

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

***l*-DEPRENIL PREVINE ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA
CEREBRAL TRANSITÓRIA.**

FLÁVIO DAMASCENO MAIA

Fortaleza – Ce

2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

***l*-DEPRENIL PREVINE ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA
CEREBRAL TRANSITÓRIA.**

FLÁVIO DAMASCENO MAIA

*Dissertação submetida à Coordenação
do Curso de Pós Graduação em
Farmacologia do Departamento de
Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.*

Orientador(a):

Profa. Dra. Glauce Socorro de B.Viana

Fortaleza – Ce

2004

L 548a Leitão, Flávio Damasceno

l-Deprenil previne alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pela isquemia cerebral transitória. / Flávio Damasceno Maia – Fortaleza, 2004.
194 f.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. *l*-Deprenil 2. alterações neuroquímicas 3. Isquemia cerebral I. Título.

CDD 615.329

**l-DEPRENIL PREVINE ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA
CEREBRAL TRANSITÓRIA.**

FLÁVIO DAMASCENO MAIA

**Dissertação submetida á Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Farmacologia.**

Dissertação aprovada em: 05 / 02 / 2004

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^ª Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará

Prof^º Dr. Otoni Cardoso do Valle
Universidade Federal do Ceará

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à paciência e sabedoria que Deus me deu, aos meus pais, parte de suma importância em tudo na minha vida, minha orientadora, minha co-orientadora, meus irmãos, minha família e meus amigos.

Agradecimentos

A **Deus**, por se fazer sempre muito presente, dando-me forças para enfrentar todos os momentos dessa caminhada e iluminado-me nos momentos obscuros da vida.

Aos Meus pais, Francisco Humberto Maia e Maria Cyrie Damasceno Maia, por terem me dado a vida, não tão somente ela, mas tudo de bom que aprendi foi por seus ensinamentos, conselhos e amor; e com ela pude chegar até onde estou hoje, sempre com muito carinho, dedicação e atenção.

À minha irmã querida, Flavianne Damasceno Maia, por ser além de irmã, uma grande amiga, e nos momentos que mais precisei estava sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, Fabiano e Fred Damasceno Maia, pelo incentivo de amigos e por tudo que fizeram durante minha vida.

À toda minha família, por sempre estarem participando das minhas conquistas, sempre presentes em tudo que conquistava, mesmo nos momentos de dificuldades tive o apoio de todos.

À minha grande amiga Ana Paula de Azevedo Leitão Carneiro Leão, por além de uma amizade que conquistamos com sinceridade e carinho, transpomos todos esses anos juntos lutando pelos nossos sonhos, sonhos estes que hoje me faz acreditar que além de uma amiga tenho uma irmã, e além de tudo foi ela a grande responsável pelo meu ingresso neste mestrado, seus incentivos e principalmente, por sua vontade me levou ao laboratório da Dra. Geanne Matos, no qual teve início tudo hoje conquistado; e não poderia de esquecer também de um grande amigo, **Carmelo**, seu esposo e seus filhos.

À minha incontestável, inestimável, amiga, mãe e querida Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha, a qual acolheu-me em seu laboratório com todo carinho e amizade, na certeza que na vida não se vive somente de sonhos, mas que dos sonhos podemos viver uma bela vida, e além do mais que no mundo existem pessoas, como ela, que nos dão a mão e o apoio quando mostramos ser um bom sonhador. Além de apoiar-me na construção do saber científico, através de seus ensinamentos, pois além de uma professora dedicada e atenciosa mostrou-me que ser inteligente correta e digna, faz parte de sua vida. Faço uma homenagem especial a esta grande mulher, que mesmo longe contribui muito pela conclusão deste trabalho.

À minha amável e mentora Orientadora Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, pelos ensinamentos do dia-a-dia, pela oportunidade que sempre depositou em mim, pelos momentos de dificuldade por que passei para adentrar neste mestrado, quero sempre ser grato por sua existência no mundo científico, pois precisamos além do saber, a forma de encontrá-lo;

Ao grande amigo sábio Prof Vietla Satyanaraiana Rao, por estar sempre presente em nosso laboratório ajudando e incentivando nossos experimentos, mostrando que nos caminhos tortuosos sempre existe uma saída sábia, compartilhando de toda sua sabedoria e inteligência conosco, além de sua grandiosa humildade que faz com que tenhamos um enorme carinho pelo seu trabalho científico;

À Profa. Dra Geanne Matos de Andrade Cunha, Prof Dra. Flávia Santos de Almeida, por prontamente participarem da minha banca de Exame de Qualificação.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, por terem transmitido com muita dignidade seus conhecimentos, os quais adquiriram com muito esforço e dedicação;

Aos Amigos da Neurofarmacologia, meu agradecimento a todos vocês por terem colaborado na minha pesquisa científica, fazendo do trabalho diário um ambiente mais ameno e alegre. Em especial a duas grandes amigas do laboratório de Neurofarmacologia, **Vilani e Jaqueline**, por toda sua paciência e amizade, não somente comigo, mas com todos que ali trabalham, pois além de tudo merece o mérito de minha dissertação.

Aos Colegas da Pós-Graduação, por termos juntos vencidos tantas disciplinas, apresentações de artigos relatórios e provas com um saldo maravilhoso, que um ambiente solidário de paz e amizade é necessário para que cresçamos juntos em tudo;

Ao meu grande amigo Rivelilson Mendes de Freitas, por ajudar-me durante todo este mestrado, sempre com sua sabedoria e honestidade que carrega, e por mostrar que é no trabalho que encontramos a sabedoria, e que não basta ser amigo, tem que participar;

Ao meu amigo Hélio Vitoriano, por sua ajuda em experimentos que nos levaram a alguns trabalhos em congressos e publicações;

A minha colega de mestrado e laboratório Rita Izabel, pela sua sabedoria e paciência com todos nós, mesmo com um pouco de ciúme consegui dividir um pouco da minha orientadora,

Aos Bolsistas do Laboratório de Neuroendócrino, Beatriz Stela, David Théophilo, Gabriela de Bruim, Ricardo, Caroline Chau, Emídio dentre outros, pela ajuda em todo desenvolvimento dos experimentos, e pelo apoio amigo;

Às minhas grandes amigas Adriana, Karina, Regilane, Flávia, do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais que sempre me ajudaram em o que

precisava, e pelo apoio amigo, além dos momentos de descontração por qual passamos juntos;

As Secretárias do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Sílvia, Aura, Marta, Joana e Rejane que sempre estiveram dispostas a nos ajudar no que fosse preciso. Em especial a **Sílvia**, pois mesmo com seu jeitão abusada aos poucos soube conquistar minha admiração e carinho. E também a **Rose**, que sempre organizada soube guia-me quando precisava de algo.

Ao Profº Dr. Otoni Cardoso do Valle por aceitar a participar da minha banca examinadora, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual

A Capes/CNPq e Funcap, por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

POEMA

“Nossas vidas só começam de fato quando percebemos que não adianta querer ser o maior e o melhor entre os homens, mas sim quando conseguirmos enxergar nas pequenas coisas que observamos, nos pequenos detalhes, as grandes verdades do universo e o fruto do amanhã, que contém a semente da sabedoria”.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	23
I – INTRODUÇÃO.....	02
1. Acidente Vascular Cerebral.....	02
1.1. Terapias de Reparo.....	05
1.2. Definição e Classificação.....	07
1.3. Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral <i>in vivo</i>	07
2. Memória.....	13
2.1. Definição.....	13
2.2. Classificação.....	13
2.3. Papel do Sistema Límbico na Memória.....	19
2.4. A bioquímica da formação da memória e sua regulação por hormônios e neuromoduladores.....	20
3. Isquemia e Reperfusão Cerebral.....	28
3.1. Generalidades.....	28
3.2. Isquemia cerebral: Conceito de núcleo e penumbra.....	28
3.3. Mecanismos de dano neuronal induzidos por isquemia e reperfusão.....	30
3.3.1. Depleção de oxigênio e ATP.....	30
3.3.2. Mudança iônica.....	31
3.3.3. Glutamato e Cálcio.....	31
3.3.4. Espécies reativas de oxigênio, lipólise e peroxidação lipídica.....	31
3.3.5. Sistemas antioxidantes.....	42
3.3.6. Inibição da síntese protéica e apoptose.....	52
3.3.7. Apoptose e Isquemia Cerebral.....	54
3.3.8. Atividade da Família Caspase.....	58

3.3.9. Mecanismos de neuroproteção durante a isquemia cerebral.....	58
4. L-deprenil (Selegilina).....	60
4.1. Generalidades.....	61
4.2. Inibidores da monoamino oxidase (MAO)	61
4.3. Atividade anti-MAO-B.....	64
4.4. Inibição da recaptação de catecolaminas.....	65
4.5. QUÍMICA.....	66
4.6. TOXICOLOGIA.....	66
4.6.1 Toxicidade aguda.....	66
4.7. Farmacologia.....	68
4.7.1. Farmacocinética.....	68
4.7.2. Farmacocinética no paciente idoso.....	68
4.8. Farmacodinâmica.....	68
II – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	70
III – OBJETIVOS.....	73
Geral.....	73
Específicos.....	73
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
1. Animais.....	75
2. Drogas utilizadas no tratamento.....	75
3. Isquemia Cerebral Transitória por Oclusão Bilateral das Carótidas.....	76
4. Protocolo Experimental.....	78
5. Quantificação do Dano Isquêmico através da Coloração pelo TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride).....	79
6. Testes Comportamentais.....	80
6.1. Teste de Atividade Locomotora (Open Field - Campo Aberto).....	80
6.2. Testes de Memória.....	81
6.2.1. Esquiva Passiva (<i>Passiva Avoidance test</i>).....	81
6.2.2. Labirinto em T elevado (T Maze).....	83
6.2.3. Labirinto Aquático de Morris (<i>Water Maze</i>).....	85

7. Dosagem de Nitrito/Nitrato.....	87
7.1. Princípio.....	87
7.2. Reagentes Utilizados.....	87
7.3. Reagente para uso (Reativo de Griess).....	87
7.4. Curva Padrão.....	87
7.5. Protocolo.....	88
8. Avaliação da Peroxidação Lipídica (Dosagem do malonilaldeído – MDA).....	89
8.1. Princípio.....	89
8.2. Protocolo.....	89
9. Determinação da Atividade da Catalase.....	90
10. Determinação da atividade da Protease Caspase-3.....	91
11. Análise Estatística.....	92
IV RESULTADOS.....	94
1. Parâmetros Fisiológicos.....	94
2. Área Total do Infarto Cerebral (Isquemia).....	95
3. Testes Comportamentais.....	97
3.1. - Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória na Teste da Atividade Locomotora (Campo Aberto).....	97
3.2. - Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) no teste do Labirinto em T elevado (T-Maze).....	99
3.3. - Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) no Teste da Esquiva Passiva (Passive Avoidance).....	102
3.4. Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) no Teste do labirinto Aquático de Morris (Water Maze).....	105
4. Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil nos níveis de Malondialdeído (MDA) no hipocampo e córtex temporal em ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT)	107
5. Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil nos níveis de Nitrito (NTT) no	

hipocampo e córtex temporal em ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).....	109
6. Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil na atividade da Catalase (CAT) em hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).....	111
7. Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil na atividade da Protease Caspase-3 em hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).....	113
V – DISCUSSÃO.....	116
VI – CONCLUSÕES.....	132
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
AA	ácido aracdônico
ADP	Adenosina difosfato
AGL	ácidos graxos livres
AMI	Amígdala
AMPA	Propionato de α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
AMPA	Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasole-propiónico
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
AP5	(D-)2-amino-7-fosfopentanoato
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
cm	Centímetros
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
CREB	c-AMP-responsive element binding protein
DA	Doença de Alzheimer
DEP	<i>l</i>-Deprenil
DP	Doença de Parkinson
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FO	Falso-operado
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
GABA	Ácido gama aminobutírico
h	Hora
HIP	Hipocampo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Precisão
i.p.	Intraperitoneal

ICT	Isquemia Cerebral Transitória
iNOS	óxido nítrico sintase indutível
Kg	Kilograma
KW	Kruskall-Wallis
LTP	Long-term potentiation
M	Molar
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
MDA	Malonil dialdeído ou malondialdeído
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MW	Mann-Whitney
Need	N-1-naftiletilenodiamina
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomoles
nNOS	Óxido nítrico sintetase isoforma neuronal
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de ativação plaquetária
PET	Tomografia com Emissão de Pósitrons
RLs	Radicais livres
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCI	Transient Cerebral ischemia
TNF	Fator de necrose tumoral
TTC	2,3,5- Triphenyltetrazolium Chloride
v.o.	Via oral
XD	xantina desidrogenase
XO	xantina oxidase

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
1 Esquema mostrando as artérias vertebrais e as artérias carótidas internas, que se comunicam através do polígono de Willis.....	04
2 Sistemas de memória.....	15
3 Representação do Sistema Límbico. É um grupo de estruturas que inclui hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, os corpos mamilares e o giro do cíngulo. Todas estas áreas são muito importantes para a emoção e reações emocionais. O hipocampo também é importante para a memória e o aprendizado.....	18
4 Principais áreas envolvidas na formação de memórias declarativas de curta e de longa duração, e suas principais conexões.....	22
5 Principais sistemas bioquímicos necessários para a formação de memórias declarativas na região CA1 do hipocampo. O processo dura de três a seis horas.....	23
6 Seqüência de eventos relacionados à isquemia e reperfusão.....	38
7 Reações de lipoperoxidação.....	39
8 Indução da apoptose pela via receptores da morte e por disfunção mitocondrial. FNT = fator de necrose tumoral; Faa-1 + fator ativador da apoptose I. Adaptado de KAPLOWITZ.....	57
9 Modelo da inibição da recaptação da dopamina, induzida pelo <i>l</i> -deprenil.....	65
10 Fórmula estrutural e química do <i>l</i> -deprenil.....	66
11 Imagem do momento da Isquemia Cerebral Transitória (ICT) com o camplamento de ambas as artérias carótidas, juntamente com e monitoramento da temperatura corporal por termômetro via retal.....	77
12 Campo Aberto.....	82
13 Aparelho de Esquiva Passiva.....	82

14	Labirinto em T Elevado (T-maze).....	84
15	Labirinto Aquático de Morris (Water Maze).....	86
16	Coloração promovida pelo TTC em ratos submetidos a ICT, após 1 h de reperfusão. (a – controle; b – isquemiado). A seta indica a área diferenciada da coloração (área infartada).....	95
17	Coloração promovida pelo TTC em ratos submetidos a ICT, após 24 h de reperfusão. (a – controle; b – isquemiado). A seta indica a área diferenciada da coloração (área infartada).....	96
18	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -deprenil (5 e 10mg/kg, v.o.) na atividade locomotora de ratos (n=7) submetidos a ICT. Cada valor representa media ± .E.P.M.....	98
19a	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -deprenil (5 e 10 mg/kg, v.o.) na aquisição da memória de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no teste T Maze. ^{a,b} vs treino , (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Cada valor representa media ± .E.P.M.....	100
19b	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -deprenil (5 e 10 mg/kg, v.o.) na retenção da memória de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no teste de T Maze . ^a vs Treino , ^b vs isquemia (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Cada valor representa media ± .E.P.M.....	101
20	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -Deprenil (5 e 10 mg/kg, v.o.) na memória recente de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no Teste da Esquiva Passiva. ^{a,b} vs isquemia, (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Cada valor representa media ± .E.P.M.....	103

- 21** Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (0.1, 5, 10 mg/kg, v.o.) na memória tardia de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no Teste da Esquiva Passiva. ^a vs falso-operado (FO), ^b vs isquemiado (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Cada valor representa media ± E.P.M..... **104**
- 22** Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (5 e 10mg/kg, v.o.) na retenção da memória de ratos (n=7) submetidos a ICT no teste do labirinto aquático de Morris. ^a vs isquemia (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Cada valor representa media ± E.P.M..... **106**
- 23** Efeito do tratamento diário com *l*-deprenil (10mg/kg, v.o.) na atividade da catalase (n=5) em ratos submetidos a ICT. Cada valor representa media ± E.P.M..... **112**

LISTA DE TABELAS

TABELAS		PÁGINA
1	Parâmetros farmacocinéticos.....	66
2	Protocolo da Experimental da cirurgia e tratamento.....	78
3	Parâmetros Fisiológicos dos animais controle e submetidos à isquemia cerebral transitória (20 min).....	94
4	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -deprenil na formação de Malondialdeído (MDA) (nmol/g de tecido) em homogenatos de hipocampo e córtex temporal de ratos (n=7) submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).....	108
5	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -deprenil na formação de Nitrito (NTT) (mM) em homogenatos de hipocampo e Córtex Temporal de ratos (n=5) submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT).....	110
6	Efeito do tratamento diário (5 dias) com <i>l</i> -deprenil na atividade da protease Caspase 3 em homogenato de hipocampo de ratos (n=5) submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT).....	114

RESUMO

***l*-DEPRENIL PREVINE ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELA ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA.** Flávio Damasceno Maia. Dissertação de Mestrado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004. O trabalho mostra o tratamento e os efeitos do *l*-deprenil (DEP), no aprendizado, na memória e na peroxidação lipídica em cérebros de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT). Os animais (ratos Wistar, fêmeas, 200-250g) foram submetidos à isquemia cerebral transitória pela oclusão de ambas as artérias carótidas durante 20 minutos e tratados durante 5 dias com DEP (5 e 10 mg/kg). A temperatura retal foi monitorada e mantida em torno de 37°C através de uma luz incandescente. O mesmo procedimento foi feito no grupo controle + salina, Falso-operado + salina (FO) com exceção do clampeamento das artérias carótidas. No 6º dia após a indução da isquemia, os animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora e memória (esquiva passiva, labirinto em T elevado e labirinto aquático de Morris), a seguir foram sacrificados e os cérebros dissecados sobre gelo (hipocampo e córtex temporal) para as determinações de MDA, nitrito/nitrato e atividade da catalase e atividade da protease caspase-3. No protocolo de avaliação da área total do infarto encontramos após 1 hora de ICT uma área de infarto $38,01 \pm 3,44\%$ da área total do cérebro, e após 24 horas de ICT uma área de infarto $22,00 \pm 2,90\%$ da área total do cérebro. Os parâmetros fisiológicos estudados não mostraram alterações entre os grupos ICT e FO. Nenhuma alteração na atividade locomotora foi detectada nos grupos FO, ICT, Dep 10 + ICT. Porém, um aumento na atividade locomotora foi observado no grupo Dep 5 + ICT ($7,37 \pm 1,77$, $p < 0,02$) quando comparado com o grupo FO, tratado com salina, ($4,66 \pm 1,54$). No teste do Labirinto em T elevado (T Maze) a ICT afetou os processos de aquisição e retenção de memória quando os animais foram testados no mesmo dia (esquiva 1 e 2) quando comparados com o grupo controle (FO). O teste de Kruskal-Wallis mostrou alteração significativa na latência da esquiva inibitória (esquiva 1 e 2 quando comparados com o treino) no falso-operado (FO - treino: $20,34 \pm 3,43$ s; esquiva 1 - $231,6 \pm 34,81$ s; esquiva 2 - $247,8 \pm 27,25$ s; KW = 19,62, $p < 0,001$), e no grupo *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg) + isquemia (Dep 5 - treino: $110,8 \pm 56,16$ s; esquiva 1 - $299,8 \pm 0,16$ s; esquiva 2 - $260 \pm 40,00$ s; KW = 9,16, $p < 0,01$. Dep 10 - treino: $29,15 \pm 8,64$ s; esquiva 1 - $299,80 \pm 0,25$ s; esquiva 2 $299,8 \pm 0,25$ s; KW = 6,98, $p < 0,05$). Isto indica uma boa aquisição de memória. Portanto, o resultado do grupo ICT + salina indicou um déficit da memória (ICT - treino: $37,75 \pm 11,52$ s; esquiva 1 - $116,30 \pm 65,46$ s; treino 2 - $195,00 \pm 64,10$ s; KW = 3,90, $p < 0,141$). Além disso, existiu uma diferença significativa (Teste Mann-Whitney) entre os grupos na esquiva 3 (retenção) quando comparados com o grupo ICT (Dep 5, MW (3) = 18,483, $p < 0,0003$, Dep 10, MW (3) = 18,483, $p < 0,003$) significando que a retenção da memória foi aumentada pelo tratamento com a droga. No teste da esquiva passiva os animais do grupo controle (FO + salina) apresentaram uma boa retenção da memória, tanto na fase imediata (memória recente - MR), quanto na fase de consolidação (memória tardia - MT), quando comparadas ao treino (ANOVA) (FO + salina (n-7)- treino - $15,94 \pm 4,40$ s, MR - $138,84 \pm 34,60$ s, MT - $196,32 \pm 34,71$, $p < 0,006$). Por outro lado, os animais que sofreram ICT não apresentaram diferença no tempo de latência de entrada no lado escuro quando comparado com o treino, significando um déficit na aprendizagem e memória (ICT (n-7)- treino - $34,37 \pm 10,16$ s, MR - $105,54 \pm 35,21$ s, MT - $96,20 \pm 33,44$, $p < 0,33$), e, portanto dano na aquisição e retenção da memória. Comparando os tratamentos observamos um aumento significativo, no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho, nos ratos tratados com *l*-deprenil 5 mg/kg quando avaliados na MR (FO + salina- $138,84 \pm 34,60$ s; ICT - $105,54 \pm 35,21$; ICT + Dep 5- $198,88 \pm 38,42$ s; ICT + Dep 10- $188,06 \pm 34,60$ s; Kruskal-Wallis, KW-9,66, $p < 0,05$, Mann-Whitney, Dep 5 vs ICT,

$p < 0,05$), enquanto na MT foi observada uma diminuição significativa, no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho, nos ratos tratados com *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg) (**FO + salina**- $196,32 \pm 34,71s$; **ICT** - $96,20 \pm 33,44s$; **ICT + Dep 5**- $299,83 \pm 0,16s$; **ICT + Dep 10**- $264,70 \pm 35,28s$; Kruskal-Wallis, KW-14,57, $p < 0,05$, Mann-Whitney, Dep 5 e Dep 10 vs ICT, $p < 0,05$), significando melhora no aprendizado do animal fazendo-o lembrar o choque recebido durante o treino e indicando uma reversão da lesão sofrida com a ICT. No teste do Labirinto Aquático (Water Maze) a ICT promoveu um dano da retenção na memória dos animais em relação ao grupo controle (FO), porém o *l*-deprenil conseguiu reverter o dano na aquisição da memória induzida pela ICT em ambas as doses (5 e 10 mg/kg), observamos também que o grupo Dep 5 obteve um melhor desempenho na aquisição da memória quando comparado com o grupo Dep 10. (**FO** (n-10): $5,4 \pm 0,84s$; **FO + DEP 10** (n-10): $9,7 \pm 2,28s$; **ICT** (n-9): $32,44 \pm 2,95s$; **ICT + DEP 5** (n-8): $12,88 \pm 1,4s$; **ICT + DEP 10** (n-8): $4,5 \pm 0,70s$; Kruskal-Wallis, KW-29,07, $p < 0,05$, Mann-Whitney, FO + DEP 10, Dep 5 e Dep 10 vs ICT, $p < 0,05$). Os ratos submetidos a ICT mostraram um aumento de 71% nos níveis de MDA no hipocampo quando comparados com o grupo controle (FO), e o tratamento com *l*-deprenil reverteu significativamente este efeito ($p < 0,05$). Os valores dos níveis de MDA foram trazidos próximos aqueles valores do grupo controle (FO) em relação aos grupos (**ICT + DEP 5** e **ICT + DEP 10**, 34 e 38%, respectivamente) com ambas as doses de *l*-deprenil mais ICT (Hipocampo - **FO** (n-7): $45,4 \pm 4,45$; **ICT** (n-7): $77,6 \pm 8,97$; **ICT + DEP 5** (n-7): $51,2 \pm 1,68$; **ICT + DEP 10** (n-7): $48,5 \pm 6,70$ nmoles/g; $p < 0,05$, ANOVA e Teste de Tukey). No córtex temporal, a ICT não aumentou os níveis de MDA quando comparados com o grupo controle. Portanto, os ratos submetidos a ICT e tratados com altas doses de *l*-deprenil (10 mg/kg) apresentaram níveis de MDA 30% menor que aqueles mostrados por ambos os grupos FO e ICT (Córtex temporal - **FO** (n-7): $46,8 \pm 4,36$; **ICT** (n-7): $48,7 \pm 1,33$; **ICT + DEP 5** (n-7): $52,5 \pm 3,74$; **ICT + DEP 10** (n-7): $33,4 \pm 2,98$ nmoles/g; $p < 0,05$, ANOVA e Teste de Tukey). No hipocampo, os níveis de nitrito foram significativamente aumentados após a ICT quando comparados com o grupo controle FO (82% aumento). O DEP 10 reverteu este efeito e os valores foram trazidos para aqueles do controle. Por outro lado, a isquemia não afetou os níveis de nitrito no córtex, entretanto o DEP 5 diminuiu significativamente os níveis de nitrito quando comparados com os grupos controle e ICT. A ICT mostrou um aumento em 50 % da atividade da protease caspase-3 no hipocampo; e o tratamento com *l*-deprenil (10 mg/kg) reverteu este efeito trazendo os valores próximos aos do grupo controle (FO), porém o tratamento com DEP 5 não mostrou o mesmo (Valor da Absorbância: **FO** - $0,083 \pm 0,006$; **ICT** - $0,124 \pm 0,017$; **ICT + DEP 10** - $0,080 \pm 0,007$; **ICT + DEP 5** - $0,125 \pm 0,007$), porém nos animais controle que receberam tratamento com DEP 10 (FO + DEP 10) a atividade da caspase - 3 diminuiu em 99% em relação ao grupo ICT. Em conclusão mostramos que a administração do *l*-deprenil diariamente por 5 dias melhorou os danos da memória observados após a isquemia cerebral transitória em ratos. A droga protegeu o cérebro contra a hiperperoxidação e formação de radicais livres observados após o dano isquêmico, como diminuiu a atividade da caspase - 3. Pelo menos parte desses efeitos é devido ao efeito antioxidante e conseqüentemente inibição da ativação da produção de radicais livres pelo *l*-deprenil.

Palavras chaves: *l*-deprenil; isquemia cerebral transitória; memória; peroxidação lipídica; nitrito; caspase e catalase .

ABSTRACTS

***l*-Deprenyl prevines neurochemicals and comportamentals alterations induced of transiente cerebral ischaemia** , Flávio Damasceno Maia, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Brazil. The present work shows the effects of *l*-deprenyl (DEP, 5 and 10 mg/kg, po) on memory, as well as on rat brain free radical formation after transient cerebral ischemia (TCI). Wistar rats were anesthetized and submitted to TCI by occlusion of both carotid arteries for 20 minutes. In another experiment, animals were submitted to surgery without ischemia (sham-operated). After surgery, ischaemic rats were treated with DEP (DEP, 5 and 10 mg/kg, po) once and daily for 5 days. One group of animals was left untreated (controls). The parameters studied were, memory acquisition and memory retention, locomotor activity and tiobarbituric acid reactive substances, as an index of lipid peroxidation. After treatment all, animals were submitted to passive avoidance test, water maze test and elevated T maze test, and 24 h later sacrificed and their hippocampi and temporal cortex dissected for evaluation of lipid peroxidation and used for catalase activity determinations. The protein concentration was measured according to the method described by Lowry (1951). In another set of experiments the animals were sacrificed forty eight hours after ischemia for caspase activity evaluation. Results show that DEP significantly reversed ischaemia-induced memory deficits. *l*-Deprenyl treatment significantly improved memory deficits as compared to ischemic group as measured by The elevated T maze and Water maze tests. A similar result was observed on the passive avoidance test where *l*-deprenyl improved late but not early memory as compared to the ischemic group. Except for an increased locomotor activity observed in the group treated with 5 mg/kg, no other alteration was detected in this behavioral test. Rats submitted to transient cerebral ischemia (and without *l*-deprenyl) showed an increase im MDA levels in the hippocampus and the treatment with *l*-deprenyl (5 and 10 mg/kg) significantly reversed this effect bringing values close to those of the sham-operated controls. A similar profile was observed with nitrite levels. Rats submitted to transient cerebral ischemia show an increase in caspase activity in the hippocampus and the treatment with *l*-deprenil (10 mg/kg) significantly reversed this effect bringing values close to those of the sham-operated controls. Moreover catalase activity in the hippocampi was not altered by ischemia. In conclusion, the work showed a signifiant protective effect of *l*-deprenyl on memory deficits and lipid hyperperoxidation observed after cerebral ischemia. Possibly, the drug is acting at least in part through its antioxidant and antiapoptotic activities.

Key words: *l*-deprenyl; transient cerebral ischemia; memory; lipid peroxidation; nitrite; caspase and catalase activity.

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

1. Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O AVC é uma das principais causas de incapacidade nos países desenvolvidos, poucos dados epidemiológicos estão disponíveis no Brasil acerca da incidência de AVC, mas segundo dados dos Estados Unidos do National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) cerca de 600.000 pessoas sofrem de um novo ou recorrente AVC a cada ano. A doença vascular cerebral isquêmica é uma das principais causas de morte e incapacidade em todo mundo (American Heart Association, 1991). Três milhões de americanos são permanentemente incapacitados devido ao AVC e 31% dos sobreviventes necessitam cuidados permanentes, 20% necessitam ajuda para caminhar, 71% têm prejudicado suas capacidades vocacionais quando examinadas até 7 anos após o ataque e 16% necessitam ser institucionalizados. Os custos diretos e indiretos do AVC em 1998 nos Estados Unidos foram estimados em 43,3 bilhões. Além disso, 70.000 pacientes por ano sofrem de ataque cardíaco com ressuscitação cardiopulmonar, no mínimo 60% destes pacientes morrem no hospital como resultados de uma lesão cerebral extensa e somente 3-10% destes pacientes ficam hábeis para reassumir suas vidas normalmente (Krause *et al.* 1986). Assim, a lesão cerebral por isquemia global transitória completa (ataque cardíaco) e isquemia cerebral regional incompleta (AVC) afligem um grande número de pacientes a cada ano, com morte ou incapacidade permanente. Os neurocirurgiões enfrentam situações semelhantes em procedimentos neurovasculares em que há necessidade de oclusão temporária de um vaso principalmente nas cirurgias dos aneurismas cerebrais, com o objetivo de prevenir ou tratar hemorragias no campo operatório (Pool, 1961). Estas podem levar a lesões hipóxico-isquêmicas de graus variados no sistema nervoso central (SNC), com repercussões clínicas, que podem ser graves para os pacientes (Zabramski *et al.*, 1994). Os estudos dos fenômenos ligados a entidades clínicas que levam a hipóxia-isquemia do SNC são relevantes, pois visam à melhoria da qualidade

de vida dos pacientes (Terent & Jonsson, 1994). A alta demanda metabólica e a baixa reserva energética disponível rendem ao SNC susceptibilidade única frente às alterações na irrigação sanguínea, apesar da rede de circulação colateral muito desenvolvida neste. O SNC pode sofrer lesões isquêmicas globais e focais, e para ambas as situações existem modelos experimentais (Colli *et al.*, 1998).

O AVC é a doença neurológica que mais freqüentemente acomete o sistema nervoso e é a principal causa de incapacidades físicas e mentais. Ocorre devido a uma interrupção do fluxo sanguíneo para o cérebro, que pode ser por obstrução de uma artéria que o supre, caracterizando o AVC isquêmico ou por ruptura de um vaso, caracterizando o AVC hemorrágico. Os principais fatores de riscos para a ocorrência dos AVCs são: hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças cardíacas, obesidade, sedentarismo e tabagismo. As seqüelas dependem da localização e do tamanho da área cerebral que foi atingida e do tempo que o paciente levou para ser atendido (melhor o prognóstico quanto mais rápido for iniciada a recuperação), sendo as mais comuns hemiparesia, alterações visuais, da fala e da memória (Cramer *et al.*, 2000). O sangue chega ao cérebro através das artérias vertebrais e das artérias carótidas internas, que se comunicam através do polígono de Willis, este é uma anastomose arterial que fornece o suprimento sanguíneo para os hemisférios cerebrais, sendo formado pelas artérias cerebrais anteriores e posteriores, artérias comunicantes anterior e posteriores e pela carótida interna (Figura 1). A artéria cerebral que é mais comumente acometida por AVC é a artéria cerebral média.

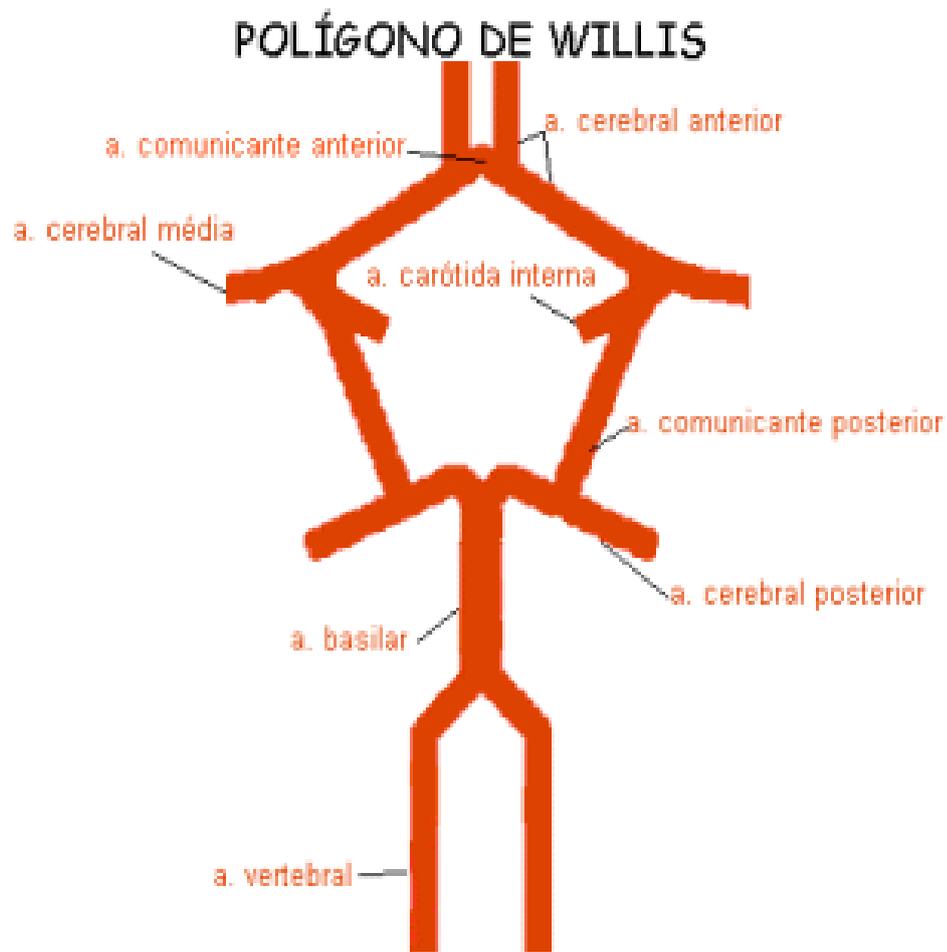


Figura 1 – Esquema mostrando as artérias vertebrais e as artérias carótidas internas, que se comunicam através do polígono de Willis.

Os estragos causados ao cérebro por um AVC podem provocar perda de sua função, mas através de um fenômeno denominado “neuroplasticidade”, o cérebro pode se reajustar funcionalmente, havendo uma reorganização dos mapas corticais que contribui para a recuperação do AVC. As mudanças descritas na organização do córtex incluem o aumento dos dendritos, das sinapses e de fatores neurotróficos essenciais para a sobrevivência de células nervosas. Após ocorrer uma lesão, em algum lugar do córtex motor, mudanças de ativação em outras regiões motoras são observadas. Essas mudanças podem ocorrer em regiões homólogas do hemisfério não afetado, que assumem as funções perdidas, ou no córtex intacto adjacente a lesão. Graças a essas

reorganizações corticais, que podem ter início de um a dois dias após o AVC e podem se prolongar por meses, os pacientes podem recuperar, pelo menos em parte, as habilidades que haviam sido perdidas. A recuperação da função nos membros, promovida pela plasticidade, é dificultada por um fenômeno conhecido como “não-uso aprendido”. Com a perda da função de uma área do cérebro atingida pelo AVC, a região do corpo que estava ligada a essa área também é afetada, perdendo a sua capacidade de movimentação. Como o paciente não consegue mover o membro mais afetado, compensa usando o outro, deste modo, após um certo tempo, quando os efeitos da lesão não estão mais presentes e ocorreram readaptações no cérebro, os movimentos poderiam ser recuperados, no entanto, o paciente já “aprendeu” que aquele membro não é mais funcional (Liepert *et al.*, 2000).

1.1. Terapias de reparo

Com o objetivo de diminuir esta morbidade neurológica, devemos procurar entender os mecanismos envolvidos no dano e reparação neuronal, bem como procurar a terapia mais efetiva. Levando-se em consideração que parte do cérebro pode sofrer infarto nas primeiras horas de isquemia cerebral, a oxigenação e certos fatores hemodinâmicos e metabólicos são fundamentais para o sucesso terapêutico. O tratamento de emergência inclui a estabilização e avaliação de fatores que podem causar complicações (como a disfagia e a desidratação).

A tomografia computadorizada (TC) consegue, na grande maioria dos casos, diferenciar o AVC isquêmico e o hemorrágico, além de identificar outras condições capazes de mimetizar um AVC. Raramente a TC é normal e a punção lombar poderá identificar o líquido hemorrágico. A ressonância magnética, quando disponível, fornece dados adicionais sobre o fluxo sanguíneo e a perfusão cerebral, o tempo de aparecimento das lesões e a presença de estenose de carótida (podendo também ser detectada pela ultra-sonografia de carótidas). Algumas condições que fazem parte do diagnóstico diferencial incluem:

neoplasias cerebrais, hematoma subdural, crise epiléptica, trauma, enxaqueca, esclerose múltipla e abscesso cerebral.

Apesar de apresentar pequeno impacto sobre a morbimortalidade, o tratamento preventivo com aspirina é empregado em pacientes com AVC agudo. A administração de heparina pode ser útil em determinados pacientes, mas a sua eficácia, mesmo em casos de embolia presumida, ainda não foi estabelecida. A trombólise, quando realizada nas primeiras três horas, aumenta significativamente a chance de reversão do quadro. É menos eficaz quando realizada nas primeiras seis horas do quadro. Os pacientes que serão submetidos a trombólise devem ser escolhidos adequadamente, tendo em vista os possíveis efeitos deletérios desta manobra. As drogas protetoras do sistema nervoso não mostraram benefícios até o momento. Os pacientes com infarto ou hemorragia cerebelar extensa devem passar por avaliação neurocirúrgica precoce para avaliar a necessidade de retirada do coágulo ou da região acometida, ou para a derivação da hidrocefalia aguda, quando necessária. A hiperglicemia, febre e hipertensão estão associadas com pior prognóstico. E todos os protocolos disponíveis atualmente, há uma unanimidade em se reduzir parcialmente a pressão arterial quando ela for igual ou superior a 200/110 mmHg. A reabilitação deve ser iniciada precocemente (Bath & Lees , 2000). Os protocolos clínicos envolvendo coma induzido por barbituratos (Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group, 1986), antagonistas de canais de cálcio (Brain Resuscitation Clinical Trial II Study Group, 1991) falharam em reduzir os danos neurológicos causados pelo ataque cardíaco e ressuscitação. Mais recentemente, a terapia com trilazade (eliminador de radicais livres) (The RANTTAS Investigation) e selfotel (antagonista de receptor de glutamato) (Davis *et al.*, 2000) também se mostraram ineficazes. Pelo exposto fica evidente a importância de se pesquisar novas drogas que ajam diminuído o dano isquêmico.

