energética, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, inflamação, ativação de caspases e estresse oxidativo (McLean &

Ferriero, 2004; Pereira *et al.*, 2008). Somando-se a isto, sabe-se ainda que o cérebro imaturo é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido as suas limitadas capacidades antioxidantes (Carloni *et al.*, 2007).

A apoptose ocorre em diversas situações, como na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes tóxicos (Grivicich *et al.*, 2007). Este tipo de morte celular é caracterizada por uma seqüência de eventos dependentes de energia regulada por meio da qual uma célula se autodestrói. Ocorre retração da célula, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo. A membrana celular forma bolhas (extrusões) e a célula se quebra em vesículas circundadas por membranas (corpos apoptóticos), contendo quantidades variadas de citoplasma, organelas e fragmentos de DNA. A fosfatidilserina, um lipídio da camada interna da membrana celular, é exposta na camada externa como um marcador da apoptose para que macrófagos e outras células fagocíticas reconheçam esse sinal e engolfem os corpos apoptóticos sem causar inflamação do tecido (Robbins, 2008; Marks, 2009).

O processo necrótico ocorre quando há uma perturbação abrupta do ambiente celular (Pagnussat, 2007) de forma passiva e caótica, não sendo específica nem dirigida. Envolve a perda da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e enzimas associadas (ex.: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) com rápido aumento dos níveis intracelulares de íons, como o Ca<sup>2+</sup> e o Na<sup>+</sup>, e água, dano mitocondrial e colapso energético que culminarão na desintegração celular (Pagnussat, 2007; Northington *et al.*, 2011).

Estudos utilizando Microscopia Eletrônica descrevem, normalmente células que apresentam tanto características necróticas quanto apoptóticas que foram classificadas com um “*continuum* apoptose-necrose” ou “parapoptose” (Sheldon *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Esse processo pode ocorrer devido a falência energética inicial da hipóxia-isquemia que levaria a uma morte por necrose, porém com a recuperação energética a célula poderia iniciar um processo de apoptose (Liu *et al.*, 2004).

O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, sendo considerado um nutriente essencial da dieta não sintetizado pelos humanos, por isso deve ser adquirido através da dieta com o consumo de, principalmente, vegetais de folhas verdes, frutas cítricas, carne de fígado e rim (Féliz, 2002; Ferreira, 2005). Entre as

suas funções, encontram-se: síntese de DNA, tRNA e aminoácidos (Féliz, 2002; Oliveira, 2008). A deficiência de folato é fortemente relacionada com defeitos na formação do tubo neural, por isso a RDA (Recommended Dietary Allowances) (Ferreira, 2005; Oliveira, 2008). A deficiência de folato também já foi correlacionada com o desenvolvimento de aterosclerose e doença vascular cerebral e cardíaca (Barp, 2007), prevenção de eventos isquêmicos (Assaneli *et al.*, 2004), doença de Alzheimer (Mattson & Shea, 2003) e danos oxidativos causados pela homocisteinemia (Matté *et al.*, 2007).

Até o momento, não há dados publicados relacionando os possíveis efeitos do tratamento com ácido fólico na hipóxia-isquemia neonatal. Por isso, o objetivo do estudo é averiguar os efeitos do tratamento com ácido fólico na caracterização da morte celular em animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, mantidas em ambiente climatizado ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) com ciclo claro / escuro de 12 horas e ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais com  $n=3$  por grupo: 1) Controle; 2) HI tratado com salina (HIV) e 3) HI tratado com ácido fólico (HIAF).

Para o cálculo de tamanho de amostra, tomou-se como base um estudo que envolveu análise por microscopia eletrônica do encéfalo de animais isquêmicos (Pagnussat *et al.*, 2007). Foram utilizados 3 animais por grupo, sendo que o cálculo foi realizado por meio da ferramenta:

<http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/amostra.html>.

Todos os procedimentos deste estudo estão de acordo com o Instituto Nacional de Saúde de Normas e Cuidados com os animais de Laboratório e foram aprovados no Comitê de Ética para uso de Animais da UFRGS (número 17401).

### **Hipóxia-Isquemia**

Foi utilizado o modelo experimental para ratos neonatos de Levine (1960), modificado por Rice e colaboradores (1981) que consiste na reprodução de um dano unilateral através da associação da oclusão permanente da carótida comum direita

com posterior exposição a uma atmosfera hipóxica. Aos sete dias de vida pós-natal (DPN), os animais foram anestesiados com halotano 2-4% para que fosse realizada uma incisão na linha média da face anterior da região cervical, permitindo que a carótida comum direita fosse identificada, isolada de estruturas adjacentes e ocluída. Após período de recuperação, os animais foram colocados em uma câmara (1500 ml) em banho-maria à 37°C, em grupos de cinco, para exposição à atmosfera hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio, com fluxo de 5l/min) durante 90 minutos. Os animais controles também foram submetidos à incisão cirúrgica, porém não houve oclusão da artéria carótida comum direita e tampouco exposição ao ambiente hipóxico.

### **Tratamento Agudo com Ácido Fólico**

A solução de ácido fólico utilizada foi dissolvida em soro fisiológico e preparada na concentração 0,011 $\mu$ M/g de peso corporal (10 $\mu$ l/g de peso corporal) com o pH ajustado para 7,4 com NaOH. A solução foi injetada por via intraperitoneal 24 horas antes, imediatamente antes e 12 horas após do procedimento de hipóxia-isquemia (LALONDE *et al.*, 1993 adaptado por MATTÉ *et al.*, 2007).

### **Microscopia Eletrônica**

Vinte e quatro horas após o procedimento de hipóxia-isquemia, os animais foram profundamente anestesiados com ketamina e xilazina e submetidos à perfusão transcardíaca através do ventrículo esquerdo com 50 ml de solução salina seguido por 75 ml de solução fixadora composta por 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato com pH 7,4. Os encéfalos foram removidos e imersos *overnight* na mesma solução fixadora.

Foram realizados cortes coronais (1000  $\mu$ m) pré-selecionando a área de interesse com a utilização de vibrátomo (Leica, Germany) que foram pós-fixados com a mesma solução fixadora por pelo menos 1 hora. Os cortes foram lavados em solução de fosfato e pós-fixados com 1% de tetróxido de ósmio (Sigma, USA) por 1 hora a temperatura ambiente. O material foi desidratado em gradientes ascendentes de álcool e óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences, USA), embebido em araldite (Durcupan ACM, Fluka, Switzerland) e mantido em vácuo por 24 horas. Posteriormente, o material foi colocado em lâminas de vidro com resina e polimerizado por 48 horas a 60°C. Após, foram retirados das lâminas e colocados

em blocos de resina e, novamente, polimerizados por 48 horas a 60°C. Os cortes semifinos (1 µm) foram obtidos através do ultramicrotomo (M T 6000-XL, RMC, Tucson, USA) e corados com azul de toluidina para a identificação dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo. A partir disso, os blocos foram trimados e foram realizados os cortes ultrafinos (100 nm) com o mesmo ultramicrotomo. Estes foram contrastados com uranila e chumbo e analisados com microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1200 EXII, Japan, CME-UFRGS).

## **RESULTADOS**

Através da microscopia eletrônica, foi possível observar a ultraestrutura dos corpos dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo dorsal, segundo Paxinos (2004), de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e tratados com ácido fólico.

### **Grupo Controle**

No grupo controle, os neurônios piramidais apresentaram características dentro da sua normalidade. O núcleo apresentava-se com forma circular ou oval (Fig. 1A) com a membrana nuclear com característica trilaminar bem definida e intacta. O núcleo apresentou-se eucromático com nucléolo facilmente identificado, principalmente, próximo à membrana nuclear interna (Fig. 1B). O citoplasma estava bem organizado com as organelas íntegras, sendo preenchido em boa parte pelos corpúsculos de Nissl, facilmente identificados até nos menores aumentos (Fig. 1B). Esses corpúsculos foram visualizados pela sua característica básica, que inclui a presença de túbulos e vesículas achatadas com ribossomos aderidos à sua membrana, conferindo-lhe aspecto granular, que se conectam com a membrana nuclear. Tal achado indica uma alta taxa metabólica da célula, especialmente a incorporação de aminoácidos e síntese de proteínas. As mitocôndrias eram características (Fig. 1C), apresentando suas cristas e a matriz eletrondensa aos elétrons, sendo que também sua quantidade varia de acordo com a atividade fisiológica da célula. Foi possível identificar ainda o complexo de Golgi formado por um conjunto de sacúolos achatados e empilhados regularmente com vesículas brotando de suas extremidades (Fig. 1C). Todas as células possuíam membrana plasmática íntegra, com o aspecto trilaminar típico (Fig. 1C).

### **Grupo Hipóxia-isquemia tratado com salina**

No hipocampo dos animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e tratados com salina, foram visualizadas diversas alterações nas células piramidais compatíveis com a degeneração, esperada para esse grupo. As células possuíam núcleos de formatos variados, alguns angulados e outros com reentrâncias (Fig. 3B). Foram encontradas células com a membrana nuclear descontínua (Fig. 2B) e em algumas ela encontrava-se totalmente desintegrada (Fig. 2C), permitindo o extravasamento do material genético sobre o conteúdo citoplasmático. Outros achados referentes à característica dos núcleos foram: membrana nuclear com dilatações ou com aspecto ondulado (Fig. 3C), núcleo heterocromático (Fig. 3B) ou com grandes espaços vazios (Fig. 2D) e a presença de vários grumos de cromatina visualizados próximos à membrana nuclear interna (Fig. 3B).

Quanto à organização do citoplasma, o RER dificilmente era identificado, podendo ser visualizado apenas fragmentos das vesículas nos maiores aumentos (Fig. 2A) e quando íntegro apresentava-se dilatado (Fig. 3D). Somando-se a esses achados, os ribossomos encontravam-se livres, dando um aspecto granular ao citoplasma (Fig. 2C). Em algumas células as mitocôndrias estavam aparentemente dilatadas com difícil identificação das cristas (Fig. 2D). Quando era possível visualizar o complexo de Golgi nas células, ele estava normalmente íntegro e algumas vezes apresentava-se dilatado (Fig. 3D). Considerando-se as características da membrana plasmática, esta se encontrava freqüentemente descontínua (Fig. 2B) e em alguns casos era dificilmente identificada (Fig. 3C). Conseqüente a isso, o citoplasma era, aparentemente, extravasado, perdendo sua estrutura típica. Em alguns casos, o núcleo era cercado por um vazio, sem que nenhuma organela pudesse ser identificada a sua volta, indicando um estágio avançado de degeneração (Fig. 3A). Muitos neuritos foram encontrados (Fig. 2B) e as células apresentaram diversos graus de vacuolização tanto no núcleo (Fig. 2A) quanto no citoplasma (Fig. 3A).

Apenas algumas células analisadas encontravam-se totalmente íntegras sem qualquer alteração, apresentando a estrutura e características típicas das células piramidais desta região (Fig. 3D).

### **Grupo hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico**

Os neurônios do hipocampo dos animais do grupo hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico apresentaram variadas alterações ultraestruturais, indicando degeneração, porém uma boa quantidade de células encontrava-se íntegra. As células apresentaram o núcleo no formato típico das células piramidais (Fig. 5D). Algumas apresentaram núcleo com algumas angulações e reentrâncias (Fig. 4<sup>a</sup>). A membrana nuclear encontrou-se intacta na maioria das células, porém dilatada e/ou ondulada em várias (Fig. 4C). Ainda assim, em poucas células ela apresentou-se rompida (Fig. 5B) ou mesmo dissolvida (Fig. 5C). A cromatina condensava-se em grumos próximos à membrana nuclear interna (Fig. 4A). Também foram visualizados muitos núcleos heterocromáticos (Fig. 5A) e outros com espaços vazios (Fig. 5B), porém a maioria encontrava-se no padrão do grupo controle (Fig. 5D).

No citoplasma, o corpúsculo de Nissl, quando presente, encontrava-se dilatado, mas com os ribossomos ainda aderidos as suas vesículas (Fig. 4D), porém em alguns neurônios o citoplasma estava desorganizado com muitos ribossomos livres (Fig. 4C). As mitocôndrias eram facilmente identificáveis, porém algumas se encontravam dilatadas com suas cristas dificilmente identificáveis (Fig. 4B). O complexo de Golgi não era freqüentemente visualizado, mas quando identificado, apresentava-se íntegro (Fig. 4D). A membrana plasmática estava intacta na maioria das células, mas em algumas aparecia rompida (Fig. 5B) e em outras, poucas, até mesmo dissolvida (Fig. 5C).

Foram identificados muitos neuritos (Fig 5 A). Houve vacuolização no citoplasma em algumas células (Fig. 5C). Boa parte dos neurônios analisados apresentaram sua ultraestrutura íntegra (Fig. 5D).

### **DISCUSSÃO**

Este estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos do tratamento agudo com ácido fólico sobre a morte neuronal na região CA1 do hipocampo de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Nossos resultados mostraram a presença de alterações ultraestruturais, em variados graus de degeneração, nas células piramidais dos animais dos grupos hipóxia-isquemia, tanto tratados com salina quanto tratados com ácido fólico.

No grupo controle foi possível observar as características típicas das células piramidais da região estudada, como já descrito por Bear e colaboradores (2008). O núcleo eucromático com formato circular a ovalado, o citoplasma bem organizado, composto, principalmente, pela substância de Nissl, as membranas nítidas e íntegras.

Observando-se o efeito da hipóxia-isquemia no hipocampo ipsilateral à oclusão arterial, os principais achados foram: algumas características encontradas típicas da morte por apoptose, como a condensação da cromatina e a formação de vacúolos, com a manutenção da integridade da membrana plasmática. No entanto, em maior proporção identificou-se a presença das características da morte celular por necrose: fragmentação das membranas celulares, permitindo o extravasamento dos conteúdos citoplasmático e nuclear, alterações nucleares como a picnose, alterações na estrutura das mitocôndrias (dilatações e perda da integridade das cristas), aumento dos ribossomos livres (aspecto granular do citoplasma) que se desprendem do RER por este sofrer alterações como dilatação e fragmentação, presença de vacúolos na célula.

Esta predominância de características necróticas pode ser explicada pelo fato de que, provavelmente no período de 24 horas após o insulto a necrose ainda seja mais favorecida pela falência energética que ocorre nas células. Ferrer e Planas (2003) demonstraram em seu trabalho que a necrose predomina sobre a morte celular programada após a isquemia permanente quando comparado com isquemia e reperfusão, o que também poderia explicar o nosso achado.

No grupo hipóxia-isquemia tratado com salina também foram identificados variados graus de degeneração entre as células de um mesmo animal, resultado que corrobora os achados de outros trabalhos, como o de Pagnussat e colaboradores (2007), que utilizaram o modelo de isquemia global transitória, e observaram uma heterogeneidade nos estágios de degeneração de células no mesmo animal e que essas características degenerativas aumentam com o tempo de reperfusão.

A heterogeneidade de alterações não foi apenas entre as células do mesmo animal, mas dentro de uma mesma célula. Diversos trabalhos já demonstraram a existência de um “*continuum*” entre apoptose e necrose após a hipóxia-isquemia neonatal (Nakajima *et al.*, 2000; Sheldon *et al.*, 2001; Northington *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Gill & Perez-Polo, 2008; Hossain *et al.*, 2008) que ocorre quando a célula

apresenta, simultaneamente, características de ambos os tipos de morte. Muito se tem discutido a respeito do que levaria a esse “novo” padrão de morte celular e acredita-se que isso se deve ao fato de no momento inicial do insulto hipóxico-isquêmico a célula inicie um processo de morte por necrose devido à falência energética instaurada. Acredita-se, porém, que após um determinado período de tempo a célula apresente uma certa recuperação, podendo iniciar o processo de morte celular programada, pois haveria energia para isso. Com isso, algumas células poderiam trocar seu padrão de morte celular e durante um período apresentar características de ambos os tipos (Sheldon *et al.*, 2001; Northington, 2001). Esse padrão de primeiro haver a preferência pela necrose e após ocorrer uma predominância de apoptose foi chamada de “necrose secundária” por Sheldon e colaboradores (2001) que acreditam que as células necróticas podem induzir a apoptose em outras células, o que poderia explicar a predominância de necrose no período de 24 horas em nossos resultados (Northington *et al.*, 2011).