1.2. Definição e Classificação

O derrame cerebral é definido classicamente como o acidente cerebrovascular (AVC) causado pela redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio e nos metabólitos de alta energia em uma área do cérebro (ATP, Glicose, principalmente).

O AVC é comumente dividido em duas categorias. A primeira e mais comum é o AVC isquêmico ou tromboembólico, devido a um suprimento sanguíneo inadequado como resultado de um coágulo sanguíneo. A segunda categoria é o AVC hemorrágico, que envolve sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo. Dados epidemiológicos revelam que 12% de todos os indivíduos que sofrem do primeiro AVC têm menos que 45 anos (Bogousslavsky *et al.*, 1988). A taxa de incidência anual indica que 65-90 por 100.000 pessoas por ano entre as idades de 15 e 49 anos sofrem um infarto cerebral isquêmico. Em crianças com menos de 15 anos a incidência é aproximadamente a metade desta, com um adicional de 31 por 100.000 crianças que sofrem de sangramento subaracnóideo ou intracerebral (Schoenberg *et al.*, 1978). Dos recém-nascidos com menos de 35 semanas de gestação, o AVC ocorre em 20-30%, uma incidência grande quando comparada com 1,2% em pessoas com mais de 65 anos (United States Department of Health, Education and Welfare, 1980).

1.3. Modelos Experimentais de Isquemia Cerebral *In vivo*.

De um lado, poucos estudos clínicos avaliaram a presença de lesões decorrentes de isquemia e reperfusão em tecido cerebral e, de outro, diversos estudos experimentais foram desenvolvidos com o intuito de entender a fisiopatologia e de buscar tratamentos adequados para essas situações. Esses estudos foram e continuam sendo extremamente úteis e importantes, mas a grande variedade de modelos

experimentais utilizados e de resultados encontrados sugere que nenhum deles é perfeito, tornando, assim, a reprodução difícil e as conclusões definitivas ainda distantes. As variações técnicas experimentais mais frequentemente encontradas foram relacionadas ao tipo de isquemia (temporária ou permanente) e ao seu tempo de duração, ao tempo de reperfusão, às artérias envolvidas no experimento, aos animais utilizados e à multiplicidade dos testes de associação com drogas antioxidantes e parâmetros (Tardini *et al.*, 2003).

O modelo de Levine, onde a hipóxia é combinada com a oclusão unilateral da artéria carótida (Levine, 1960), adaptado em meados de 1960 como ponto de referência para estudos por Brown, Brierly e cols. (Brierly, 1996; Brown & Brierly, 1968; Mcgee-Russell *et al.*, 1970), estabilizou as bases para o estudo sistêmico do dano cerebral em roedores. Muito dos modelos *in vivo* agora conta na oclusão dos vasos que predominantemente afeta o cérebro, desenvolvido entre o final de 1970 e início de 1980 (Fox *et al.*, 1993; Ginsberg & Busto, 1989; Hossmann, 1993). Esses estudos são geralmente divididos em duas categorias, isquemia global e focal, mas uma modificação no modelo de Levine (isquemia/hipóxia) têm algumas propriedades de ambos os modelos.

Os danos da isquemia global são mais comumente produzidos pela oclusão dos vasos, e menos comum pela completa interrupção da circulação cerebral. Embora os modelos usados não sejam atualmente globais, uma grande porção do cérebro é completamente afetada de forma uniforme.

Os três modelos de isquemia global extensamente utilizados são: oclusão dos 4 vasos (4-OV) e oclusão dos 2 vasos (2-OV) combinados com hipotensão nos ratos, e a oclusão dos 2 vasos em gerbils. A importância de ratos transgênicos tem gerado também o uso da 2-OV em experimentos com rato, e este tipo de animal é utilizado frequentemente no modelo 2-VO (Kitagawa *et al.*, 1998; Strijbos *et al.*, 1996). Os resultados mostram um efeito similar para ambos os animais gerbil e ratos (Kitagawa *et al.*, 1998).

A) 4-OV em ratos. A oclusão dos 4 vasos em ratos (4-VO) envolve a coagulação permanente das artérias vertebrais (que não tem efeito deletério) e a ligação temporária de ambas às artérias carótidas. A ligação temporária reduz o fluxo de forma eficaz (Pulsinelli & Brierly, 1979 Pulsinelli & Buchan, 1988). Em ratos Wistar o fluxo sanguíneo é diminuído em 3% em relação aos valores do controle no hipocampo, estriato e neocortex (Pulsinelli *et al.*, 1982).

B) 2-OV em ratos. Esta envolve somente a ligação de ambas as artérias carótidas, junto com a redução da pressão sanguínea em torno 50 mmHg, e tem efeitos levemente mais profundos que a 4-OV. O fluxo sanguíneo diminui em 1% no hipocampo, neocortex e corpo estriado (Smith *et al.*, 1984a; 1984b). Esta pequena intensidade do dano é mais facilmente protegida, por exemplo, por bloqueadores de receptores NMDA.

C) 2-OV em gerbils. Esta é induzida pelo ligamento temporário das artérias carótidas, sem redução da pressão sanguínea, porque não existem artérias de comunicação posterior nos gerbils, produzindo uma profunda isquemia cerebral (Kirino *et al.*, 1985). Estas mudanças são semelhantes aquelas dos modelos em ratos, diminuição do fluxo em torno de 1% no córtex e no hipocampo em torno de 4% em relação ao controle (Kato *et al.*, 1990).

D) ISQUEMIA COMPLETA VERSUS ISQUEMIA GLOBAL.

Finalmente, existe uma isquemia cerebral completa, geralmente alcançada pelo fechamento das artérias cervicais (Dietrich *et al.*, 1987; Eleff *et al.*, 1991; Ljunggren *et al.* 1974), parada cardíaca (Crumrine & Lamanna, 1991; Ekholm & Siesjo, 1992), ou pelo ligamento ou obstrução de todas as artérias do coração (Kawai *et al.*, 1992; Pluta *et al.*, 1991). O fluxo sanguíneo para todo o cérebro é zero ou <1% nestes modelos (Eleff *et al.*, 1991).

A oclusão dos vasos sanguíneos é freqüentemente chamada de “isquemia incompleta” por causa do fluxo sanguíneo residual, e existe controvérsia se a isquemia completa ou incompleta é mais danosa, com a dúvida de que a queda do pH ou o aumento na formação dos radicais livres durante a isquemia incompleta possa aumentar o dano. Isto não parece ser o caso. A isquemia completa por 10 minutos em ratos, sem a manutenção da temperatura, causa completa destruição das células piramidais da região CA1 após 7 dias (Crumrine *et al.*, 1997). Este dano é certamente mais severo que no modelo de isquemia global. Geralmente, a oclusão dos vasos no gerbil é o modelo mais estudado porque a cirurgia é mais simples que no rato. De qualquer forma, existem muitas diferenças entre as duas espécies, ambas em termos de mudanças metabólicas e genéticas durante e após a isquemia, e a habilidade de diferentes agentes em proteger contra o dano. Assim o processo de morte celular deve ser diferente; os resultados de uma espécie não podem necessariamente ser generalizado (Lipton , 1999).

A maioria dos modelos de isquemia cerebral depende predominantemente da oclusão dos vasos que afetam o cérebro (Lipton, 1999). Uma hora de isquemia foi sugerido na literatura para favorecer ao aparecimento de radicais livres, formadores dos mecanismos patofisiológicos do dano isquêmico. Deve ser possível que longos períodos de isquemia (> 15 min.) seja necessário para promover danos no tecido vascular, onde a atividade das enzimas xantina oxidase e redutase são encontradas (Agardh *et al.*, 1991). Um modelo de isquemia cerebral completa, obtido pela oclusão de ambas as artérias carótidas de ratos por 1 hora, seguida de reperfusão por mais uma hora, foi usada freqüentemente (Vanella *et al.*, 1990; Shaheen *et al.*, 1996; Seif-El-Nasr *et al.*, 1999). Tal indução de isquemia parcial, sem afetar o polígono de Willis (circulação colateral), foi sugerido ser o modelo que melhor representa os eventos ocorridos em ataques isquêmicos transitórios e infartos clínicos cerebrais (Vanella *et al.*, 1990).

A oclusão carotídea temporária, unilateral ou bilateral, é um modelo bastante utilizado em estudos de isquemia e reperfusão cerebral, variando o tempo de

isquemia e o de reperfusão. Siragusa *et al.*, (1997) e Nakase *et al.*(2000) promoveram isquemia temporária em ratos Wistar através da oclusão de apenas uma das artérias carótidas comuns. No entanto, enquanto o primeiro provocou períodos de isquemia de cinco minutos e reperfusão de 10 minutos, o segundo autor promoveu 15 minutos de isquemia com quatro dias de reperfusão. Outros autores realizaram estudos em que ambas as artérias carótidas eram ocluídas temporariamente e de maneira isolada (Seifel-Nasr *et al.*, 1995; Vagnozzi *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1998; Sugimura *et al.*, 1998; Terashima *et al.*, 1998; Abraham & Lazar, 2000; Rao *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001).

Para diminuir a circulação colateral, outros autores associaram a aplicação de manguito de pressão ao redor do pescoço do animal ou promoveram hipotensão durante a isquemia, buscando, dessa maneira, um maior grau de isquemia (Islekel *et al.*, 1999). O uso do manguito de pressão ao redor do pescoço do animal também foi utilizado em associação com ligadura de artéria basilar (Kuo & Schroeder, 1995).

Pulsinelli *et al.*, (1979), buscando intensificar a isquemia cerebral, descreveram uma técnica de cauterização das artérias vertebrais em ratos Wistar que, por ser efetiva, vem sendo empregada por outros autores para promoção de isquemia cerebral, com variações no tempo de isquemia e/ou reperfusão, assim como na espécie do animal utilizado para realização do experimento (Islekel *et al.*, 1999; Dienel *et al.*, 1980; Pulsinelli *et al.*, 1982; Blomqvist *et al.*, 1984; Yu *et al.*, 1992). Furlow (1982) desenvolveu estudo sobre o fluxo sanguíneo cerebral durante a oclusão de ambas as artérias carótidas em ratos Sprague-Dawley associada ou não com a cauterização das artérias vertebrais e verificou diminuição significativa desse fluxo nos animais com cauterização das artérias vertebrais.

Outros autores realizaram estudos com oclusão definitiva (Kochanek *et al.*, 1987; Gümüslü *et al.*, 1997) ou temporária de artérias intracranianas, geralmente a artéria cerebral média. Kochanek *et al.* (1987) ocluíram as artérias intracranianas de cães através de embolização de ar a partir da artéria carótida. Já Bralet *et al.* (1987) promoveram isquemia definitiva intracraniana em ratos da raça Sprague-Dawley pela

embolização de artéria cerebral média com micropartículas. A isquemia temporária de artéria cerebral média foi alvo de estudos de diversos outros autores (Yu *et al.*, 1992; Abe & Yuki., 1998; Anderson & Sims, 2000; Feng *et al.*, 1998; Takamatsu *et al.*, 2000; Holtz *et al.*, 2001), com variação de animais e raça. Takamatsu *et al.*(2000) realizaram um experimento em macacos, Anderson *et al.* (1999) em ratos da raça Wistar, enquanto Feng *et al.*(1998) e Abe & Yuki (1998) o fizeram em ratos raça Sprague-Dawley.

2. MEMÓRIA

2.1. Definição

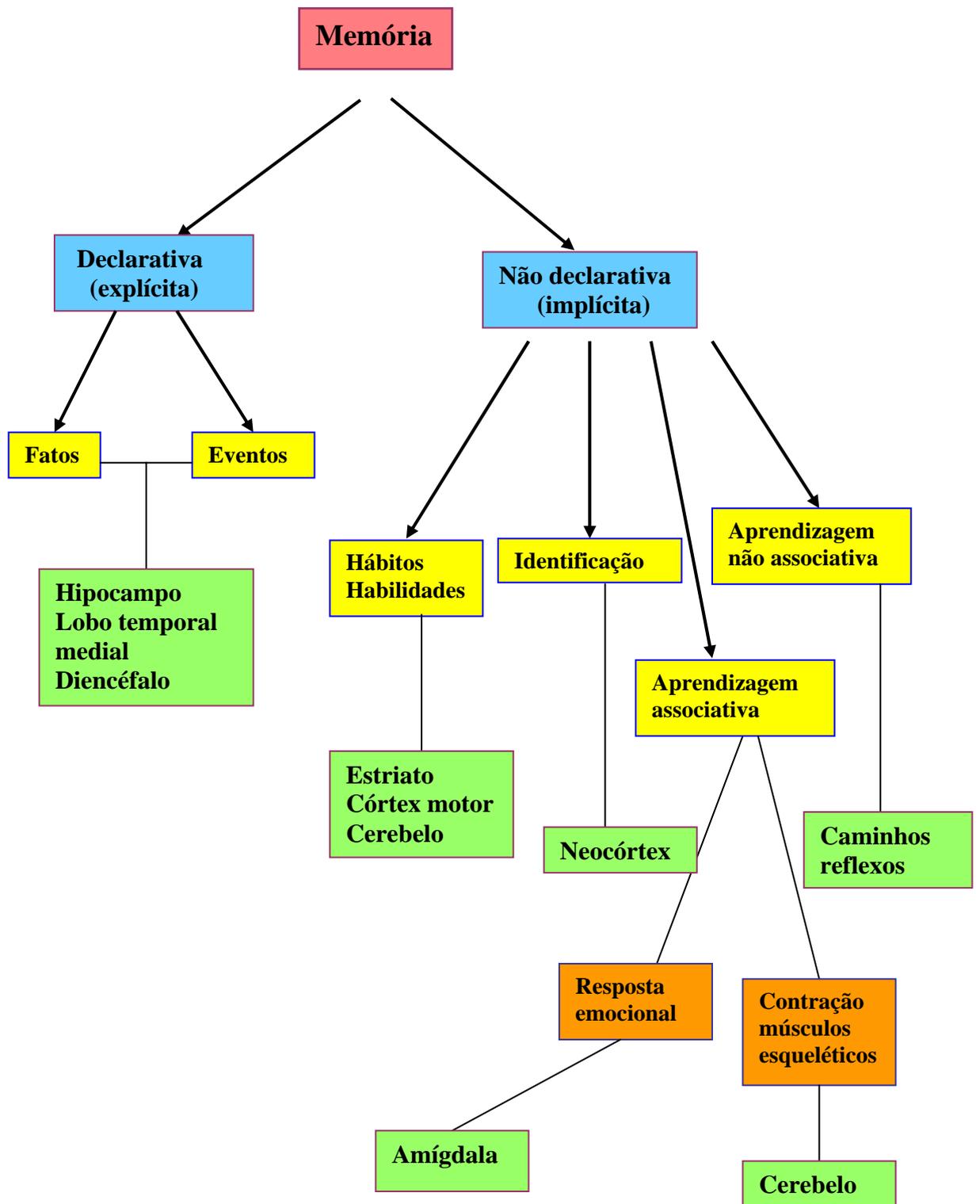
Memória é a capacidade de reter e recuperar informações, um processo que produz alteração no nosso comportamento, permitindo que o indivíduo se situe no presente, considerando o passado e o futuro. Ela fornece as bases para todos os nossos conhecimentos, habilidade, sonhos, planos e anseios. Memória é, portanto, um aspecto central da existência humana. Assim, o conhecimento de sua natureza e bases biológicas é essencial para se entender a psique humana e desenvolver terapias relacionadas com as doenças cognitivas. A pesquisa básica que investiga a neurobiologia da memória está centrada em dois objetivos. O primeiro visa à identificação de áreas cerebrais envolvidas nestes fenômenos, bem como o papel dos sistemas cerebrais no controle do armazenamento dos diferentes tipos de memória. O segundo destina-se a elucidar as alterações celulares e bioquímicas que ocorrem entre neurônios durante a aquisição da informação.

2.2. Classificação

Existem várias formas de aprendizagem e memória, envolvendo diferentes sistemas neuronais (Figura 2). Muitos trabalhos distinguem entre memória “declarativa” e “não declarativa” (ou “de procedimento” - *procedural*). A memória declarativa geralmente refere-se à memória explícita – de “o que” - e está relacionado às experiências próprias, reconhecimento de cenas e de objetos familiares. A memória não declarativa, de procedimento ou implícita – de “como fazer” constitui a vasta maioria dos processos de memória em animais não humanos, mas também muitos aspectos da memória em humanos. Considera todos os seus gostos e desgostos, todos os hábitos e habilidades (p.ex. dirigir, nadar, andar de bicicleta) e pode incluir o fenômeno de identificação (*priming*), que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia

(Welkowitz *et al.*, 1987). Estas categorias de memória não são excludentes, quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados. A memória não declarativa inclui o condicionamento clássico, habilidades, e é em grande parte inconsciente. A memória declarativa envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos. Este tipo de memória é processado em partes diferentes do cérebro, mas podem ser interconvertidas. No homem a memória declarativa é dividida em recuperação imediata de eventos que ocorrem em curso, memória a curto prazo ou recente de eventos que ocorrem de segundo a horas ou dias antes, e memória remota de eventos do passado distante. A memória a curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este tempo, a memória a curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias remotas são extremamente resistentes e persistem na presença de grave lesão cerebral (Squire & Zola-Morgan, 1996).

Figura 2 - Sistemas de memória



Segundo, Squire & Knowlton, 1996

Um aspecto da memória de curto prazo é a memória operacional (*working memory*), um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Evidência clínica de vulnerabilidade da memória em curto prazo é a observação de que há com frequência perda da memória de eventos imediatamente depois de uma concussão cerebral (amnésia retrógrada), mas a memória retrógrada e a não declarativa não são afetadas. Em animais, a aquisição de respostas aprendidas, ou pelo menos sua recuperação, é impedida se dentro de 5 minutos após cada sessão de treinamento, os animais forem anestesiados ou tratados com antibióticos que inibam a síntese protéica. Quatro horas após as sessões de treinamento estes tratamentos não têm efeito sobre a aquisição (Squire & Zola-Morgan, 1996). Alguns pesquisadores argumentam que o núcleo estriado está envolvido na codificação da memória não declarativa, mas existem outras evidências de que o cerebelo também está envolvido. Pesquisa recente sobre a memória operacional indica o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral. Quando os indivíduos são solicitados a lembrar a localização espacial de estímulos visuais, a varredura por PET mostra atividade aumentada no córtex occipital, parietal e frontal direitos, o hipocampo não está envolvido (Squire & Zola-Morgan, 1996).

Por outro lado, o processo de codificação que converte memórias de curto prazo em memórias de longo prazo no homem e em outros primatas envolve o hipocampo e as porções adjacentes entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial. No homem, a destruição bilateral do hipocampo ventral ou processos patológicos que destroem seus neurônios na área CA1 causa defeitos acentuados na memória recente. Humanos com esta destruição mantêm intacta a memória imediata (Memória imediata pode ser ilustrada como a memória de um número de telefone que consultamos na lista telefônica, e que geralmente esquecemos logo após tê-lo digitado. Este tipo de memória não deixa "traços", ou seja, não forma "arquivos"; e parece depender da atividade elétrica de células de uma região cerebral denominada córtex pré-frontal. Pelo fato da memória imediata não deixar traços é que, antes do aparecimento da tecla de "re-disco" nos aparelhos de telefone, tínhamos que consultar a lista telefônica tantas vezes.) e a remota, e não podem constituir novas memórias de

longo prazo. As conexões do hipocampo para o diencéfalo também estão envolvidas com a memória. Alguns alcoólatras com lesão cerebral desenvolvem uma deficiência de memória recente, e a perda de memória correlaciona-se com alterações nos corpos mamilares, estes se projetam para o tálamo anterior e em macacos, lesões do tálamo causam perda de memória recente. Do tálamo, as fibras projetam-se para o córtex pré-frontal e para o prosencéfalo basal. Deste, há uma projeção colinérgica para todo o neocórtex, amígdala e hipocampo, a partir do núcleo basal de Meynert. Enquanto o processo de decodificação para a memória a curto prazo envolve o hipocampo, as de longo prazo estão armazenadas no neocórtex (Squire & Zola-Morgan, 1996). Talvez a primeira proposição da existência de alterações celulares subjacentes à formação de memórias tenha sido feita pelo psicólogo canadense Donald Hebb, no seu livro *Organization of Behavior*, publicado em 1949. Baseado nos trabalhos anatômicos de Lorente de Nó sobre a estrutura e as conexões entre neurônios, Hebb propôs que durante a situação de aprendizagem um neurônio estimula outro, de tal forma que a sinapse entre eles se torna mais fortalecida e isso poderia produzir alterações estruturais. De acordo com essa idéia, o armazenamento dessa informação estrutural poderia explicar o fenômeno da memória. Entretanto ele não tinha a menor idéia dos mecanismos neurais subjacentes à sua teoria.

Em 1973, os fisiologistas Timothy Bliss e Terje Lømo demonstraram em neurônios localizados no hipocampo (uma estrutura intimamente relacionada aos processos de memória) que a estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos produz um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. O aumento pode durar algumas horas em animais anestesiados ou vários dias ou mesmo meses em animais acordados. Este fenômeno foi denominado pelos pesquisadores de potenciação de longa duração (*long-term potentiation- LTP*). Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação do sistema nervoso, cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo ou numa analogia, depende do “treinamento” e, portanto, de um processo de aprendizagem. Esses fenômenos seriam a base para a teoria neuropsicológica proposta por Hebb. A ativação repetitiva dos receptores NMDA causa LTP (*long term*

potentiation) (Bliss & Lomo, 1973; Chapman *et al.*, 1990). LTP pode ser definido como uma forma de memória ou mecanismo de memória, é importante no hipocampo e amígdala (Clugnet & Le Doux, 1990), ambas as estruturas estão envolvidas no processamento dos estágios iniciais da memória (consolidação) e também no córtex, onde se acredita ser o sítio de estocagem da memória (Izquierdo, 1989; Keller *et al.*, 1990). Algumas memórias tais como olfativa e espacial podem ser localizadas no hipocampo (Morris *et al.*, 1986; Staubli *et al.*, 1989). Animais e pacientes com ablação do hipocampo e amígdala não perdem a memória já adquirida (memória retrógrada), mas se tornam incapazes de reter novos conhecimentos, eles podem adquirir informações e retê-las por segundos ou minutos, mas não se torna uma memória de longa duração.

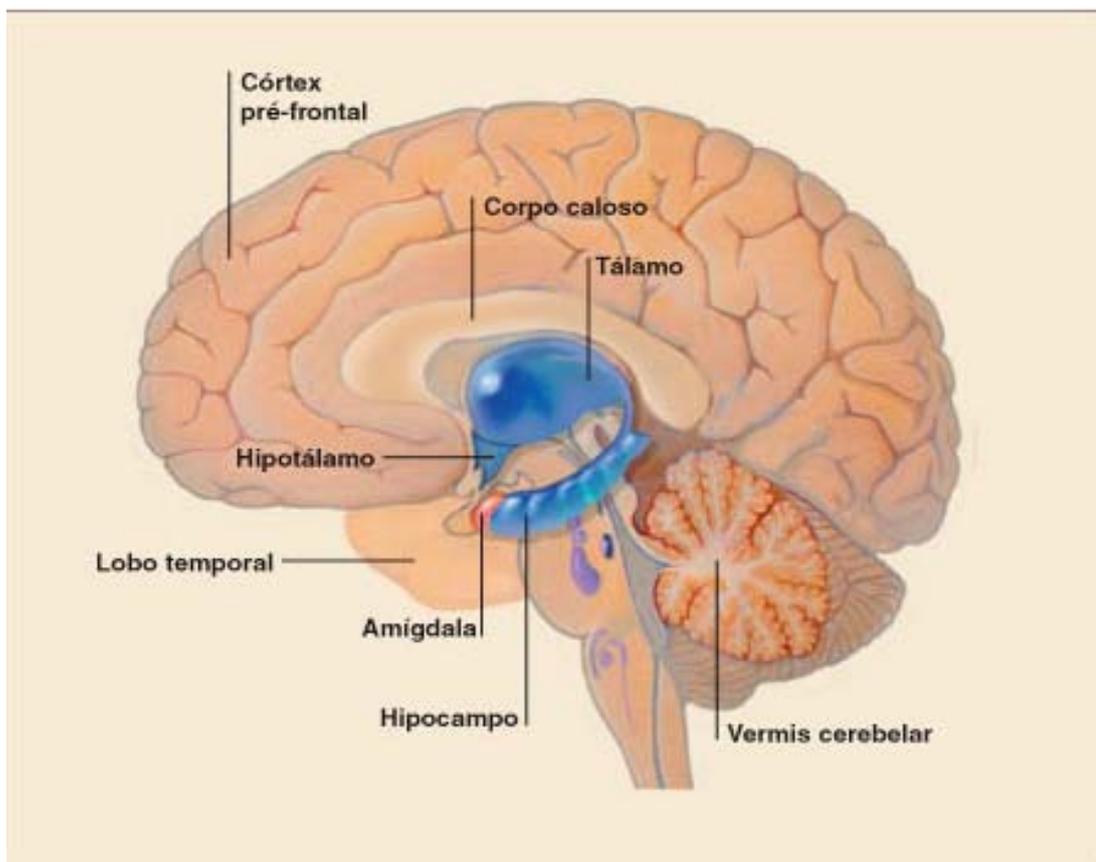


Figura 3 - Representação do Sistema Límbico. É um grupo de estruturas que inclui hipotálamo, tálamo, amígdala, hipocampo, os corpos mamilares e o giro do cíngulo. Todas estas áreas são muito importantes para a emoção e reações emocionais. O hipocampo também é importante para a memória e o aprendizado.

2.3. Papel do Sistema Límbico na Memória

Estudos farmacológicos e clínicos têm mostrado que a memória explícita ou declarativa é processada por estruturas no lobo temporal e suas conexões (Figura 3). Acredita-se que a memória implícita ou de procedimento (*procedural*) seja processada pelo núcleo estriado e/ou diencéfalo (Izquierdo, 1993c; Squire, 1987). Nem todas as memórias declarativas são processadas pelas mesmas estruturas (Cahil & McGaugh, 1990; Izquierdo & Medina, 1991; McDonald & White, 1994). Por exemplo, a memória da esquiva inibitória depende do hipocampo, amígdala e septo medial, a memória da habituação espacial depende somente do hipocampo (Izquierdo e cols, 1992, 1993a), e a memória de estímulo (susto) condicionado (Davis & Cassell, 1994) ou esquiva da água motivada pelo choque (Cahil & McGaugh, 1990) depende da amígdala. A amígdala (Brioni, 1993; Izquierdo e cols, 1992) e por extensão o septo medial (Izquierdo & Medina, 1991, Izquierdo e cols, 1993c) lidam com a memória de alerta, ansiedade ou aversividade associada com cada evento. O septo medial e o hipocampo processam a memória de trabalho e a memória espacial. O hipocampo também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em humanos (Brioni, 1993; Izquierdo, 1994a; Izquierdo *et. al.*, 1993c).

O córtex entorrinal (CE) está interconectado com o hipocampo, amígdala e septo medial por caminhos aferentes e eferentes mono e polisinápticos (Nieuwenhuys, 1985; Witter *et. al.*, 1989) e participa tanto da memória espacial, quanto do aprendizado da esquiva inibitória (Izquierdo, 1993; Zola-Morgan *et.al.*, 1989). O CE é à parte do cérebro onde lesões são mais comumente encontradas na doença de Alzheimer (Hyman e cols, 1990). As lesões são usadas como marcadores precoces desta doença e elas aumentam em número com a piora dos achados clínicos (De Leon *et.al.*, 1993). Estudos usando infusões de muscimol e AP5 no CE mostraram que o CE registra informações aprendidas no momento da aquisição, mas não é necessário para aquisição (Ferreira *et. al.*, 1992b), entretanto, o CE é necessário para o processo de

memória 90 a 180 minutos depois (tempo de consolidação), momento em que ele aparentemente integra memórias ou componentes da memória previamente processada pelo hipocampo e amígdala e septo medial (Ferreira *et al.*, 1992a, b). O núcleo estriado (McDonald & White, 1994; Packard & McGaugh, 1992) e o cerebelo (Thompson & Krupa, 1994) participam na estocagem e recuperação de alguns tipos de memórias, talvez para a exclusão de estruturas límbicas.

2.4. A Bioquímica da Formação da Memória e sua Regulação por Hormônios e Neuromoduladores

Dados recentes têm mostrado que a bioquímica da formação e estocagem da memória declarativa envolve uma cascata de eventos em áreas específicas do cérebro que é similar às áreas da LTP no hipocampo (Baudry & Massicotte, 1992; Izquierdo, 1994; Izquierdo e Medina, 1995; Maren & Baudry, 1995; Sossin, 1996). A cascata bioquímica da memória tem sido estudada no hipocampo em conexão com a esquiva inibitória (Izquierdo & Medina, 1995), muitos achados sugerem que ocorre na amígdala, septo medial e córtex entorrinal (Izquierdo & Medina, 1995). O envolvimento de uma ou outra área depende da tarefa. Na esquiva inibitória, todas estas áreas participam de maneira coordenada ou sequencial, em outras tarefas, como habituação a um novo ambiente, a amígdala e/ou o septo medial não estão aparentemente envolvidos (Brioni, 1993; Izquierdo, 1994; Zanatta *et. al.* 1996). A memória certamente não é formada ou consolidada somente em uma região (Da Cunha *et al.* 1992), se ela é estocada por longos períodos após aquisição em áreas restritas, é razão de debate e estudos intensos. O local ou locais envolvidos nesta estocagem varia grandemente com a natureza da informação e provavelmente muda com o tempo (Zanatta *et. al.*, 1996) (Figura 4).

A cascata bioquímica envolve, primeiro uma ativação dos receptores AMPA, algumas vezes NMDA ou metabotrópicos, seguidos por uma entrada pré e pós-sináptica de cálcio, que em muitos casos ocorre através do canal formado pelo

receptor NMDA e em outros, através do canal de cálcio dependente de voltagem (Izquierdo & Medina, 1995; Nicoll & Malenka, 1995; Riedel, 1996). A associação como os mecanismos de liberação de óxido nítrico (NO) e do fator ativador de plaquetas (PAF), aumenta a liberação pré-sináptica de glutamato. Estes eventos são seguidos por um rápido aumento nos níveis de GMP cíclico (GMPc) pós-sináptico, um lento aumento do AMP cíclico (AMPc) (Huang et al. 1994; Bernabeu et al. 1996), por uma ativação pré e pós-sináptica da proteína quinase A e C e cálcio-calmodulina quinase II (Reymann, 1993) e pela fosforilação de uma variedade de proteínas, incluindo as subunidades do receptor NMDA (Koga et al. 1996) e da transcrição do gene de transcrição do fator CREB (*c-AMP-responsive element binding protein*) (Yin & Tully, 1996), entre outros. A ativação gênica leva a síntese protéica que é necessária para a manutenção duradoura da LTP e da memória (Dunn, 1980; Huang et al., 1994; Yin & Tully, 1996) (Figura 5).

Os eventos iniciais desta cascata (ativação do receptor de glutamato) são bloqueados por agonistas do receptor GABA_A (Brioni, 1993) e são modulados pelas sinapses colinérgicas muscarínicas e β -noradrenérgicas (Izquierdo et al., 1992). Além disso, os receptores GABA_A são modulados por substâncias endógenas benzodiazepínicas-símile (Wolfman et al., 1991). Os eventos tardios (3 ou 6h após a ativação inicial dos receptores glutamatérgicos) são modulados por mecanismos dopaminérgicos, primeiro descritos por Grecksch e Matthies (1982). Em particular a última fase, que é dependente da síntese da proteína quinase A e CREB, é modulada pelos receptores D₁/D₂, tanto no caso da LTP na região CA₁ hipocampal (Huang et al., 1994), como no processamento da memória pelo hipocampo. Estes últimos eventos não ocorrem se a atividade da proteína quinase é inibida (Reymann, 1993; Izquierdo & Medina, 1995). Inibidores de síntese protéica ou a perda de genes que codificam algumas formas de CREB tem um efeito “abortivo” na LTP (Huang et al., 1994; Yin & Tully, 1996).

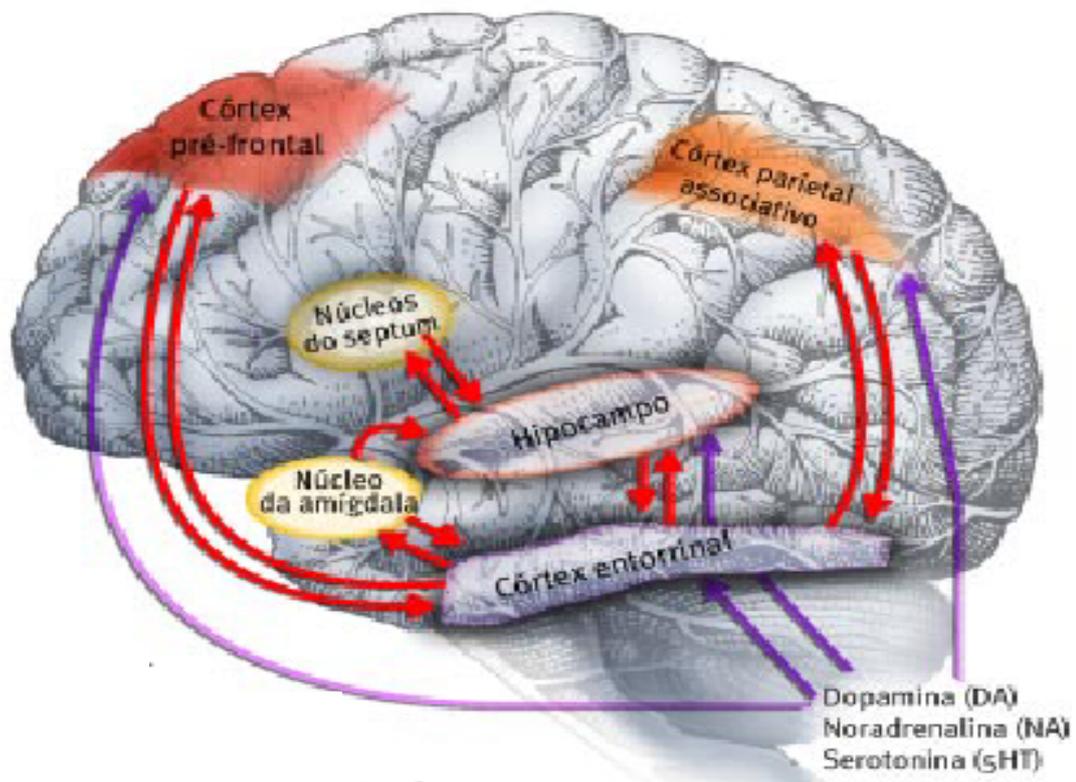


Figura 4 - Principais áreas envolvidas na formação de memórias declarativas de curta e de longa duração, e suas principais conexões (linhas vermelhas mostram a interconexão entre as áreas cerebrais, e as demais linhas mostram a ação dos neurotransmissores sobre as mesmas áreas cerebrais). Fonte: Revista Ciência Hoje. Abril-1999.

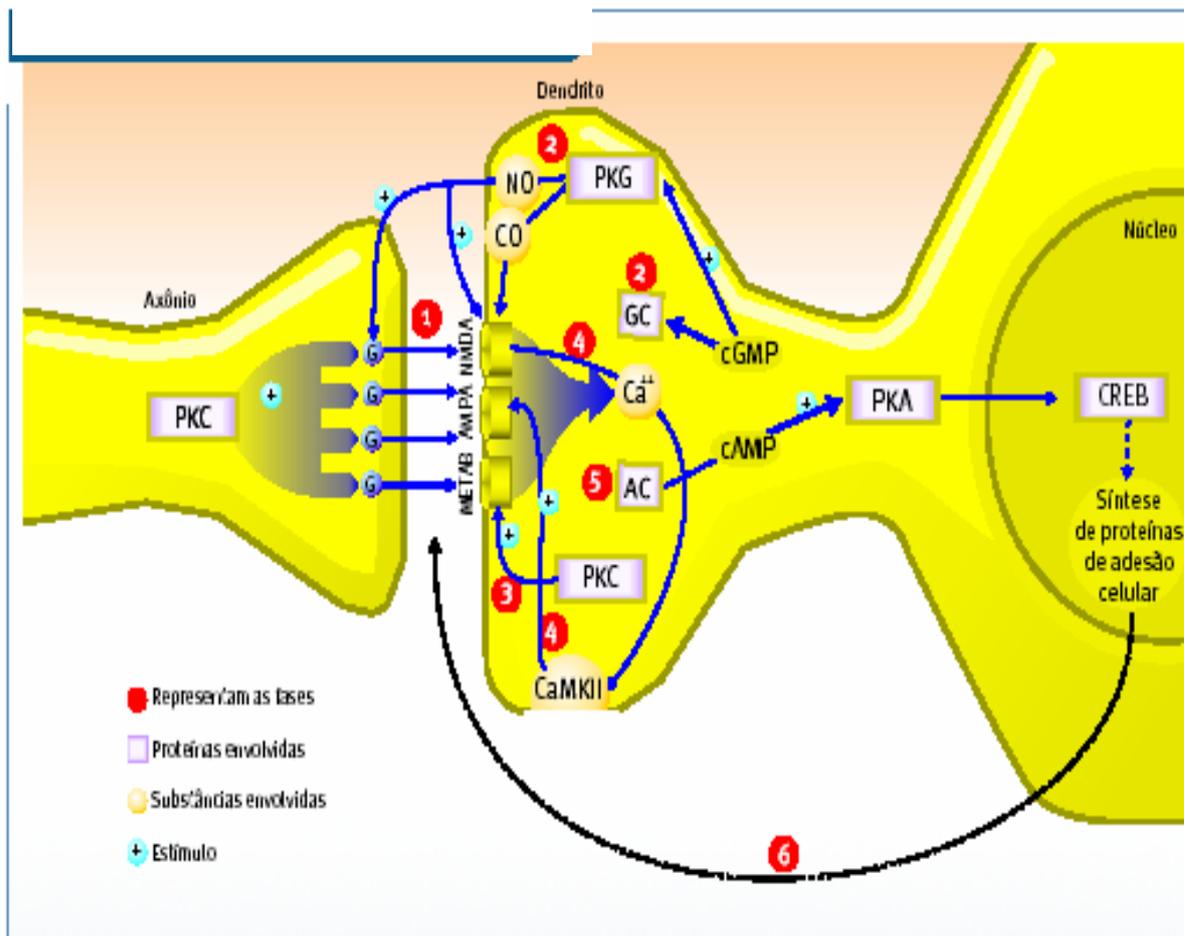


Figura 5 - Principais sistemas bioquímicos necessários para a formação de memórias declarativas na região CA1 do hipocampo. O processo dura de três a seis horas. Fonte: Revista Ciência Hoje. Abril-1999.