A morte celular programada, porém, pode ser subestimada como acredita Nakajima e colaboradores (2000), pois em seu trabalho eles detectaram a caspase-3 ativa por um longo período de tempo no hemisfério ipsilateral à lesão, mostrando um padrão temporal e regional correspondente com a apoptose. Diversos outros estudos também abordam o fato de haver um dano progressivo no tecido nervoso dos animais afetados devido à apoptose que pode se estender por dias após a ocorrência do insulto (McLean & Ferriero, 2004; Hossain, 2008). Ainda, Nakajima e colaboradores (2000) sugeriram em seu estudo que o controle das vias apoptóticas pode ser uma importante ferramenta de neuroproteção da HI neonatal devido a sua maior “janela terapêutica”. A presença tardia da apoptose também pode explicar o nosso achado de predominância de necrose num período de, apenas, 24 horas após à hipóxia-isquemia neonatal.

A suscetibilidade do encéfalo do neonato ao evento hipóxico-isquêmico é justificada pelo maior dano oxidativo, pois possui uma maior concentração de lipídios polinsaturados (facilmente oxidáveis), ferro livre e defesas antioxidantes imaturas (McLean & Ferriero, 2004; Siegel, 2006; Gill & Perez-Polo, 2008). Em um estudo recente, Weis e colaboradores (2011) observaram as alterações bioquímicas que ocorrem logo após a HI neonatal e demonstraram que há diminuição na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e aumento nos níveis de produção de malondialdeído (MDA), que indicam lipoperoxidação, e oxidação de dihidroclorofluoresceína (DCFH), que

indica a produção de espécies reativas de oxigênio. Blomgren & Hagberg (2006) estudaram as diferenças entre as respostas de um encéfalo adulto e de um neonato após a HI e verificaram que os recém-nascidos apresentaram diminuição na atividade das principais enzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase e a catalase, além de um aumento bastante significativo na ativação de caspase, translocação do citocromo c com a formação do apoptossomo e translocação do AIF, indicando um maior dano causado pela apoptose nesses animais.

Essa grande degeneração celular apresentada nos animais do grupo hipóxia-isquemia neonatal pode justificar os diversos danos cognitivos já demonstrados em vários estudos. Arteni e colaboradores (2003) estudaram as diferenças cognitivas apresentadas entre animais adultos previamente submetidos à HI neonatal, porém um grupo com oclusão da carótida comum direita e outro com oclusão da carótida comum esquerda. Foi verificado dano na memória aversiva e de referência de ambos os grupos, porém apenas o grupo com dano no hemisfério direito apresentou déficit na memória de trabalho. Pereira e colaboradores (2007, 2008) verificaram em seu estudo déficits tanto na memória espacial quanto na de reconhecimento de animais adolescentes e adultos submetidos previamente à HI neonatal.

Neste estudo abordamos também o efeito do tratamento com ácido fólico sobre a morte celular na HI. Nas células piramidais dos animais do grupo hipóxia-isquemia tratado com ácido fólico também foram encontrados diversos níveis de degeneração, apresentando rompimento das membranas celulares e perda da integridade das organelas, porém é visível a presença de uma maior quantidade de células intactas comparando-se com os animais do grupo hipóxia-isquemia tratado com salina. O tratamento com ácido fólico já foi correlacionado com a prevenção de eventos isquêmicos (Assaneli *et al.*, 2004) e danos oxidativos causados pela homocisteinemia (Matté *et al.*, 2007). Ainda não é conhecido o mecanismo de ação do ácido fólico como antioxidante, mas Jia e colaboradores (2008) estudaram a suplementação com ácido fólico em um modelo de células expostas à alta concentração de glicose e verificaram uma diminuição da morte celular programada, dados esses que corroboram com os achados do presente estudo.

Em um estudo preliminar do nosso grupo (dados ainda não publicados) que analisou os efeitos do tratamento crônico com ácido fólico em parâmetros cognitivos e bioquímicos de animais submetidos à HI neonatal, foi possível verificar uma melhora na memória aversiva e a diminuição da inibição da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase

no córtex e estriado desses animais. Talvez esses dados possam também ser explicados pelos achados nesse presente estudo, pois uma diminuição do dano ao tecido cerebral, no caso hipocampo, causaria menos déficits cognitivos. A enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase é um elemento-chave na cascata molecular da HI neonatal, se é possível reverter sua inibição os demais danos que culminariam na morte celular poderiam também ser evitados e/ou prevenidos.

## CONCLUSÃO

Nossos achados apresentam um dano celular compatível com degeneração tanto por necrose quanto por apoptose conseqüente à HI. Ainda, o tratamento com ácido fólico parece resultar numa diminuição da degeneração neuronal. No entanto, considerando que nossos resultados ainda são preliminares, mais estudos são necessários para que possamos realmente afirmar que o tratamento com ácido fólico diminui a degeneração celular na região CA1 do hipocampo dorsal de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Considerando que a suplementação com ácido fólico já é utilizada no primeiro trimestre da gravidez pelas gestantes para prevenir más formações do tubo neural no feto, sua utilização contínua poderia prevenir um possível evento hipóxico-isquêmico ou, pelo menos, reduzir seus efeitos.

## AGRADECIMENTOS

O financiamento para esse trabalho foi feito pelas agências brasileiras de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul através da bolsa de iniciação científica BIC-UFRGS.

## LEGENDAS DAS IMAGENS

**Figura 1.** Imagens de neurônios da região CA1 do hipocampo de animais controle. A: Neurônios piramidais com núcleos eucromáticos: núcleo (N), membrana nuclear (MN) e retículo endoplasmático rugoso (RER). Barra = 5 $\mu\text{m}$ . B: Neurônio em maior aumento, permitindo a visualização do aspecto trilaminar da membrana nuclear (MN) e plasmática (MP), nucléolo (n) próximo a membrana nuclear interna, retículo endoplasmático rugoso com muitos ribossomos aderidos à sua membrana (RER),

mitocôndria e suas cristas (M). C: Detalhe dos limites precisos entre as células piramidais através da membrana plasmática (MP), núcleo (N), nucléolo (n), mitocôndrias (M), retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi (G). Scale bar: A: 5  $\mu\text{m}$ , B: 1  $\mu\text{m}$ , C: 1  $\mu\text{m}$

**Figura 2.** Imagens de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal tratados com salina. A: Neurônio piramidal com nucléolo excêntrico (n), núcleo (N) com a presença de vacúolos, membrana nuclear (MN) e plasmáticas (MP) aparentemente íntegras, fragmentos do retículo endoplasmático rugoso (RER) com poucos ribossomos aderidos, mitocôndrias íntegras (M). B: Detalhe do neurônio em A mostrando rompimento (setas) nas membranas nuclear (MN) e plasmática (MP), diminuição do conteúdo nuclear (N) e mitocôndrias íntegras. C: Detalhe de uma célula piramidal com sua membrana nuclear (MN) dissolvida (seta) e mistura do conteúdo nuclear com o citoplasmático (N), muitos ribossomos livres no citoplasma. D: Neurônio piramidal com a membrana nuclear (MN) rompida (seta), núcleo (N) com pouco conteúdo devido ao extravasamento, retículo endoplasmático rugoso dilatado (RER), mitocôndrias íntegras (M). Scale bar: A: 1  $\mu\text{m}$ , B: 1  $\mu\text{m}$ , C: 1  $\mu\text{m}$ , D: 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 3.** Imagens de neurônios piramidais de animais submetidos à hipóxia-isquemia e tratados com salina. A: Neurônio com núcleo heterocromático (N), membrana nuclear dilatada (MN), vacúolos citoplasmáticos (V), mitocôndrias íntegras (M), mas com poucas organelas e sem estrutura no citoplasma. B: Imagens de neurônios com formatos nucleares diversos (N), inclusive com reentrâncias e angulações, mitocôndria íntegra (M) e vacúolo citoplasmático (V). C: Núcleos heterocromáticos (N), membrana nuclear (MN) dilatada (seta). D: Célula piramidal íntegra, com membrana nuclear (MN) e plasmática (MP) bem delimitadas, núcleo eucromático (N) e retículo endoplasmático rugoso íntegro, porém um pouco dilatado (RER). Scale bar: A: 1  $\mu\text{m}$ , B: 2  $\mu\text{m}$ , C: 1  $\mu\text{m}$ , D: 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 4.** Imagens de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e tratados com ácido fólico. A: Neurônio com núcleo heterocromático (N), membrana nuclear dilatada (MN) e plasmática (MP) íntegras, retículo endoplasmático rugoso dilatado (RER) e mitocôndria íntegras (M). B: Neurônio com núcleo eucromático (N), membrana nuclear (MN) e plasmática (MP)

íntegras, retículo endoplasmático rugoso (RER) e algumas mitocôndrias dilatadas (M). C: Neurônio com núcleo eucromático (N), mas com grumos de cromatina próximos à membrana nuclear (MN), retículo endoplasmático rugoso bastante dilatado (RER), mitocôndria (M) e muitos ribossomos livres no citoplasma (R). D: Detalhe do neurônio em C, mostrando o retículo endoplasmático rugoso dilatado (RER), complexo de Golgi (G) e mitocôndrias (M). Scale bar: A: 2  $\mu\text{m}$ , B: 1  $\mu\text{m}$ , C: 1  $\mu\text{m}$ , D: 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 5.** Imagens de neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal e tratados com ácido fólico. A: Neurônio com núcleo heterocromático (N), membrana nuclear (MN) e plasmática (MP), porém com citoplasma bastante degenerado. B: Célula com núcleo eucromático (N) e nucléolo excêntrico (n), retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias (M), membrana nuclear (MN) e plasmática (MP) rompidas (setas). C: Neurônio com núcleo heterocromático (N), membrana nuclear (MN) rompida, ausência de membrana plasmática entre as células, mitocôndrias íntegras (M) e vacúolos citoplasmáticos (V). D: Imagens de neurônios com núcleos eucromáticos (N) com citoplasmas bem conservados. Scale bar: A: 2  $\mu\text{m}$ , B: 1  $\mu\text{m}$ , C: 1  $\mu\text{m}$ , D: 5  $\mu\text{m}$ .

## REFERÊNCIAS

- Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA (2003). Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973, 171-178.
- Assanelli D, Bonamone A, Pezzini A *et al.* (2004). Folic Acid and Vitamin E Supplementation Effects on Homocysteinemia, Endothelial Function and Plasma Antioxidant Capacity in Young Myocardial-Infarction Patients. *Pharm Res* 49, 79-84.
- Barp J (2007). Avaliação do Dano Oxidativo e Função Cardiovascular em Diferentes Modelos de Hiperhomocisteína: Papel Protetor do Folato e do Estrogênio. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2008). Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3ª ed.
- Blomgren K, Hagberg C (2006). Free radicals, mitochondria, and hypoxia – ischemia in the developing brain. *Free Rad Biol & Med* 40, 388 – 397
- Carlioni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini A (2007). Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J. Pienal Res.* 44, 157-167.

Colleen S, Marks A, Lieberman M (2009). Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach. Lippincott Williams & Wilkins, 3<sup>nd</sup> ed.

Féliz TM (2002). Metabolismo da Homocisteína e Defeitos do Tubo Neural: um Estudo Bioquímico e Molecular no Sul do Brasil. 2002. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas: Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ferreira AFS (2005). Consumo de farináceos fortificados e de alimentos ricos em folatos por mulheres em idade fértil de Porto Alegre, RS, Brasil. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Pediatria) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Ferrer I & Planas AM (2003). Signaling of Cell Death and Cell Survival Following Focal Cerebral Ischemia: Life and Death Struggle in the Penumbra. *J. of Neuropath and Experim Neurol* Vol. 62, No. 4, 329-339.

Gill MB, Perez-Polo JR (2008). Hypoxia Ischemia-Mediated Cell Death in Neonatal Rat Brain. *Neurochem Res* 33, 2379-2389.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007). Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras de Cancerol* 53(3), 335-343.

Hossain MA (2008). Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Brain: Involvement of a Novel Neuronal Molecule in Neuronal Cell Death and Potential Target for Neuroprotection. *Int J Dev Neurosci* 29, 93-101.

Jia D, Liu H, Wang F *et al.* (2008). Folic acid supplementation affects apoptosis and differentiation of embryonic neural stem cells exposed to high glucose. *Neurosci Letters* 4 (40), 27–31.

Lalonde R, Joyal CC, Botez MI (1993). Effects of folic acid and folinic acid on cognitive and motor behavior sin 20-month-old rats. *Pharmacol Biochem Beh* 44, 703-707.

Liu CL, Siesjo BK, Hu BR (2004). Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia–ischemia changes during brain development. *Neurosci* 127, 113–123.

Matté, C., Scherer, E.B.S, Stefanello, F.M., Barschak, A.G., Vargas, C.R., Netto, C.A., Wyse, A.T.S (2007). Concurrent folate treatment prevents Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *Int J of Develop Neurosci* 25, 545-552.

Mattson MP & Shea TB (2003). Folate and homocysteine metabolism in neuralplasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26 (3), 137-146.

Mclean C, Ferriero D (2004). Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the *Tern Infant*. *Semin. Perinatol* 28, 425-432.

Nakajima W, Ishida A, Lange MS *et al.* (2000). Apoptosis Has a Prolonged Role in the Neurodegeneration after Hypoxic Ischemia in the Newborn Rat. *The J Neurosci* 20(21), 7994-8004.

Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ (2001). Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol Dis* 8, 207–219.

Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ (2011). Neuronal Cell Death in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Ann Neurol* 69, 743–758.

Pagnussat AS, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M (2007). An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J. Anat.* 211, 589–599.

Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, Rocha AP, Achaval M, Netto CA (2007). Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxic-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87, 101-108.

Pereira LO, Strapasson ACP, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA (2008). Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1218, 257-266.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V (2006). Fundamentos de Robbins. Patologia Estrutural e Funcional. 2ª Ed.

Sheldon RA, Hal JJ, Noble LJ, Ferriero DM (2001). Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. *Neurosci Letters* 304, 165-168.

Siegel G, Alberts RW, Brady S, Price D (2006). Basic neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Ch. 32 p. 561. 7ª Ed.

Weis SN, Schunck RVA, Pettenuzzo LF *et al.* (2011). Early biochemical effects after unilateral hypoxia–ischemia in the immature rat brain *Int. J. Devl Neurosci* 29, 115–120.