De maneira geral, para que um estímulo chegue com sucesso a seu destino no cérebro, é necessário que a informação seja passada de célula a célula. Isto é feito com a ajuda de neurotransmissores. Os neurotransmissores são moléculas lançadas nas sinapses (espaço entre dois neurônios) que, ao se ligarem a receptores específicos presentes na membrana da célula a ser estimulada, desencadeiam uma cascata de reações bioquímicas. O ácido glutâmico (G) é o neurotransmissor que desempenha papel-chave na construção da memória de longa duração. Ao se ligar a seus receptores (METAB, AMPA e NMDA) – fase 1 – o ácido glutâmico ativa uma enzima celular chamada guanililciclase que, por sua vez, passa a

produzir o guanilil-monofosfato cíclico (cGMP), que atua como segundo mensageiro. Este ativa a proteína quinase G (PKG) que interage com as enzimas que produzem óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) (fase 2).

Esses gases estimulam fortemente a ação do ácido glutâmico (G) tanto em nível pré-sináptico – agindo na célula que liberou esse neurotransmissor – como em nível pós-sináptico, isto é, na célula que liga o neurotransmissor. A ação do NO e do CO dura de segundos a minutos. Além dessa cascata de reações, a ligação do ácido glutâmico a seu receptor na membrana também é capaz de ativar outra proteína – a proteína quinase C (PKC). Esta também tem o papel de favorecer a transmissão glutamatérgica mantendo-a por pelo menos meia hora (fase 3). A ligação do ácido glutâmico a seu receptor (NMDA) promove o aumento do cálcio intracelular (Ca^{++}). Este íon ativa uma proteína quinase dependente de cálcio (CaMKII), que atua diretamente sobre um receptor específico do ácido glutâmico (AMPA), cuja ação se estende por mais três horas (fase 4). Entretanto, para que aquele estímulo ora recebido seja fixado para constituir uma memória de longa duração, é necessário que proteínas envolvidas na adesão celular ‘sedimentem’ as sinapses recém-estimuladas. Para isso, é necessário que o ácido glutâmico ative a adenilil-ciclase (AC) – enzima que produz outro segundo mensageiro, o AMP cíclico (cAMP), que por sua vez ativa uma outra proteína quinase (PKA) – fase 5. Esta ativa as proteínas nucleares CREB que regulam a transcrição gênica de diversas proteínas, entre elas proteínas de adesão celular. Essa seqüência de eventos dependentes de CREB começa a atuar umas três horas depois da aquisição de cada memória e se estende até umas seis horas. A chegada de proteínas de adesão àquela sinapse causa alterações morfológicas (crescimento ou diminuição) cinco a sete horas após a aquisição (fase 6). (CIÊNCIA HOJE. Os Labirintos da Memória • vol . 25 • Abril, n ° 148, pág. 42, 1999).

Além dos sistemas já mencionados, uma variedade de sistemas centrais e periféricos altera a formação da memória no período pós-treino imediato: β -endorfinas cerebrais e outros opióides, influenciam nicotínicas colinérgicas,

serotonina, adrenocorticotropina, vasopressina, oxitocina, glicocorticóides, adrenalina e glicose (Izquierdo, 1989; Bohus, 1994; Cahil & McGaugh, 1996; Gold, 1991, 1995; Grigoryan et al., 1996; Izquierdo & Medina, 1995). A maioria destas substâncias é liberada no cérebro ou fora dele durante muitas formas de treinamento comportamental, o que significa que muitas ou a maioria das formas de memória são atualmente formadas sob a sua influência (Zornetzer, 1978; Izquierdo, 1989). Agentes colinérgicos alteram a atividade da proteína quinase A, catecolaminas influenciam os níveis de AMPc e assim a atividade da proteína quinase A (Gold, 1995). Enquanto que a vasopressina e a corticotropina influenciam os níveis de catecolaminas cerebrais (De Wied & Bohus, 1979).

Vários dos processos modulatórios que acompanham o aprendizado e a consolidação da memória interagem um com outro. Assim, as β -endorfinas exercem geralmente efeitos amnésicos através de influências sobre sinapses β -noradrenérgicas e D₂-dopaminérgicas na amígdala (McMaugh, 1989), infusões intraseptais de β -endorfinas são também amnésicas (Bostock et al., 1988). Interações colinérgicas muscarínicas e β -noradrenérgicas na amígdala (Dalmaz et al., 1993; Introini-Collison et al., 1996) e no hipocampo e septo medial (Izquierdo et al., 1992), relevante para a modulação da memória já foram descritas. Existem fortes evidências de que a corticotropina (Gold, 1991), glicocorticóides (Roozendaal & McGaugh, 1996) vasopressina e ocitocina (De Wied & Bohus, 1979) causam seus efeitos na memória através de interações com mecanismos noradrenérgicos na amígdala e hipocampo. Existem receptores específicos para os glicocorticóides no hipocampo, amígdala e outras regiões do cérebro e evidências indicam que no mínimo em parte seus efeitos na memória podem ser diretamente através destes receptores (De Kloet et al., 1991; Mcewen & Sapolsky, 1995; Roozental & McGaugh, 1996). Opióides e antagonistas opióides administrados periféricamente alteram a memória principalmente através de influências na amígdala (McGaugh, 1989; Izquierdo, 1989). Os níveis de epinefrina periférica regulam a glicemia e o aumento na glicose sanguínea mimetiza os efeitos facilitatórios da epinefrina na

memória (Gold, 1995; Gold & McMarty, 1995) e aumenta a LTP hipocampal (Gold et al., 1984). Estudos em humanos e animais demonstram que a glicose sanguínea é um dos maiores fatores modulatórios nos processos de memória e eventos neurais relacionados (Gold, 1995; Golg & McCarty, 1995).

É provável que as mudanças pós-treino reportadas nos níveis de nucleotídeos cíclicos (Bernabeu et al., 1996), atividade da proteína quinase (Bernabeu et al., 1997), ligação ao receptor AMPA (Cammara et al., 1995; Tocco et al., 1991) e síntese protéica (Dunn, 1980; Izquierdo et al., 1993), sejam efeitos secundários dos fatores modulatórios. Em particular, aumentos na síntese protéica que ocorrem em várias regiões do cérebro após o treinamento, podem ser abolidos após adrenalectomia e mimitizados pela administração intracerebral de corticotropina e adrenalina (Dunn, 1980; Izquierdo et al., 1983). A relevância das influências modulatórias em cada região do cérebro obviamente depende do tipo de memória sendo processada. O hipocampo é um sítio de ação de influências modulatórias em muitos tipos de memória ou componentes de memória: espacial, verbal e contextual, entre outros (Bechara et al., 1995; Izquierdo & Medina, 1995). A amígdala (Bechara et al., 1995; Izquierdo et al., 1992; Young et al., 1995) e o septo medial (Davis, 1992; Izquierdo & Medina, 1995) são implicadas nos aspectos da memória emocional e aversiva. além disso, o septo medial está envolvido na memória espacial (Bostock et al., 1988; Brioni et al., 1990).

Alguns dados sugerem que o papel principal da amígdala pode ser realmente modular memórias estabelecidas no hipocampo e outros locais, particularmente no núcleo caudato (Cahil & McGaugh, 1996; McGaugh et al., 1995). O córtex entorrinal e parietal parecem estar envolvidos nos processos tardios de uma variedade de memórias, possivelmente como integrador de dados previamente processados pelo hipocampo, amígdala e septo medial (Zanatta et al., 1996). Hipocampo, amígdala, septo e neocórtex são conhecidos por receber inervação noradrenérgica, dopaminérgica e colinérgica e cuja falência pode ser atribuída a um papel na gênese de distúrbios de memória relacionados à idade ou a doenças

degenerativas do cérebro, tais como, Parkinson e Alzheimer (Winblad et al., 1985; Izquierdo et al., 1992). É conhecido que a mais simples forma de aprendizagem e memória está situada em mais de uma estrutura. A habituação da exploração de um ambiente fechado requer o hipocampo e o córtex entorrinal e não a amígdala ou o septo (Izquierdo et al., 1992; Izquierdo & Medina, 1995). A esquiva inibitória requer as quatro estruturas e subseqüentemente o córtex parietal posterior (Izquierdo et al., 1992; Izquierdo & Medina, 1995; Zanatta et al., 1996). O condicionamento de piscar os olhos (*eye-blink*) é formado em um circuito que envolve principalmente o cerebelo (Thompson & Krupa, 1994), mas é acompanhado por mudanças na ligação ao receptor AMPA no hipocampo (Tocco *et al.*, 1991) que são muito similares aos descritos para a esquiva inibitória (Cammarota *et al.*, 1995) ou LTP (Tocco *et al.*, 1991). O susto condicionado necessita da amígdala antes do hipocampo, mas requer a ativação de um complexo circuito (Davis, 1992). Ele pode ser atenuado pelo condicionamento alimentar Pavloviano, indicando que muitos caminhos diferentes são usualmente empregados neste tipo de aprendizado (Schmid *et al.*, 1995).

Componentes separados de tarefas de aprendizado estão sendo reconhecidos e cada um pode requerer diferentes estruturas cerebrais e envolver diferentes mecanismos neurais (Grant & Silva, 1994; Izquierdo & Medina, 1995; McGaugh et al., 1995), e recentemente um componente espacial da tarefa do labirinto aquático, insensível ao AP5 foi descrito (Bannerman et al., 1995). O estudo das influências dos sistemas modulatórios na cadeia bioquímica de eventos durante a plasticidade cerebral e memória pode abrir caminho não somente para um melhor conhecimento da memória, mas também para o tratamento de suas desordens e de uma variedade de doenças cerebrais que são acompanhadas de distúrbios de cognição.

3. ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL

3.1. Generalidades

A isquemia cerebral pode ser desencadeada através da oclusão de vasos cervico-cranianos ou por hipoperfusão para o cérebro, causada por variados processos: arterotrombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas. A arterotrombose ocorre nas artérias cervico-cranianas e nas pequenas artérias penetrantes intracranianas. Nesta condição, um trombo é formado *in situ* em um estreitamento arterial aterosclerótico que impede o fluxo sanguíneo distal e causa isquemia e conseqüente infarto do tecido cerebral suprido pelo vaso ocluído. Na embolia cerebral, a artéria cerebral é subitamente bloqueada pelo material embólico que é geralmente um trombo que se desenvolveu mais proximamente ao coração (cardiogênica), aorta ou artérias mais proximais (intra-arterial). O material embólico também pode ser de origem gasosa, gordurosa, infecciosa (vegetações bacterianas na endocardite) ou de fragmentos calcificados de válvulas cardíacas. A outra normalidade associada à isquemia cerebral é a hipoperfusão sistêmica que é caracterizada por fluxo sanguíneo cerebral criticamente diminuído causado por falência cardíaca ou hipovolemia que leva a uma redução global no fluxo sanguíneo, enquanto a isquemia cerebral de origem arterotrombótica ou embólica leva a diminuição localizada ou focal do fluxo sanguíneo cerebral.

3.2. Isquemia cerebral: Conceito de núcleo e penumbra

A isquemia cerebral pode ser global ou focal. A isquemia global é encontrada durante situações tais como parada cardíaca, enquanto a isquemia focal é encontrada durante falência do suprimento sanguíneo a uma parte restrita do cérebro. Experiências com pacientes que se recuperaram de um insulto vascular mostraram que

não é um fenômeno “tudo ou nada”. Uma consideração sobre fluxo sanguíneo cerebral (FSC) é importante para se entender a evolução e conseqüências do ataque isquêmico focal. Quando a autoregulação é perdida, o FSC varia com a pressão de perfusão. Se a taxa do FSC cai a um terço do normal, existe uma perda da excitabilidade elétrica (Hossmann, 1994), entretanto a homeostase iônica não é perdida até o FSC cair abaixo de um quarto do normal, esta falência na membrana vai resultar na perda do fluxo de íons e na morte dos neurônios dentro de minutos. O limiar para redução da síntese protéica e o desenvolvimento de edema ou acidose é alcançado mais cedo que o limiar para a falência da excitabilidade elétrica. A penumbra isquêmica é definida como a zona de tecido adjacente à zona central (*core*) de infarto isquêmico (Hakim, 1987; Ginsberg & Pulsinelli, 1994). A zona central contém neurônios necróticos, como uma conseqüência da falência da membrana, enquanto a penumbra geralmente contém neurônios eletricamente silentes (que não respondem ao estímulo elétrico), com seus gradientes iônicos intactos e com neurônios que podem ter suas membranas despolarizadas se o fluxo sanguíneo for restaurado a tempo (Hogan & Hakim, 1992). Os neurônios perifocais na zona de penumbra são os de mais alto risco e com o tempo a zona de infarto vai crescer em tamanho, com mais células da penumbra sendo recrutadas para a zona central. O período de tempo deste processo de recrutamento constitui um período crítico, em que a onda de tecido necrótico pode ser bloqueada pela intervenção farmacológica. Esta janela terapêutica corresponde as primeiras 2 a 4 horas que se segue ao derrame, após as quais a eficácia da terapêutica decresce rapidamente (Ginsberg & Pulsinelli, 1994).

Diversos mecanismos estariam envolvidos na produção de lesões cerebrais após isquemia e reperfusão, à semelhança de diversos outros órgãos (Guyton AC.; 1996). Dentre esses mecanismos, poder-se-iam destacar as lesões causadas por metabólitos de ácidos graxos livres, por metabólitos das purinas, por formação de óxido nítrico e por ação de leucócitos. O estudo de drogas antioxidantes e de bloqueadoras de radicais livres auxiliaria na compreensão das diversas reações bioquímicas e dos possíveis caminhos seguidos por esses metabólitos no desencadeamento das lesões.

Embora os mecanismos dos danos provocados pela isquemia cerebral não tenham sido claramente determinados, evidências experimentais acumuladas sugerem que a produção de radicais livres seja possivelmente um dos principais fatores envolvidos (Flamm *et al.*, 1978; Siesjö *et al.*, 1989; Siesjö *et al.*, 1992). Vários trabalhos têm demonstrado que a produção de radicais livres durante a isquemia representa um papel importante no desenvolvimento do dano neuronal (Chan, 1992; Kinouchi *et al.*, 1991; Kitagawa *et al.*, 1990).

3.3. Mecanismos de dano neuronal induzidos por isquemia e reperfusão

3.3.1. Depleção de oxigênio e ATP

Durante a fase de isquemia, ocorre diminuição do aporte de oxigênio para o tecido acometido, levando à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e à queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP). O metabolismo anaeróbico supre o ATP por um curto período de tempo, levando a acidose tecidual. No entanto, o consumo do estoque de ATP continuaria e seria degradado a adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) e, posteriormente, a adenosina, inosina e hipoxantina (Yoshida WB, 2002). A falta de energia celular causaria a falência da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) e, devido à falência da bomba, passaria a haver maior acúmulo de Na^+ intracelular e perda de K^+ para fora da célula, com conseqüente edema da célula e de suas organelas. Concomitantemente, estaria ocorrendo influxo de Ca^{++} e de cloreto para o meio intracelular (Bralet J *et al.*, 1987; Traystman *et al.*, 1991; Lipton P., 1999). O aumento da ativação dos receptores NMDA pelo glutamato causa também um grande influxo de cálcio, o que ativa a bomba de cálcio aumentando mais ainda a depleção de ATP. Sem o ATP a célula perde sua habilidade de manter a homeostase, entretanto outro efeito é o acúmulo de produtos metabólicos tais como a adenosina (Sweeney, 1995). Inicialmente o aumento da adenosina extracelular é neuroprotetor, entretanto, uma exposição prolongada (>3h), causa “dwnregulation” dos receptores da adenosina do tipo A1, exacerbando a morte neuronal (Onodera & Kogure, 1990).

3.3.2. Mudança iônica

Durante a isquemia ocorre uma alcalinização nos astrócitos por influxo de bicarbonato e conseqüente acidificação extracelular e neuronal (Chesler & Kraig, 1989). É conhecido que uma moderada acidose tem um efeito protetor para os neurônios, pois inibe as reações enzimáticas, a atividade dos canais (Balestrino & Somjem, 1988) e modera o aumento de cálcio intracelular que se segue ao aumento do glutamato (Ou-Yang et al. 1994). Entretanto a acidose reduz a quebra do ATP, isto contribui para a depleção energética, acarretando uma lenta e contínua despolarização nos astrócitos devido ao vazamento de corrente que não é compensada pela atividade da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. Esta despolarização abre canais dependentes de voltagem, aumentando o fluxo de K^+ , Cl^- e HCO_3^- , e conseqüente inchaço do astrócito por aumento da entrada de água (Harol & Walz, 1992).

3.3.3. Glutamato e Cálcio

Já está bem demonstrado que a grande liberação de glutamato, com o aumento de Ca^{++} intracelular desempenha um papel importante na morte neuronal vista na isquemia cerebral (Lipton & Rosenberg, 1994; Choi, 1995, 1993; Choi *et al.*, 1998). O aumento no Ca^{++} é devido principalmente ao influxo através de canais voltagem-dependente e canais acoplado ao receptor NMDA. Este grande aumento no cálcio intracelular tem várias conseqüências (Morley et al. 1994), entre elas: ativação de enzimas hidrolíticas, resultando em dano intracelular; ativação de segundos mensageiros, com mudanças na expressão gênica e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente na zona da penumbra.

3.3.4. Espécies reativas de oxigênio, lipólise e peroxidação lipídica.

Na estrutura dos átomos e das moléculas, os elétrons associam-se normalmente em pares. Define-se *radicais livres* ou *espécies reativas* (RLs) espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados (Clark, 2002). A presença de elétrons não pareados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química. Além disso, essa característica confere-lhes grande instabilidade, por tenderem a acoplar o elétron não pareado com um outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como receptores (*oxidantes*) ou como doadores (*redutores*) de elétrons. Os RLs podem ser eletricamente neutros, terem carga positiva ou negativa. O mais simples é representado por um átomo de hidrogênio com um próton e um único elétron. O *oxigênio* é o principal fornecedor de RLs. Além deste, são exemplos de RLs o superóxido, os radicais hidroxila, do óxido nítrico e do ácido hipoclorito. São produzidos principalmente por eosinófilos, neutrófilos e células endoteliais. Os principais indutores de sua produção pelos neutrófilos são os microorganismos fagocitados, contribuindo também para a liberação em menor escala os complexos imunes, o ácido aracdônico, os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (Halliwell, 1997).

Radicais livres de oxigênio

Os RLs tomam parte na destruição de microorganismos durante o processo de fagocitose, mecanismo essencial na defesa contra infecções, e atuam como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo à apoptose. Quanto aos efeitos adversos, sua produção tem sido implicada na carcinogênese, na progressão de doenças cardiovasculares, na patogênese da sepse e doenças oculares (catarata e degeneração macular), em complicações do *diabetes mellitus*, disfunções cognitivas associadas ao envelhecimento e também na isquemia tecidual seguida de reperfusão que ocorre em procedimentos cirúrgicos (Clark, 2002).

O superóxido é gerado pela reação entre moléculas de substâncias que participam da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e no retículo endoplasmático e outras (como as catecolaminas e os tetrahidrofolatos) com o

oxigênio, em decorrência do metabolismo aeróbico. Apenas uma pequena fração do oxigênio inspirado é utilizada para fabricar radicais superóxido gerados por acidentes químicos, conseqüência natural da existência no organismo de moléculas que necessitam de oxigênio. As células fagocitárias produzem superóxido como parte do mecanismo de defesa imunológica para eliminar microorganismos patogênicos; nas doenças inflamatórias crônicas esta produção torna-se excessiva, provocando lesões nos tecidos.

Se o O_2 é parcialmente reduzido pela recepção de dois elétrons, o produto é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); se receber apenas um elétron, o produto será o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O H_2O_2 não é considerado um verdadeiro RL, por ter sua órbita externa pareada, porém por ser uma substância altamente hidrossolúvel e penetrar facilmente na célula, age como precursor da formação de outros RLs. O H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ são extremamente tóxicos porque atacam os ácidos graxos das membranas celulares, causando lesão celular. Sua toxicidade se deve, em grande parte, à conversão em radical hidroxila (OH^{\bullet}). Radicais livres como OH^{\bullet} são altamente lesivos, causando quebra e modificações nas bases de DNA levando a alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica e conseqüente prejuízo do transporte intercelular. A peroxidação lipídica produzida nas paredes do endotélio vascular contribui para a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Halliwell, 1997).

Radicais livres de nitrogênio

Além do oxigênio, o nitrogênio também participa da estrutura dos RLs, em especial o óxido nítrico, cujo precursor é a L-arginina. Entre suas principais funções destacam-se a regulação da pressão arterial e a sinalização intercelular. Seu efeito tóxico, como RL, contribui de modo importante para a lesão tecidual que ocorre nos processos inflamatórios crônicos e também na sepse.

O óxido nítrico é sintetizado a partir da arginina por ação da óxido nítrico sintetase (NOS), enzima presente no endotélio e nos macrófagos. Promove relaxamento do endotélio vascular (vasodilatação com redução da resistência periférica), inibe agregação plaquetária e desempenha importante papel na síndrome de lesão por isquemia-reperfusão. Tem meia vida muito curta, em torno de milésimos de segundo, podendo rapidamente se converter em RL, com efeito, vasoconstritor, anulado pela presença de vitamina C, que recupera o óxido nítrico. Além da situação de reperfusão pós-isquemia, a superprodução de óxido nítrico por macrófagos durante a inflamação tem sido implicada no choque séptico e em outros processos crônicos relacionados à presença de macrófagos ativados (Clark, 2002; Roth, 1998). A enzima superóxido-dismutase (SOD) previne a conversão do óxido nítrico em suas formas oxidativas, apresentando efeito sinérgico com a L-arginina.

Estresse oxidativo

Mais de 95% do oxigênio consumido durante o metabolismo aeróbico é utilizado nas mitocôndrias para produção de energia; o restante não é completamente oxidado em água, produzindo RLs, que são tóxicos (Clark, 2002; Grimble, 1994). Aos efeitos nocivos das reações de oxidação induzidas pelos RLs e capazes de lesar as estruturas dos sistemas biológicos dá-se o nome de estresse oxidativo. Pode resultar do excesso na produção oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes. O estresse oxidativo pode ser benéfico nos casos de infecção, quando ocorre produção de RLs por células fagocitárias para matar microorganismos invasores. Passa a ser prejudicial quando a inflamação se torna sistêmica, como na sepse, em que a perda de controle da produção de RLs pode causar lesão à distância.

Os RLs lesam a célula de modo direto ou danificam os ácidos nucléicos e as proteínas, tornando-os mais suscetíveis à degradação. Além de seu efeito citotóxico, atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias. Um exemplo é a ativação do fator nuclear *kappa* B (NF *kappa* B), induzida pelo

peróxido de hidrogênio e bloqueada por vários antioxidantes, incluindo a vitamina E. O NF *kappa* B é um fator central de transcrição, envolvido na regulação de numerosos genes pro-inflamatórios, incluindo muitas citocinas (fator de necrose tumoral, interleucinas 1, 6, 8 e 2), fatores de crescimento hematopoiéticos, moléculas de adesão celular e óxido nítrico sintetase. Esse fator nuclear é considerado um importante mediador no sinal de transdução para endotoxinas e atividade inflamatória induzida por citocinas (Grimble, 1994).

Citocinas

As citocinas são glicoproteínas que atuam como mensageiros intercelulares do sistema imunológico, tendo sua produção ativada em resposta a vários estímulos. Até o momento, são conhecidas 18 interleucinas (entre elas IL-1, IL-2, IL-6) e seis fatores mediadores estimulantes da resposta inflamatória e metabólica, entre eles o fator de necrose tumoral (TNF- α) e os fatores de crescimento transformadores (TGF a e b). Entre os efeitos das citocinas pró-inflamatórias podem ser mencionados:

1) ativação das células do sistema imune, estimulando a produção de citocinas de efeito imunomodulador (IL2, IL4, IL-8, TGF-b);

2) auxílio na eliminação de microorganismos invasores pelo aumento da produção de moléculas antioxidantes, da temperatura corpórea e da velocidade dos processos biológicos;

3) interferência em processos metabólicos como proteólise muscular, lipólise, gliconeogênese; mudança da prioridade da síntese de proteínas pelo fígado, o que leva ao aumento da síntese de proteína C reativa em detrimento de proteínas de transporte como albumina, por exemplo, (Grimble, 1994).

Se as citocinas têm papel benéfico na resposta metabólica e inflamatória por aumentarem a disponibilidade de substratos energéticos e a velocidade dos processos biológicos, o aumento da sua produção em resposta ao trauma, doenças inflamatórias crônicas, aterosclerose e estresse psicológico geram RLs potencialmente tóxicos, que

por sua vez, podem aumentar ainda mais a produção de citocinas pela ativação do fator nuclear kappa B. Por outro lado, as citocinas pró-inflamatórias também ajudam as defesas antioxidantes, aumentando as atividades da SOD, catalase e glutathione peroxidase (Bulger & Maier, 2001; Kretzchmar *et al.*, 1998).

As citocinas, em especial IL-1, TNF- α , TNF- β e Interferon- δ estimulam a produção de RLS, fazendo-o em concentrações três a cinco vezes mais baixas que as necessárias para alguns eicosanóides, como os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária (Grimble, 2001).

Os radicais livres são lesivos através de uma variedade de mecanismos: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzimas; 3) alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; 4) direta inativação do óxido nítrico (NO) comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 5) formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com o NO; 6) ativação de citocinas como a interleucina-1. Dentro da luz de vasos reperfundidos os ânions superóxidos estimulam a agregação plaquetária e iniciam a liberação de variados fatores vasoconstritores, incluindo o ADP, o PAF, a serotonina e o tromboxane A₂ (Seccombe *et al.*, 1994). A evidência para um papel patofisiológico das ERO na degeneração neuronal induzida pelo derrame foi demonstrada por Hall (1993). Muito deste dano é mediado pelo radical hidroxil, com a produção de peróxidos lipídicos. As mudanças conformacionais nos ácidos graxos resultantes da peroxidação lipídica, alteraram a permeabilidade e fluidez da membrana, prejudicando as funções dos receptores, canais iônicos e outras proteínas que fazem parte da membrana (Freeman & Crapo, 1982). Os ácidos graxos livres e em particular, os ácidos araquidônicos livres, são liberados durante a isquemia cerebral, como consequência da atividade da fosfolipase C e A₂ (Drenth *et al.* 1976; Moskowitz *et al.* 1984), e elevadas concentrações destes ácidos graxos persistem após reperusão (Umemura 1990) podendo ser a maior fonte de ânion superóxido ($^{\circ}\text{O}_2^-$).

Esse acúmulo de Ca^{++} no citossol provocaria a ativação da protease calpaína, que, por sua vez, promoveria a quebra de uma ponte peptídica da enzima xantina desidrogenase (XD), levando à formação da enzima xantina oxidase (XO) (Traystman RJ *et al.*, 1991; Lipton P., 1999; Shaheen *et al.*, 1996; Watson , 1993; Beetsch *et al.*, 1998; Croall *et al.*, 1991). Diferentemente da XD, a XO necessita de oxigênio para realizar a conversão de hipoxantina em xantina. Na fase da isquemia, portanto, ocorreria acúmulo dessas duas substâncias. Com a reperfusão, a hipoxantina seria, então, oxidada em xantina e esta em ácido úrico, tendo como subproduto dessa reação a formação do ânion superóxido (Kontos , 2001.) (Figura 6).

Segundo Kontos (2001) , a produção de ânion superóxido, um radical livre, teria diversas origens: a via da ciclooxigenase; a oxidação de moléculas de hemoglobina e mioglobina, de componentes mitocondriais e de ácidos graxos insaturados; e a ação de enzimas, como a xantina oxidase. O superóxido é um oxidante fraco (Beckman *et al.*, 1990, 1991; Chan, 1996) e sua ação tóxica ocorreria, na verdade, mais em função dos produtos de sua redução, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila ($\text{HO}_2\cdot$) e o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), este último um potente agente oxidante. Esses radicais livres são as espécies reativas do oxigênio (ERO). Além disso, o aumento de cálcio intracelular, juntamente com o aumento de potássio extracelular, levaria à ativação das fosfolipases C e A, promovendo a degradação de fosfolipídios da membrana celular e liberando grande quantidade de ácidos graxos livres (AGL), principalmente, o ácido araquidônico (AA) cuja liberação estaria diretamente relacionada ao tempo de isquemia e ao local cerebral que é acometido (Bralet *et al.*, 1987; Traystman *et al.*, 1991; Lipton *et al.*, 1999; Gutteridge *et al.*, 1990). Na reperfusão, o AA acumulado durante a isquemia sofreria metabolização pelas vias da lipoxigenase e da ciclooxigenase, formando tromboxanos (vasoconstritores), prostaglandinas (vasodilatadoras) e superóxido. A lipoperoxidação também seria uma das importantes conseqüências da ação dos radicais livres. Trata-se de uma cadeia de reações que iniciaria com a retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo carbonometileno da cadeia lateral de uma molécula de ácido graxo livre (AGL), transformando-o, igualmente, em um radical livre ($\text{L}\cdot$) (Watson , 1993;

Beckman *et al.*, 1990; Gutteridge & Halliwell, 1990). Para estabilizar sua configuração, durante a reperfusão, esse L[•] reagiria com O₂, formando um radical peroxila, o qual sofreria a ação de diversos agentes, dentre eles o íon ferroso (Fe II), formando íon férrico (Fe III) e L[•] (Reação de Fenton). Assim, a partir dessas cadeias de reações, os AGL se transformariam em lipo-hidroperóxidos (Figura 7).

Ainda secundariamente ao aumento intracelular de cálcio na isquemia, haveria formação de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina (Moncada *et al.*, 1991; Klatt *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1995) pela ação do óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), Ca⁺⁺ dependente. Sabe-se que, nos neurônios e no endotélio vascular cerebral, apenas a cNOS é encontrada, sendo, hoje, chamada de nNOS nos neurônios e de ecNOS no endotélio vascular (Wong *et al.*, 1996). Nos períodos iniciais da isquemia, o Ca⁺⁺ seria importante no aumento da liberação de glutamato, um neurotransmissor excitatório que estaria aumentado no meio extracelular. Esse gradiente aumentado de glutamato extracelular na isquemia também seria um “precursor”, ou seja, fonte de radicais livres, para alterações que viriam a ocorrer na reperfusão (Lipton , 1999; Wong *et al.*, 1996; Nishizawa , 2001). A ativação de receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) levaria à ativação de nNOS com geração de óxido nítrico (NO) e subsequente vasodilatação (Kontos, 2001).

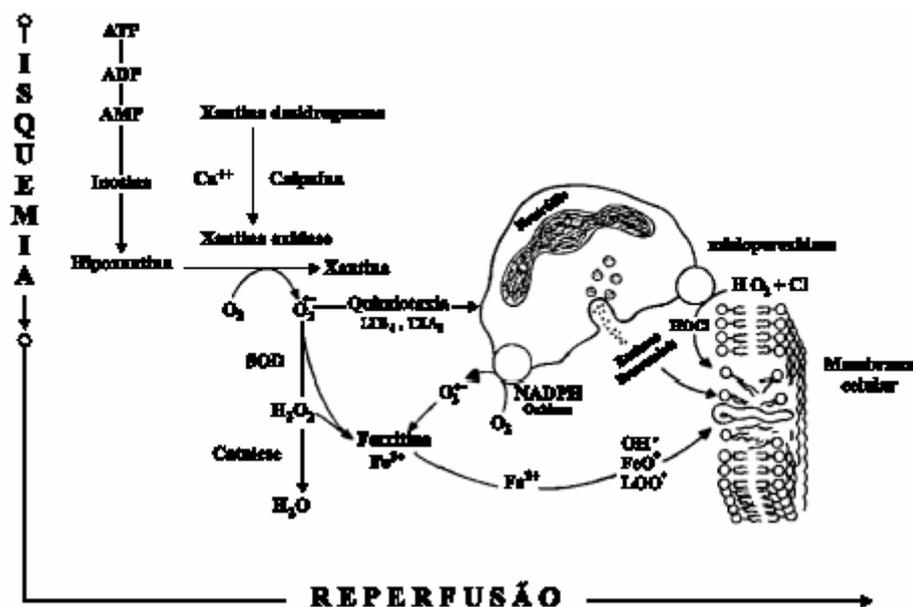


Figura 6 – Seqüência de eventos relacionados à isquemia e reperfusão (Yoshida *et al.*, 2002).

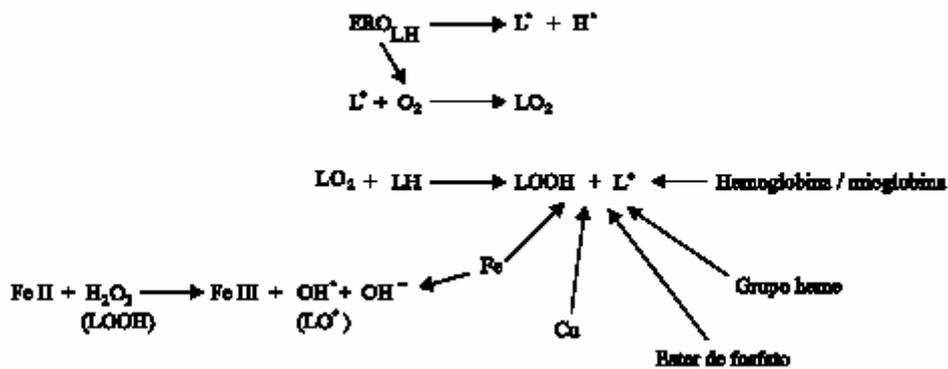


Figura 7 – Reações de lipoperoxidação

Contudo, quando da estimulação de receptores AMPA (ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasole-propiónico), haveria geração de superóxido, podendo ocorrer, assim, a interação do NO com radicais superóxido (Pou *et al.*, 1992), levando à formação de peroxinitrito, que se decomporia em radical hidroxila. Existem evidências de que os leucócitos também participariam das lesões de isquemia e reperfusão no cérebro. Supõe-se que, durante a isquemia, existiria ativação de leucócitos que ficariam presos na vasculatura cerebral e que passariam a liberar fatores quimiotáticos para leucotrienos (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄) na reperfusão.

Na reperfusão, os leucócitos poderiam, além de interagir com plaquetas, metabolizar o ácido araquidônico, levando, assim, à formação de lipoperoxídeos. Entretanto, a obstrução mecânica dos leucócitos nos capilares cerebrais não parece ter a mesma importância que nas lesões causadas por isquemia e reperfusão em outros tecidos. Estudos sobre o tratamento de I/R cerebral com drogas vasodilatadoras e com heparina demonstraram que o acúmulo de leucócitos não seria o responsável pela hipoperfusão (Kocanek *et al.*, 1987). Além dos leucócitos, as células da glia também seriam importantes nas lesões de isquemia e reperfusão cerebrais. Supõe-se que essas células, assim como os macrófagos, possuiriam também a iNOS (óxido nítrico sintase induzida), sendo, assim, produtoras de NO através de duas vias enzimáticas, uma Ca⁺⁺-independente (iNOS) e outra Ca⁺⁺-dependente (cNOS). Essas duas classes de fagócitos, os macrófagos e as células da glia também seriam responsáveis por

atividade citotóxica no cérebro. Em resumo, o aumento intracelular de Ca^{++} , causado pela falência das bombas de Na^+/K^+ na isquemia devido à falta de O_2 e ATP, poderia ocasionar:

- estímulo da proteína quinase C, levando à liberação de superóxido pelo endotélio e por neutrófilos;
- estímulo da fosfolipase C, causando quebra de fosfolípidios de membrana e aumento da quantidade de ácidos graxos livres, os quais vão entrar no metabolismo da lipoxigenase e da ciclooxygenase;
- ação nas células musculares lisas, levando a vasoconstrição na fase de reperfusão. Ativação da cNOS, transformando L-arginina em NO;
- quebra da ligação peptídica da xantina desidrogenase, formando xantina oxidase e tendo o superóxido como um subproduto. Por outro lado, assim como nos diversos outros tecidos, haveria um status antioxidante no cérebro, ou seja, um balanço entre a formação dos agentes pró-oxidantes, citados anteriormente, e a ação de substâncias antioxidantes, as quais são responsáveis pelo combate as ERO formadas na isquemia e reperfusão cerebral.

3.3.5. Sistemas antioxidantes

Sabe-se que existem muitos antioxidantes, dentre os quais as enzimas superóxido dismutase, responsáveis pela conversão de ânion superóxido em H_2O_2 , e a catalase, que transforma o peróxido de hidrogênio em O_2 e H_2O . Ambas agiriam como antioxidantes “preventivos”, evitando a formação de OH^\bullet . Da mesma forma que a catalase, a hemoglobina e a mioglobina agiriam convertendo H_2O_2 em O_2 e H_2O (De Bono, 1994). Um outro grupo antioxidante seria o “sistema glutaciona”, podendo este agir como preventivo ou como antioxidante de quebra de cadeia, ou seja, agiria reduzindo grupos oxidados por ERO e formas oxidadas por outros agentes antioxidantes (De Bono, 1994). Em vista de suas características particulares, o tecido cerebral seria suscetível às lesões por agentes oxidantes por possuir grandes reservas de ferro e altos níveis de lípidios poliinsaturados e por exibir uma escassa defesa

antioxidante (Weigand *et al.*,1999). Alguns autores (Almeida *et al.*, 1998; Anderson & Sims, 2002 e Lièvre *et al.*, 2001) ressaltaram que alterações na função do sistema glutathiona poderiam relacionar-se a uma maior suscetibilidade do tecido cerebral às lesões de isquemia e reperfusão. Almeida *et al.* (1998) observou depleção de glutathiona frente a sua exposição a neurotoxicidade do glutamato através do mecanismo que envolve a formação de NO. Anderson & Sims (2002) e Lièvre *et al.*(2001) também observaram diminuição da atividade da glutathiona relacionada à isquemia e reperfusão.

As células aeróbias são protegidas da ação do superóxido e do peróxido de hidrogênio pela ação da *superóxido-dismutase (SOD)*, uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e pela ação da *catalase*, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A SOD citoplasmática necessita da presença de cobre e zinco para agir e a mitocondrial, de manganês; já a catalase depende do ferro (Heitor & Sarni, 2003).

Além da catalase, outra enzima importante no controle dos peróxidos é a glutathiona peroxidase (GPX), que utiliza para sua ação a glutathiona (GSH), um tripeptídeo contendo cisteína, e representa o tiol não protéico mais abundante nas células de mamíferos. É substrato para as enzimas anti-oxidantes: *GSH transferases e peroxidases* (dependentes de selênio). As demais funções da GSH envolvem sua participação no estoque e transporte de cisteína, regulação do balanço "redox", metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, síntese de desoxirribonucleotídeos, função imune e proliferação celular. Suas múltiplas funções, em vários tecidos, têm sido documentadas na literatura, pelas inter-relações entre GSH tecidual, nutrição, estresse oxidativo e doença (Evans & Halliwell, 2001; Bray & Taylor, 1993; Nutall *et al.*, 1998).

3.3.6. Inibição da síntese protéica e apoptose

A supressão da síntese protéica após a isquemia foi reportada pela primeira vez em 1971 por Kleihues & Hossman, que observou um decréscimo de 30% na incorporação de aminoácidos após 4 h de reperfusão seguindo a isquemia. O mecanismo de translação no cérebro pós-isquemia não é homogêneo em todas as áreas do cérebro, no córtex, hipocampo (CA1 e hilo) e núcleo caudato ocorre uma severa e prolongada supressão da síntese, enquanto as regiões do giro denteado (hipocampo) e tronco cerebral são menos afetadas (Bodsch *et al.* 1985; Widmann *et al.* 1991). Embora os padrões na supressão da síntese protéica no cérebro estejam bem descritos, o mecanismo que causa a supressão não foram completamente entendidos até recentemente. A integridade do DNA (O’Neill *et al.* 1991; White *et al.* 1992), a maquinaria transcripcional (Lindvall *et al.* 1992; Matsumoto *et al.* 1990) o transporte e processamento do RNAm (Tiffany *et al.* 1995; Roberts & Morelos 1976) e a competência translacional dos ribossomos (De Gracia *et al.* 1993) estão preservados no início da reperfusão (Nowak *et al.* 1984), assim estes componentes não são responsáveis pela inibição da síntese protéica. Várias evidências são consistentes com a hipótese de que a supressão protéica é devida a inibição da iniciação da translação durante a reperfusão e foi sugerida uma modificação nos fatores de iniciação e bloqueio na formação do complexo de iniciação (Gaitero *et al.* 1988).

Decifrando o programa letal

Na grande maioria das células em apoptose observa-se a destruição do material genético, o ácido desoxirribonucléico DNA. Células eucariotas (com DNA contido em núcleo limitado por membrana) têm cromossomos formados por unidades repetitivas, os nucleossomas. Antes da morte da célula, o DNA é cortado por enzimas (endonucleases) em regiões específicas entre os nucleossomas. Como cada unidade

dessas tem cerca de duzentos pares de bases (nucleotídeos), os fragmentos de DNA gerados têm esse número de pares de bases ou múltiplos dele.

Várias proteínas são apontadas como "alvos" das caspases, mas ainda não foi estabelecida uma relação direta entre o corte dessas proteínas e a morte celular. O primeiro vínculo entre a ação de uma caspase e o corte do DNA foi constatado há pouco. A caspase 3 corta uma proteína (ICAD, de inibidor da caspase ativada DNase) normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e começa a cortar o DNA. Outra relação direta já identificada é o corte, também pela caspase 3, da gelsolina, proteína ligada aos filamentos de actina (parte do citoesqueleto, que mantém a estrutura normal da célula). Esse corte danifica os filamentos e a célula perde sua forma, o que leva a apoptose.

Os gatilhos do suicídio celular

A apoptose pode ser acionada por vários tipos de gatilhos. A ausência dos sinais químicos que mantêm a célula em atividade e multiplicação (os chamados fatores de crescimento) pode ser um deles. No caso da cauda do girino, o gatilho para o "suicídio" é o aumento da concentração do hormônio tiroxina, liberado por certas células da rã. Células expostas em laboratório a altas concentrações de tiroxina morrem mesmo que o animal não tenha chegado à fase adulta. No entanto, se as concentrações de tiroxina são mantidas abaixo dos níveis normais a cauda persiste, mesmo na rã adulta.

Dois exemplos interessantes de indução de apoptose estão no sistema imune. Um deles é a morte prematura de linfócitos T capazes de atacar o próprio organismo que os gerou. Originados na medula óssea, os linfócitos T "amadurecem" na glândula timo (daí o "T"), entram no sangue e no sistema linfático e passam a ter papel crucial na defesa contra microrganismos. Isso se dá por meio de moléculas receptoras produzidas em sua superfície, durante sua maturação, que "reconhecem"

substâncias estranhas e as combatem. Ainda no timo, porém, algumas dessas células produzem receptores que se ligam a substâncias do próprio organismo, o que levaria à auto-agressão, se elas fossem liberadas. Normalmente, porém, só saem do timo linfócitos que se ligam a componentes estranhos. Os demais, "inadequados", são selecionados e levados ao suicídio, graças à apoptose.

O outro exemplo está na ação dos linfócitos T chamados de "citotóxicos" contra uma infecção virótica. Os vírus só sobrevivem se estiverem dentro de uma célula. Eles usam a máquina celular para produzir suas próprias proteínas e gerar novos vírus, que invadem outras células sadias. Células infectadas, porém, expõem na superfície componentes do vírus, reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos. Com isso, o linfócito liga-se à célula-alvo e a bombardeia com pelo menos dois tipos de proteínas que, juntas, levam à morte celular (por necrose ou apoptose), evento descrito em 1991 em estudo do qual um dos autores (Young) participou.

Uma dessas proteínas é a perforina, que se insere na membrana celular e forma "poros" ("furos") que expõem o interior da célula, como demonstrado pelos autores, junto com outros grupos. O dano à membrana é suficiente para levar a célula a necrose. Outros grupos revelaram depois que a segunda proteína, a enzima granzima B, liga-se à superfície da célula-alvo e entra no citoplasma. Ali, essa enzima ativa a cascata das caspases, provavelmente ao clivar a caspase 10, induzindo a apoptose.

Mas as células "citotóxicas" também induzem apoptose por meio da proteína Fas, presente na membrana de várias células. Essa proteína mantém uma parte dentro da célula e outra fora, e pode ligar-se a outra proteína, a Fasligante (FasL), presente na membrana dos linfócitos T citotóxicos. Quando o linfócito liga-se à célula-alvo, a FasL, une-se à Fas e altera a forma da parte externa dessa última. Essa alteração faz com que a parte interna ative a caspase 8, iniciando a cascata de caspases. Em certos casos, fatores acidentais podem ser o "gatilho" do programa de morte.

A mitocôndria no processo da apoptose

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intracelular. Paradoxalmente, a mitocôndria guarda no espaço intermembranoso substâncias letais, capazes de deflagrar o processo de morte celular, entre as quais figura o citocromo-c. Quando liberado da mitocôndria, o citocromo-c se associa a duas proteínas presentes no citosol — a apaf-1 e a pró-caspase-9 - e na presença de ATP, ativa a caspase-9. A caspase-9, por sua vez, ativa as pró-caspases-3 e 7, que executam o processo de apoptose. A caspase-3 pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase-8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica *Bcl-2* que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (Kaplowitz, 2000; Patel & Gores, 1995).

Para a manutenção da integridade celular é necessário que os componentes pró-apoptóticos, presentes no interior da mitocôndria, não sejam liberados para o citosol. Existe na membrana mitocondrial interna uma estrutura protéica chamada poro de transição de permeabilidade mitocondrial ("mitochondrial permeability transition pore", MPTP), que se mantém habitualmente fechado, assegurando a sobrevivência celular. Seu fechamento é facilitado pelo magnésio intracelular, pelo potencial elevado da membrana mitocondrial, pela expressão das proteínas *Bcl-2* e *Bcl-X_L*, pela maior expressão da superóxido dismutase mitocondrial, rica em manganês, que atua como removedora de radicais superóxido, e pela translocação nuclear do fator nuclear -kB (NFkB) (Pessayre *et al.*, 1999).

Diferentes estímulos podem causar a abertura do poro de permeabilidade, resultando na morte celular pela ativação das caspases: a ligação do TNF α , ligantes-Fas ou do fator de crescimento transformador-b1 aos respectivos receptores na membrana celular; a entrada de granzime-B, liberada pelos linfócitos T citotóxicos e facilitada pela perforina. A caspase-8 ativada cliva a proteína pró-apoptótica Bid

presente no citosol, gerando um fragmento truncado dessa proteína, que se liga à mitocôndria, permeabilizando as suas membranas. A lesão do DNA celular pode intensificar a expressão do *p53* que favorece maior expressão da proteína pró-apoptótica Bax que, por sua vez, causa abertura do poro mitocondrial. Outros estímulos para a abertura desse poro incluem: maior formação de espécies reativas de oxigênio, aumento do cálcio intra-mitocondrial, ácidos biliares hidrofóbicos e algumas drogas (Pessayre *et al.*, 1999).

Uma das conseqüências da abertura do poro de permeabilidade é a expansão da matriz mitocondrial devido a sua hiperosmolaridade. A membrana mitocondrial interna, que apresentando várias pregas, pode acomodar o aumento do volume da matriz, enquanto a membrana externa, que é esférica, se rompe, liberando componentes pró-apoptóticos, como o fator indutor da apoptose e o citocromo-c. Outra conseqüência é a nova entrada de prótons na matriz, causando colapso no potencial de membrana mitocondrial e comprometendo a síntese de ATP (Feldmann, *et al.*, 2000; Pessayre *et al.*, 1999).

A abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causa, simultaneamente, ativação das caspases (potencialmente levando à apoptose) e depleção de ATP (potencialmente causando necrose). Essa disputa entre a ativação das caspases e a depleção de ATP irão orientar a morte celular, seja por apoptose, seja por necrose. A disputa pode ser vencida pelas caspases quando estas são diretamente ativadas pelos receptores da superfície celular ou granzime B e quando o poro de permeabilidade se abre em apenas algumas mitocôndrias, permitindo que as demais sintetizem ATP. Nestas circunstâncias, a célula entra no processo de apoptose. Por outro lado, se o poro de permeabilidade é aberto rapidamente e a célula não pode obter energia suficiente a partir da glicólise anaeróbia, a depleção do ATP impede que a apoptose de instale (processo ativo que requer energia) e a célula morre por necrose (Pessayre *et al.*, 1999).

Os genes são os responsáveis?

Células insubstituíveis, como neurônios e fibras musculares esqueléticas, são mais resistentes a apoptose porque sua perda seria desastrosa para o organismo. Já células substituídas com facilidade, como as do sangue, são mais propensas a morrer desse modo. Mas o que determina que serão mais suscetíveis ou mais resistentes?

As primeiras evidências de que os mecanismos do suicídio celular são regulados por certos genes vieram dos estudos pioneiros de Robert Horvitz e colaboradores (2003) (no Massachusetts Institute of Technology, nos Estados Unidos,) com o *Caenorhabditis elegans*. Esse pequeno verme de vida livre no solo é um modelo excelente para esse tipo de estudo por ter apenas 1.090 células somáticas (já diferenciadas), das quais 131 morrem durante seu desenvolvimento. Inofensivo ao homem, o *C. elegans* reproduz-se rapidamente em laboratório e é transparente: cada célula pode ser observada.

Outra vantagem é que todos os seus genes são conhecidos (estudo concluído em dezembro de 1998). Isso permitiu identificar, em vermes mutantes, os quatorze genes com algum papel na morte programada das células, batizadas de ced (de cell death abnormal). Para a destruição das 131 células, apenas dois (ced-3 e ced-4) são necessários: mutações em um deles bloqueiam a apoptose, e as células do *C. elegans* que morreriam continuam saudáveis. O ced-3 é semelhante ao gene humano que codifica a caspase 1, sugerindo que descendem de um ancestral comum.

Que mecanismo faz com que só as células supérfluas do *C. elegans* sejam eliminadas? A resposta parece estar em outro gene, o ced-9, que impede a ação dos dois genes suicidas, evitando a apoptose. Esse "gene de sobrevivência" parece ser expresso normalmente em muitas células que não devem morrer, talvez para protegê-las. Em vermes mutantes, sem um ced-9 ativo, muitas células que estariam no adulto morrem por apoptose. Ao contrário, em mutantes que expressam em excesso esse gene certas células supérfluas são poupadas da morte.

Um gene dos mamíferos muito parecido com o ced-9 é o que codifica a proteína Bcl-2 (de B-cell lymphoma), que também protege as células da morte programada. Vários trabalhos vêm sugerindo que a Bcl-2 e outras proteínas da mesma família regulam, em grande parte, a suscetibilidade celular à morte programada. Essa função começou a ser compreendida pelo estudo de portadores do linfoma de células B, tipo de leucemia que só afeta esses linfócitos. Descobriu-se que nessas células tumorais o gene responsável pela Bcl-2 tem atividade excessiva, levando à produção de grandes quantidades da proteína. Em geral, os oncogenes (genes que causam câncer se expressos em excesso) promovem a divisão celular, mas a superexpressão da Bcl-2 não tinha esse efeito, o que intrigou os cientistas.

O mistério foi desfeito com a descoberta de que a Bcl-2 impede a morte celular, o que também leva, como a divisão descontrolada, ao acúmulo de células anormais e, com isso, ao câncer. Outros estudos mostraram que o efeito protetor da Bcl-2 é geral, evitando a apoptose em diversos tipos de célula, tanto de modo direto (bloqueando complexos de caspases) quanto indireto (impedindo a liberação para o citoplasma de componentes da mitocôndria, capazes de ativar a caspase 3). O excesso de Bcl-2, embora não seja suficiente para causar câncer, favorece a ação de outros oncogenes.

Certas células normais produzem níveis relativamente altos de Bcl-2. Acredita-se que isso preserve células cuja morte seria devastadora para o organismo. O excesso de proteção, porém, tem um preço: quando se tornam cancerosas, elas costumam gerar tumores mais agressivos, já que resistem mais à morte programada. Isso parece ocorrer com os melanócitos. Tais células, produtoras do pigmento melanina, que escurece a pele e ajuda a evitar a absorção de doses letais de luz solar, precisam ser protegidas porque sua morte precoce ameaçaria outras células da pele. Mas por causa dessa resistência à apoptose, os melanócitos, se há algum dano nos genes, geram tumores (melanomas) mais agressivos e que se espalham rapidamente.

Outro gene envolvido na apoptose também foi detectado em estudos de tumores. O câncer surge quando células recém-formadas apresentam mutações simultâneas em genes que controlam o crescimento e a sobrevivência. Esses "defeitos", se pouco extensos, podem ser "corrigidos" por enzimas especializadas. Em geral, se a mutação é irreparável, ocorre o suicídio celular (segundo o princípio "melhor morta que errada"). O processo é comandado por um gene, presente em células normais, que codifica a proteína p53 (o nome refere-se à massa da molécula: 53 quilodáltons). Ao contrário do gene Bcl-2, o p53 desencadeia a apoptose. Células mutantes, sem esse gene, não sofrem apoptose. Elas vivem mais tempo, acumulam mais mutações e multiplicam-se sem controle, gerando tumores. Por impedir isso, protegendo o organismo do câncer, o p53 foi chamado de gene supressor de tumores.

Outros estudos mostraram que o gene p53 está alterado com maior frequência nos portadores de câncer do que nas pessoas saudáveis. Em mais da metade de todos os tumores sólidos (incluindo os de pulmão, intestino grosso e mama) as duas cópias desse gene foram eliminadas ou alteradas — portanto, não codificam a proteína p53 ou levam a formas não-funcionais da mesma.

O estudo da apoptose e do câncer está começando a esclarecer por que muitos tumores resistem à radioterapia e à quimioterapia. Pensava-se que tais terapias destruíam o tumor por necrose, mas agora se sabe que as células morrem em geral por apoptose. O que parece ocorrer é que tanto a radiação quanto às drogas danificam o ADN das células cancerosas, ativando o gene p53 e levando ao suicídio celular. Mas células cancerosas sem a p53 ou com altos níveis de Bcl-2 não morrem, tornando inúteis essas terapias. Há poucos anos também foi constatado que algumas dessas terapias ativam proteínas que estimulam a transcrição de "genes protetores".

Hoje, está sendo explorada a possibilidade de usar terapias genéticas para evitar a resistência das células cancerosas à apoptose. Uma dessas terapias consiste em introduzir o gene p53 em tumores nos quais ele não existe ou está alterado, para

restaurar a produção dessa proteína na célula. Também estão sendo investigadas maneiras de prevenir que genes Bcl-2 hiperativos produzam essa outra proteína.

A apoptose e as doenças

A morte celular programada faz parte de diversos processos vitais, como o desenvolvimento embrionário, o controle de tumores e a regulação de populações de células do sistema imune. Alterações nos genes responsáveis pela autodestruição podem ser desastrosas. Por ser indispensável à vida, a morte da célula deve seguir um plano meticuloso. Qualquer distúrbio de sua regulação (tanto o excesso quanto a insuficiência) pode provocar uma variedade de doenças.

A apoptose excessiva podem causar doenças neurodegenerativas (como o mal de Alzheimer e o mal de Parkinson), lesões secundárias após isquemia (bloqueio de circulação do sangue), retinite pigmentosa (uma causa de cegueira) e osteoporose (perda de massa óssea). Certas infecções também podem levar à apoptose excessiva: no mal de Alzheimer, os neurônios parecem cometer suicídio precocemente, o que resulta em demência progressiva e irreversível, por perda da cognição e da memória.

Em ataques cardíacos por isquemia, o bloqueio sangüíneo leva à necrose as células que dependem do vaso afetado. Mas a destruição não termina aí: células próximas da área afetada também morrem, mais lentamente, e sua aparência sugere a ocorrência de apoptose. Parece que o conteúdo tóxico das primeiras células mortas, quando não destrói as células vizinhas por necrose, as leva ao suicídio.

Infecções por bactérias e protozoários também podem provocar a apoptose. Bactérias como *Shigella flexneri* e espécies de *Salmonella*, causadoras de disenterias, invadem as células e liberam as proteínas IpaB (*S. flexneri*) e SipB (*Salmonella*), que ativam a caspase 1 e levam à autodestruição. O protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, induz apoptose em algumas das células que infecta (não em todas), embora não se conheça o processo em detalhes. Resultados

preliminares de estudo recente do grupo de um dos autores (Horta) indicam que macrófagos infectados em laboratório pelo protozoário *Leishmania amazonensis*, causador de um tipo de leishmaniose, mostram diminuição do conteúdo, fragmentação "em escada" do ADN e condensação de cromatina, eventos típicos da apoptose.

Já a ausência de apoptose, em que a célula "esquece" de morrer, pode levar a doenças auto-imunes (em que o sistema imune ataca o próprio organismo), infecções viróticas prolongadas ou tumores (como no câncer). As doenças auto-imunes podem ser geradas por falhas no programa de morte (ainda no timo) de células T que reagem com substâncias do próprio organismo, ou mesmo após uma reação de defesa a certos componentes externos muito semelhantes aos internos.

Infecções viróticas também podem se alongar pela ausência de apoptose. As células invadidas por vírus com frequência param ou reduzem a síntese das próprias proteínas para fabricar as dos invasores. Em geral, isso bastaria para levar à apoptose muitas células, mas alguns vírus inibem o processo. O vírus Epstein-Barr, agente da mononucleose e associado a cânceres linfáticos, produz proteínas parecidas com a Bcl-2 (inibidora de apoptose) e moléculas que induzem maior produção dessa proteína na célula. Outros inativam ou destroem a p53 (indutora da apoptose), como o vírus do papiloma, principal causa do câncer de colo do útero. O vírus da varíola bovina produz uma proteína que impede a cascata de caspases. O conhecimento dessas estratégias está permitindo a criação de novas drogas, que bloqueiam a ação do vírus.

Na Aids, a indução de apoptose em células sadias contribui para a deficiência do sistema imune que caracteriza a doença. O vírus da Aids (HIV) infecta basicamente os linfócitos T "auxiliares", usando como porta de entrada a proteína de superfície CD4. A "chave" que se encaixa no CD4 e abre essa porta é a proteína virótica gp120. Pessoas com Aids perdem grande parcela desses linfócitos, mas a maioria dos que morrem não parece estar infectada, e foi provado que muitos morrem por apoptose. Estudos recentes sugerem que a gp120 também presente no sangue dos portadores do HIV, ativaria o suicídio de células não-infectadas ao ligar-se ao CD4.

Interações entre as proteínas Fas e FasL, cuja produção aumenta durante a infecção, fariam o mesmo. Os linfócitos T citotóxicos (mesmo não tendo a CD4) também são levados ao suicídio, pois dependem de fatores de crescimento derivados dos auxiliares para evitar o processo.

3.3.7. Apoptose e Isquemia Cerebral

Até recentemente os cientistas acreditavam que as células só morriam quando agredidas por fatores externos, por um processo chamado necrose. Agora, sabe-se que existe outra forma: o suicídio celular programado, necessário para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Esse fenômeno biológico, batizado de apoptose, tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças e sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos.

A apoptose é um processo de autodestruição celular que envolve mecanismos codificados no genoma das células eucarióticas (Bredesen 1996); como também é uma forma de morte celular programada dependente de energia. Batizado de apoptose, o suicídio celular programado tem papel importante em diversos processos vitais e em inúmeras doenças. Sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos. Na última década, muito progresso tem sido feito para elucidar as várias vias de transdução de sinal que podem levar à morte celular. Baseado nesta informação, muitas cascatas apoptóticas têm sido descritas, como vias intrínsecas, extrínsecas, caspases-dependentes e independentes, em associação com fases de início, comprometimento e execução. Tem se tornado aparente, portanto, que a apoptose não é uma série de vias claramente definidas, mas uma multiplicidade de vias interconectadas, altamente reguladas e convergentes resultando nas alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (Ashe & Berry, 2003). Já está claro que o processo de apoptose está intimamente relacionado a várias doenças agudas, inclusive no mecanismo envolvido na isquemia e reperfusão de órgãos, além dos eventos mutacionais durante o desenvolvimento de muitos tipos de câncer. As

alterações características da apoptose são fragmentação do DNA, além de outras alterações morfológicas características tais como, condensação da cromatina, alterações no arranjo dos microtúbulos e fragmentação da célula em “corpos apoptóticos” (Hale *et al.* 1995).

A apoptose é um processo importante no desenvolvimento embrionário, particularmente em órgãos altamente diferenciados como rim, coração e cérebro (Hale *et al.* 1995). Já foram identificados vários genes envolvidos no processo de apoptose, entre eles, a Apo-1, o receptor do fator de necrose tumoral (TNF), e receptores da membrana plasmática que ativam proteases denominadas caspases (Nagata & Golstein 1995; Hu *et al.* 1999). Existem evidências para a ativação de um tipo de caspase, a caspase 3 dentro de algumas horas após um episódio de isquemia cerebral (Blomgren *et al.* 1999, Namura *et al.* 1998) e que inibidores de caspases reduzem o dano tecidual em modelos de derrame em ratos (Hara *et al.* 1997). As células apoptóticas são rapidamente removidas por fagocitose sem promover uma reação inflamatória. Em contraste, necrose celular geralmente afeta grande número de células contíguas causando edema citoplasmático, mitocondrial e de outras organelas que levam à ruptura da membrana plasmática e lise celular produzindo reação inflamatória.

Fora do core necrótico de um infarto cerebral típico, há morte de neurônios em que a condensação da cromatina e freqüentemente um achado precoce proeminente e em modelos experimentais de isquemia, neurônios apoptóticos tendem a ser largamente ausentes na região central da isquemia, na qual a morte celular é necrótica. Portanto, neurônios apoptóticos são predominantemente encontrados na zona de penumbra isquêmica (Love, 2003). Existe evidência, especialmente em modelos animais indicando que alguma morte neuronal pós-isquemia é mediada pela ação de caspases (cysteine-requiring aspartate-directed proteases), as enzimas proteásicas responsáveis pela morte celular programada (Schulz *et al.*, 1999). As caspases são sintetizadas como pro-enzimas inativas (pro-caspases). Em episódios isquêmicos em humanos, os achados diferem consideravelmente se o infarto é devido à oclusão

arterial aterotrombótica ou um período de parada cardíaca. Infarto aterotrombótico é o tipo mais comum de doença cérebro-vascular isquêmica. Morte neuronal neste tipo de infarto tem alguns dos achados bioquímicos precoces da morte celular programada como “up-regulation” de pro-caspase-3 e rápido desaparecimento de algumas proteínas de reparo do DNA (Love *et al.*, 2000).

3.3.8. Atividade da Família Caspase

As caspases constituem uma família de proteases que incluem no seu sítio catalítico um pentapeptídeo contendo cisteína e apresentam a exigência de um resíduo aspartato na porção N-terminal do sítio de clivagem do substrato (Love *et al.*, 2003). A ativação resulta de clivagem da pro-caspase geralmente devido à ação de outras caspases ativadas. Certas proteases, recentemente chamadas de caspases (nome derivado de cisteína-protease que cliva — "corta" — após resíduos de ácido aspártico) têm papel central na apoptose, em todo o tipo de célula e em todo o organismo multicelular já estudado. A primeira enzima dessa família descrita em mamíferos foi a ICE (interleukin-1 β converting enzyme), hoje caspase 1. O que levou à identificação da ICE foi sua função de ativar a interleucina-1 β , proteína importante no sistema imune, mas depois ela atraiu maior atenção por seu papel na apoptose. Outras enzimas, com características semelhantes, foram identificadas depois: a família já tem quatorze integrantes. As caspases podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas da família convertendo interleucina-1 β (caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 14) que estão envolvidas na maturação de citocinas e na indução de inflamação e aquelas caspases diretamente envolvidas na apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10). Neste último grupo, pode-se dividir caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7). Os substratos degradados ou inativados por caspases incluem proteínas do citoesqueleto, proteínas do reparo do DNA, proteínas anti-apoptóticas como da família Bcl-2 e inibidores das DNAases caspase-ativadas (Strasser *et al.*, 2000). De início, atribuiu-se a caspase 1 um papel primordial na apoptose, mas estudos recentes, com camundongos "nocautes" para essa enzima (que não a produzem), mostraram que

várias formas de apoptose ocorrem na sua ausência. Em alguns casos, no entanto, a caspase 1 é preponderante. Uma caspase pode clivar outras e esse "corte" parece ser essencial à ativação dessas enzimas. Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em seqüência, até gerar uma caspase executora. Esta destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Todos os casos levam à morte celular. Vários experimentos em laboratório sugerem uma hierarquia na ativação das caspases, mas essa hierarquia e as caspases envolvidas podem diferir, dependendo do modo de indução da apoptose. A caspase 8 ou a caspase 10, dependendo do tipo de estímulo que a célula recebe, são fortes candidatas a caspases iniciadoras, e há indícios de que, em geral, a ativação da caspase 3 e da caspase 7 precede a ativação da caspase 6 (caspases executoras). Há duas principais vias de ativação de caspases: aquela mediada por receptor de morte e a mitocondrial. A via mitocondrial de ativação de caspases é iniciada por muitas proteínas, sendo a da família Bcl-2 de papel central. A família Bcl-2 pode ser dividida em 3 grupos: grupo I-proteínas anti-apoptóticas e grupos II e III de proteínas pro-apoptóticas. Estímulos pro-apoptóticos tais como radiação ionizante, queda no pH citosólico, citocinas ou fatores de crescimento levam a modificação e translocação de Bcl-2 pro-apoptótica do citosol e de outras partes da célula para a membrana mitocondrial externa. Na membrana mitocondrial externa, múltiplos dessas proteínas formam canais que permitem a liberação de citocromo c do espaço intermembrana mitocondrial. A liberação do citocromo c promove a oligomerização do fator ativador de apoptose-1 (Apaf-1), ligação da pro-caspase 9, e agregação de moléculas de citocromo c, pro-caspase 9 e Apaf-1 para formar o apoptossomo. O apoptossomo cliva e ativa a pro-caspase -3, o efetor chave da morte celular caspase-mediada.

Membros da família caspase desempenham um papel importante na desintegração da arquitetura celular durante a apoptose, por clivar a SAF-A em um sítio não canônico (Kipp *et al.*, 2000). SAF-A é um componente abundante do esqueleto nuclear e cromatina. Há evidências que ela possui pelo menos duas funções distintas: arquitetura nuclear e metabolismo do RNA (Gohring *et al.*, 1997).

Modelos de isquemia experimental têm evidenciado supra-regulação e ativação da pro-caspase-3 precedendo a morte de neurônios em modelos de isquemia cerebral global e focal transitórios. Muito permanece, entretanto, a ser compreendido sobre a regulação transcripcional das proteínas pro-apoptóticas Bcl-2, Apaf-1 e de outras proteínas necessárias para a liberação do citocromo c e formação do apoptossomo após isquemia cerebral. Evidências da ação do fator nuclear transcripcional NF- κ B nessa seqüência de eventos é controversa (Love *et al.*, 2003). A outra via de ativação de caspases, a via mediada por receptor, também contribui para o dano cerebral isquêmico. A liberação de TNF- α por neurônios, glia e células inflamatórias infiltrativas é uma explanação possível (Sairanen *et al.*, 2001).

Mecanismos de ativação das caspases

Receptores da morte e disfunção mitocondrial

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é através dos receptores da morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria identificada dos receptores da morte é membro da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (FNT) e é caracterizada por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada cadeia da morte ("death domain"), essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizados é o receptor Fas (CD95 ou APO-1) (Faubion & Gores, 1999).

Quando o ligante-Fas se acopla ao receptor Fas, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando agregado de cadeias da morte. Este permite que as mesmas se liguem a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia da morte associada ao Fas ("Fas-associated death domain", FADD). A ligação desse complexo à pro-caspase-8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica.

A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora) (Figura 8).

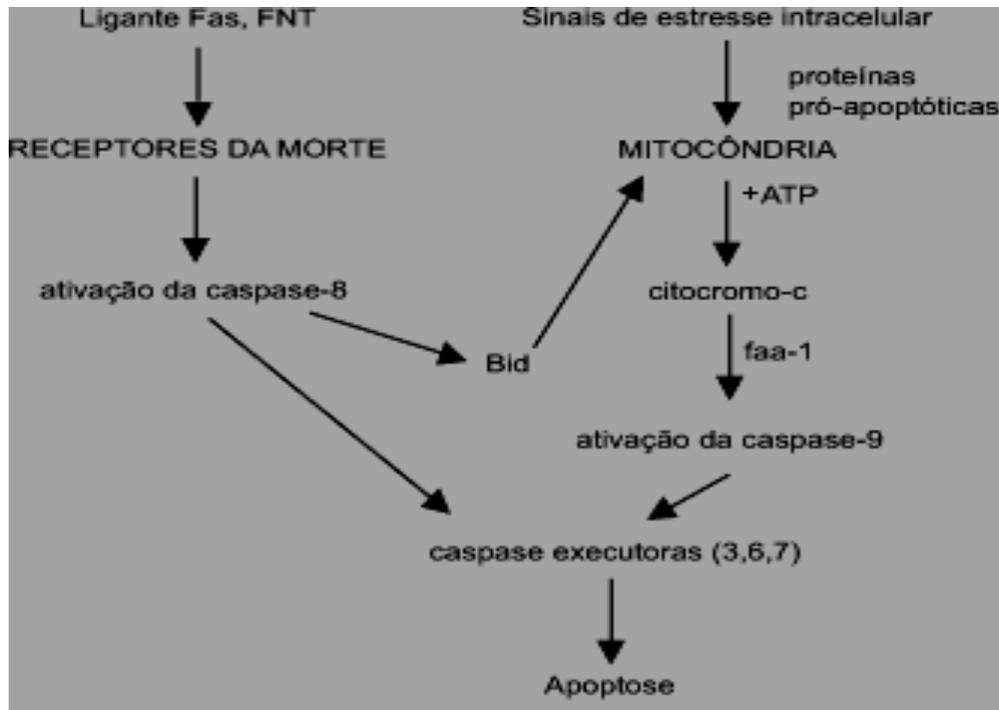


Figura 8 - Indução da apoptose pela via receptores da morte e por disfunção mitocondrial. FNT = fator de necrose tumoral; Faa-1 = fator ativador da apoptose I. Adaptado de KAPLOWITZ (Harada *et al.*, 1997).

O receptor-Fas é expresso em uma variedade de células, incluindo células epiteliais, hematopoiéticas e linfócitos B e T ativados. O padrão de expressão tecidual do ligante Fas é mais restrito, sendo expresso nos linfócitos T maduros CD4+ e CD8+ e nas células "natural killer" ativadas. A expressão simultânea de receptor-Fas e ligante-Fas em linfócitos maduros ativados pode representar mecanismo de autolimitação da resposta imunológica (Patel, 1995).

Recentemente, identificou-se uma expressão significativamente reduzida do receptor-Fas em formas agressivas de hepatocarcinoma, especialmente em tumores pouco diferenciados e que cursam com invasão da veia porta, ou extracapsulares. A perda da expressão do receptor-Fas em tais tumores, provavelmente reflete mecanismo de adaptação para evitar a morte das células tumorais pelo sistema imune (Faubion & Gores, 1999).

Além dos receptores da morte, a apoptose pode também ser deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene *p53*), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento. Na presença de sinais de estresse intracelular ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid, etc) do citosol para a mitocôndria. Essas proteínas são membros da família de proteínas *Bcl-2* que exercem importante função reguladora da apoptose, como será discutido adiante. A translocação das proteínas pró-apoptóticas para a mitocôndria resulta na liberação para o citosol do citocromo-c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna. No citosol, o citocromo-c forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 ("apoptosis-activating factor 1, apaf-1"), levando à ativação da caspase-9, que ativa caspases efetoras. Portanto, a ativação das caspases pode ser desencadeada via receptores da morte ou via disfunção mitocondrial, com liberação do citocromo-c (Figura 8).

3.3.9. Mecanismos de neuroproteção durante a isquemia cerebral

Vários eventos são essenciais para a recuperação dos neurônios após a isquemia. Primeiro, os níveis de ATP devem ser mantidos e isto requer a imediata reperfusão da zona de penumbra (Hossmann, 1994). Um segundo fator é impedir o massivo aumento de cálcio e por último, é prevenir a formação das ROS. Vários estudos em modelos animais de isquemia têm demonstrado que os antagonistas dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e/ou AMPA pode conferir alguma proteção

(Choi, 1995). E já foi demonstrado que a hipotermia moderada (33°C) é neuroprotetora, pois diminui a liberação de glutamato (Yager *et al.* 1993). A inibição da liberação de glutamato também pode ser inibida reduzindo-se a entrada de Ca⁺⁺ nos terminais neuronais, com o uso de antagonistas de canais de cálcio voltagem-dependente do tipo N e L (Huston *et al.* 1990). Os neurotransmissores inibitórios tais como GABA (Travagli *et al.* 1991) e adenosina (Sciotti *et al.* 1992) também pode inibir a liberação de glutamato, provavelmente por inibição do canal de cálcio ou por hiperpolarização da membrana neuronal. O *l*-deprenil, um inibidor da MAO-B, tem sido usado clinicamente em combinação com L-dopa para o tratamento da DP (Youdim & Finberg, 1985). A droga também tem mostrado uma melhora clínica nos pacientes com DA (Mangoni *et al.*, 1991; Sano & Ernesto, 1997) e depressão (Gerlach *et al.*, 1992).

Mattson e Cheng (1993) demonstraram efeitos neuroprotetores de vários fatores de crescimento, citocinas e da proteína precursora do β-amilóide (β-APP), devido à estabilização dos níveis de cálcio intracelular (Goodman & Mattson, 1994) e já foi demonstrado que fator de crescimento do fibroblasto regula para baixo o número dos receptores NMDA e que o fator de necrose tumoral (TNF) aumenta o número de neurônios que expressam calbindina (proteína carreadora de cálcio) (Bruce *et al.* 1996). A reperfusão restaura nutrientes e oxigênio aos tecidos, mas também resulta no aumento na produção de ERO e na peroxidação lipídica, isto sugere que os neurônios vulneráveis têm pequena capacidade de retirar as ERO, assim o uso de drogas que retirem as ROS pode ser neuroprotetoras (Truelove *et al.* 1994). Já foi demonstrado que a ativação da esfingomielinase pelo TNF ou β-APP resulta na liberação de ceramida, que induz a expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e catalase, provavelmente mediada pela ativação do fator de transcrição NF-κB (Mattson *et al.* 1997).

4. *L*-deprenil (Selegilina)

4.1. Generalidades

O *l*-deprenil foi descoberto entre 1964 e 1965, por Joseph Knoll e colaboradores, sendo que as primeiras perspectivas farmacológicas da droga se voltaram para o metabolismo cerebral, possivelmente um estimulante. Também conhecido como Selegilina, a substância foi motivo de intensas pesquisas nos últimos 36 anos. No princípio, Knoll não percebeu que tinha desenvolvido uma molécula com peculiar atividade sobre neurotransmissores catecolaminas, provocando especificamente o aumento de dopamina e feniletilamina. A peculiaridade foi desvendada em 1968, quando se descobriu que havia 2 tipos da enzima Monoamino oxidase (MAO) - o *l*-deprenil é um inibidor seletivo dose-dependente da MAO: até a dosagem de 15mg/dia inibi apenas a MAO tipo "B". Acima dessa dosagem, especialmente a partir de 20mg/dia, o *l*-deprenil pode atuar também sobre a MAO-A.

O *l*-deprenil é dotado de um espectro de atividade jamais atribuído a uma só molécula (Knoll J.,1992). O fármaco age através de mecanismos de ação antagonizando a ação dos radicais livres e das neurotoxinas. Mais recentemente, foi atribuído ao *l*-deprenil uma ação neurotrófica específica demonstrada em alguns modelos experimentais. O *l*-deprenil (DEP), inibidor da monoamino oxidase B (MAO-B), é efetivo no tratamento da Doença de Parkinson e possivelmente na doença de Alzheimer. Ele produz vasodilatação e protege o endotélio vascular dos efeitos tóxicos da proteína beta amilóide. Porque o óxido nítrico modula o fluxo sanguíneo cerebral e a memória, e a redução da produção de óxido nítrico tem sido observada em cérebros de pacientes com Alzheimer, a estimulação da produção de óxido nítrico pelo *l*-deprenil poderia contribuir para a melhora das funções cognitivas neste pacientes (Thomas, 2000). É também conhecido como ativador de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase em regiões cerebrais dopaminérgicas (Kitani *et al.*,2002). Além disso, a neuropatologia associada com a doença de Parkinson (PD), na

substância negra, está envolvida com o excesso de produção de radicais livres, autooxidação da dopamina, defeitos na expressão da glutathione peroxidase, atenuando os níveis de glutathione reductase, alterando a homeostase do cálcio, excitotoxicidade e defeitos genéticos na ativação do complexo mitocondrial I (Mazzio *et al.*, 2001).