IMAGENS

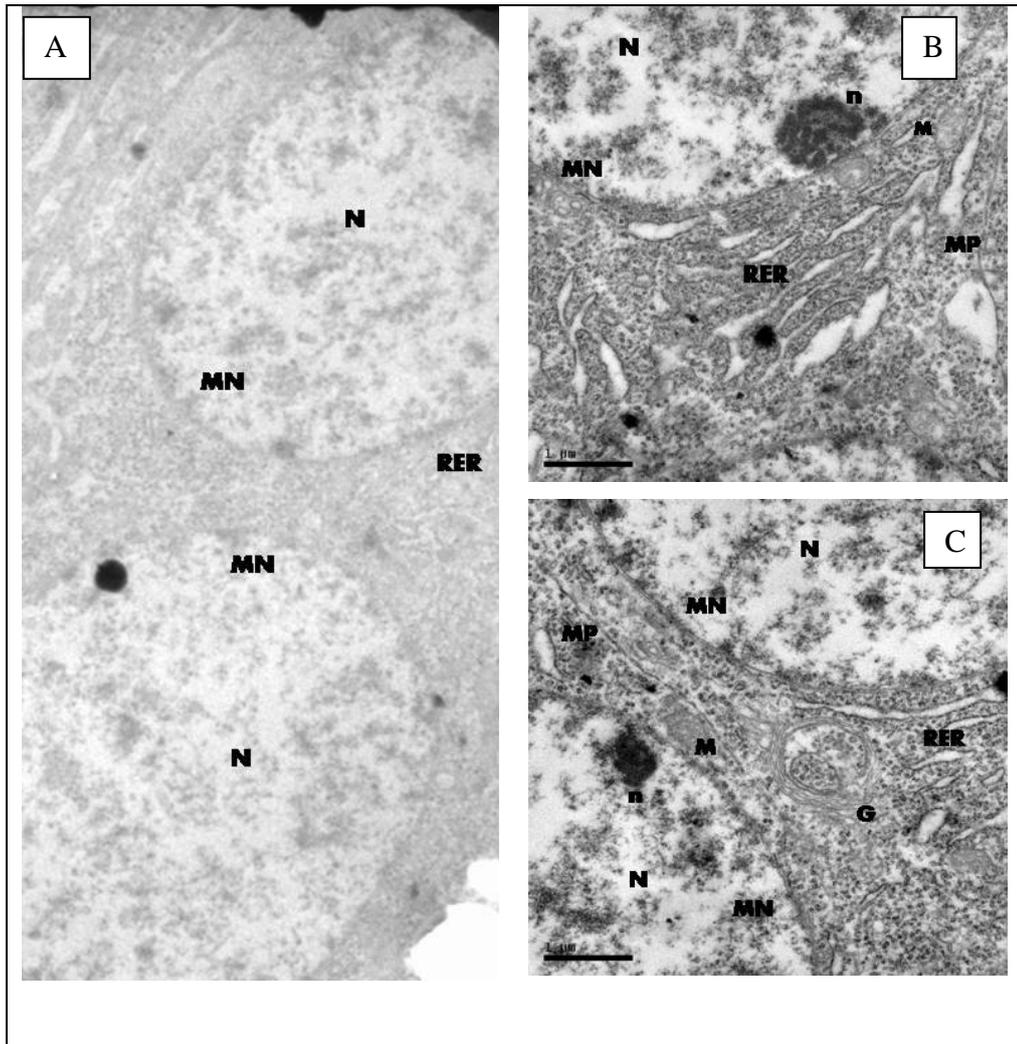


Figura 1. Grupo Controle

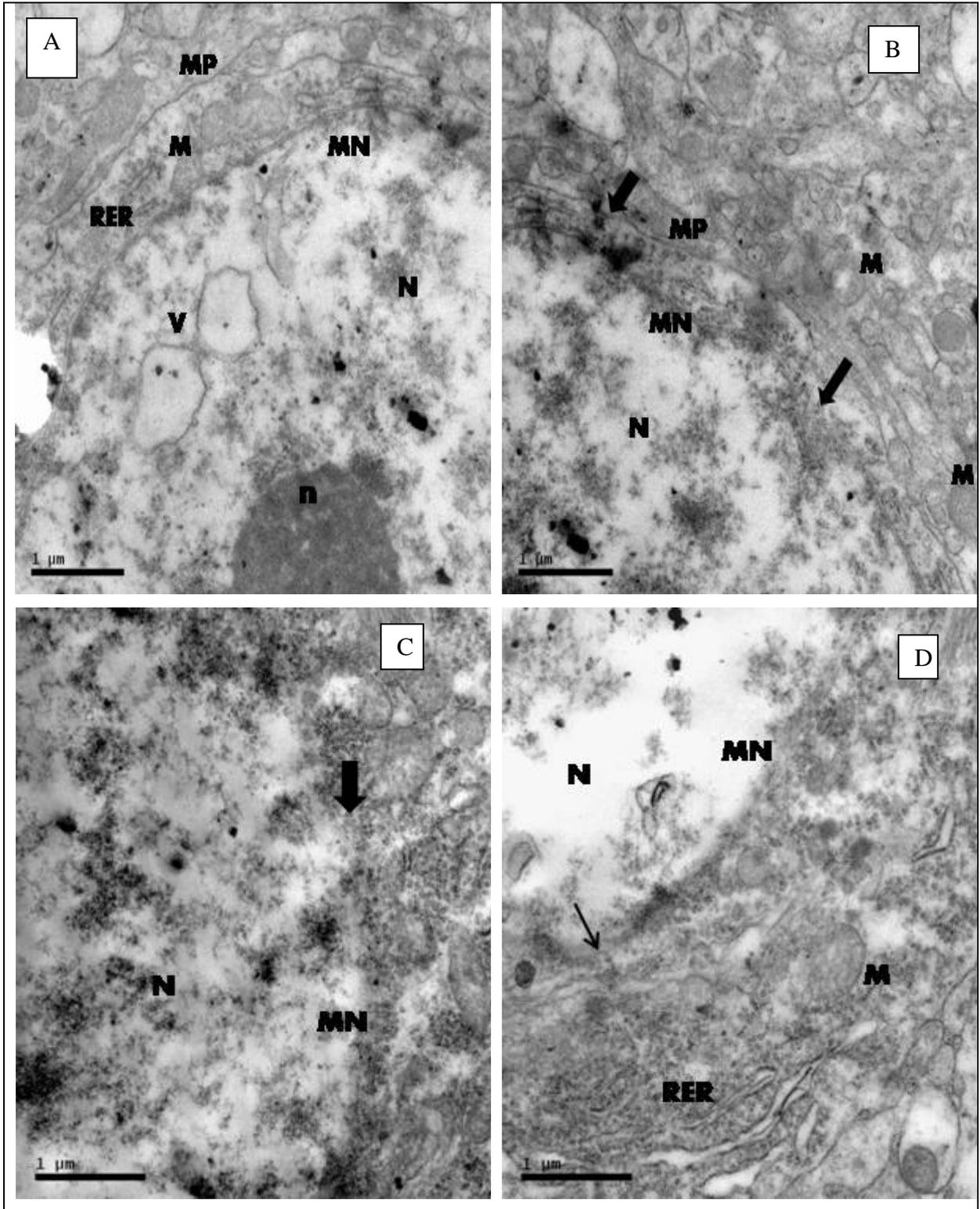


Figura 2. Grupo Hipóxia-Isquemia Tratado com Salina