As evidências sugerem que a eficácia clínica do *l*-deprenil pode não estar associado a sua propriedade de inibir a atividade da MAO-B. O atual interesse nos inibidores da MAO-B é baseado na possibilidade que estes compostos possuem efeitos neuroprotetores e possa retardar a progressão de doenças neurodegenerativas (Thomas *et al.* 1998). Outras ações do *l*-deprenil conhecidas e que contribui para a propriedade de neuroprotetor inclui as seguintes: inibição da produção de radicais livres neurotóxicos, ação semelhante a das anfetaminas (amphetamine-like) provavelmente pela elevação dos níveis do β -feniletilamina, antagonista dos receptores NMDA pela elevação dos níveis de poliaminas N-acetilado (Gerlach *et al.*, 1992), e indutor de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase e catalase (Carrillo *et al.*, 1991; Kushleika *et al.*, 1996).

4.2. Inibidores da monoamino oxidase (MAO)

A MAO é uma enzima que transforma catecolaminas em seus respectivos aldeídos, e localiza-se principalmente na membrana externa das mitocôndrias. Pela sua localização, a MAO atua preferencialmente sobre o neurotransmissor que está “livre” no citoplasma, isto é, aquele que foi recaptado pelo terminal e que ainda não foi captado pelos grânulos, ou aquele que foi liberado pelos grânulos antes de passar pela membrana axonal.

Estudos farmacológicos demonstraram que a nível mitocondrial existem dois tipos de enzima monoaminoxidase (MAO) codificadas por dois genes (Shih, 1991): MAO-A e MAO-B. No homem, a MAO-A concentra-se principalmente no

intestino e tem como substrato principal a serotonina, a adrenalina e a noradrenalina. A MAO-B predomina a nível cerebral sendo responsável pelo catabolismo da dopamina.

A MAO-A encarregada de inativar a serotonina, noradrenalina, tiramina e, em níveis menores, a dopamina. A tiramina é encontrada em queijos curtidos (com fungos) e vinhos tintos. A tiramina, junto com a noradrenalina e adrenalina, promove surtos hipertensivos graves, ligando-se aos receptores NA. A MAO B encarregada de inativar prioritariamente dopamina e feniletilamina (a droga da "paixão"), presente apenas em traços no cérebro. Em doses de 5-10mg por dia, *l*-deprenil inibe até 90% da atividade desta enzima. O isômero *d*-deprenil é biologicamente menos ativo que o *l*-deprenil. Clinicamente a mais importante monoamina que é elevada pelo *l*-deprenil é a dopamina, que é substrato para a MAO-A e MAO-B. O *l*-deprenil tem sido usado como adjuvante à L-DOPA no tratamento da doença de Parkinson (Parkinson Study Group, 1993). Ela também previne a toxicidade induzida pelo MPTP e os sintomas Parkinson-símile em animais (Heikkla *et al.* 1984). A atividade antidepressiva do *l*-deprenil pode ser atribuída à inibição tanto da MAO-A como da MAO-B.

O *l*-deprenil privilegia um aumento significativo na dopamina, trazendo os seguintes benefícios:

- Melhoria da Memória de Longo Prazo,
- Melhoria da Criatividade e Inventividade, por ser fundamental na conexão entre a substância nigra e o corpo estriato, a dopamina é importante no controle motor. A Dopamina atua na ativação do sistema Mesolímbico-cortical e no Locus coeruleus.
- Com o aumento da dopamina cerebral a depressão do tipo hipocatecolinérgica tende a diminuir e desaparecer, assim como os pensamentos fixos negativos.
- Como o *l*-deprenil aumenta a dopamina e não propicia aumento da tiramina, por ser seletiva para a MAO-B, os efeitos colaterais são menores ou insignificantes.
- O *l*-deprenil também aumenta a noradrenalina, neurotransmissor que aumenta a autoconfiança e a autoestima.

Estudos apontam para os efeitos benéficos do *l*-deprenil na doença de Alzheimer (DA) (Knoll *et al.* 1989; Sano *et al.* 1997), vários mecanismos foram propostos para explicar seus efeitos sobre DA. O aumento central das monoaminas através da inibição da MAO-B é considerado o efeito mais proeminente do *l*-deprenil, a MAO-B é a forma mais proeminente no cérebro de humanos. Além da perda de neurônios colinérgicos, existe um decréscimo nos níveis de dopamina e serotonina no cérebro de pacientes com DA (Olfsson *et al.* 1979). Os inibidores da MAO-B podem agir por reduzir a formação de radicais livres e prevenindo a quebra das monoaminas e assim elevando os níveis de monoaminas no cérebro de pacientes com DA. Já foi sugeridos que a eficiência do *l*-deprenil pode resultar da sua conversão ao estimulante anfetamina e meta-anfetamina. Mas o *d*-deprenil que é convertido à *d*-anfetamina, um estimulante mais potente, mostra menos atividade biológica quando comparada ao *l*-deprenil (Nickel *et al.* 1990).

Muitos trabalhos demonstram um efeito neuroprotetor em modelos de isquemia cerebral (Magyar *et al.* 1998; Tatton 1993), mas alguns trabalhos ainda mostram resultados conflitantes, não sendo sido observado efeito protetor (Jolkkonen *et al.* 2000; Holschneider *et al.* 1999; Ballabriga *et al.* 1997), Foi demonstrado que o tratamento com *l*-deprenil reduz o dano produzido no estriato e tálamo após hipóxia/isquemia transitória (Knollema *et al.* 1995) e aumenta a sobrevivência de células piramidais hipocampais após isquemia global (Lahtinen *et al.* 1997; Paterson *et al.* 1997), além de tecido cortical após isquemia focal (Semkova *et al.* 1996). Já foram demonstrados efeitos neuroprotetores contra a morte celular programada (apoptose) em neurônios piramidais após isquemia e tratamento com ácido caínico (Gelowitz & Paterson, 1994). O efeito neuroprotetor pôde ser observado se administrado 1 e 6 horas após a isquemia, com doses efetivas menores que as necessárias para a inibição da MAO-B (Ansaki *et al.* 1993). Outras ações do *l*-deprenil podem contribuir para seus efeitos neuroprotetores que incluem, antagonismo dos receptores NMDA pela elevação nos níveis de poliaminas acetiladas (Gerlach *et al.* 1992), indução de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase (Kushleika *et al.* 1996).

4.3. Atividade anti-MAO-B

O *l*-deprenil é provido de potente e duradoura ação anti-MAO-B, enzima predominante nas células gliais (Knoll J.,1978a; Knoll J.,1978b; Cohen & Spina, 1989; Knoll J, 1985; Knoll J., 1986a; Knoll J., 1986b; Mytilineou C.,1985; . D'Amato RJ., 1987; Bronzetti E *et al.* 1992; Finnegan *et al.*, 1990; Amenta *et al.*, 1990; Knoll, 1981). De fato, o *l*-deprenil é o único inibidor MAO-B seletivo disponível para uso clínico. A molécula do *l*-deprenil se liga às moléculas de MAO-B através de ligações covalentes e provocando a sua inativação como catalisador da reação de desaminação da dopamina. A interferência com o sistema da MAO-A somente se verifica com doses muito acima daquelas usadas na terapêutica. A seletividade do *l*-deprenil a MAO-B também se evidencia pelo fato de que não é necessária nenhuma alteração na dieta, pois o fármaco é totalmente desprovido do efeito tiramina (cheese effect), freqüentemente observado com a terapia com outros inibidores da MAO não seletivos (Knoll ,1992).

4.4. Inibição da recaptação de catecolaminas

Em experimentos realizados com culturas sinaptossomais de tecido cerebral, o *l*-deprenil demonstrou ser um inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina no corpo estriado de animais de experimentação (Knoll , 1992; Knoll ,1978b; Knoll, 1981; Knoll, 1972; Simpson, 1977; James, 1980). Knoll e colaboradores demonstraram que além da inibição da recaptação de dopamina, existe uma consistente elevação da síntese deste neurotransmissor. Estudos posteriores (Knoll, 1992; Simpson, 1977) também mostraram que o *l*-deprenil inibe a recaptação de monoaminas endógenas ao nível de terminações nervosas de neurônios catecolaminérgicos, simulando uma ação semelhante às substâncias simpatomiméticas (Figura 9). O resultado destas ações é o aumento significativo do tono dopaminérgico.

Adicionalmente, o comportamento do *l*-deprenil neste aspecto é único porque não desloca o neurotransmissor do seu sitio de reserva.

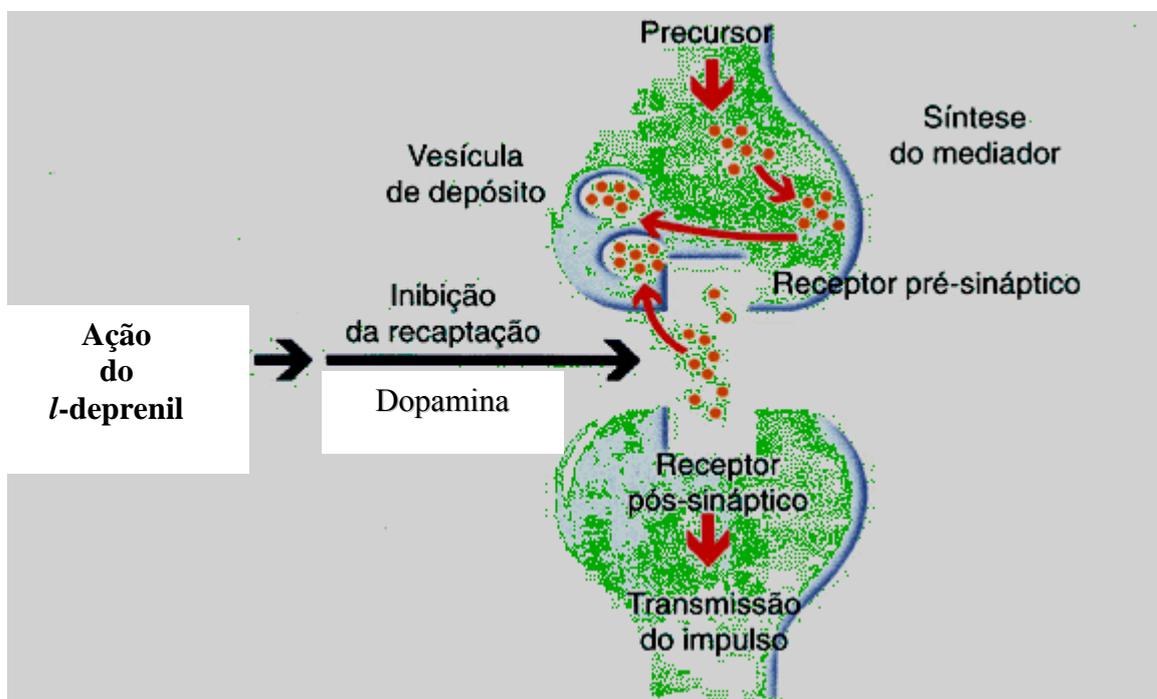


Figura 9 - Modelo da inibição da recaptação da dopamina, induzida pelo *l*-deprenil.

O *l*-deprenil, também conhecido como selegilina foi originalmente desenvolvido como um "psychic energizer" nomeado para integrar alguns dos efeitos cerebrais dependentes de anfetamina com efeitos antidepressivos (Knoll, 1983). O *l*-deprenil tem mostrado ser um potente ativador das catecolaminas, protegendo as células nervosas contra um grande número de neurotoxinas e também tem demonstrado ser "neuroprotective/neurorescue agent" quando células são expostas a danos ou a condições estressantes (Knoll, 1983; Knoll *et al.*, 1996; Maruyama *et al.*, 1998; Magyar *et al.*, 1996; Tatton *et al.*, 1993).

4.5. QUÍMICA

Denominação química: Cloridrato de R(-)N, alfa-dimetil-N-(2-propinil)-fenetilamina (Figura 7). Denominação Comum Internacional: Selegilina ou *L*-deprenil.

Fórmula bruta: C₁₃ H₁₇ N · HCl; Peso molecular: 223,75; Forma física: Pó cristalino branco, inodoro; Ponto de fusão: 140-143 ° C; pH: 3,5 - 4,5; Solubilidade: Solúvel em água e fracamente solúvel em metanol (Figura 10).

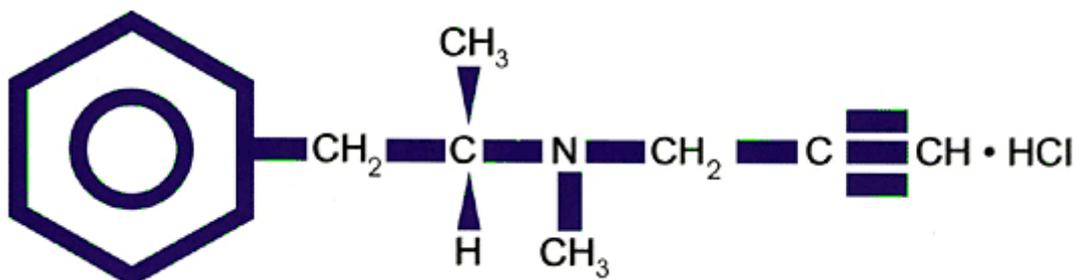


Figura 10 - Fórmula estrutural e química do *l*-deprenil

4.6. TOXICOLOGIA

4.6.1 Toxicidade aguda

Os estudos de toxicidade foram realizados em ratos e em camundongos; o *l*-deprenil foi administrado por via oral, subcutânea e endovenosa (Sebestyen GY, 1975). A avaliação toxicológica por via oral foi também realizada em cães (Sebestyen GY, 1977a). Com relação ao perfil anatomopatológico, o exame macroscópico e microscópico dos animais não evidenciou fenômenos dignos de nota. Foram observadas, unicamente, alterações ponderais como, por exemplo, do coração, fígado e próstata, com aumento de peso do cérebro, cerebelo e rins.

4.7. FARMACOLOGIA

4.7.1. Farmacocinética

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que o *l*-deprenil, por via oral, é absorvido rapidamente de modo quase completo e distribui-se nos diversos compartimentos com igual velocidade.

Tabela.1 - Parâmetros farmacocinéticos (v.o.)

T_{max} :	120 minutos
C_{max} :	45 mg/ml

A absorção por via oral é rápida e completa. Atravessa a barreira hematoencefálica. Atinge o pico de concentração plasmática em 30 minutos a 2 horas. Possui meia-vida média de 39 horas (16 a 69 horas), sendo que 95% dos metabólitos são encontrados na urina após 48 horas.

O equilíbrio dinâmico (Steady state) é alcançado após 2-3 dias com doses repetidas de 10 mg/dia por via oral. No terceiro dia, a média das concentrações resultou semelhante á medida após 24 horas da administração única (Gerlach M *et al.*,1996.) Atingido o equilíbrio, as concentrações de metabólitos do *l*-deprenil resultam substancialmente inalteradas em relação aos valores verificados após dose única. Estas observações experimentais indicam que não existem fenômenos de acúmulo para o *l*-deprenil nem para os seus metabólitos. No homem, com o emprego de PET (Tomografia com Emissão de Pósitrons), foi demonstrado que o *l*-deprenil marcado, administrado experimentalmente por via endovenosa, distribui-se e fixa-se seletivamente em regiões cerebrais ricas em MAO-B (tálamo, corpo estriado, córtex, mesencéfalo, ponte e bulbo) (Fowler J.S., 1987). De acordo com a estereoseletividade do *l*-deprenil para a MAO-B, a PET demonstra, ainda, que a recaptação cerebral e a retenção do fármaco comparada com a forma dextrógira revelam que somente *l*-deprenil levógiro é retido por longo tempo no tecido cerebral, ao contrário da forma dextrógira, que mostra um rápido "clearance". Este tipo de distribuição coincide também com a observada em exames autópsias de indivíduos idosos, nos quais a MAO-B havia sido visualizada através de técnicas auto-radiográficas.

A afinidade de ligação do *l*-deprenil ao tecido cerebral, analisada através de densitometria computadorizada, revelou presença em concentrações elevadas do fármaco marcado no nível do núcleo caudado, *putamen*, tálamo, substância nigra,

hipocampo e corpos geniculados medial e lateral. Na faixa de concentrações terapêuticas, 94% do *l*-deprenil se liga às proteínas séricas humanas. Após a administração *l*-deprenil é rapidamente metabolizada ao nível hepático. Com HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Precisão) e fluorimetria foram determinados os principais valores cinéticos dos metabólitos do *l*-deprenil, após administração única e após doses múltiplas. Os seus principais metabólitos (Reynolds , 1978) no homem são I - anfetamina (M₁), I - metanfetamina (M₂), 1-desmetil-Selegilina (M₃), dotados de fraca atividade central, que nos leva a concluir que doses terapêuticas do *l*-deprenil (10 mg/dia) não podem determinar ações estimulantes do tipo anfetamínico. A excreção renal (Gerlach *et al.*,1996), após administração de 10 mg/dia em voluntário sadio, é de 52% nas primeiras 24 horas e quase completa após 72 horas (73%). A taxa de eliminação nas fezes é de 15% após 72 horas.

4.7.2. Farmacocinética no paciente idoso

Em relação ao particular emprego do *l*-deprenil na terapia do idoso, os resultados obtidos pelo estudo (Heinonen E.H., 1989) de grupos de pacientes idosos, portadores de patologias incapacitantes degenerativas cerebrais (Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson), demonstram que as concentrações do *l*-deprenil no líquor e no soro não se afastam dos valores obtidos no voluntário sadio, mantendo um perfil farmacocinético semelhante.

4.8. FARMACODINÂMICA

Numerosos estudos demonstraram um aumento da atividade MAO-B no cérebro de indivíduos idosos, principalmente naqueles que sofrem de alguma doença degenerativa (Blaschko, 1974; Fowler *et al.*, 1978; Agnati *et al.*, 1988; Knoll , 1992). Este fenômeno se deve, provavelmente, às alterações entre as relações neurônio - glia observadas nos idosos. Além disso, este aumento patológico provoca uma aceleração da destruição de dopamina, noradrenalina e serotonina ao nível cerebral. A desaminação oxidativa, atuando sobre as amins endógenas produzirá radicais livres do tipo peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila que, ao acumularem-se

intracelularmente no neurônio, produzem efeitos citotóxicos alterando a estrutura do DNA e da membrana celular, ocasionando a morte neuronal (Tipton, 1977; Knoll, 1978a; Knoll, 1978b; Cohen & Spina, 1989). A própria dopamina, ao sofrer a desaminação oxidativa se transforma parcialmente em 6-Hidroxi-dopamina, uma potente neurotoxina que tem sido descrita nos sistemas dopaminérgicos de indivíduos com idade avançada (Knoll J., 1985). Neurotoxinas exógenas [MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina) (Knoll, 1985; Knoll, 1986a; Knoll, 1986b; Mytilineou, 1985; D'Amato, 1987), análogos do MPTP como 5,7-dihidroxitriptamina (Knoll, 1992), mostardas nitrogenadas como AF64A (Mostarda Etilcolina Aziridínio) (D'Amato, 1987) DSP-4 (cloridrato de N-(2-cloroetil) N-etil-2-bromobenzilamina) (Finnegan *et al.*, 1990) imitam com eficácia no animal o dano neuronal global e toda uma variedade de fenômenos degenerativos microanatômicos e ultraestruturais, que aparecem de maneira característica no envelhecimento cerebral. As alterações neurotransmissoras se concretizam, na prática, em mutações morfológicas, com caráter regressivo e progressivo, que se quantificam como idade-dependentes e se configuram na perda de células nervosas, na redução da extensão da rede nervosa e num decréscimo das espinhas dendríticas (Amenta *et al.*, 2003). Diante desse quadro, começou-se a explorar as atividades farmacodinâmicas do *l*-deprenil as expectativas da pesquisa foram superadas e novas aquisições relativas às interações entre neurônios e glia e aos respectivos fatores neurotróficos e/ou neurotóxicos foram alcançadas.

II – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O acidente vascular cerebral (AVC) é a doença neurológica que mais freqüentemente acomete o sistema nervoso e é a principal causa de incapacidades físicas e mentais. A Incidência Americana esta estabilizada em torno de 0,5 a 1,0 casos por cada 1000 habitantes e alguns países europeus e o Japão esta incidência chega a 3 por cada 1000 habitantes por motivos que não se pode explicar até o momento. É a terceira principal causa de morte entre as patologias clínicas e a mais freqüente causa de morbidade entre as doenças neurológicas após a Doença de Alzheimer. Estes índices são maiores entre negros e proporcionais em relação ao sexo. Nos indivíduos acima dos 75 anos esta incidência chega a 30 por 1000hab. O AVC constitui a primeira causa de morte entre as doenças cardiovasculares no Brasil, principalmente entre mulheres, onde os coeficientes são dos mais elevados quando comparados a países do hemisfério ocidental. Há grande impacto das doenças cerebrovasculares sobre a sociedade como um todo, tanto no aspecto relativo às perdas econômicas quanto ao custo social gerado pela doença cerebrovascular. Por outro lado, as doenças cerebrovasculares representam uma das áreas da medicina que experimentam progressos cada vez mais rápidos. Pessimismo e negativismo, atitudes comuns há menos que duas décadas, deram lugar a avanços fantásticos nos seus aspectos diagnósticos, de conduta e prevenção. Com o objetivo de diminuir esta morbidade neurológica, devemos procurar entender os mecanismos envolvidos no dano e reparação neuronal, bem como procurar a terapia mais efetiva. A perda da memória e o dano neuronal causados pela isquemia leva-nos a pesquisar drogas que beneficiem os pacientes acometidos pela injúria. O *l*-deprenil (DEP), inibidor da monoamino oxidase B (MAO-B), é efetivo no tratamento da Doença de Parkinson e possivelmente na doença de Alzheimer. Ele produz vasodilatação e protege o endotélio vascular dos efeitos tóxicos da proteína beta amiloide. Porque o óxido nítrico modula o fluxo sanguíneo cerebral e a memória, e a redução da produção de óxido nítrico tem sido observada em cérebros de pacientes com Alzheimer, a estimulação da produção de óxido nítrico pelo *l*-deprenil poderia contribuir para a melhora das funções cognitivas nestes pacientes (Thomas, 2000). É também conhecido como ativador de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e catalase em regiões cerebrais

dopaminérgicas (Kitani *et al.*,2002). Por esses motivos utilizamos o *l*-deprenil no estudo do dano causado pela isquemia cerebral transitória.

OBJETIVOS

Gerais

- Estudar o comportamento, a memória e as alterações neuroquímicas nas áreas cerebrais em ratos submetidos a isquemia cerebral transitória (ICT) após tratamento com *l*-deprenil .

Específicos

- Verificar a área de infarto no cérebro de ratos após ICT.
- Estudar os efeitos do *l*-deprenil, na atividade locomotora e na memória, após a indução da isquemia cerebral transitória por oclusão das artérias carótidas em ratos, usando os modelos de Esquiva passiva, labirinto em T elevado e Labirinto Aquático.
- Tentar reverter às alterações comportamentais e déficits de memória nos animais isquemiados, pelo tratamento com *l*-deprenil.
- Determinar o nível de peroxidação lipídica, através da dosagem de malondialdeído em hipocampo e córtex temporal, após tratamento dos animais, com *l*-deprenil, no modelo de isquemia cerebral transitória.
- Determinar a formação de óxido nítrico, através da dosagem de nitrito/nitrato, em hipocampo e córtex temporal, após tratamento com *l*-deprenil, no modelo de isquemia cerebral transitória.
- Mensurar os efeitos do *l*-deprenil na atividade enzimática da catalase e da protease caspase-3 em hipocampo de ratos isquemiados
- Estudar a participação da enzima catalase no modelo de isquemia cerebral transitória e após tratamento com *l*-deprenil.
- Estudar a ação do *l*-deprenil na atividade da Protease Caspase-3 no modelo de isquemia cerebral transitória.

MATERIAIS E MÉTODOS

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS.

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas, jovens (2 meses, 200-250g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos à temperatura de 25°C com um ciclo de 12 h de luz/escuro e com livre acesso a água e comida.

2. DROGAS UTILIZADAS NOS TRATAMENTOS

- *l*-Deprenil (Niar®) 10 mg comprimidos;
- Ketamina (Francotar – Virbac, Brasil®) (100 mg/mL ampola) ;
- Cloridrato de Xilazina 2% (0,02g/mL) (Rompum® - Bayer, Brasil)

Todas as drogas foram dissolvidas em salina 0,9%. Os reagentes usados no preparo dos tampões e demais soluções eram de grau analítico.

3. ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITÓRIA POR OCLUSÃO BILATERAL DAS CARÓTIDAS (Ulrich, 1998).

Os animais foram anestesiados com Ketamina (Francotar® – Virbac, Brasil, 90 mg/kg) e Cloridrato de xilazina a 2% (Rompum® - Bayer, Brasil, 10 mg/Kg) administrados por via intraperitoneal (i.p.) e imobilizados. Foi feito um corte vertical na altura da traquéia, para exposição das carótidas em ambos os lados. Após separação do nervo vago das artérias, estas foram pinçadas com pinça buldogue e submetidas à isquemia cerebral transitória durante 20 minutos. A artéria caudal dos animais foi usada para retirada de uma amostra de sangue arterial para medição do pH, saturação do PaCO₂, PaO₂ e O₂. A temperatura retal foi monitorada e mantida em torno de 37°C através de uma luz incandescente (Figura 11). Após esse período, os buldogues foram removidos, o local da incisão foi suturado e os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperação da cirurgia com livre acesso a água e comida. O grupo falso-operado foi submetido a procedimento semelhante com exceção do clampeamento das artérias carótidas.



Figura 11 – Imagem do momento da Isquemia Cerebral Transitória (ICT) com o clampeamento de ambas as artérias carótidas, juntamente com e monitoramento da temperatura corporal por termômetro via retal.

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após a cirurgia os animais foram divididos em grupos de 10 animais, de acordo com o seguinte esquema de tratamento (Tabela 2):

Grupos	Tratamento
1	Falso operado
2	Falso operado + <i>l</i>-deprenil 10 mg/kg; <i>v.o.</i>(FO + DEP 10)
3	Isquemiado (20 min) (ICT)
5	Isquemiado (20 min) + <i>l</i>-deprenil 5 mg/kg; <i>v.o.</i> (ICT + DEP 5)
6	Isquemiado (20 min) + <i>l</i>-deprenil 10 mg/kg; <i>v.o.</i> (ICT + DEP 10)

v.o. – via oral

* - O tratamento com o *l*-deprenil foi feito 2 horas antes do início da cirurgia da isquemia cerebral transitória e continuado, diariamente, por 5 dias após a cirurgia.

Após 1 hora e 24 horas da ICT, os animais foram sacrificados e os cérebros dissecados sobre gelo para determinação do tamanho da área de infarto utilizando a coloração por 2,3,5 Cloridrato de trifeniltetrazolim TTC.

Após 48 horas da ICT e tratamento com *l*-deprenil, os animais foram sacrificados e os cérebros dissecados sobre gelo para retirada do hipocampo utilizado para a determinação da atividade da enzima protease caspase-3.

Após 24 horas do final do tratamento (6° dia), os animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora e memória, a seguir foram sacrificados e os cérebros dissecados sobre gelo para retirada do hipocampo e córtex temporal utilizados para a determinação da dosagem de MDA, nitrito/nitrato, atividade da enzima catalase e atividade da protease caspase-3.

5. QUANTIFICAÇÃO DO DANO ISQUÊMICO ATRAVÉS DA COLORAÇÃO PELO TTC (2,3,5- Triphenyltetrazolium Chloride) (Goldlust *et al.*, 1996)

Para validar o modelo de isquemia cerebral, grupos de animais foram sacrificados 1 hora e 24 horas após a isquemia, os cérebros foram removidos, e fatias foram feitas ao nível do corpo estriado (Bregma \pm 0.5, Paxinos e Watson, 1986). As fatias foram imersas em uma solução de 1% TTC e levadas ao banho-maria a 37°C por 15 minutos, então foram fixadas em formol a 10%, e transferidas para uma lâmina de vidro e escaneada. A intensidade da coloração promovida pelo TTC foi analisada através de um programa de computação OsirisTM (University of Geneva, Switzerland). A área total do infarto no córtex e nos gânglios da base foi mostrada junta e expressada como o percentual da área total.

6. TESTES COMPORTAMENTAIS

6.1 TESTE DE ATIVIDADE LOCOMOTORA (OPEN FIELD – CAMPO ABERTO)

Para verificar se o tratamento não acarretou alteração da atividade locomotora, o que prejudicaria a realização dos testes de memória, foi feito o teste de atividade locomotora usando o modelo de Campo Aberto (*Open Field*) (Broadhurst, 1957). O teste foi realizado vinte e quatro horas após o fim do tratamento com *l*-deprenil.

O campo aberto consiste de uma arena quadrada (50 x 50 cm), iluminada com luz vermelha. O piso da arena é dividido em 4 quadrados iguais. No teste o animal será colocado na arena e deixado para explorar o ambiente por um (01) minuto, após este período será registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal, durante um tempo de três (03) minutos e o número de rearings (levantar as patas- exploração vertical). A arena será limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interfira no teste (Figura 12).

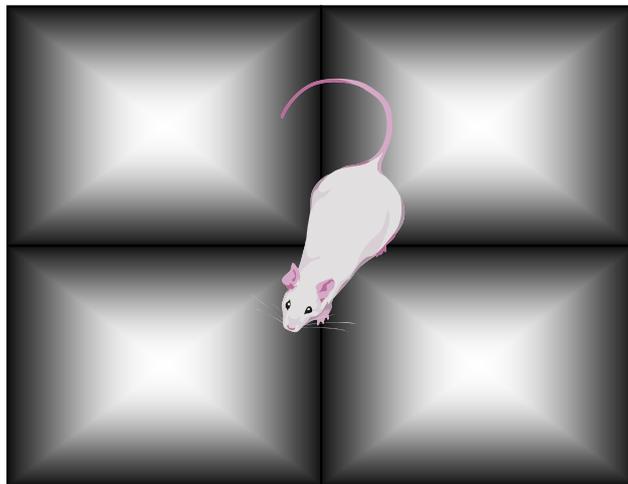
6.2 TESTES DE MEMÓRIA

6.2.1 ESQUIVA PASSIVA (*PASSIVE AVOIDANCE TEST*)

Este teste foi baseado no método de De Noble e cols. (1986). Vinte e quatro horas após o protocolo de isquemia e tratamento com as drogas, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva. O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), dividida em dois compartimentos separados por uma janela, um branco (iluminado) e um preto (escuro), este tem o piso eletrificado. O animal foi colocado no compartimento iluminado e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 min., quando então foi retirado (Figura 13).

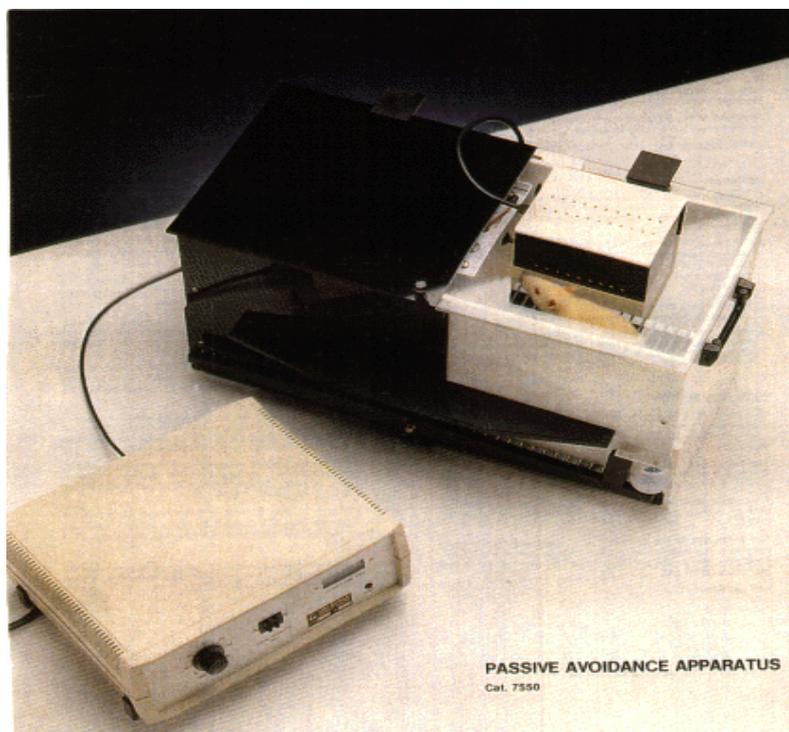
Após 30 seg o animal foi colocado novamente no compartimento iluminado. O animal ao entrar no compartimento escuro, recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 seg., com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 300 seg. (treino). Retirou-se o animal (alguns animais saíram espontaneamente após o choque) e após 15 min. este foi colocado novamente no compartimento iluminado e registrou-se a latência de entrada (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado foi testada após 24 h, quando os animais foram colocados no compartimento iluminado e o tempo de latência para a entrada no compartimento escuro foi registrado (os animais nesta fase não levaram choque) (avaliação da memória tardia).

Figura 12 – Campo Aberto



Quadrados / 3 min

Figura 13 - Aparelho de Esquiva Passiva.



6.2.2 LABIRINTO EM T ELEVADO (*T MAZE*)

Este teste para estudos de memória foi validado por Viana *et al.* (1994). O labirinto foi construído em madeira, com 3 braços de dimensões idênticas (50 X 10 cm), sendo um braço fechado por paredes de 40 cm de altura perpendicular aos dois braços abertos opostos. Para evitar a queda dos animais os braços abertos estão circundados por uma tira de acrílico de 1 cm de altura. O labirinto está elevado 50 cm do chão (Figura 14). Nos dois dias antes do teste os animais foram gentilmente manuseados durante 5 minutos. Vinte quatro horas após o final do tratamento com *l*-deprenil e salina o teste foi realizado. Cada rato foi colocado no final do braço fechado do labirinto e o tempo gasto para sair do braço com as quatro patas foi registrado (treino). A seguir o mesmo procedimento foi repetido em dois treinos subsequentes (Esquiva 1 e 2) com 30 segundos de intervalo. Dois dias mais tarde (48 h), o animal foi colocado novamente no labirinto e o tempo gasto para sair do braço fechado foi medido (Esquiva 3). O tempo máximo de observação (*cut off*) durante as esquivas foi de 300 seg.

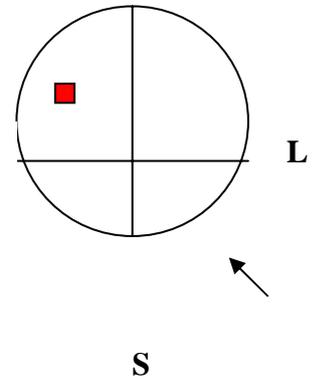
Figura 14 – Labirinto em T Elevado (T-maze)



6.2.3 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (*WATER MAZE*)

Este teste é usado para se avaliar a memória espacial (Morris, 1984). O labirinto aquático consiste de um tanque de plástico circular (132 cm de diâmetro) e paredes de 40 cm de altura, cheio (até 10 cm da borda) com água (25°C) acrescida de leite em pó (para deixar a água opaca). O aparelho possui uma plataforma de acrílico (15 X 15 X 19) colocada no quadrante noroeste 2 cm abaixo da superfície da água (Figura 15). Vinte e quatro horas após o término do tratamento com *l*-deprenil e salina, os animais iniciaram o treinamento. Foram feitos 6 treinos em dois dias consecutivos (aprendizagem) e após 48 horas os animais foram testados para avaliação da memória espacial (retenção). Durante o treino o animal foi colocado em 6 locais diferentes do tanque e teve 54 segundos para achar a plataforma ao final deste tempo, era colocado manualmente na mesma durante 10 segundos e retirado do tanque por 30 segundos. Ao final do segundo dia cada animal recebeu 12 treinos para a aquisição da memória. No quarto dia (48h após), a plataforma foi removida e os animais colocados no tanque, na posição sudeste (em relação à posição da plataforma). Os animais permaneceram até 60 segundos e o tempo de latência para alcançar o local da plataforma original foi registrado.

Figura 15 - Labirinto Aquático de Morris (Water Maze)



■ Plataforma

→ Saída do animal

7. DOSAGEM DE NITRITO/NITRATO (Green *et al.* 1981)

7.1. Princípio:

O reativo de Griess (N-1-naftiletlenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 560 nm.

7.2. Reagentes utilizados:

Need 0,1% (N-1-naftiletlenodiamina)

Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%

Ácido fosfórico 5%

7.3. Reagente para uso (Reagente de Griess)

Misturar em partes iguais: Need 0,1% , H₂O bidestilada, Sulfanilamida 1% e Ácido fosfórico 5%.

7.4. Curva padrão:

Solução estoque de NaNO₂ (10 mM em tampão). Pesar 7 mg e dissolver em 10 mL de água destilada. Foram feitas diluições em série e usadas na obtenção da curva padrão (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,76 µM).

7.5. Protocolo:

Para realização do ensaio foram usados 100 μL do reagente de Griess e adicionados 100 μL do sobrenadante (centrifugado) do homogenato a 10% do hipocampo dos ratos em salina ou 100 μL dos padrões nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100 μL do reagente de Griess e adicionados 100 μL de salina. A leitura da absorvância foi feita em 560 nm em leitor de placa. As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então se determinou a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

8. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (Dosagem do Malondialdeído - MDA) (Mihara & Uchiyama, 1978).

8.1. Princípio:

A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para a determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorvância máxima em pH ácido de 532 a 535 nm.

8.2. Protocolo:

Foram preparados homogenatos a 10% do tecido hipocampal em solução de KCl 1,15%, 500 µL do homogenato foram adicionados a um tubo de ensaio, seguidos de 3,0 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) a 1 % e 1mL de solução de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.) 0,6 %. Esta mistura foi submetida a fervura em banho-maria por 45 minutos ($100^\circ C$), a seguir resfriada em banho de gelo, adicionados 4 mL de n-butanol, agitada em vortex por 1 minuto e centrifugada a 1200 rpm por 15 min. A fase butanólica foi utilizada para leitura em espectrofotômetro a 520 nm (A_1) e 535 nm (A_2). A diferença das absorvâncias obtidas nas duas leituras ($A_2 - A_1$) foi utilizada para calcular a concentração de malondialdeído. A curva padrão foi obtida usando-se solução de MDA. Foram feitas diluições em série e

utilizadas na obtenção da cura padrão (1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 mM). A concentração de MDA foi expressa em nmoles/g de tecido.

9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (Michiels *et al.*,1994).

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de H₂O e O₂ à proporção que a H₂O₂ é utilizado como substrato, ou seja, é hidrolisado.

A atividade da enzima é medida em 230nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e fornece maior sensibilidade. A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos.

MEIO DA REAÇÃO

- H₂O₂
- Tampão Tris HCl 1M EDTA 5mM pH = 8,0
- H₂O Mimmi-Q

ENSAIO

- Meio da reação - 985 µL
- Amostra (Homogenato a 10% em salina 0,9%) – 15 µL

CÁLCULO

$$\text{CATALASE} = (\Delta \text{ Abs. Am/min} \times V_c / \epsilon \times T_e \times [\text{prot}])$$

$\Delta \text{ Abs. Am/min}$: média do dA dos pontos que estão lineares

V_c : Volume da cubeta

ϵ : Épson ; $0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

T_e : Tomada de ensaio (mL)

[prot] = concentração de proteínas totais

10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEASE CASPASE-3

O método (Nicholson *et al.*, 1995) se baseia na clivagem do poli-(ADP-ribose) polimerase pela caspase-3, no sítio do tetrapeptídeo (Asp-Glu-Val-Asp ou DEVD). Este ensaio utiliza o kit ApoAlert CPP32™- CLONTECH- USA) que utiliza um tetrapeptídeo sintético, DEVD ligado com uma molécula de *p*-nitroanilide (*p*NA) como substrato. Após 48 horas da indução da apoptose pela isquemia cerebral transitória, os animais foram sacrificados e o hipocampo retirado para preparação do respectivo homogenato a 10 % em salina 0,9%. As células do homogenato foram lisadas com uma solução tampão de lise e incubadas com o substrato e o tampão de reação. Após este período as amostras serão lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm. A percentagem do aumento no valor da densidade óptica nas amostras em relação ao controle será indicativo do aumento na atividade da protease caspase-3.

11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney) para a análise estatística dos testes comportamentais e ANOVA e teste de Tukey para os teste paramétricos. O programa de computador usado foi o Graph Pad Instat. Nos teste da habituação ao campo aberto foram utilizados os testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney. No teste de esquiva passiva foram utilizados ANOVA para a análise das diferenças dentro dos tratamentos e os testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney para a análise entre os tratamentos. Para os testes bioquímicos foram utilizados ANOVA e o teste de Tukey como teste post-hoc, com o critério de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Parâmetros Fisiológicos

Os animais foram submetidos à coleta de sangue arterial da artéria caudal durante o procedimento cirúrgico (isquemia) com monitorização da temperatura retal (He *et al.*, 1996). Os resultados são apresentados como percentagem dos valores do pH sanguíneo, níveis de saturação de PaCO₂, PaO₂ e PO₂ no grupo controle e no isquemiado (20min.). Os resultados não mostraram nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros Fisiológicos dos animais controle e submetidos à isquemia cerebral transitória (20 min.).

Valores (%)	Controle (n=5)	Isquemiado (n=5)
pH	7,31 ± 0,02	7,38 ± 0,05
PaCO₂ (mmHg)	24,64 ± 7,33	20,20 ± 5,21
PaO₂ (mmHg)	66,50 ± 2,52	98,40 ± 5,66
PO₂ (mmHg)	91,88 ± 3,32	95,96 ± 1,79

2. Área Total do Infarto Cerebral (Isquemia)

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito anteriormente, sendo que seus cérebros foram retirados 1 hora e 24 horas após a

indução da isquemia cerebral transitória (20 min.) com monitoramento da temperatura. Os resultados são apresentados como a porcentagem da área do infarto em relação à área total.

O TTC coloriu as áreas normais com uma cor vermelha intensa, mas não coloriu a área infartada (isquemiada). Nós encontramos no grupo isquemiado uma área de infarto (córtex mais gânglios da base) oscilando entre 34,57 - 41,45% (média $38,01 \pm 3,44\%$) após 1 hora de isquemia (Figura 16) e 17-27% (média $22,00 \pm 2,90\%$) após 24 horas de isquemia (n = 5) (Figura 17) .

A) Isquemia Cerebral transitória com 1 hora de perfusão.

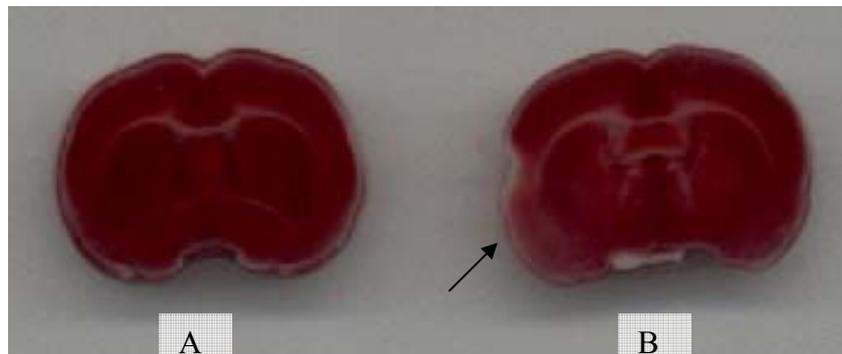


Figura 16 – Coloração promovida pelo TTC em ratos submetidos a ICT, após 1 h de perfusão. (a – controle; b – isquemiado). A seta indica a área diferenciada da coloração (área infartada).

B) Isquemia Cerebral transitória com 24 horas de perfusão.

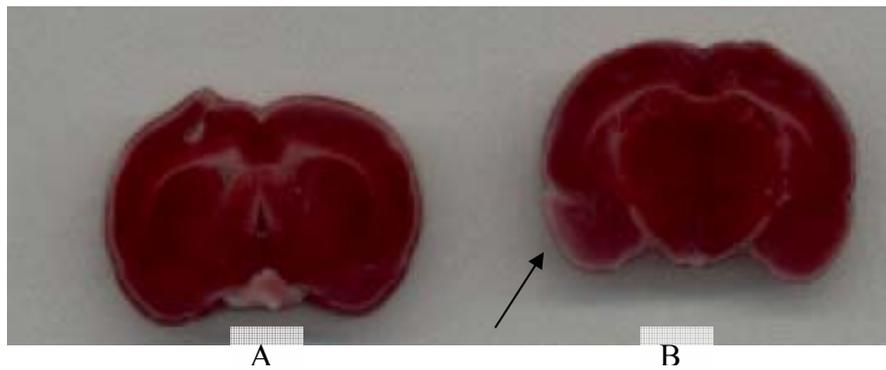


Figura 17 – Coloração promovida pelo TTC em ratos submetidos a ICT, após 24 h de reperfusão. (a – controle; b – isquemiado). A seta indica a área diferenciada da coloração (área infartada).

3. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.1. - Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória na Teste da Atividade Locomotora (Campo Aberto).

Os estudos comportamentais foram realizados como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM observadas no número de animais em parênteses.

Nenhuma alteração na atividade locomotora foi detectada nos grupos FO, ICT, Dep 10 + ICT (**Cruzamentos - FO - $4,66 \pm 1,54$; ICT - $3,37 \pm 1,17$; ICT + DEP 10 - $3,00 \pm 1,00$; Rearing - FO - $3,66 \pm 1,45$; ICT - $2,57 \pm 0,75$; ICT + DEP 5 - $3,12 \pm 0,89$; ICT + DEP 10 - $2,83 \pm 0,30$** No de ocorrências). Porém, um aumento na atividade locomotora foi observado no grupo Dep 5 + ICT ($7,37 \pm 1,77$, $p < 0,02$) quando comparado com o grupo FO, tratado com salina, ($4,66 \pm 1,54$) (Figura 18). Um aumento da atividade locomotora espontânea no campo aberto é consistente com a hipótese da disfunção hipocampal, e no presente trabalho, este efeito foi apresentado na presença do *l*-deprenil na dose de 5 mg/kg.

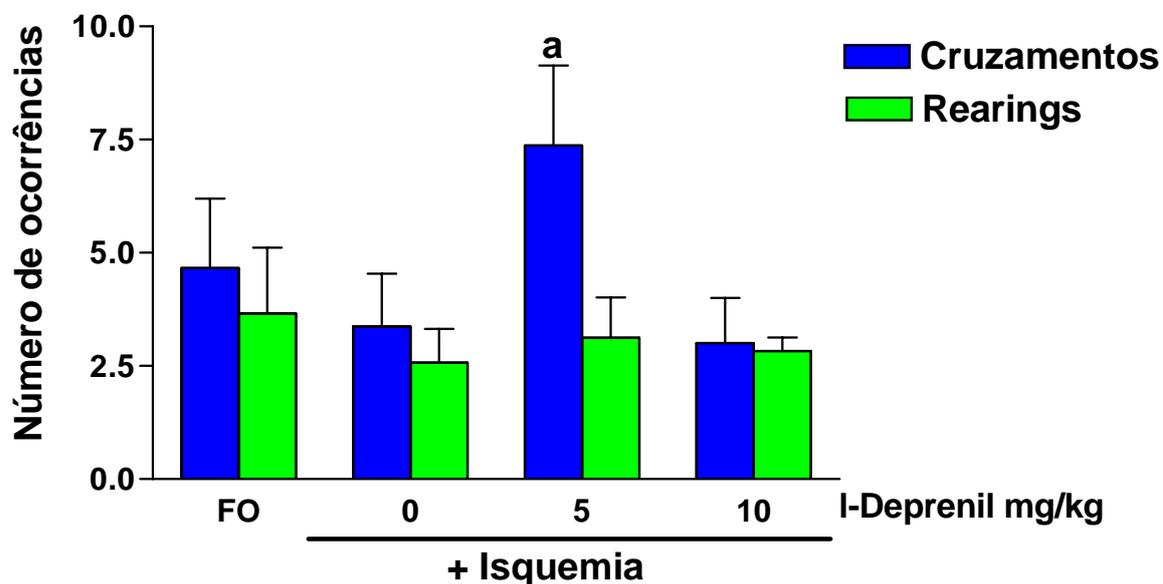


Figura 18 - Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (5 e 10mg/kg, v.o.) na atividade locomotora de ratos (n=7) submetidos a ICT. ^a vs controle, (P<0.05, Teste de Mann-Whitney). Os valores representam a média ± EPM e o número de animais observados em parênteses. Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min.

3.2. - Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) no teste do Labirinto em T elevado (T-Maze).

Como ilustrado na Fig. 19 (a), a ICT afetou a aquisição da memória e a retenção quando os animais foram testados no mesmo dia (esquiva 1 e 2) quando comparados com o grupo controle (FO). O teste de Kruskal-Wallis mostrou alteração significativa na latência da esquiva inibitória (esquiva 1, 2 quando comparados com o treino) no falso-operado (FO - treino: $20,34 \pm 3,43$ s; esquiva 1 - $231,6 \pm 34,81$ s; esquiva 2 - $247,8 \pm 27,25$ s; KW = 19,62, $p < 0,001$), e no grupo *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg) + isquemia (Dep 5 - treino: $110,8 \pm 56,16$ s; esquiva 1 $299,8 \pm 0,16$ s; esquiva 2 - $260 \pm 40,00$ s; KW = 9,16, $p < 0,01$. Dep 10 - treino: $29,15 \pm 8,64$ s; esquiva 1 - $299,80 \pm 0,25$ s; esquiva 2 $299,8 \pm 0,25$ s; KW = 6,98, $p < 0,05$). Isto indica uma boa aquisição de memória. Portanto, o resultado do grupo ICT + salina não foi eficiente indicando um déficit da memória (ICT - treino: $37,75 \pm 11,52$ s; esquiva 1 - $116,30 \pm 65,46$ s; treino 2 - $195,00 \pm 64,10$ s; KW = 3,90, $p < 0,141$). Além disso, existiu uma diferença significativa (Teste Mann-Whitney) entre os grupos na esquiva 3 (retenção) quando comparados com o grupo ICT (Dep 5, MW (3) = 18,483, $p < 0,0003$, Dep 10, MW (3) = 18,483, $p < 0,003$) significando que a retenção da memória foi melhorada pelo tratamento com a droga (Fig. 19 (b)).

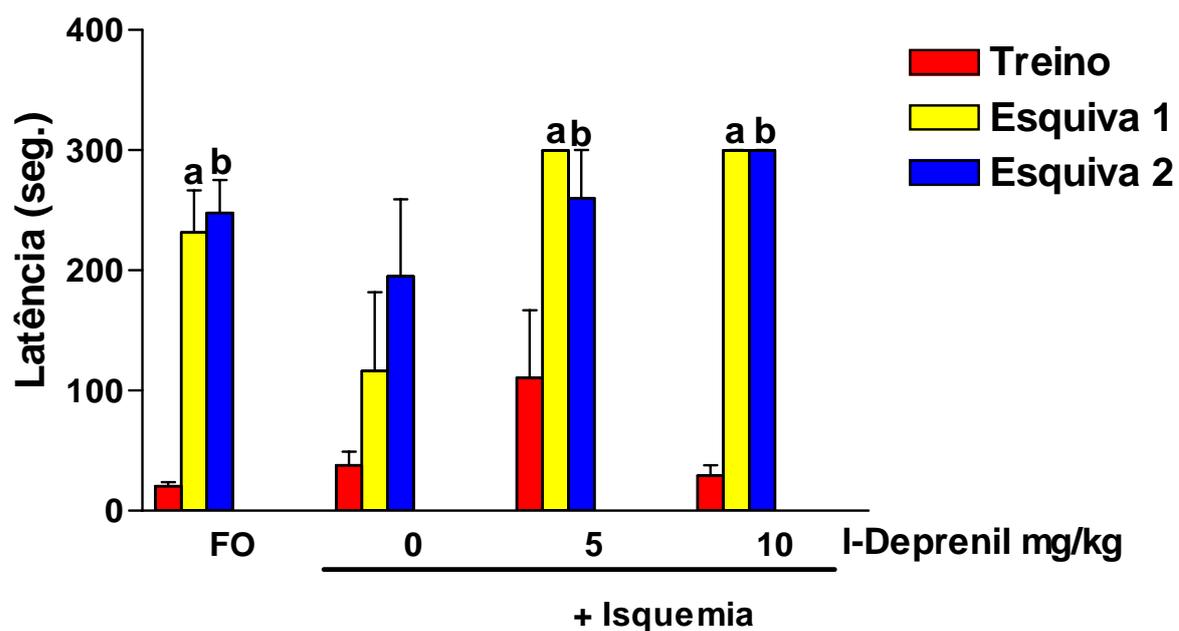


Figura 19 a – Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg, v.o.) na aquisição da memória de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no teste T Maze . ^{a,b} vs treino , (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Os valores representam a média ± EPM e o número de animais observados em parênteses. Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 minutos.

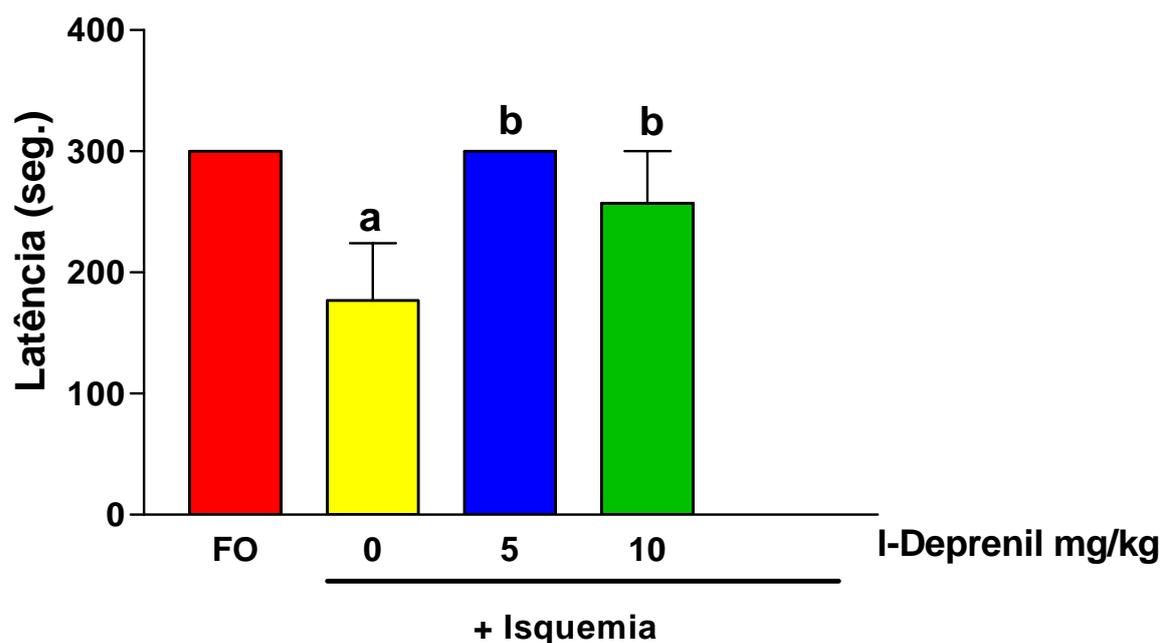


Figura 19 b - Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg, *v.o.*) na retenção da memória de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no teste de T Maze . ^a vs Treino , ^b vs isquemia (P<0.05, Testes Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Os valores representam a média ± EPM e o número de animais observados em parênteses. Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min.

3.3. - Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) no Teste da Esquiva Passiva (Passive Avoidance).

No teste da esquiva passiva os animais aprendem a evitar o choque (treino) não entrando no lado escuro do aparelho, quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). A figura 20 mostra que os animais do grupo controle (FO + salina) apresentaram uma boa retenção da memória, tanto na fase imediata (memória recente), quanto na fase de consolidação (memória tardia), quando comparadas ao treino (ANOVA) (**FO + salina** (n-7)- treino - $15,94 \pm 4,40$ s, memória recente - $138,84 \pm 34,60$ s, memória tardia - $196,32 \pm 34,71$, $p < 0,006$). Por outro lado, os animais que sofreram ICT não apresentaram diferença no tempo de latência de entrada no lado escuro quando comparado com o treino, significando um déficit na aprendizagem e memória (**ICT** (n-7)- treino - $34,37 \pm 10,16$ s, memória recente - $105,54 \pm 35,21$ s, memória tardia - $96,20 \pm 33,44$, $p < 0,33$), o que indica um dano na aquisição e retenção da memória. Comparando os tratamentos observamos um aumento significativo, no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho, nos ratos tratados com *l*-deprenil 5 mg/kg quando avaliados na memória recente (**FO + salina**- $138,84 \pm 34,60$ s; **ICT** - $105,54 \pm 35,21$; **ICT + Dep 5**- $198,88 \pm 38,42$ s; **ICT + Dep 10**- $188,06 \pm 34,60$ s; Kruskal-Wallis, KW-9,66, $p < 0,05$, Mann-Whitney, Dep 5 vs ICT, $p < 0,05$) (Figura 20), quanto na memória tardia foi observado uma diminuição significativa, no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho, nos ratos tratados com *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg) (**FO + salina**- $196,32 \pm 34,71$ s; **ICT** - $96,20 \pm 33,44$ s; **ICT + Dep 5**- $299,83 \pm 0,16$ s; **ICT + Dep 10**- $264,70 \pm 35,28$ s; Kruskal-Wallis, KW-14,57, $p < 0,05$, Mann-Whitney, Dep 5 e Dep 10 vs ICT, $p < 0,05$), significando um aprendizado do animal em lembrar o choque recebido durante o treino, indicando uma reversão da lesão sofrida pelos animais com a ICT (Figura 21).

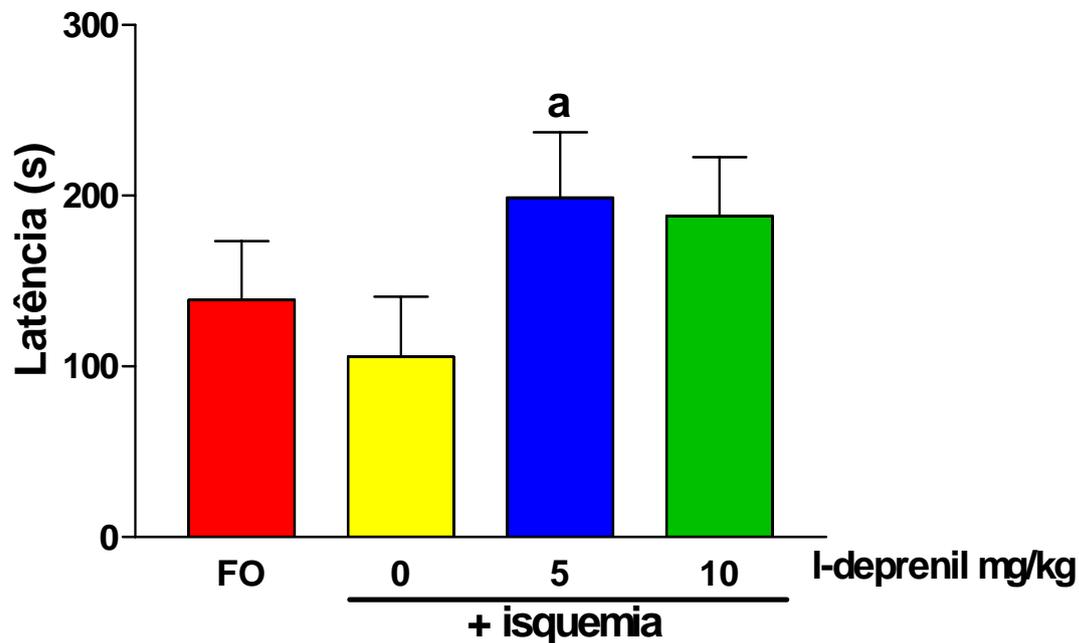


Figura 20 – Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil (5 e 10 mg/kg, v.o.) na memória recente de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no Teste da Esquiva Passiva. ^a vs isquemia, (P<0.05, Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). Os valores representam a média ± EPM e o número de animais observados em parênteses. Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min.

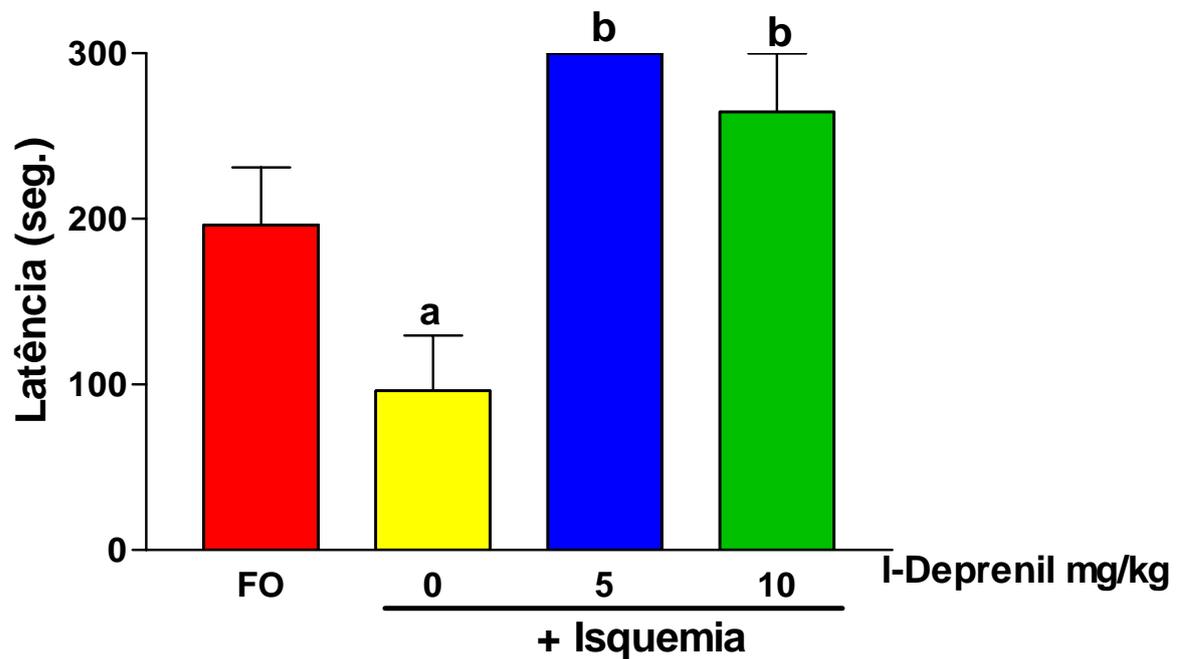


Figura 21 – Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (0.1, 5, 10 mg/kg, v.o.) na memória tardia de ratos (n=7) submetidos a ICT (20 min) no Teste da Esquiva Passiva. ^a vs falso-operado (FO), ^b vs isquemiado (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min.

3.4. Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil nos ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) no Teste do labirinto Aquático de Morris (Water Maze).

Neste teste a ICT promoveu um dano na retenção memória dos animais em relação ao grupo controle (FO), porém o *l*-deprenil conseguiu reverter o dano na aquisição da memória induzida pela ICT em ambas as doses (5 e 10 mg/kg) observamos também que o grupo Dep 10 apresentou um melhor desempenho na aquisição da memória quando comparado com o grupo Dep 5. (**FO** (n-10): $5,4 \pm 0,84s$; **FO + DEP 10** (n-10): $9,7 \pm 2,28s$; **ICT** (n-9): $32,44 \pm 2,95s$; **ICT + DEP 5** (n-8): $12,88 \pm 1,4s$; **ICT + DEP 10** (n-8): $4,5 \pm 0,70s$, Kruskal-Wallis, KW-29,07, $p < 0,05$, Mann-Whitney, FO + DEP 10, Dep 5 e Dep 10 vs ICT, $p < 0,05$). (Figura 22).

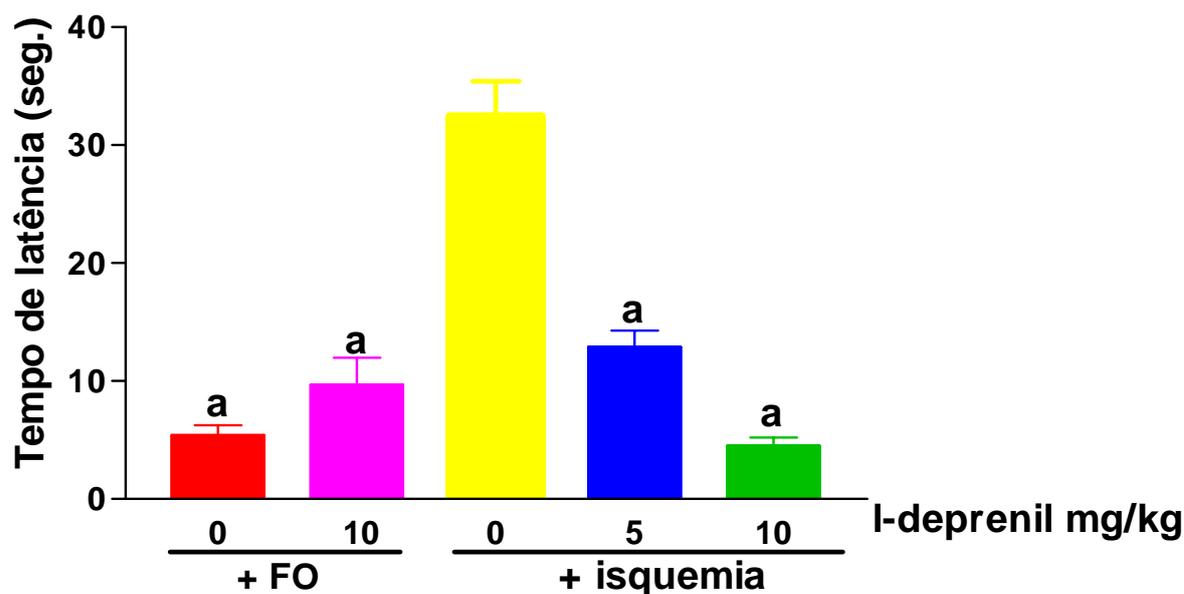


Figura 22 - Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil (5 e 10mg/kg, v.o.) na retenção da memória de ratos (n=7) submetidos a ICT no teste do labirinto aquático de Morris. ^a vs isquemia (P<0.05, Testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney). Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min.

4. Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil nos níveis de Malondialdeído (MDA) no hipocampo e córtex temporal em ratos submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT) .

Os ratos submetidos a ICT mostraram um aumento de 71% nos níveis de MDA no hipocampo quando comparados com o grupo controle (FO), e o tratamento com *l*-deprenil reverteu significativamente este efeito ($p < 0,05$). Os valores dos níveis de MDA foram trazidos próximos aqueles valores do grupo controle (FO) em relação aos grupos (ICT + DEP 5 e ICT + DEP 10, 34 e 38%, respectivamente) com ambas as doses de *l*-deprenil mais ICT. No córtex temporal, a isquemia (grupo ICT) não aumentou os níveis de MDA quando comparados com o grupo controle FO. Portanto, os ratos submetidos a ICT e tratados com altas doses de *l*-deprenil (10 mg/kg) apresentaram níveis de MDA 30% menores que aqueles mostrados por ambos os grupos FO e ICT (Tabela 4). Os resultados são apresentados como a percentagem.

Tabela 4 – Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil na formação de Malondialdeído (MDA) (nmol/g de tecido) em homogenatos de hipocampo e córtex temporal de ratos (n=7) submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).

Grupos	Hipocampo	Córtex Temporal
Controle (falso-operado)	45,4 ± 4,45	46,8 ± 4,36
Isquemia 20 min.	77,6 ± 8,97 ^a	48,7 ± 1,33
<i>l</i> -deprenil (5 mg/kg, v.o.) + isquemia	51,2 ± 1,68 ^b	52,5 ± 3,74
<i>l</i> -deprenil (10 mg/kg, v.o.) + isquemia	48,5 ± 6,70 ^b	33,4 ± 2,98

Nota. $p < 0,05$, ANOVA e Teste de Tukey.

^a vs. Controle.

^b vs Isquemia.

Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min. Os valores na tabela são expressos como a média ± EPM em nmol/g de tecido.

5. Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil nos níveis de Nitrito (NTT) no hipocampo e córtex temporal em ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).

No hipocampo, os níveis de nitrito foram significativamente aumentados após a ICT quando comparados com o grupo controle FO (82% aumento). O *l*-deprenil (10 mg/kg) reverteu este efeito (*l*-deprenil 10 + ICT) e os valores foram trazidos próximos àqueles do controle. Por outro lado, a isquemia não afetou os níveis de nitrito no córtex cerebral. O *l*-deprenil na dose menor diminuiu de modo significativo os níveis de nitrito quando comparados com os grupos controle e ICT (Tabela 5).

Tabela 5– Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil na formação de Nitrito (NTT) (mM) em homogenatos de hipocampo e Córtex Temporal de ratos (n=5) submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT).

Grupos	Hipocampo	Córtex Temporal
Controle (falso-operado)	1,31 ± 0,17	0,10 ± 0,006
Isquemia 20 min.	2,39 ± 0,20 ^a	0,1 ± 0,008
<i>l</i> -deprenil (5 mg/kg, v.o.) + isquemia	1,74 ± 0,42	0,05 ± 0,017 ^a
<i>l</i> -deprenil (10 mg/kg, v.o.) + isquemia	1,31 ± 0,21 ^b	0,08 ± 0,005

Nota. $p < 0,05$, ANOVA e Teste de Tukey.

^a vs. Controle.

^b vs Isquemia.

Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min. Os valores na tabela são expressos como a média ± EPM em mM.

6. Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil na atividade da Catalase (CAT) em hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).

A isquemia cerebral transitória não alterou a atividade da enzima catalase em hipocampo de ratos quando comparados com o grupo controle. Como também o tratamento com *l*-deprenil 10 mg / kg (**FO** – $11,92 \pm 1,48$; **ICT** – $11,19 \pm 1,47$; **ICT + DEP 10** – $10,75 \pm 1,09$ mM/min/ug de proteína) (Figura 23).

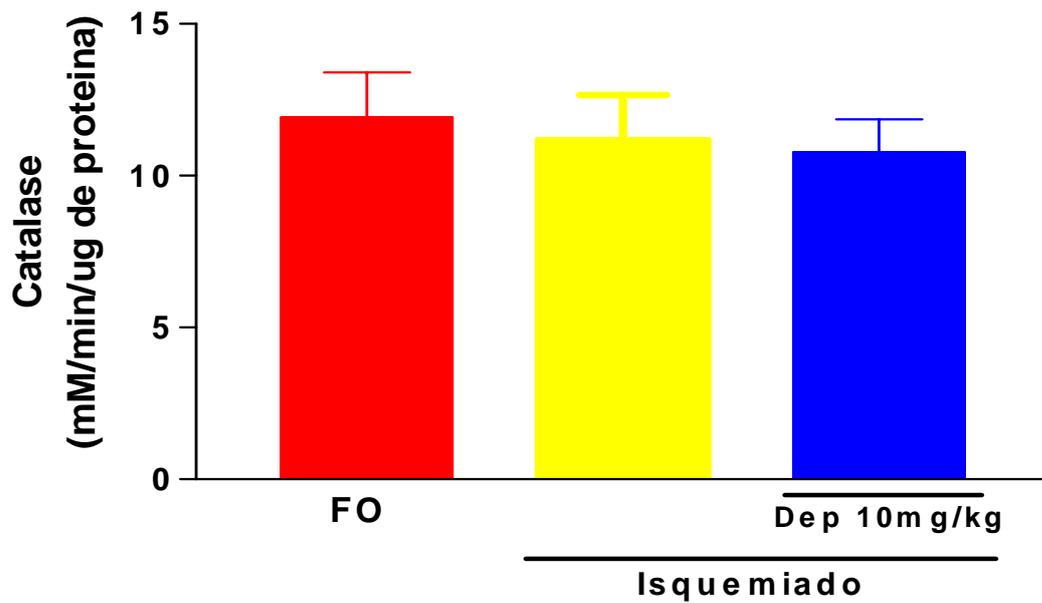


Figura 23 - Efeito do tratamento diário com *l*-deprenil (10mg/kg, v.o.) na atividade da catalase (n=5) em ratos submetidos a ICT. Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min. Os valores são expressos como a média \pm EPM em mM/min/ug de proteína.

7. Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-Deprenil na atividade da Protease Caspase-3 em hipocampo de ratos submetidos à isquemia cerebral transitória (ICT).

No hipocampo, a atividade da protease caspase 3 foi significativamente aumentada após a ICT quando comparado com o grupo controle FO (50% aumento). O *l*-deprenil (10 mg/kg) reverteu este efeito (*l*-deprenil 10 + ICT) e os valores foram trazidos próximos àqueles do controle. Por outro lado, o tratamento do grupo controle com *l*-deprenil 10 mg / kg (FO + DEP 10) apresentou uma menor atividade da protease caspase 3 quando comparado com o próprio controle sem tratamento (FO), entretanto o tratamento do grupo que sofreu isquemia cerebral transitória e tratado com *l*-deprenil na dose de 5 mg/kg (ICT + DEP 5) não apresentou diminuição significativa na atividade da protease caspase 3 quando comparado com o grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito do tratamento diário (5 dias) com *l*-deprenil na atividade da protease Caspase 3 em homogenato de hipocampo de ratos (n=5) submetidos à Isquemia Cerebral Transitória (ICT).

Grupos	Hipocampo (nm)
Controle (falso-operado)	0,083 ± 0,006
Controle (falso-operado) + <i>l</i> -deprenil (10 mg/kg, v.o.)	0,0405 ± 0,002 ^a
Isquemia 20 min.	0,124 ± 0,017 ^a
<i>l</i> -deprenil (5 mg/kg, v.o.) + isquemia	0,125 ± 0,007
<i>l</i> -deprenil (10 mg/kg, v.o.) + isquemia	0,080 ± 0,007 ^b

Nota. $p < 0,05$, ANOVA e Teste de Tukey.

^a vs. Controle.

^b vs Isquemia.

Ratas Wistar fêmeas (200-250g, 2 meses) foram tratadas duas horas antes da indução da ICT e diariamente com *l*-deprenil (DEP 5 e 10 mg/kg) durante 5 dias (n=7), e os animais controle (falso-operado, FO) e isquemiado (ICT, 0 mg/kg de *l*-deprenil) com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de isquemia cerebral de 20 min. Os valores são expressos como a média ± EPM em nm.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O derrame cerebral definido classicamente como o acidente cerebrovascular (AVC) é causado pela redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio e nos metabólitos de alta energia em uma área do cérebro. É comumente dividido em duas categorias.

A primeira e mais comum é o AVC isquêmico ou tromboembólico, este é devido a um suprimento sanguíneo inadequado como resultado de um coágulo sanguíneo. A segunda categoria é o AVC hemorrágico, que envolve sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo.

A isquemia cerebral pode ser global ou focal. A isquemia global é encontrada durante situações tais como parada cardíaca, enquanto a isquemia focal é encontrada durante falência do suprimento sanguíneo a uma parte restrita do cérebro. Com o objetivo de diminuir esta morbidade neurológica, devemos procurar entender os mecanismos envolvidos no dano e reparação neuronal, bem como procurar a terapia mais efetiva.

A fisiopatologia da isquemia cerebral tem sido extensivamente estudada em ratos através de vários métodos, incluindo oclusão de múltiplos vasos, hipotensão, hipovolemia e alteração da temperatura ambiente, para produzir alterações globais no fluxo sanguíneo cerebral e no metabolismo. A isquemia cerebral causa um grupo de modificações seqüenciais, envolvendo redistribuição iônica, modificações das reações enzimáticas, que são próprias do metabolismo e da sinalização intracelular (Zagrean *et al.*, 1995). Portanto, essas alterações, em si, já podem justificar muitas dos achados encontrados em nossos experimentos.

A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações, funcionais e estruturais, que se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. Em adição à reversão da isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em um número de efeitos deletérios: necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular (*cell swelling*) e restauração não

uniforme do fluxo para todas as porções do tecido. Esta restauração caótica do fluxo tissular é conhecida como fenômeno do não refluxo (*no reflow phenomenon*), que é o resultado de um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local, mais alterações disfuncionais, mais edema etc (Evora *et al.*, 1996).

Os distúrbios metabólicos durante isquemia ou hipóxia tissular são muito bem estabelecidos, porém evidências clínicas e experimentais demonstram que os principais eventos que levam a disfunções celular e tecidual relacionam-se com a subsequente reperfusão. Quando o fluxo sanguíneo tissular é interrompido, uma série de processos metabólicos e enzimáticos é afetada. As reservas de ATP são rapidamente depletadas, há um acúmulo de lactato, a célula torna-se acidótica e são ativadas proteases intracelulares (Hackel & Jennings, 1988). Além disso, o aumento da permeabilidade capilar causa edema tissular (Ogawa *et al.*, 1992). Porque a reversibilidade deste processo relaciona-se diretamente com a duração da isquemia (Sthal *et al.*, 1989), o objetivo terapêutico principal é restabelecer a reperfusão o mais rápido possível. Embora o benefício da reperfusão precoce seja inquestionável, a reintrodução do oxigênio em um meio isquêmico inicia uma corrente complexa de eventos levando a lesões tissulares adicionais e a um acúmulo intracelular de cálcio (Ku, 1982; Braunwald & Kloner, 1985). Muito se tem estudado nos últimos 35 anos para se definir a patogênese da lesão de reperfusão. Estes estudos incluem investigações laboratoriais, observações clínicas e grandes ensaios clínicos. Teorias atuais tentam integrar três observações básicas: 1) o comprometimento do relaxamento vascular observado após isquemia-reperfusão afeta, primariamente, os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 2) seqüestradores (*scavengers*) de radicais livres do oxigênio limitam a lesão de reperfusão, e 3) o bloqueio da ativação e adesão dos neutrófilos podem reduzir a lesão de reperfusão (Seccombe & Schaff, 1994).