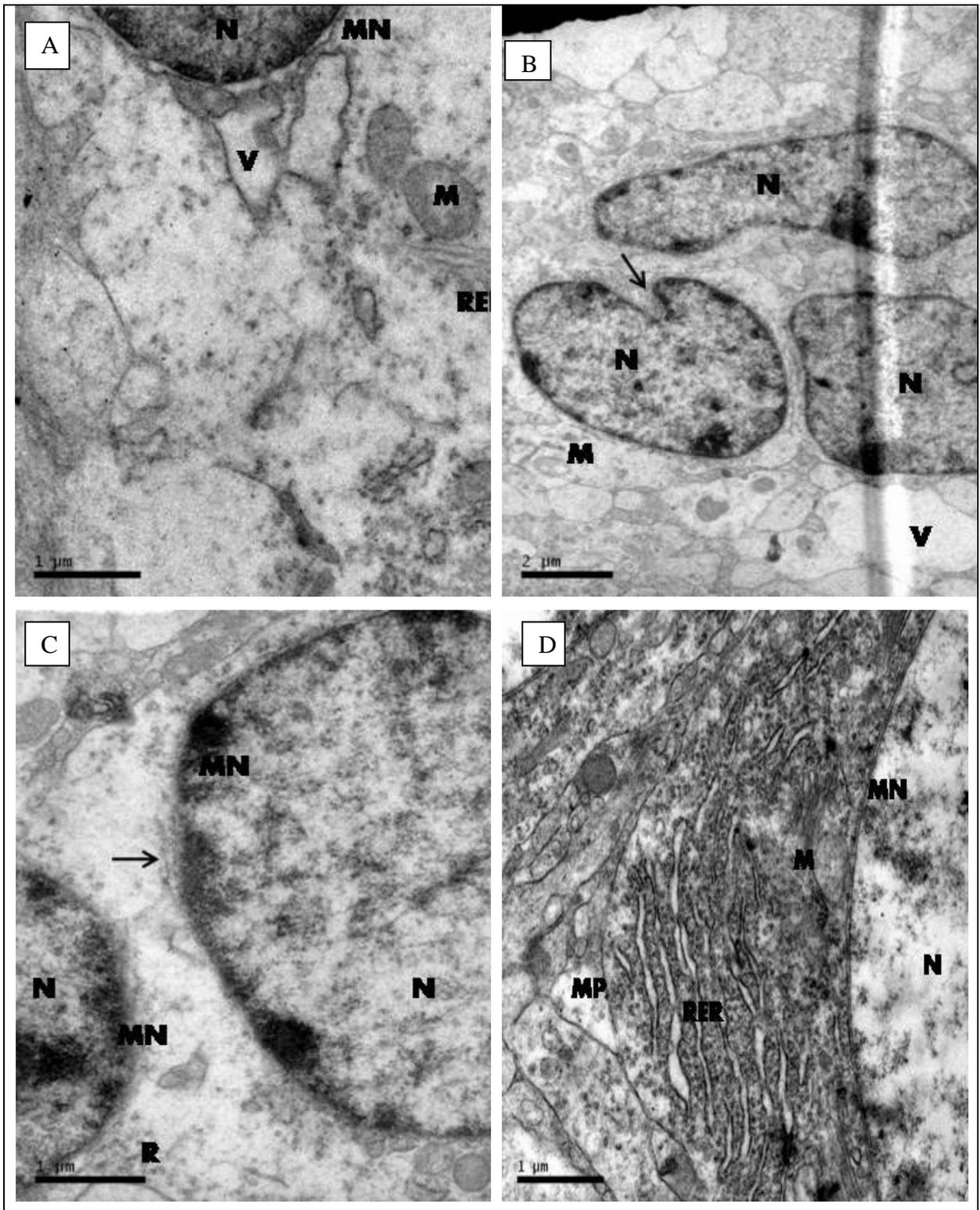


Figura 3. Grupo Hipóxia-Isquemia Tratado com Salina

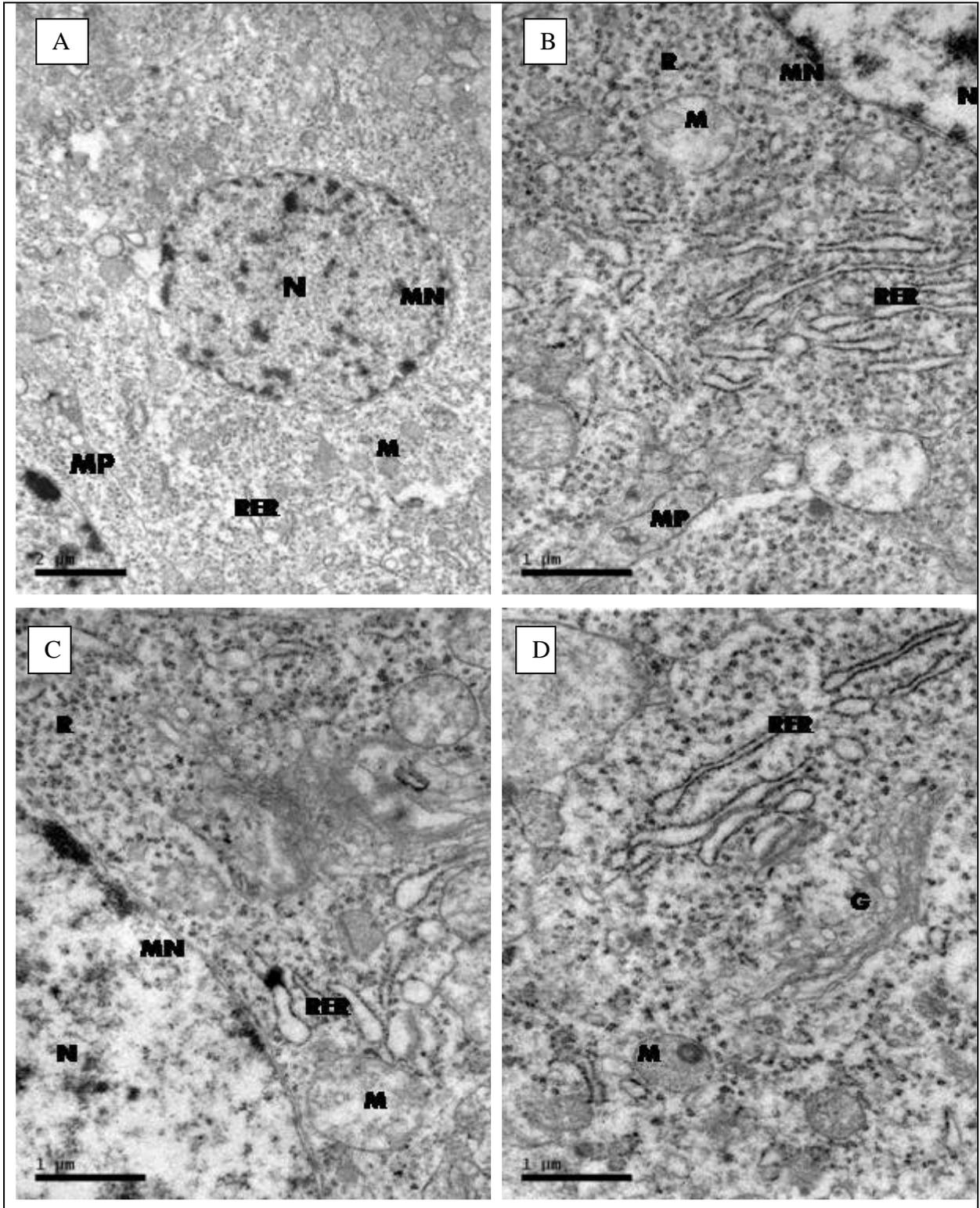
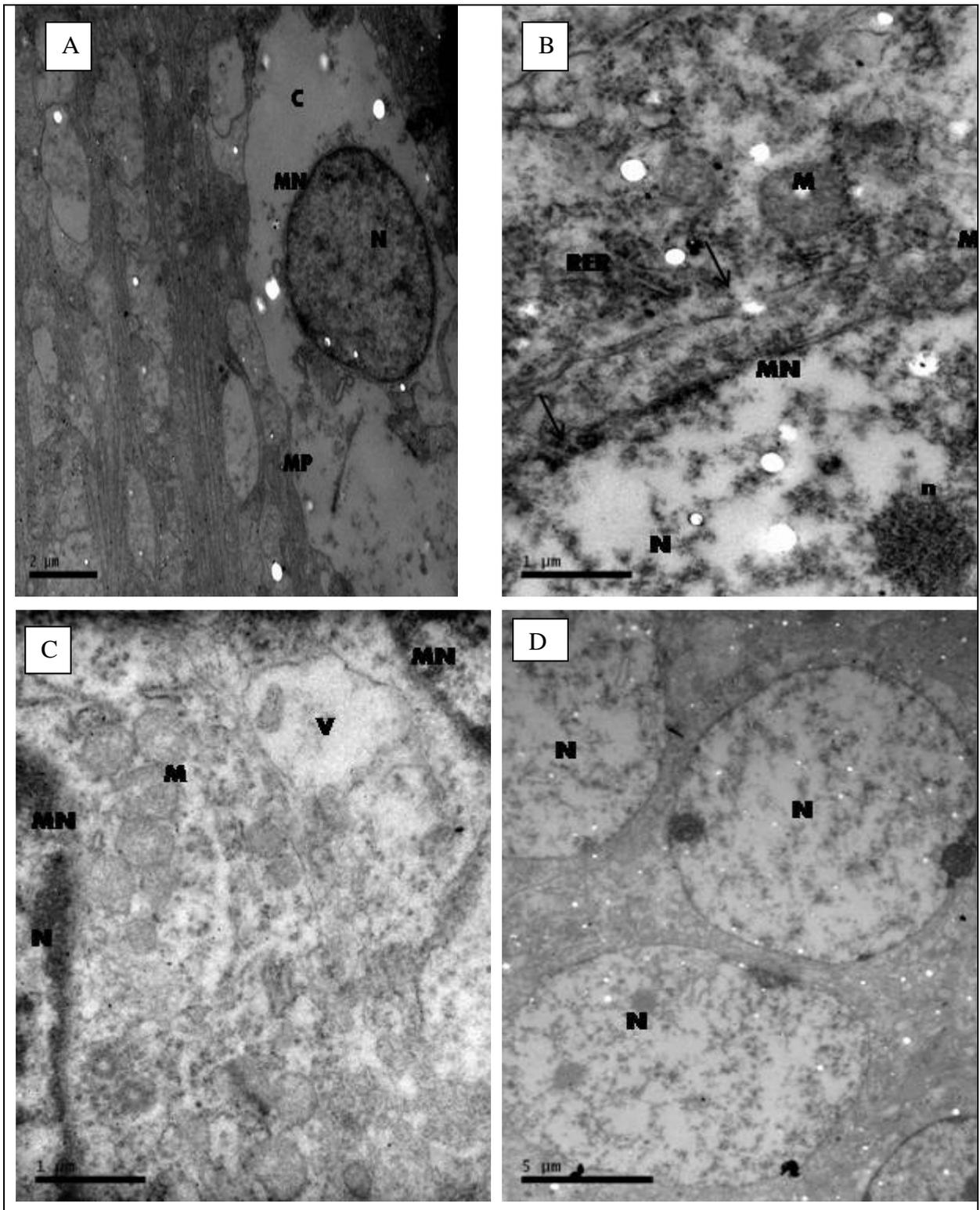


Figura 4. Grupo Hipóxia-Isquemia Tratado com Ácido Fólico



**Figura 5.** Grupo Hipóxia-Isquemia Tratado com Ácido Fólico

#### **4 CONCLUSÕES**

-Foi possível observar um predomínio de características necróticas vinte e quatro horas após o insulto hipóxia-isquemia no grupo hipóxia-isquemia tratado com salina tratado.

-Foram identificados alguns neurônios que apresentaram tanto características apoptóticas quanto necróticas no grupo hipóxia-isquemia tratado com salina

-Nos neurônios piramidais dos animais tratados com ácido fólico também foram observadas características de morte tanto por apoptose quanto por necrose, porém foi verificada uma maior quantidade de células íntegras que nos animais HI tratados com salina.

-Nossos resultados ainda são preliminares, mas indicam que o tratamento com ácido fólico pode sim influenciar na degeneração celular, em especial na região CA1 do hipocampo, de animais submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

## 5 **PERSPECTIVAS**

Por esse estudo ser preliminar e ainda não haver trabalhos relacionando o ácido fólico com a hipóxia-isquemia neonatal, ainda há muito que ser estudado, portanto as perspectivas desse trabalho são:

- Inicialmente, concluir esse estudo, aumentando o número de animais por grupo e também avaliar o hemisfério contralateral da lesão.

- Também seria importante repetir esse trabalho para outros tempos após a HI neonatal, para verificar uma possível mudança no padrão de morte celular e observar se o efeito do tratamento com ácido fólico permanece.

- Avaliar quais as caspases ativas em diferentes tempos.

- Realizar testes bioquímicos que pudessem verificar um possível efeito do ácido fólico como antioxidante também seriam importantes.

## REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Alvarez-Díaz A, Hilario E, Goñi de Cerio F, Valls-i-Soler A, Alvarez-Díaz FJ (2007). Hypoxic-Ischemic Injury in the Immature Brain – Key Vascular and Cellular Players. *Neonatology* 92, 227–235.

Blom HJ & Smulders Y (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis* 34, 75 –81.

Brandalize, APC (2009). Análise dos fatores genéticos e ambientais relacionados ao metabolismo do ácido fólico/ homocisteína como fatores de risco para a síndrome de down e suas malformações maiores. 2009. 145 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Das UN (2008). Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia and Alzheimer's disease—But how and why? *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids* 78, 11 – 19.

Ding B, Yuan L, Yu H *et al.* (2011). Genistein and Folic Acid Prevent Oxidative Injury Induced by  $\beta$ -Amyloid Peptide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108, 333 –340.

Distefano G & Praticò AD (2010). Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ital J Pediatr* 16, 36-63.

Elmore S (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35(4), 495–516.

Ginsberg MD, Busto R (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20, 1627-1642.

Gonzalez FF, Ferriero DM (2009). Neuroprotection in the Newborn Infant. *Clin Perinatol* 36(4), 859–880.

Greene NDE, Massa V, Copp AJ (2009). Understanding the Causes and Prevention of Neural Tube Defects: Insights from the Splotch Mouse Model. *Birth Defects Res A Clin Model Teratol* 85, 322–330.

Gulbins E, Dreschers S, Bock J (2003). Special Review Series – Biogenesis and Physiological Adaptation of Mitochondria Role of mitochondria in apoptosis. *ExpimPhysiol* 88.1, 85–90.

Hengartner, MO (2000). The Biochemistry of Apoptosis. *Nature* 407, 770-776.

Hyl K, Shoffner J, Heales SJ (2010). Cerebral folate deficiency. *J Inherit Metab Dis* 33, 563 – 570.

Ikonomid CS, Kain AM (2011). Neuronal Death and Oxidative Stress in the Developing Brain. *Antioxidants & redox signaling* 14 (8), 1535-1550.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Koury MJ (2004). New insights into erythropoiesis: The Roles of Folate, Vitamin B12, and Iron. *Annu Rev Nutr* 24, 105–131.

Lai M & Yang SN (2011). Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* Volume 2011, Article ID 609813, 6 pages.

Levine, S (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36, 1-17.

Lipton P (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol reviews* 79 (4), 1431-1568.

Manolescu BN, Oprea E, Farcasanu IC, Berteanu M, Cercasov C. (2010) Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: a review. *Acta Biochim Pol* 57 (4), 467–477.

Miura S, Ishida A, Nakajima W, Ohmura A, Kawamura M, Takada G (2006). Intraventricular ascorbic acid administration decreases hypoxic– ischemic brain injury in newborn rats. *Brain Res* 1095, 159 – 166.

Miura S, Ishida-Nakajima W, Ishida A *et al.* (2009). Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. *Brain Develop* 31, 307-317.

Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ (2001). Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol Dis* 8, 207–219.

Ogawa S, Kitao Y, Hori O (2007). Ischemia-Induced Neuronal Cell Death and Stress Response. *Antioxid Redox Signal* 9 (5), 573-587.

Oliveira, ALP (2008). Epidemiologia dos Defeitos de Fechamento do Tubo Neural no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Renolleau S, Fau S, Charriaut-Marlangue C (2008). Gender-Related Differences in Apoptotic Pathways After Neonatal Cerebral Ischemia. *Neuroscientist* 14, 46-52.

Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9, 131-141.

Wei L, Ying DJ, Cuia L, Langsdorf J, Yu SP (2004). Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res* 1022, 54 – 61.

Williams PJ, Bulmer JN, Innes BA, Pipkin FB (2011). Possible Roles for Folic Acid in the Regulation of Trophoblast Invasion and Placental Development in Normal Early Human Pregnancy. *Biol Reprod* 84, 1148–1153.

Yuan J, Lipinski M, Degtarev A (2003). Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death. *Neuron* 40, 401–413.

## Author Guidelines

Articles submitted to Journal of Anatomy are done so on the following conditions: that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### EXCLUSIVE LICENCE FORM

Authors are required to sign an exclusive licence form (ELF) granting the Anatomical Society of Great Britain and Ireland exclusive publishing rights for all papers accepted for publication. Signature of the ELF is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher unless a signed form has been received. Signature of the ELF does not affect ownership of copyright in the material. After publication authors retain the right to publish their paper in various medium/ circumstances (please refer to the form for more information). The ELF can be downloaded from the JAnat [online submission website](#) or [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JOA\\_ELF.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JOA_ELF.pdf).

Production will not start on your paper until we are in receipt of a signed exclusive licence form.

Government employees need to complete the AUTHOR WARRANTY sections, although copyright in such cases does not need to be assigned. For multi-author papers, it is the responsibility of the corresponding author to submit a signed ELF, on behalf of all contributors.

### ONLINEOPEN

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete both the online payment form AND the ELF form available from our website at:

<https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder> (Please note this online form is for OnlineOpen use ONLY)  
[http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JOA\\_ELF.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JOA_ELF.pdf) (ELF form; please send this to the Production Editor)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### SUBMISSIONS

#### *Pre-submission English-language editing*

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

#### *Manuscripts*

Manuscript submission online (please see <http://mc.manuscriptcentral.com/janat>) can be as Word document (.doc) or RTF (.rtf). If submitting to Manuscript Central using LaTeX please upload a PDF file of the manuscript for the reviewers. Note that upon acceptance we will require your TeX/LaTeX source files to edit and typeset the article. Figures for review should be uploaded separately as GIF (.gif), JPEG (.jpg), TIFF (.tif), or EPS (.eps). On acceptance, you will be required to provide HIGH RESOLUTION GRAPHICS FILES (note that GIF (.gif), JPEG (.jpg), and PNG (.png) files are not acceptable for publication). The Digital Expert tool can be used to check figures before submission and identify any problems which could cause delays. Please use the following link for the Digital Expert tool <http://dx.sheridan.com/about/main.html>

Full upload instructions and support are available online from the submission site via the Get Help Now button. Please submit your covering letter or comments to the Editor in Chief when prompted online.

#### *Revisions*

Revised manuscripts must be submitted in their final form, within 2 months of authors being notified of conditional acceptance (pending satisfactory revision). Resubmissions after this time will be considered as new.

### PRESENTATION

#### *Text*

Text should be divided into the following sections and appear in the order:

- (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations);
- (2) summary;
- (3) keywords;
- (4) introduction;
- (5) main body;
- (6) concluding remarks;
- (7) acknowledgements;

- (8) references;
- (9) supplementary material;
- (10) tables; and
- (11) figure legends.

Authorities for the latin binomial of every organism are not used in the title or summary, and only on the first mention in the main body of the text.

Gene names and loci should be italic, proteins should be roman.

Virus nomenclature (and acronyms) should follow the guidelines of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV). The current report is: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL (Eds) (2001) *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy Viruses*. San Diego: Academic Press. Authors are also advised to check the ICTV website for the latest information.

Chemical nomenclature should follow the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) definitive rules for nomenclature.

Industrial products should be referred to by their common names (ISO Publications 1831, 2474, etc.). In the absence of a common name, use the full name or a defined abbreviation, in preference to a trade name. At first mention, trade names should be capitalised.

Statistics: Calculations and the validity of deductions made from them should be checked and validated by a statistician.

Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units, as given in: Baron DN (Ed) (1994) *Units and Abbreviations: a guide for medical authors and editors*. London: Royal Society of Medicine Press. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. Apply to the Editorial Office for advice.

#### *Author Contributions*

*Journal of Anatomy* recommends that authors submit a short description of all contributions to their manuscript. Each author's contribution should be described in brief, to appear immediately before the references. Authorship credit might include contributions to concept/design, acquisition of data, data analysis/interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript and approval of the article. Contributors who do not qualify as authors can also be listed and their particular contribution described. Further information on authorship and contributorship may be found [here](#).

#### *References*

References in the text should be inserted in parentheses in full for single and dual authored papers, but using the first author and *et al.* for multiple authored papers. Reference to personal communications, unedited and un-refereed work, and work that is unpublished should be minimal and should appear in the text only. It is the author's responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication.

References in the list should follow the Harvard system. Over 6 authors will be abbreviated to 3 authors *et al.* Refer to a recent copy of the journal for examples.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for [here](#).

Reference Manager reference styles can be searched for [here](#).

#### *Supplementary Material*

Quantitative biological data too extensive for inclusion in the print edition of the journal may be presented in the online edition, as supplementary material (supp. mat.). As such, it will be reviewed as an integral part of the paper. The availability of supp. mat. should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the references, providing titles of figures, tables, etc. There are guidelines regarding supplementary material [here](#).

#### *Graphics*

Numerical results should be presented either as tables or figures, but not both. The journal welcomes colour figures and plates, when information would be lost if reproduced in black and white.

Tables: Tables should be typed on separate pages, as an integral part of the text file. They should have a brief descriptive title and be self-explanatory. Units should appear in parentheses in the column headings, not in the body of the table. Repeated words or numerals on successive lines should be written in full. Footnotes should be minimal. When the precision of data is expressed as standard error (se) or standard errors of differences (sed) the degrees of freedom (df) should be given.

Electronic artwork: *JAnat* only accepts submission of electronic artwork. The journal accepts the following formats only:

- (1) GRAPHS, CHARTS and MAPS as Encapsulated Postscript Format (.eps).

The best results are obtained with software applications that can output EPS format (Systat SigmaPlot; Adobe Illustrator; CorelDraw; Deneba Canvas; Macromedia Freehand); and

- (2) PHOTOGRAPHS in Tagged Image File Format (.tif).

TIFF files should be supplied at a minimum resolution of 300 dpi (dots per inch) at the final size at which they are to appear in the journal. TIFF and EPS formats are the industry standard for archiving and print and online publication. Detailed information on digital illustration standards is available at [this webpage](#). The Digital Expert tool can also be used to check figures before submission: <http://dx.sheridan.com/about/main.html>

Please note that file formats other than EPS and TIF will be automatically rejected by the online submission website. Colour files should be in CMYK format. Labelling should be in 10pt sans serif style font. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification bars should be given on electron and light micrographs.

Original artwork: If you are unable to submit electronic artwork, please provide two sets of all figures as high-quality glossy prints at the size that they are to appear in print. One set should be unlabelled.

Legends: Table and figure legends should be included within the text file and contain sufficient information to be

understood without reference to the text. Each should begin with a short title for the figure. All symbols and abbreviations should be explained within the legend.

Cover images: Electronic artwork of high quality suitable for the cover of JAnat are welcomed. They should be sent to the Editorial Office and be accompanied by a relevant caption. It is preferred that images should be related to submitted papers. Contributors are required to grant exclusive publishing rights to the Society. It is the Publisher's policy not to publish items without signed exclusive licence forms.

#### **PLAGIARISM**

Authors must obtain permission to reproduce any copyright material, and include an acknowledgement of the source in their Article. Authors should be aware that the unreferenced use of the published and unpublished ideas, writing or illustrations of others, from whatever source (including research grant applications), or submission of a complete paper under 'new' authorship in the same or a different language, constitutes plagiarism.

#### **CONDITIONS OF ACCEPTANCE**

Manuscripts are accepted on the understanding that they will not be published elsewhere in any form, without the prior consent of the Society. Your material will not be passed to the Publisher without receipt of:

1. covering letter documenting any revisions required by the editor;
2. signed exclusive licence form;
3. completed accepted artwork checklist - documenting the graphic files supplied in accordance with industry standards; and
4. EPS files output from vector based software/ 800dpi TIFF files. **LOW RESOLUTION ARTWORK SUBMITTED FOR REVIEW IS NOT SUITABLE FOR PRINT OR ONLINE PUBLICATION.**

#### **ARTICLE TRACKING**

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's [Author Services](#). Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit Blackwell's Author Services for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

#### **PROOFS**

Email notification that your work is in proof and ready for collection will be sent from the JAnat e-proofing website. Further instructions will be sent with the upload notification email. Acrobat Reader is required in order to read this file. This can be downloaded (free of charge) from [Adobe](#).

In your absence, please arrange for a colleague to correct on your behalf. Major alterations will be charged to the author and delay publication.

#### **OFFPRINTS**

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: [http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE\\_ID=bw&FID=USER\\_HOME\\_PG](http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG)

If you have queries about paper offprints please email [offprint@cosprinters.com](mailto:offprint@cosprinters.com)

#### **AUTHOR MATERIAL ARCHIVE POLICY**

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.