A função normal cerebral depende altamente de uma adequada oxigenação do tecido. A isquemia é definida como uma redução severa no fluxo sanguíneo, resultando na falta de oxigênio e transporte de nutrientes, levando o tecido cerebral a hipóxia e morte celular. Diante de um episódio de doença cérebro-vascular isquêmica, observa-se que não é homogênea a redução do fluxo sanguíneo cerebral através do

território isquêmico, mas é maior no centro da lesão, região denominada core isquêmico.

A isquemia torna-se progressivamente menos severa quanto mais distante o core isquêmico, até que o fluxo retorne ao normal em regiões supridas por artérias adjacentes que não estão ocluídas. Esta região na periferia do território isquêmico é então chamada de penumbra isquêmica. A manutenção relativa da perfusão nessa região é o resultado de fluxo colateral originado de território não-isquêmico adjacente (Iadecola C., 1999).

A penumbra isquêmica é uma região eletrofisiologicamente dinâmica e metabolicamente instável, porque, a despeito do declínio crítico da perfusão na zona de penumbra, o nível de metabolismo de glicose tende a ser mantido em níveis normais (Zhao *et al.*, 1997).

No presente estudo, os dados dos parâmetros fisiológicos (pH, PaCO₂, PaO₂ e saturação de O₂) não mostraram diferença significativa entre os grupos controle (FO) e isquemiado (ICT), e estes resultados estão de acordo com os dados de He *et al.*(1996). Um método comum de avaliar o tamanho da lesão em cérebros de ratos após isquemia focal envolve a coloração dos cérebros com 2,3,5- cloridrato de tetrazolio (TTC). O TTC que é incolor em solução é reduzido por enzimas no interior da mitocôndria produzindo uma coloração vermelha intensa. As regiões do infarto cerebral não convertem (reduzem) o TTC ficando incolores. A marcação pelo TTC demonstra as lesões da isquemia que podem ser avaliadas visualmente mesmo sem exame por microscópio. As áreas infartadas avaliadas com TTC correspondem quase com aquelas avaliadas com outros métodos histológicos. A estabilidade desta técnica permite avaliação do tamanho da lesão com pequena quantidade de preparação de tecido. A dimensão da quantidade do volume do infarto determinou que esta técnica tem utilidade na determinação da extensão do dano cerebral em experimentos com modelos de isquemia e na avaliação do potencial neuroprotetor de drogas para a isquemia cerebral (Goldlust *et al.*, 1996). O infarto é em grande parte detectado pela

coloração com um corante específico TTC (cloridrato de trifeniltetrazolim) (Bederson *et al.*, 1986; Goldlust *et al.*, 1996; Mathews *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003). No modelo de isquemia global cerebral mostrou-se que 24 horas de reperfusão aumento em torno de 40% a área do infarto pelo método de coloração usando TTC (Gupta *et al.*, 2003). Em nossos estudos a ICT promoveu uma pequena área de infarto após 1 e 24 horas da indução nas áreas cerebrais visualizadas.

O *l*-deprenil, um inibidor seletivo irreversível da enzima MAO-B é clinicamente usado no tratamento da Doença de Parkinson e apresenta um mecanismo de ação complexo o qual não pode ser explicado somente pela sua ação inibitória da MAO-B. O pré-tratamento com *l*-deprenil pode proteger os neurônios contra uma variedade de neurotoxinas as quais danificam os neurônios dopaminérgicos, adrenérgicos, colinérgicos e serotoninérgicos (ver revisão Ebadi *et al.*, 2002). O *l*-deprenil produz um efeito “amphetamine-like”, aumentando a liberação de dopamina e bloqueando a sua recaptação e também estimula a expressão gênica da descarboxilase de aminoácidos L-aromáticos, aumentando os níveis estriatais de feniletilamina e ativando os receptores dopaminérgicos. Além disso, o *l*-deprenil reduz a produção de radicais oxidativos, promove uma “up-regulation” das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase e catalase (Ebadi *et al.*, 2002). Contudo, o *l*-deprenil tem sido proposto possuir ação protetora de neurônios dopaminérgicos na Doença de Parkinson (Naoi *et al.*, 2000).

A memória é a capacidade que têm o homem e os animais de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Difere da aprendizagem, pois está é apenas o processo de aquisição das informações. São vários os processos da memória. O primeiro deles é a aquisição (aprendizagem), seguindo-se a retenção durante tempos variáveis. A retenção por tempos curtos pode ser transformada em retenção de longa duração pelo processo da consolidação da memória. Em ambos os casos, entretanto, pode haver evocação (lembrança) ou esquecimento das informações memorizadas (Roberto L., 2001).

A perda da memória recente é um dos eventos iniciais e piores sintomas da velhice nos humanos. Um dano similar na memória de curto prazo e na aquisição de nova informação é visto como consequência de um dano bilateral no hipocampo (Milner, 1978; Woods *et al.*, 1982). Estudos anatômicos e bioquímicos têm demonstrado que o hipocampo é particularmente vulnerável aos eventos que ocorrem em consequência da velhice em humanos e animais (Geinisman & Bondareff, 1976; Landfield *et al.*, 1981), sendo os déficits de memória que acompanham o processo de envelhecimento, o resultado de uma falência gradual e progressiva na função hipocampal. Além disso, evidências da perda de fibras colinérgicas com o envelhecimento e na doença de Alzheimer (Terry & Davies, 1980; Bartus *et al.*, 1982) podem comprometer a função hipocampal da qual a memória recente depende.

Os mecanismos neurais da memória não são completamente conhecidos. Considera-se que as informações transitórias e duradouras são armazenadas em diversas áreas corticais, de acordo com sua função: memórias motoras no córtex motor, memórias visuais no córtex visual, e assim por diante. Dessas regiões elas podem ser mobilizadas como memória operacional pelas áreas pré-frontais, em ligação, com áreas do córtex parietal e occipitotemporal. Além disso, as memórias explícitas podem ser consolidadas pelo hipocampo e áreas corticais adjacentes do lobo temporal medial, em conexão com núcleos do tálamo e do hipotálamo. Finalmente, o processo de consolidação é fortemente influenciado por sistemas moduladores, especialmente aqueles envolvidos com o processamento emocional, como o complexo amigdalóide do lobo temporal (Roberto, 2001).

Quando O'Keefe e Dostrovsky (1971) descreveram, pela primeira vez, que determinadas células do hipocampo apresentam aumento na taxa de disparos em função da posição do animal no ambiente, ampliaram-se as perspectivas para exploração dos substratos neurobiológicos da aprendizagem e memória espaciais. A formação hipocampal fornece, para o restante do sistema nervoso, um mapa espacial do ambiente. Existiria, segundo esses autores, um segundo sistema de orientação espacial que independeria das relações espaciais entre os objetos do ambiente e que

não necessitaria da integridade da formação hipocampal, denominado sistema de “Taxon” (ou sistema de guiamento). Esse sistema envolve a localização de uma região pela aproximação do animal em relação à uma única pista específica do ambiente ou, alternativamente, por mudanças baseadas nas rotações do eixo egocêntrico de seu corpo, como por exemplo, virar a direita ou a esquerda em determinado ponto. Este sistema seria capaz de funcionar independentemente do sistema de mapeamento espacial (ou cognitivo).

O modelo do labirinto aquático de Morris é bastante usado para avaliação da habilidade e aprendizado espacial (memória espacial) em roedores (Morris, 1981). A tarefa requer que o animal encontre uma plataforma submersa em uma piscina circular contendo água opaca. Pistas colocadas à distância, tais como as características da sala, objetos, armários, são usados pelo animal para se localizar no ambiente, sem a presença de pistas olfatórias, auditivas ou visuais colocadas próximos para guiar o animal para a plataforma. Também não são definidos caminhos para a plataforma, embora um animal possa aprender a achar a plataforma por circular a piscina a uma distância apropriada da parede. Vários pesquisadores têm identificado sítios de lesões e tratamentos farmacológicos que produzem déficits para aprender a tarefa no labirinto, sem alterar a habilidade em nadar ou ver as pistas. Em particular, as lesões na formação hipocampal e em algumas áreas neocorticais parecem prejudicar o aprendizado para localizar a plataforma, sem afetar a habilidade em nadar (Kolb *et al.*, 1982; Schenk & Morris, 1985, Sutherland *et al.*, 1983). Animais com danos cerebrais provocados por isquemia, restritos ao sub-campo CA1, quando submetidos ao treinamento no labirinto aquático, apresentaram prejuízos na localização espacial da plataforma somente quando treinados em uma situação experimental onde a posição inicial de saída, a partir da borda da piscina, foi alterada a cada nova tentativa. No entanto, as deficiências desaparecem nos treinamentos onde, durante todas as tentativas, a posição inicial de saída foi mantida constante. No segundo caso, os animais provavelmente se valeram de um sistema de orientação não-alocêntrico para resolver a tarefa. Da mesma forma estudos realizados com animais hipocampectomizados foi demonstrado que os animais apresentaram prejuízos de

desempenho no labirinto aquático, quando a plataforma estava submersa, mas conseguiram encontrá-la tão rapidamente quanto aos animais controles, quando esta se encontrava acima do nível da água; ou seja, quando não necessitavam utilizar um sistema de localização espacial aloccêntrica.

Uma dissociação similar na habilidade de aprender é produzida pelo tratamento com drogas que bloqueiam os receptores muscarínicos colinérgicos ou glutamatérgicos do tipo NMDA (Sutherland *et al.*, 1982; Whishaw *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1986). No modelo de lesão hipocampal com a indução da isquemia cerebral transitória usado em nosso trabalho mostramos um dano na aquisição e retenção de memória, nos animais lesados com ICT. No modelo do labirinto aquático de Morris, no qual o animal tem que lembrar do local onde se localiza uma plataforma submersa, se orientando pelos objetos existentes na sala (memória espacial), a região hipocampal tem grande participação como local de estocagem da memória, observamos um dano na memória nos animais lesados por este modelo, sem alteração na capacidade de nadar. O *l*-deprenil na dose de 5 e 10 mg/kg em tratamento de 5 dias diários após a lesão, demonstrou ter melhora nos déficits de memória induzidos pelo ICT neste modelo, assim a distinção entre sistemas de localização espacial devem estar sempre presente no momento da interpretação dos resultados sobre aprendizagem espacial no labirinto aquático, bem como, especial atenção deve ser dedicada á confecção de situações comportamentais que permitam descartar a utilização, pelos animais, de sistemas de localização não-cognitivos.

Do mesmo modo, no modelo de memória emocional, no qual o animal aprende a evitar um choque (esquiva passiva), que envolve o sistema límbico, do qual fazem parte, o hipocampo, amígdala, septo medial, bulbo olfatório e áreas talâmicas anteriores, interconectadas formando o circuito de Papez. O *l*-deprenil, também foi capaz de melhorar os déficits de memória, na dose de 5 e 10 mg/kg, na memória recente (poucos minutos após o aprendizado), e na memória tardia (um dia após o aprendizado). Já no modelo do labirinto em T, observamos um dano pronunciado na

retenção do aprendizado nos animais que sofreram o dano isquêmico, mas que foi revertido pelo tratamento com o *l*-deprenil em ambas as doses (5 e 10 mg/kg).

No presente trabalho, mostramos que ratos submetidos à isquemia cerebral transitória apresentaram danos na memória. Portanto, a aquisição da memória como também a retenção da memória foram significativamente diminuídas e no tratamento com *l*-deprenil foi revertido o dano. Estes dados sugerem que a memória foi melhorada com o tratamento. Resultados semelhantes foram observados no teste da esQUIVA passiva no qual o grupo ICT mostrou diferença significativa na latência de entrada no lado escuro após 15 minutos e 24 horas (memória recente e tardia, respectivamente) quando comparados com o treino indicando um prejuízo na aquisição e retenção da memória. Por outro lado, uma melhora foi verificada no desempenho após o tratamento (na presença da ICT) quando comparados com seus treinos. O tratamento com *l*-deprenil na dose (Dep 5 + ICT) melhorou significativamente o desempenho da memória recente quando comparado com o grupo ICT. Na fase da memória tardia o dano na memória do grupo ICT foi bloqueado pelo tratamento com *l*-deprenil nas doses de 5 e 10 mg/kg. No teste do campo aberto que avalia a atividade locomotora dos animais, verificamos que em nenhum grupo a atividade locomotora foi alterada, exceto no grupo tratado com *l*-deprenil na dose de 5 mg/kg, o qual foi um achado inesperado sugerindo então uma disfunção do hipocampo.

Tem sido sugerido que *l*-deprenil tem propriedades neuroprotetoras e de resgate neuronal (Puurunen *et al.*, 2001). Ao contrário um recente trabalho (Barbelivien *et al.*, 2001) mostrou que o tratamento com o *l*-deprenil por 24 dias (0,25 mg/kg) não melhorou o desempenho em achar a plataforma no teste do labirinto aquático de Morris, quando comparados com o grupo tratado com salina, mas aumentou significativamente a velocidade de nado dos ratos. Estes resultados indicam que a inibição da MAO-B não facilita o aprendizado espacial em ratos adultos. Portanto, nesta condição, os autores usaram uma baixa dose de *l*-deprenil o que poderia explicar as diferenças observadas entre estes resultados e os nossos. Em um recente trabalho (Head *et al.*, 1996) cães jovens e idosos foram testados no teste da

memória espacial. Os autores mostraram que enquanto o tratamento com *l*-deprenil não mostra qualquer efeito significativo em cães jovens, aumentou a memória espacial em animais idosos. A dose ideal ou a duração do tratamento com *l*-deprenil variou entre os cães individualmente.

O *l*-deprenil também aumenta as funções cognitivas, a memória e funções motoras em pacientes com Doença de Parkinson. Dados de Dixit *et al.*(1999) sugeriram que o *l*-deprenil melhorou as funções cognitivas da memória e inteligência nos pacientes com PD além das funções motoras. A droga também preveniu a prolongação da latência P 300 que é um marcador da função cognitiva. Ao lado disso, a administração aguda de *l*-deprenil apresenta um efeito antiapoptótico e neuroprotetor em experimentos com isquemia. Seu uso diário reduziu o declínio da cognição em pacientes com demência vascular. O *l*-deprenil tem mostrado efeito neuroprotetor numa variedade de processos neurodegenerativos. Tem sido demonstrado que uma pequena dose de *l*-deprenil pode aumentar a sobrevivência de células neuronais hipocâmpais em gerbils quando administrado por 2 horas depois da isquemia (Lahtinen *et al.*, 1997). Outros (Unal *et al.*, 2001) estudaram a ação neuroprotetora da administração diária crônica do *l*-deprenil em camundongos submetidos à oclusão das artérias cerebrais e 72 horas de reperfusão. Os dados sugerem que o uso profilático de *l*-deprenil poderia aumentar a resistência cerebral minimizando o dano isquêmico. Um recente trabalho (Nowakowska *et al.*, 2001) mostrou que *l*-deprenil (0,25 mg/kg) apresenta um pequeno efeito antidepressivo e ansiolítico em ratos submetido a um tratamento simples ou prolongado com a droga. Os autores discutiram a possibilidade que o *l*-deprenil tem como modulador da memória e aprendizado e que este efeito depende da dose usada e provavelmente envolve uma maior ação na liberação das monoaminas e transmissão colinérgica. Possivelmente, a dose e duração do tratamento entre outros fatores, poderiam explicar algumas das controvérsias observadas na literatura e até o efeito do *l*-deprenil na memória.

O estresse oxidativo pode resultar do excesso na produção de substâncias oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes do organismo. A terapia

antioxidante parece promissora em atenuar os efeitos da produção descontrolada de radicais livres (RLs) em pacientes com doenças neurodegenerativas; há, porém, escassez de evidências que definam a melhor forma de suplementação e a fase da doença adequada para isso. Também os efeitos adversos de seu uso clínico devem ser levados em conta, pois todo antioxidante pode ter efeito pró-oxidante e aumentar a lesão tecidual. Rabl *et al.*(1996), em estudo clínico, observaram que a administração venosa pré-operatória de um complexo vitamínico em pacientes submetidos a endarterectomia carotídea (método tradicional de remoção da placa aterosclerótica e de trombos que obstruem parcialmente a artéria, sob visualização direta) promoveu a diminuição da presença de lipoperóxidos plasmáticos no período pós-operatório, quando comparados com pacientes que receberam placebo. Da mesma forma, Bacon *et al.*(1996) observaram diminuição de antioxidantes plasmáticos em pacientes operados, tanto na fase de isquemia, ou seja, durante o pinçamento da artéria carótida, quanto na fase de reperfusão, demonstrando que existiu consumo de antioxidantes e, deste modo, possivelmente ocorreria produção de radicais livres nessas situações. Em estudo similar, Weigand *et al.*(1999) observaram que, durante o pinçamento da artéria carótida, na cirurgia de endarterectomia, o status antioxidante plasmático teve um declínio significativo. Verificaram, também, que houve aumento da dosagem sanguínea arterial e venosa de malondialdeído (MDA), um produto de degradação de lipoperóxidos, tanto na isquemia quanto após 15 minutos de reperfusão. Concluíram, assim, que o aparecimento de produtos da lipoperoxidação (MDA) e a depleção de antioxidantes plasmáticos indicavam a presença de produção de radicais livres durante a endarterectomia de carótida (Tardini *et al.*, 2003). Os antioxidantes têm sido avaliados como agentes neuroprotetores na isquemia (Cherubini *et al.*, 2000). Nós mostramos que a isquemia cerebral transitória aumentou significativamente a peroxidação lipídica quando comparados o grupo controle falso-operado. O *l*-deprenil protegeu os neurônios do hipocampo da peroxidação lipídica determinados pelo método de detecção das TBARS. Nossos resultados indicam uma redução em 34 e 38% nos níveis de MDA no hipocampo após tratamento com *l*-deprenil (na presença de ICT) nas doses de 5 e 10 mg/kg respectivamente quando comparados com ratos submetidos à isquemia sem tratamento com *l*-deprenil (grupo ICT). Interessantemente,

o dano isquêmico não afetou o córtex temporal como demonstrado sem alteração dos valores do MDA no grupo ICT quando comparado com o grupo controle falso-operado. Um resultado semelhante foi observado com os valores do nitrito que expressão formação de radicais livres. No hipocampo, os níveis aumentaram significativamente após a ICT quando comparados com o grupo FO, em 82%, entretanto, o tratamento com DEP 10 reverteu este efeito, trazendo os valores próximos do controle. Por outro lado a ICT não afetou os níveis de nitrito no córtex cerebral. Além do mais, o tratamento com *l*-deprenil na menor dose (5 mg/kg) diminuiu de modo significativo os níveis de nitrito quando comparados com os grupos FO e ICT. Nossos resultados estão de acordo com Ghoneim *et al.*(2002) que descreveu que a peroxidação lipídica estava aumentada com a indução da isquemia e reperfusão pela medida dos níveis de MDA; e que Bromonte *et al.*(1989) mostrou que a reoxigenação do cérebro isquemiado é responsável pela peroxidação lipídica. Além de que os achados de Foramn *et al* (1998) sugerem que a isquemia cerebral/reperfusão causa aumento da produção de ERO no cérebro e a produção de peroxinitrito dependente da ação do NO. O NO tem mostrado como um importante mediador de eventos celulares e moleculares que influencia na patologia da isquemia cerebral. Ainda que se pergunte se NO é bom ou mal para a isquemia cerebral, a questão é que não se deve subestimar a complexidade do papel químico e fisiológico do NO como também simplificar a patofisiologia da isquemia cerebral focal (Dalkara & Moskowitz, 1994). Porém D'Ischia *et al* (2000) mostrou que o NO pode inibir a formação de TBARS pela decomposição principal dos produtos da peroxidação lipídica. Recentemente (Homi *et al.*, 2002) foi mostrado que o hipocampo e o corpo estriado são mais susceptíveis ao estresse oxidativo que outras áreas cerebrais. Além disso, foi observado que o dano oxidativo no hipocampo nos estágios mais tarde (48-96h) enquanto no córtex cerebral mostrou-se mudanças recentes no dano oxidativo com nenhuma significância de deterioração na atividade oxidativa (Candelario-Jalil *et al.*, 2001). Sabe-se que os lipídios são as macromoléculas mais susceptíveis ao estresse oxidativo (Ghoneim *et al.*, 2002).

Kiray *et al.* (2004) demonstraram que o *l*-deprenil e sua co-administração com estradiol melhoraram a memória espacial de ratas idosas; como também aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes no cérebro e reduziram a peroxidação lipídica. Então, esse efeito positivo do *l*-deprenil e o hormônio estradiol na memória espacial ocorrem devidos não somente as suas atividades mas também as suas diferentes ações. Estes resultados como os nossos, indicam que o tempo e outros fatores influenciam na formação de radicais seguidos de um dano de isquemia cerebral.

A reperfusão após curtos períodos de isquemia cerebral global é acompanhado pelo aparecimento de componentes de hiperperoxidação da cadeia respiratória da mitocôndria. Estudos sugerem (Perez-Pinzon *et al.*, 1999) que a hiperperoxidação mitocondrial é mediado ao menos em parte pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e acúmulo de cálcio citosólico o qual poderiam enfraquecer as enzimas chaves metabólicas e/ou promover o transtorno da membrana da mitocôndria que resultaria na translocação das cadeias de elétrons da cadeia respiratória.

Uma possível relação entre a atividade de três enzimas antioxidantes – superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) foram verificada em ratos após indução de dano pelo tetracloreto de carbono (CCl₄), verificando que a atividade da SOD e GPX não alterou significativamente no fígado dos animais, mas que a atividade da CAT aumentou após 24 horas e permaneceu durante todo o estudo. Porém no cérebro, a atividade da SOD e CAT diminui após 24 horas do experimento, mas a atividade da GPX aumentou por todo tempo do estudo, este estudo sugeriu que a mudança na atividade das enzimas antioxidantes pode ser relevante a ponto do fígado e outros órgãos investigados deparar-se com o estresse oxidativo durante exposição ao CCl₄. O estresse oxidativo é um mecanismo de injúria que se comporta de forma diferente dependendo do órgão afetado ou do mecanismo, químico ou físico, utilizado para promovê-lo (Szymonik-Lesiuk *et al.*, 2003).

Surpresamente, nenhuma alteração na atividade da catalase foi observada no cérebro de ratos devido à isquemia e reperfusão ou subseqüentemente após tratamento com *l*-deprenil, como observado em outro estudo anterior (Ghoneim *et al.*, 2002). Isto poderia ser pela pequena importância de alteração da atividade da catalase no cérebro de ratos frente ao estresse oxidativo (Matsuyama, 1997), um achado similar observado por Dikshit *et al.* (1995) em coração de gato. Esta sutil alteração deve ter sido além da sensibilidade da técnica utilizada (Ghoneim *et al.*, 2002). Entretanto, além da catalase existem outras enzimas antioxidantes mais importantes para reversão do estresse oxidativo, como por exemplo, SOD e Glutathione, isto poderia justificar o achado em nosso trabalho, pois também o tempo de tratamento (5 dias) após a ICT poderia levar o próprio organismo a se restabeler frente ao dano.

O *l*-deprenil tem ação neuroprotetora sobre os neurônios dopaminérgicos em cérebro de doentes com Parkinson, protegendo as células da apoptose (Naoi *et al.*, 2000), entretanto, esta ação independe de sua função mais conhecida que é de inibir a enzima MAO-B (Suuronen *et al.*, 2000). Apoptose é sabido ser a morte programada celular. O gene Bcl-2 é antiapoptótico nas células dos mamíferos. Recentes estudos têm mostrado que a liberação do citocromo c da mitocôndria é o componente principal da ativação das caspases, dominante da apoptose. O Bcl-2 localiza-se predominantemente na membrana externa da mitocôndria, mas também no núcleo e membrana do retículo endoplasmático. O Bcl-2 age na mitocôndria prevenindo a liberação do citocromo c e inibindo a ativação das caspase-3. As caspases são uma família de proteases que cliva — "corta" — após resíduos de ácido aspártico. Um membro desta família, caspase-3, tem sido identificado como ser a chave mediadora da apoptose em células de mamíferos (Ikeda *et al.*, 2003).

Em vários modelos de isquemia, a caspase-3 é um importante efetor de morte neuronal (Endres *et al.*, 1997; Hara *et al.*, 1997a; Chen *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Endres *et al.*, 1998; Namura *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1998, Schulz *et al.*, 1999). Inibidores de caspase são neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral em adultos (Hara *et al.*, 1997b; Cheng *et al.*, 1998), mesmo quando

os animais são tratados 6-9 horas após o início da isquemia (Endres *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998). No hipocampo, a intensa imunoreatividade da caspase-3 esteve presente na região CA1 e no giro denteado 48 horas após o insulto mas desapareceram após 7 dias do insulto da isquemia cerebral (Nakajima *et al.*, 2000).

Em modelos de isquemia pela oclusão da artéria cerebral média, até 46 horas após o insulto, a razão entre as células apoptóticas e as necróticas foi 1:9, 1:6, e 1:13 no centro e interior da isquemia e na penumbra, respectivamente (Li *et al.*, 1998). Ainda que a maioria das células isquêmicas apareça necróticas, os achados sustentam a existência de células apoptóticas no centro da isquemia. Porque a pequena meia-vida das células apoptóticas relaciona-se com as das células necróticas (Wyllie *et al.*, 1980; Bursch *et al.*, 1990; Pittman *et al.*, 1993; Messam & Pittman, 1998), a contribuição da apoptose para a hipóxia no dano da isquemia de cérebros possa ter sido subestimado (Chopp & Li, 1996; Li *et al.*, 1998).

O modelo de isquemia cerebral variou na presença de apoptose em cada região, mas duas gerais foram observadas. No córtex frontal e parietal, corpo estriado, região CA1, um aumento relativo da densidade das células apoptóticas foi observado entre 6 ou 12 h dos 7 dias após a isquemia, final no estudo. No córtex singular, região CA3 foi observada uma curva com o pico da densidade entre 24 e 72 h após a isquemia e subsequente declínio (Nakajima *et al.*, 2000). Em nosso estudo observamos a atividade da caspase 3 no hipocampo de ratos submetidos a isquemia cerebral transitória após 48 horas da indução, baseado em estudos já realizados; e observamos que ICT aumentou significativamente a atividade da caspase 3, e o tratamento com DEP 5 mg/kg não reverteu os valores, entretanto o tratamento com DEP 10 mg/kg nos animais com ICT ocorreu uma redução significativa nos valores. O DEP também pode ser utilizado de forma preventiva na ICT uma vez que produziu efeitos significativos de redução da atividade da protease caspase-3 nos animais controle (FO). Suuronen *et al.* (2000) observou que o *l*-deprenil protegeu culturas de células contra a apoptose induzida por ácido okadaico. A severidade e variabilidade no dano e o modelo do dano no estudo foi similar a estudos anteriores (Rice *et al.*, 1981, Towfighi *et al.*, 1995;

Towfighi *et al.*, 1997; Trescher *et al.*, 1997). O córtex, corpo estriado, região CA1 do hipocampo foram particularmente sensíveis à isquemia/hipóxia. No tálamo, núcleo dorsal, lateral e reticular foi às áreas mais severamente afetadas (Nakajima *et al.*,2000). Em estudos de indução de isquemia/hipóxia em animais recém-nascidos e em outros modelos, a necrose predomina na área central da isquemia, enquanto que a apoptose ocorre primariamente na penumbra (Nakajima *et al.*,2000; Li *et al.*, 1995a,b,c, 1997, 1998; Charriaut-Marlangue *et al.*, 1998; Chopp & Li, 1996). Como mostrado anteriormente o tempo (Nakajima *et al.*,2000), o tempo da injúria e a quantidade da morte dos neurônios dependeram da severidade do insulto.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Os resultados da presente investigação nos permitem concluir que:

- ❖ A isquemia cerebral transitória promoveu uma lesão cerebral observada pela medida da área de infarto em fatias cerebrais coloridas pelo TTC.

- ❖ A isquemia cerebral transitória dos animais por oclusão bilateral de ambas as artérias carótidas durante 20 minutos promoveu um déficit de memória quando analisado em modelos que avaliam a memória espacial (labirinto aquático), memória emocional ou aversiva (esquiva passiva) e memória não declarativa (labirinto em T elevado).
- ❖ O *l*-deprenil nas doses de 5 e 10 mg/kg, v.o., reverteu de modo significativo, os déficits de memória causados pela ICT, nos modelos do labirinto aquático e labirinto em T elevado, e também no teste da esquiva passiva, embora neste caso, com menor intensidade na memória recente.
- ❖ A ICT promoveu um aumento nos níveis de peróxidos lipídicos e nos níveis de nitrito e nitrato no hipocampo dos animais, e este aumento foi revertido pelo tratamento com *l*-deprenil (5 e 10 mg/kg). Por outro lado, nenhum aumento foi observado nos níveis de peróxidos lipídicos e nitrito/nitrato no córtex temporal dos animais submetidos à isquemia cerebral transitória.
- ❖ A atividade enzimática da catalase não sofreu alteração após a ICT e também não foi verificada nenhuma mudança na ação da enzima no hipocampo após tratamento com *l*-deprenil.
- ❖ Com relação à atividade da protease caspase 3 no hipocampo foi visto um aumento da atividade após a ICT, e nos animais tratados com DEP na dose de 5 mg/kg não foi visto alteração significativa, por outro lado, com a dose maior de DEP (10 mg/kg) foi observada uma redução significativa em relação ao grupo ICT.
- ❖ Pode-se verificar que 48 após a isquemia ocorreu um aumento da atividade da caspase 3 sugerindo um papel desta enzima no hipocampo durante a ICT. E o tratamento com DEP apresentou efeito redutor na maior dose (10 mg/kg), sugerindo que sua ação pode ser dose dependente em relação à atividade da protease caspase 3.

- ❖ O *l*-deprenil pode também ser utilizado de forma preventiva na ICT uma vez que produziu efeito significativo de redução da atividade da caspase-3 nos animais controles-tratado (FO + DEP 10).

- ❖ A ação neuroprotetora pode ser devido ao efeito antioxidante e conseqüentemente inibição da ativação da produção de radicais livres pelo *l*-deprenil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE K, YUKI SKK. **Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger.** *Stroke*;19:480-5, 1998.

ABRAHAM H, LAZAR G. **Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats.** *Brain Res* ;862:63-73, 2000.

AGARDH C-D, ZHANG H, SMITH ML, SIESJÖ BK. **Free radical production and ischemic brain damage: influence of postischemic oxygen tension.** *Int J Dev Neurosci* ; **9(2)**: 127–38, 1991.

AGNATI LF, ZINI I, ZOLI M, FUXE K, MERLO PICH E, GRIMALDI R, TOFFANO G, GOLDSTEIN M. **Regeneration in the central nervous system: concepts and facts.** Adv Tech Stand Neurosurg. 16:3-50; 1988.

ALMEIDA A, HEALES SJ, BOLAÑOS JP, MEDINA JM. **Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion.** Brain Res.;790(1-2):209-16; 1998

AMENTA F . **Effect of long term monoamine oxidase-b inhibitor treatment on the structure of the hippocampus of the age rat.** In: 9 th Intemational Conference on Alzheimer´s Disease and Related Disorders, 2003.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart and Stroke facts.** Dallas, TX, 1991.

ANDERSON MF, SIMS N R. **Mitochondrial respiratory function and cell death in focal cerebral ischemia.** J Neurochem ; 73:1189-99, 1999.

ANDERSON MF, SIMS N R. **The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions.** J Neurochem. 81:541-9; 2002.

ANSAKI KS, YU PH, KRUCK, TPA, TATTON WG. **Rescue of axotomized immature rat facial motoneurons by R(-)-deprenyl: stereospecificity and independence from monoamine oxidase inhibition.** J Neurosci 13: 4042-4053, 1993.

ASHE PC, BERRY MD., **Apoptotic signaling cascades.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. Apr;27(2):199-214; 2003

BACON PJ, LOVE A, GUPTA AK, KIRKPATRICK PJ, MENON DK. **Plasma antioxidant consumption associated with ischemia/ reperfusion during carotid endarterectomy.** Stroke; 27: 1808-11, 1996.

BALESTRINO M, SOMJEN GG. **Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat.** J Physiol 93: 161-172, 1988.

BALLABRIGA J, PELLISE A, FERRER I. **L-Deprenyl does not reduce brain damage in global forebrain ischemia in adult gerbils (Meriones unguiculatus).** J Neurol Sci 148: 1-5, 1997.

BANNERMAN, D. M., GOOD, M. A., BUTCHER, S. P., RAMSAY, M., MORRIS, R. G. M. **Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade.** *Nature*, v. 378, p. 182-186, 1995.

BARBELIVIEN A, NYMAN L, HAAPALINNA A, SIRVIO J. **Inhibition of MAO-A activity enhances behavioural activity of rats assessed using water maze and open arena tasks.** *Pharmacol Toxicol.* Jun;88(6):304-12; 2001

BARTUS, R. T., DEAN, R. L., BEER, B., LIPPA, A. S. **The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction.** *Science (Washington, D. C.)*, v. 217, p. 408-416, 1982.

BATH PW, LEES KR. **Acute Stroke.** *West J Med* September. 173:209-12; 2000.

BAUDRY, M. & MASSICOTTE, G. **Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and memory.** *Concepts in Neurosci*, v. 2, p.79-98, 1992.

BECHARA, A., TRANEL, D., DAMASIO, H., ADOLPHIS, R., ROCKLAND, C., DAMASIO, A. **Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans.** *Science*, v. 269, p. 1115-1118, 1995.

BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA. **Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.** *Proc Natl Acad Sci USA.*87:1620-4; 1990

BECKMAN JS. **The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury.** *J Dev Physiol* 15: 53-59, 1991.

BEDERSON JB, PITTS LH, GERMANO SM, NISHIMURA MC, DAVIS RL, BARTKOWSKI HM. **Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats.** *Stroke.* Nov-Dec;17(6):1304-8; 1986.

BEETSCH JW, PARK TS, DUGAN LL, SHAH AR, GIDDAY JM. **Xanthine oxidase derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells.** *Brain Res.* 786:89-95; 1998.

- BERNABEU, R., BEVILAQUA, L., ARDENGHI, P., BROMBERG, E., SCHMITZ, P., BIANCHIN, M., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. **Involvement of hippocampal cAMP/cAMP dependent protein kinase signaling pathway in a late memory consolidation phase of an aversively motivated learning in rats.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 94, 1997.
- BERNABEU, R., PRINC., F., LEVI DE STEIN, M., FIN, C. *et al.* **Evidence for the involvement of hippocampal coproduction in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning.** Neuroreport, v. 6, p. 516-518, 1996.
- BLASCHKO H. **The natural history of amine oxidases.** Rev Physiol Biochem Pharmacol 70:83-148, 1974.
- BLISS TV, LOMO T. **Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.** J Physiol. Jul; 232(2): 331-56, 1973.
- BLOMGREN K. HALLIN U, PUKA-SUNDEVALL M, HAGBERG H. **Caspase-calpain interaction and calpastatin as a stress protein in neonatal rat hypoxia-ischemia.** J Cereb Blood Flow Metab 19(Suppl):S49,1999.
- BLOMQVIST P, MABE H, INGVAR M, SIESJO BK. **Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. Circulatory and functional effects of 4-vessel occlusion.** Acta Neurol Scand; 69:376-84, 1984.
- BODSCH W, TAKAHASHI K, BARBIER A, GROSSE OPHOFF B, HOSSMANN KA. **Cerebral protein synthesis and ischemia.** Prog Brain Res ;63:197-210, 1985
- BOGOUSSLAVSKY J, VAN MELLE G., REGLI F. **The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1000 consecutive patients with first stroke.** Stroke 19: 1083-1092, 1988.
- BOHUS, B. **Humoral modulation of learning and memory processes: Physiological significance of brain and peripheral mechanisms.** In J. Delacour (Ed.), The memory system of the brain, Singapore: World Scientific, 1994, p. 337-364.
- BOSTOCK, E., GALLAGHER, M., KING, R. A. **Effects of opioid microinjections into the medial septal area on spatial memory in the rat.** Behavioral Neurosci., v. 102, p. 604-652, 1988.

BRAIN RESUSCITATION CLINICAL TRIAL I STUDY GROUP. **A Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest.** *New Engl J Med*, 314:397-401,1986.

BRAIN RESUSCITATION CLINICAL TRIAL II STUDY GROUP. **A Randomized clinical study of a calcium-entry blocker (lidoflazine) in the treatment of comatose survivors of cardiac arrest.** *New Engl J Med*:324:1225-31,1991.

BRALET J, BELEY P, JEMAA R, BRALET AM, BELEY A. **Lipid metabolism, cerebral metabolic rate, and some related enzyme activities after brain infection in rat.** *Stroke* 1987;18:418-25; 1987.

BRAUNWALD E, KLONER RA - **Myocardial reperfusion: A double-edge sword?** *J Clin Invest*: 76: 1713-9, 1985.

BRAY TM, TAYLOR CG. **Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress.** *Can J Physiol Pharmacol*; 71:746-51, 1993.

BREDESEN DE. **Keeping neurons alive: the molecular control of apoptosis.** *Neuroscientist*, 2:211-6, 1996.

BRIERLY, J. B. **Cerebral hypoxia.** In: *Greenfield's Neuropathology*, 246, edited by W. Blackwood and J. A. N. Corsellis. Chicago, IL: Year Book Medical, p. 43–85, 1996.

BRIONI, J. D. **Role of GABA during the multiple consolidation of memory.** *Drug Dev. Res.*, v. 28, p. 3-27, 1993.

BRIONI, J. D., DECKER, M. W., GAMBOA, L. P., IZQUIERDO, I., McGAUGH, J. L. **Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning.** *Brain Res.*, v. 522, p. 227-234, 1990.

BROADHURST PL **Determinants of emotionality in the rat: I situational factors.** *Brit. J. Psychol.*, 48: 1-12, 1957.

BROMONT C, MARIE C, BRALET J. **Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats.** *Stroke*; 20: 918–24, 1989.

BRONZETTI E, FELICI L, FERRANTE F, VALSECCHI B. **Effect of ethylcholine mustard aziridinium (AF64A) and of the monoamine oxidase-B-inhibitor L-deprenyl on the morphology of the rat hippocampus.** *Int J Tissue React.* 14(4):175-81; 1992.

BROWN, A. W., AND J. B. BRIERLY. **The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope.** *Br. J. Exp. Pathol.* 49: 78–106, 1968.

BRUCE AJ, BOLING W, KINDY MS, PESCHON J, KRAEMER PJ, CARPENTER MK, HOLTSBERG FW, MATTSON MP. **Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors.** *Nat Med.* 2(7):788-94, 1996.

BULGER EM, MAIER RV. **Antioxidants in critical illness.** *Arch Surg;* 136:1201-7, 2001.

BURSCHE W, PAFKE S, PUTZ B, BARTHEL G, SCHULTE-HERMANN R. **Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats.** *Carcinogenesis* 11:847-853, 1990.

CAHILL, L. & McGAUGH, J. L. **Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement.** *Behav. Neurosci.*, v. 104, p. 532-543, 1990.

CAHILL, L. & McGAUGH, J. L. **Modulation of memory storage.** *Curr. Opinion in Neurobiology*, v. 6, p. 237-242, 1996.

CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., WOLFMAN, M., LEVI DE STEIN, M., BERNABEU, R., JERUSALINSKY, D., MEDINA, J. H. **Inhibitory avoidance training induces rapid and selective changes in [³H]AMPA receptor binding in the rat hippocampal formation.** *Neurobiol of Learn. Mem.*, v. 64, p. 257-264, 1995.

CANDELARIO-JALIL E, MHADU NH, AL-DALAIN SM, MARTINEZ G, LEON OS. **Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils.** *Neurosci Res.*;41(3):233-41, 2001.

CARRILLO MC, KANAI S, NOKUBO M, KITANI K. **(-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats.** *Life Sci.* 8(6):517-21, 1991.

CHAN PH. **Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: role of CuZn-superoxide dismutase.** *J Neurotrauma.*; 9 Suppl 2:S417-23, 1992.

CHAN PH. **Role of oxidants in ischemic brain damage.** *Stroke;* 27:1124-9, 1996.

CHAPMAN PF, KAIRISS EW, KEENAN CL, BROWN TH. **Long-term synaptic potentiation in the amygdala.** Synapse. ; 6(3): 271-8, 1990.

CHARRIAUT-MARLANGUE C, REMOLLEAU S, AGGOUN-ZOUAOU D, BEN-ARI Y. **Apoptosis and programmed cell death: a role in cerebral ischemia.** Biomed Pharmacother 52:264-269, 1998.

CHEN J, NAGAYAMA T, JIN K, STETLER RA, ZHU RL, GRAHAM SH, SIMON RP. **Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia.** J Neurosci 18:4914-4928, 1998.

CHENG Y, DESHMUKH M, D, COSTA A, DEMARO JA, GIDDAY JM, SHAH A, SUN Y, JACQUIN MF, JOHNSON EM, HOLTZMAN DM. **Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury.** J Clin Invest 101:1992-1999, 1998.

CHERUBINI A, POLIDORI MC, BREGNOCCHI M, PEZZUTO S, CECCHETTI R, INGEGNI T, DI IORIO A, SENIN U, MECOCCI P. **Antioxidant profile and early outcome in stroke patients.** Stroke. Oct; 31(10): 2295-300, 2000.

CHESLER M, KRAIG RP. **Intracellular pH transients of mammalian astrocytes.** J Neurosci 9: 2011-2019, 1989.

CHOI DW, MAULUCCI-GEDDE M, KRIEGSTEIN AR. **Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.** J Neurosci., 7:357-68, 1987

CHOI DW. **Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death.** Trends Neurosci 18: 58-60, 1995.

CHOI DW. **Nitric oxide: foe or friend in the injured brain?** Proc Natl Acad Sci USA 90: 9741-9743, 1993.

CHOPP M, LI Y. **Apoptosis in focal cerebral ischemia.** Acta Neurochir Suppl (Wien) 66:21-26, 1996.

CIÊNCIA HOJE. **Os Labirintos da Memória** • v o l . 25 • Abrl, n ° 148, pág. 42, 1999.

CLARK SF. **The biochemistry of antioxidants revisited.** Nutr Clin Pract; 17:5-17, 2002.

CLUGNET, M. C. & LEDOUX, J. E. **Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body.** *J. Neurosci.*, v. 10, p. 2818-2824, 1990.

COHEN G; SPINA MB. **Selegiline suppresses the oxidant stress associated with increased dopamine turnover.** *Ann Neurol* 26:689-90, 1989.

COLLI BO, NUNES M, CARLOTTI CG JR. **Ischemia cerebral experimental.** In Castro e Silva O, Beer A, Zuccoloto S (eds). *Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia.* São Paulo: Probel Editora, 643-662, 1998.

CRAMER, S. C., MOORE, C. I., FINKLESTEIN, S. P., ROSEN, B. R. **A Pilot Study of Somatotopic Mapping After Cortical Infarct.** *Stroke* 31: 668-671; 2000.

CROALL D.E., DE MARTINO G.N. **Calcium-activated neutral protease (Calpain) system: structure, function, and regulation.** *Physiol Rev*, 3:813-47, 1991.

CRUMRINE, R. C., AND J. C. LAMANNA. **Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11:272-282, 1991.

CRUMRINE, R. C., K. BERGSTRAND, A. T. COOPER, W. L. FAISON, AND B. R. COOPER. **Lamotrigine protects hippocampal neurons from ischemic damage after cardiac arrest.** *Stroke* 28: 2230-2237, 1997.

D'ISCHIA M, PALUMBO A, BUZZO F. **Interactions of nitric oxide with lipid peroxidation under aerobic conditions: Inhibitory effects on the formation of malondialdehyde and related thiobarbituric acid-reactive substances.** *Nitric Oxide* ; 4:4-14, 2000.

DA CUNHA, C., HUANG, C. H., WALZ, R., DIAS, M., KOYA, R., BIANCHIN, M., PEREIRA, M. E., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. **Memory facilitation by post-training intraperitoneal, intraventricular and intra-amygdala injection of Ro5-4864.** *Brain Res.*, v. 544, p.133-136, 1992.

DALKARA T, MOSKOWITZ MA. **The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia.** *Brain Pathol* 4: 49-57, 1994.

DALMAZ, C., INTRONIONI-COLLISON, I.B., McGAUGH, J.L. **Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage.** *Behav. Brain Res.*, v. 58, p. 167-174, 1993.

D'AMATO RJ. **Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, to neuromelanin.** J Neurochem: 48:653-8, 1987.

DAVIES MG, FULTON GJ, HAGEN PO. **Clinical biology of nitric oxide.** Br J Surg. ;82:1598-610; 1995

DAVIS S.M.,LEES K.R., ALBERS G.W., DIENER H.C., MARKABI S. KARLSSON G. **Selfotel in acute ischemic stroke:possible neurotoxic effects of na NMDA antagonist.** Stroke: 31: 1453-8,2000

DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. **Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety.** Trends in Neurosci., v.17, p. 208-214, 1994.

DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. **The role of the amygdala in fear and anxiety.** Annual Rev. Neurosci., v. 15, p. 353-375, 1992.

DE BONO DP. **Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover.** QJM. 87(8):445-53; 1994.

DE GRACIA DJ, O'NEIL BJ, FRISCH C, KRAUSE GS, SKAJAERLUND JM, WHITE BC. **Studies of the protein synthesis system in the brain cortex during global ischemia and reperfusion.** Rsuscitation, 21,161-70,1990.

DE KLOET, E. R., ROSENFELD, P., VAN EEKELEN, J. A. M., RATKA, A., JOËLS, M., LEVINE, S. **Long-term effect of glucocorticoids on brain function.** In R. C. A. Fredrickson, J. L. McGaugh & D. L. Felten (Eds.), Peripheral signalling of the brain, Toronto: Hogrefe & Huber, 1991, p. 225-242.

DE LEON, M. J., GOLOMB, J., GEORGE, A., G., CONVIT, A., TARSHISH, C. Y., McRAE, T., DE SMITH, G., FERRIS, S. H. **The radiologic prediction of Alzheimer's disease: The atrophic hippocampal formation.** Am. J Neuroradiology, v. 14, p. 897-906, 1993.

DE NOBLE, VJ, REPETTI, SJ, GELPKE, LW, WOOD, LM, KEIM, KL **Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats.** Pharmac. Biochem. Behav., 24: 1123-1128, 1986.

DE WIED, D. & BOHUS, B. **Modulation of memory processes by neuropeptides of hypothalamic-neurohypophyseal origin.** In M. A. B. Brazier (Ed.), Brain

mechanisms in memory and learning: From the single neuron to man, New York: Raven, 1979, p. 139-150.

DIENEL GA, PULSINELLI WA, DUFFY TE. **Regional protein synthesis in rat brain following acute hemispheric ischemia.** *JNeurochem*; 35:1216-26, 1980.

DIETRICH, W. D., R. BUSTO, S. YOSHIDA, AND M. D. GINSBERG. **Histopathological and hemodynamic consequences of complete versus incomplete ischemia in the rat.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.*7: 300–308, 1987.

DIKSHIT M, RASTOGI L, SHUKLA R, SRIMAL RC. **Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin, prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin and quinidine in the cat heart.** *Indian J Med Res* ; 101: 31–5, 1995.

DIXIT SN, BEHARI M, AHUJA GK. **Effect of selegiline on cognitive functions in Parkinson's disease.** *J Assoc Physicians India*; 47(8):784-6, 1999.

DRENTH J, ENZING C.M., KALK K.H., VESSIES J.C., **Structure of porcine pancreatic phospholipase A2.** *Nature* ,48:503-9,1976.

DUNN, A. J. **Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data.** *Ann. Rev. Psychol.*, v. 31, p. 343-390, 1980.

DUNN, A. J. **Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data.** *Ann. Rev. Psychol.*, v. 31, p. 343-390, 1980.

EBADI M, SHARMA S, SHAVALI S, EL REFAEY H. **Neuroprotective actions of selegiline.** *J Neurosci Res.*;67(3):285-9, 2002.

EKHOLM, A., B. ASPLUND, AND B. K. SIESJO. **Perturbation of cellular energy state in complete ischemia: relationship to dissipative ion fluxes.** *Exp. Brain Res.* 90: 47–53, 1992.

ELEFF, S. M., Y. MARUKI, L. H. MONSEIN, R. J. TRAYSTMAN, R. N. BRYAN, AND R. C. KOEHLER. **Sodium, ATP and intracellular pH transients during reversible compression ischemia of dog cerebrum.** *Stroke* 22: 233–241, 1991.

ENDRES M, NAMURA S, SHIMIZU-SASAMATA M, WAEBER C, ZHANG L, GOMEZ-ISLA T, HYMAN BT, MOSKOWITZ MA. **Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family.** *J Cereb Blood Flow Metab* 18:238-247, 1998.

ENDRES M, WANG ZQ, NAMURA S, WAEBER C, MOSKOWITZ MA. **Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase.** J Cereb Blood Flow Metab 17:1143-1151, 1997.

EVANS P, HALLIWELL B. **Micronutrients: oxidant/antioxidant status.** Br J Nutr ;85 (Suppl 2):S67-74, 2001.

EVORA PR, PEARSON PJ, SECCOMBE JF, SCHAFF HV. **Ischemia-reperfusion lesion. Physiopathologic aspects and the importance of the endothelial function.** Arq Bras Cardiol.;66(4):239-45, 1996.

EVORA PRB, PAUL J. PEARSON, JOHN F. SECCOMBE, HARTZELL V. SCHAFF. **Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial.** Arq Bras Cardiol volume 66, (nº 4), 1996

FAUBION WA, GORES GJ. **Death receptors in liver biology and pathobiology.** Hepatology ;29:1-4, 1999.

FENG Z, LIANGFU Z, FENGPING H, YONG L, GUOHUA Z. **U-74389G suppresses lipid peroxidation and apoptosis following focal cerebral ischemia and reperfusion in rats.** Chin Med J; 111:838-41, 1998.

FERREIRA, M. B. C., WOLFMAN, C., MEDINA, J. H., IZQUIERDO, I. **Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: Role of NMDA and GABAergic receptors.** Pharmacol. Bioch. Behav., v. 41, p. 767-771, 1992a.

FERREIRA, M. B. C., WOLFMAN, C., WALZ, R., Da SILVA, R. C., ZANATTA, M. S., MEDINA, J. H., IZQUIERDO, I. **NMDA-dependent, GABA-A-sensitive role of the entorhinal cortex in post-training memory processing.** Behav. Pharmacol., v. 3, p. 387-391, 1992b.

FINK K, ZHU J, NAMURA S, SHIMIZU-SASAMATA M, ENDRES M, MA J, DALKARA T, YUAN J, MOSKOWITZ MA. **Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation.** J Cereb Blood Flow Metab 18:1071-1076, 1998.

FINNEGAN KT, SKRATT JJ, IRWIN I, DELANNEY LE, LANGSTON JW. **Protection against DSP-4-induced neurotoxicity by deprenyl is not related to its inhibition of MAO B.** Eur J Pharmacol.;184(1):119-26, 1990.

- FLAMM ES, DEMOPOULOS HB, SELIGMAN ML, POSER RG, RANSOHOFF J. **Free radicals in cerebral ischemia.** *Stroke*. Sep-Oct;9(5):445-7, 1978.
- FORMAN LJ, LIU P, NAGELE RG, YIN K, WONG PY-K. **Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat.** *Neurochem Res*; 23:141-8, 1998.
- FOWLER CJ; CALLINGHAM BA; MANTLE TJ. **Monoamine oxidase A and B: a useful concept.** *Biochem Pharmacol*, 27: 97-101, 1978.
- FOWLER JS. **Mapping human brain monoamine oxidase A and B with ¹⁴C-labeled suicide inactivators and PET.** *Science* 235: 481, 1987.
- FOX, G., D. GALLACHER, S. SHEVDE, J. LOFTUS, AND G. SWAYNE. **Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat.** *Stroke* 24: 2087–2093, 1993.
- FREEMAN B.A., CRAPO J.D. **Free radicals and tissue injury.** *La Invest*,47:412-26,1982.
- FRYKHOLM P, ANDERSON JLR, VALTYSSON J. **A metabolic threshold of irreversible ischemia demonstrated by PET in a middle cerebral artery occlusion-reperfusion primate-model.** *Acta Neurol Scand*; 102:18-26, 2000.
- FURLOW TW JR. **Cerebral ischemia produced by four-vessel occlusion in the rat: a quantitative evaluation of cerebral blood flow.** *Stroke*; 13:852-5, 1982.
- GAITERO F.,LIMAS GG, MENDEZ E, DEHARO C. **Purification of a novel heat-stable translation inhibitor from rabbit reticulocyte lysates.** *FEBS Lett*, 236: 479-83, 1988.
- GEINISMAN, Y. & BONDAREFF, W. **Decrease in the number of synapses in the senescent brain: A quantitative electron microscopic analysis of the dentate gyrus molecular layer in the rat.** *Mechanisms of Aging and Dev.*, v. 5, p. 11-23, 1976.
- GELOWITZ DL, PATERSON IA. **L-Deprenyl reduces kainic acid-induced neuronal death in the hippocampus.** *Soc Neurosci Abstr* 20: 553-554, 1994.
- GERLACH M, REIDERER, P, YODIM, MBH. **The molecular pharmacology of L-deprenyl.** *Eur. J. Pharmacol.*, 226: 97-108, 1992.
- GERLACH M, YODIM MB, RIEDERER P. **Pharmacology of selegiline.** *Neurology*;47(6 Suppl 3):S137-45, 1996.

- GHONEIM A I, NAIM A B, KHALIFA A E & DENSHARY E E. **Protective Effects of Curcumin Against Ischaemia/Reperfusion Insult In Rat Forebrain.** Pharmacological Research, Vol. 46, No. 3, 2002.
- GINSBERG MD, PULSINELLI WA. **The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke.** Ann Neurol 36: 553-554, 1994.
- GINSBERG, M. D., AND R. BUSTO. **Rodent models of cerebral ischemia.** *Stroke* 20: 1627–1642, 1989.
- GOHRING F, SCHWAB BL, NICOTERA P, LEIST M, FACKELMAYER FO. **The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown.** EMBO J. Dec 15; 16(24): 7361-71, 1997.
- GOLBE L I . **Deprenyl as symptomatic therapy in Parkinson's disease.** Clin Neuropharmacol, 11 (5): 387 - 400, 1988.
- GOLD, P. E. & McCARTY, R. C. **Stress regulation of memory processes. Role of peripheral catecholamines and glucose.** In M. J. Friedman. D. S. Charney & A. Y. Deutch (Eds.), Neurobiological and clinical consequences of stress, Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 151-162, 1995.
- GOLD, P. E. **An integrated memory regulation system: From blood to brain.** In R. C. A. Fredrickson, J. L. McGaugh & D. L. Felten (Eds.), Peripheral signalling of the brain, Toronto: Hogrefe & Huber, p. 391-419, 1991.
- GOLD, P. E., DELLANOY, R. L., MERRIN, J. **Modulation of long-term potentiation by peripherally administered amphetamine and epinephrine.** Brain Res., v. 305, p. 103-107, 1984.
- GOLDBERG, MP, CHOI, DW. **Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury.** J Neurosci, 13: 3510-3524, 1993.
- GOLDLUST EJ, PACZYNSKI RP, HE YY, HSU CY, GOLDBERG MP. **Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains.** Stroke.;27(9):1657-62, 1996
- GOODMAN Y, MATTSON MP. **Staurosporine and K-252 compounds protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide toxicity and oxidative injury.** Brain Res.4;650(1):170-4, 1994.

- GRANT, S. G. N. & SILVA, A. J. **Targeting learning.** Trends in Neurosci., v. 17, p. 71-75, 1994.
- GRECKSCH, G. & MATTEHIES, H. J. **Involvement of hippocampal dopaminergic receptors in memory consolidation in rats.** In C. Ajmone-Marsan & H. Mathies (Eds.), Neuronal plasticity and memory formation, New York: Raven, 1982, p. 353-357.
- GREEN, LC, TANNENBAUM SR, GOLDMAN P. **Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat.** Science, 212:56-58, 1981.
- GRIGORYAN, G., HODGES, H., MITCHELL, S., SINDEN, J. D., GRAY, J. R. **6-OHDA lesions of the nucleus accumbens accentuate memory deficits in animals with lesions to the forebrain cholinergic projection system: Effects of nicotine administration on learning and memory of the water maze.** Neurobiol. Learn. Mem., v. 65, p.135-153, 1996.
- GRIMBLE RF. **Antioxidantes e radicais livres.** In: Waitzberg D (ed). Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3. ed. São Paulo: Atheneu; p.1481-1494, 2001.
- GRIMBLE RF. **Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice.** New Horizons ;2(2):175-185, 1994.
- GROENENDAAL F, SHADID M, MCGOWAN JE, MISHRA OMP, VAN BEL F. **Effects of deferoxamine, a chelator of free iron, on Na⁺/K⁺ ATPase activity of cortical brain cell membrane during early reperfusion after hypoxia-ischemia in newborn lambs.** Pediatr Res;48:560-4, 2000.
- GÜMÜSLÜ S, SERTESER M, ÖZBEN T, BALKAN S, BALKAN E. **Inhibitory role of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats.** Clin Chim Acta;267:213-23, 1997.
- GUPTA R, SINGH M, SHARMA A. **Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury.** Pharmacol Res. Aug; 48(2): 209-15, 2003.
- GUTTERIDGE JMC, HALIWELL B. **The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems.** TIBS ;15:129-35, 1990.

GUYTON AC. **Controle local do fluxo sanguíneo pelos tecidos e sua regulação humoral.** In: Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; p. 181-9, 1996.

GUYTON AC. **Fluxo sanguíneo cerebral, o líquido céfalo-raquídeo e o metabolismo cerebral.** In: Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; p. 705-11, 1996.

HACKEL DB, JENNINGS RB - The heart. In: Rubin E, Farber DJ, eds - Pathology. Philadelphia: Lippincott, 515-25, 1988.

HAKIM AM. **The cerebral ischemic penumbra.** Can J Neurol 14: 557-559, 1987.

HALE AJ, SMITH CA, SUTHERLAND LC, STONEMAN VEA, LONGTHORNE VL, CULHANE AC. **Apoptosis : molecular regulation of cell death.** Eur J Biochem, 236:1-26, 1995.

HALL ED. **Cerebral ischaemic, free radicals and antioxidant protection.** Biochem Soc Trans 21: 334-339, 1993.

HALLIWELL B. **Antioxidantes.** In: Ziegler EE, Filer Jr LJ (eds). Conocimientos actuales sobre nutrición. 7a. ed . Washington: OMS; p.636-644, 1997.

HARA H, FINK K, ENDRES M, FRIEDLANDER RM, GAGLIARDINI V, YUAN J, MOSKOWITZ MA. **Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein.** J Cereb Blood Flow Metab 17:370-375, 1997a.

HARA H, FRIEDLANDER RM, GAGLIARDINI V, AYATA C, FINK K, HUANG Z. **Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage.** Proc Natl Acad Sci USA, 94:2007-2012, 1997a.

HARADA K, OZAKI S, GERSHWIN ME, NAKANUMA Y. **Enhanced apoptosis relates to bile duct loss in primary biliary cirrhosis.** Hepatology ; 26:1399-405, 1997.

HAROLD D, WALZ W. **Metabolic inhibition and electrical properties of type-1-like astrocytes.** Neuroscience 47: 203-211, 1992.

HE Z, SUGIMORI H, IBAYASHI S, FUJII K, S SADOSHIMA S AND FUJISHIMA M. **Age-Related ischemia in the Brain Following Bilateral Carotid Artery**

occlusion – Collateral Blood Flow and Brain Metabolism. Neurochemical Research, Vol. 22, No. 1, 1997, pp. 37-42, 1996.

HEAD E, HARTLEY J, KAMEKA AM, MEHTA R, IVY GO, RUEHL WW, MILGRAM NW. **The effects of L-deprenyl on spatial short term memory in young and aged dogs.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry;20(3):515-30, 1996.

HEIKKILA RE, HESS, A, DUVOISIN, RC. **Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice,** Science 224: 1451-3, 1984.

HEINONEN E H. **Pharmacokinetics and metabolism of Selegiline.** Acta Neurol Scand 126:93, 1989.

HEITOR H. P., SARNI R. S., **Free radicals, antioxidants and nutrition.** Rev Bras Nutr Clin; 18(2):87-94, 2003.

HOGAN MJ, HAKIM AM. **Reversibility of nimodipine binding to brain in transient cerebral ischemia.** J Neurochem 59: 1745-1752, 1992.

HOLSCHNEIDER DP, SCREMIN OU, HUYNH L, CHEN K, SHIH JC. **Lack of protection from ischemic injury of monoamine oxidase B-deficient mice following middle cerebral artery occlusion.** Neurosci Lett 259: 161-4, 1999.

HOLTZ ML, CRADDOCK SD, PETTIGREW LC. **Rapid expression of neuronal and inducible nitric oxide synthases during postischemic reperfusion in rat brain.** Brain Res ; 898:49-60, 2001.

HOMI HM, FREITAS JJ, CURI R, VELASCO IT, JUNIOR BA. **Changes in superoxide dismutase and catalase activities of rat brain regions during early global transient ischemia/reperfusion.** Neurosci Lett. 15;333(1):37-40. 2002.

HOSSMAN KA. **Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia.** Ann Neurol 36: 557-565, 1994.

HOSSMANN, K.-A. **Collateral circulation of the brain.** In: Collateral Circulation: Heart, Brain, Kidney, and Limbs, edited by W. Schaper and J. Schaper. Boston, MA: Kluwer, p. 291–315, 1993.

HU WH, JOHSON H, SHU HB. **Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kB and JNK Activation and apoptosis through distinct pathways.** J Biol Chem, 274:30603-10, 1999.

HUANG, Y. -Y., LI, X.-C., KANDEL, E.R. **cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and a macromolecular-synthesis dependent late phase.** *Cell*, v. 79, p. 69-79, 1994.

HUSTON E, SCOTT RH, DOLPHIN AC. **A comparison of the effect of calcium channel ligands and GABAB agonists and antagonists on transmitter release and somatic calcium channel currents in cultured neurons.** *Neuroscience*. 38(3):721-9, 1990.

HYMAN, B. T., van HOESEN, G. W., DAMASIO, A. R. **Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: Na anatomic study.** *Neurology*, v. 40, p. 1721-1730, 1990.

IADECOLA, C. **Mechanisms of cerebral ischemic damage.** In. Wolfgang Walz (ed), **Cerebral ischemia: molecular and cellular pathophysiology**, New Jersey: Humana Press, 199, p. 3-32, 1999.

IKEDA K, NEGISHI H, YAMORI Y. **Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents.** *Toxicology*. Jul 15; 189(1-2): 55-61, 2003

INTROINI-COLLISON, I. B., DALMAZ, C., McGAUGH, J. L. **Amigdala β -noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation.** *Neurobiol. Learn. Memory*, v. 65, p. 57-64, 1996.

ISLEKEL H, ISLEKEL S, GÜNER G, ÖZDAMAR N. **Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia-reperfusion.** *Brain Res* ; 843:18-24, 1999.

IZQUIERDO, I, BIANCHIN, M., BUENO E SILVA, M., ZANNATA, M. S., WALZ, R., Da SILVA, R. C., RUSCHEL, A., PACZKO, N., MEDINA, J. H. **CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks.** *Behav. Neural Biol.*, v. 59, p. 1-4, 1993a.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. **Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory.** *Neurobiol. Learn. Mem.* v 63, p. 19-32, 1995

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. **GABA-A receptor modulation of memory: The role of endogenous benzodiazepines.** *Trends in Pharmacol. Sci.*, v. 12, p. 260-265, 1991.

- IZQUIERDO, I. **Different forms of post-training memory processing.** *Behav. Neur. Biol.*, v. 51, p. 171-202, 1989.
- IZQUIERDO, I. **Long-term potentiation and the mechanisms of memory.** *Drug Dev. Res.*, v. 30, p. 1-17, 1993.
- IZQUIERDO, I. **Pharmacology evidence for a role of long-term potentiation in memory.** *FASEB* , v. 8, p.1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO, I., Da CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M. B. C., MEDINA, J. H. **Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats.** *Behav. and Neural Biol.*, v. 58, p. 16-26, 1992.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., BIANCHIN, M., WALZ, R., ZANATTA, M. S., Da SILVA, R. C., BUENO E SILVA, M., RUSCHEL, A. C., PACZKO, N. **Memory processing by the limbic system: Role of specific neurotransmitter systems.** *Behav. Brain Res.*, v. 58, p. 91-98, 1993c.
- JAMES C K. **The monoamine oxidase inhibitors clorgyline and Selegiline also affect the uptake of dopamine, noradrenaline and serotonin by rat brain synaptosomal preparations,** *Biochem Pharmacol* 29: 2763-7, 1980.
- JOLKKONEN J, KAUPPINEN R, NYMAN L, HAAPALINNA A, SIVENIUS J. **MAO-B inhibition by a single dose of l-deprenyl or lazabemide does not prevent neuronal damage following focal cerebral ischaemia in rats.** *Pharmacol Toxicol* 87: 242-5, 2000.
- KAPLOWITZ N. **Cell death at the millennium. Implications for liver diseases.** *Clin Liver Dis*; 4:1-23, 2000.
- KATO, R., T. ARAKI, K. KOGURE, M. MURAKAMI, AND K. UEMURA. **Sequential cerebral blood flow changes in short-term cerebral ischemia in gerbils.** *Stroke* 21: 1346–1349, 1990.
- KAWAI, K., L. NITECKA, F. JOO, N. SAITO, AND I. KLATZO. **Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat. I. Dynamics of early neuronal changes.** *J. Cereb. Blood Flow Metab* . 12: 238–249, 1992.
- KELLER, A., PAVLIDES, C., ASANUMA, H. **Long-term potentiation in the cat somatosensory cortex.** *Neuroreport*, v. 1, p. 49-52, 1990.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. **Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br J Cancer ;26:18, 1972.

KINOUCI H, EPSTEIN CJ, MIZUI T, CARLSON E, CHEN SF, CHAN PH. **Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Dec 15;88(24):11158-62.

KIPP M, SCHWAB BL, PRZYBYLSKI M, NICOTERA P, FACKELMAYER FO. **Apoptotic cleavage of scaffold attachment factor A (SAF-A) by caspase-3 occurs at a noncanonical cleavage site.** J Biol Chem. Feb 18; 275(7): 5031-6, 2000.

KIRAY M, UYSAL N, SONMEZ A, ACIKGOZ O, GONENC S. **Positive effects of deprenyl and estradiol on spatial memory and oxidant stress in aged female rat brains.** Neurosci Lett. Jan 16; 354(3): 225-8, 2004.

KIRINO, T., A. TAMURA, AND K. SANO. **Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage.** *Prog. Brain Res.* 63: 39–58, 1985.

KITAGAWA K, MATSUMOTO M, ODA T, NIINOBE M, HATA R, HANDA N, FUKUNAGA R, ISAKA Y, KIMURA K, MAEDA H. **Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death.** Neuroscience.; 35(3):551-8, 1990.

KITAGAWA, K., M. MATSUMOTO, AND G. M. YANG. **Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture in mice: evaluation of the patence of posterior communicating artery.** *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 570–579, 1998.

KITANI K, MINAMI C, ISOBE K, MAEHARA K, KANAI S, IVY GO, CARRILLO MC. **Why (--) deprenyl prolongs survivals of experimental animals: increase of anti-oxidant enzymes in brain and other body tissues as well as mobilization of various humoral factors may lead to systemic anti-aging effects.** Mech Ageing Dev.;123(8):1087-100, 2002.

KLATT P, SCHMIDT K, URAY G, MAYER B. **Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase.** J Biol Chem ;268:14781-7, 1993.

KLEIHUES P, HOSSMANN KA. **Protein Synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia.** Brain Res ;35:409-18, 1971.

KNOLL J, DALLO J, YEN, TT. **Striatal dopamine, sexual activity and life span longevity of rats treated with L-deprenil.** Life Sci, 45: 525-31, 1989.

KNOLL J. **On the dual nature of monoamine oxidase.** Horizons Biochem Biophys; 5: 37 - 64, 1978b.

KNOLL J. **Pharmacological basis of the therapeutic effect of Selegiline in age-related neurological diseases.** Med Res Rev 12(5):505-24, 1992.

KNOLL J. **Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors.** Advances in Biochemical Psychopharmacol, 5:393-408, 1972.

KNOLL J. **Striatal dopamine, aging and Selegiline.** Jugoslav Physiol Pharmacol Acta, 22: 261-73, 1986a.

KNOLL J. **The facilitation of dopaminergic activity in the aged brain by Selegiline: a proposal for a strategy to improve the quality of life in senescence.** Mechanisms of Ageing and Development 30:109-22, 1985.

KNOLL J. **The pharmacology of selective MAO inhibitors: monoamine oxidase inhibitors: the state of art.** In: YODIM-PAYKEL, ed. , p.45-61, 1981

KNOLL J. **The pharmacology of Selegiline.** J Neural Transm: 22: 75 - 89, 1986b.

KNOLL J. **The possible mechanism of action of Selegiline in Parkinson's disease.** J Neural Transm, 43: 177 - 98, 1978a.

KNOLLEMA S, AUKEMA W, HOM H, KORF J, TER HORST GJ. **L-Deprenyl reduces brain damage in rats exposed to transient hypoxia-ischemia.** Stroke 26: 1883-1887, 1995.

KOCHANEK PM, DUTKA AJ, HALLENBECK JM. **Indomethacin, prostacyclin, and heparin improve postischemic cerebral blood flow without affecting early postischemic granulocyte accumulation.** Stroke ;18:634-7, 1987.

KOGA, T., SAKAI, T., TANAKA, C., SAITO, N. **Presynaptic and Ca²⁺-independent PKC subspecies modulates NMDAR₁.** Curr. Neuroreport., v. 7, p. 477-480, 1996.

KOLB, B., SUTHERLAND, R. J., WHISHAW, I. Q. **Comparison of the contributions of the prefrontal cortex and dorsomedial thalamic nucleus to spatially guided behavior in the rat.** Behav. Brain Res., v. 6, p. 365-378, 1982.

KONTOS HA. **Oxygen radicals in cerebral ischemia.** The 2001 Willis Lecture. Stroke ;32:2712-6, 2001.

KRAUSE G.S., KUMAR K., WHITE B.C., AUST S.D., WIEGENSTEIN J.G. **Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanism of tissue injury and prospects for protection.** Am Heart J.,111:178-80,1986.

KRETZCHMAR M, PFEIFFER L, SCHMIDT C, SCHIRMEISTER W. **Plasma levels of glutathione, alpha-tocopherol and lipid peroxides in politraumatized patient: evidence for a stimulating effect of TNF-alpha on glutathione synthesis.** Exp Toxically Pathol; 50:477-83, 1998.

KU D.D. **Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia.** Science ; 218: 576-8, 1982.

KUO PC, SCHROEDER RA. **The emerging multifaceted roles of nitric oxide.** Ann Surg ; 221:220-35, 1995.

KUSHLEIKA J, CHECKOWAY H, WOODS JS, MOON JD, SMITH-WELLER T, FRANKLIN GM, SWANSON PD. **Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson's disease.** Ann Neurol.;39(3):378-81, 1996.

LAHTINEN H, KOISTINAHO J, KAUPPINEN R, HAAPALINNA A, KEINANEN R, SIVENIUS J. **Selegiline treatment after transient global ischemia in gerbils enhances the survival of CA1 pyramidal cells in the hippocampus.** Brain Res 757: 260-267, 1997.

LANDFIELD, P. W., BRAUN, L. D., PITLER, T. A., LINDSEY, J. D., LYNCH, G. Hippocampal aging in rats: A morphometric study of multiple variables in semithin sections. **Neurobiology of Aging**, v. 2, p. 265-275, 1981.

LEVINE, S. **Anoxic-ischemic encephalopathy in rats.** *Am. J. Pathol.* 36: 1-17, 1960.

LI Y, CHOPP M, JIANG N, YAO F, ZALOGA C. **Temporal profile of *in situ* DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat.** J Cereb Blood Flow Metab 15:389-397, 1995b.

LI Y, CHOPP M, JIANG N, ZHANG ZG, ZALOGA C. **Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats.** *Stroke* 26:1252-1257, 1995a.

LI Y, CHOPP M, POWERS C, JIANG N. **Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat.** *Brain Res* 765:301-312,1997.

LI Y, POWERS C, JIANG N, CHOPP M . **Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat.** *J Neurol Sci* 156:119-132, 1998.

LI Y, SHAROV VG, JIANG N, ZALOGA C, SABBAAH HN, CHOPP M. **Ultrastructural and light microscopic evidence of apoptosis after middle cerebral artery occlusion in the rat.** *Am J Pathol* 146:1045-1051, 1995c.

LIEPERT, J., BAUDER, H., MILTNER, W. H. R., TAUB, E., WEILLER, C. **Treatment-Induced Cortical Reorganization After Stroke in Humans.** *Stroke* 31: 1210-1216.2000.

LIÈVRE V, BECUWE P, BIANCHI A. **Intracellular generation of the free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia.** *Neuroscience* ;105:287-97, 2001.

LINDVALL O, ERNFORS P., BENZON J, KOKAIA Z. SMITH ML. SIESJO B.K. **Differential regulation of mRNAs nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma.***Proc Natl Acad Sci USA* ,89:648-52,1992.

LIPTON AS, ROSENBERG PA. **Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders.** *N Engl J Med*, 330: 613-622, 1994.

LIPTON, PETER. **Ischemic Cell Death in Brain Neurons.** *Physiol. Rev.* 79: 1431-1568, 1999.

LJUNGGREN, B., H. SCHUTZ, AND B. K. SIESJO. **Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia.** *Brain Res.* 73: 277–289, 1974.

LOVE S, BARBER R, SRINIVASAN A, WILCOCK GK. **Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischaemia in man.** *Neuroreport.*;11(11):2495-9, 2000.

LOVE S., **Apoptosis and brain ischemia**. Progress in neuropsychopharmacology & biological psychiatry, v. 27, p. 267-282, 2003.

LOWRY H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. AND RANDALL R.J., **Protein measurements with the folin phenol reagent**, J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

MACMILLAN V. **Cerebral Na⁺, K⁺ - ATPase activity during exposure to and recovery from acute ischemia**. J Cereb Blood Flow Metab ;2:457-65, 1982.

MAGYAR K, SZENDE B, LENGYEL J, TARCZALL J, SZATMARY I. **The neuroprotective and neuronal rescue effects of (-)-deprenyl**. J Neural Transm 52: 109-123, 1998.

MANGONI A, GRASSI MP, FRATTOLA L, PIOLTI R, BASSI S, MOTTA A, MARCONE A, SMIRNE S. **Effects of a MAO-B inhibitor in the treatment of Alzheimer disease**. Eur Neurol.;31(2):100-7, 1991.

MAREN, S. & BAUDRY, M. **Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: Relationships to learning and memory**. Neurobiol. Learn. Mem., v. 63, p. 1-18, 1995.

MARKGRAF, CG, GREEN EJ, HURWITZ BE, MORIKAWA E, DIETRICH WD, MCCABE PM, GINSBERG MD, SCHNEIDERMAN N. **Sensorimotor and cognitive consequences of middle cerebral artery occlusion in rats**. Brain Res 575: 238-246, 1992.

MATHEWS KS, MCLAUGHLIN DP, ZIABARI LH, TONER CC, STREET PC, HISGROVE E, BEZZINA EL, STAMFORD JA. **Rapid quantification of ischaemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining**. J Neurosci Methods.;102(1):43-51, 2000.

MATSUMOTO K, YAMADA K, HAYAKAWA T, SAKAGUCHI T., MOGAMI H., **RNA synthesis and processing in the gerbil brain after transient hindbrain ischaemia**. Neurol Res, 12:45-8, 1990.

MATSUYAMA T. **Free radical-mediated cerebral damage after hypoxia/ischemia and stroke**. In: Ter Horst GJ, Korf J, eds. Clinical pharmacology of cerebral ischemia. Totowa, NJ: Humana Press, 153-84, 1997.

- MATTSON MP, CHENG B, CULWELL AR, ESCH FS, LIEBERBURG I, RYDEL RE. **Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein.** *Neuron*. Feb;10(2):243-54, 1993.
- MATTSON MP, GOODMAN Y, LUO H, FU W, FURUKAWA K. **Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration.** *J Neurosci Res*. Sep 15;49(6):681-97, 1997.
- MAZZIO E, HUBER J, DARLING S, HARRIS N, SOLIMAN KF. **Effect of antioxidants on L-glutamate and N-methyl-4-phenylpyridinium ion induced-neurotoxicity in PC12 cells.** *Neurotoxicology* ;22(2):283-8, 2001.
- McCGAUGH, J. L. **Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage.** *Annu. Ver. Neurosci.*, v. 12, p. 255-287, 1989.
- McDONALD, R. J. & WHITE, N. J. Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav. Neural. Biol.*, v. 61, p. 260-270, 1994.
- McEWEN, B. S. & SAPOLSKY, R. M. **Stress and cognitive function.** *Curr. Opinion in Neurobiol.*, v. 5, p. 205-216, 1995.
- MCGEE-RUSSELL, S. M., A. W. BROWN, AND J. B. BRIERLY. **A combined light and electron microscope study of early anoxicischemic cell change in rat brain.** *Brain Res*. 20: 193–200, 1970.
- MESSAM CA, PITTMAN RN. **Asynchrony and commitment to die during apoptosis.** *Exp Cell Res* 238:389-398, 1998.
- MICHIELS C, RAES M, TOUSSAINT O, REMACLE J. **Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress.** *Free Radic Biol Med*. Sep; 17(3): 235-48, 1994.
- MIHARA M, UCHIYAMA M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** *Anal Biochem*. May;86(1):271-8,1978.

MILNER, B. Clues to the cerebral organization of memory. In P. A. Buser and A. Rougel-Buser (Eds.), **Symposium on Cerebral Correlates of Conscious Experience**, Amsterdam, Elsevier, p. 139-153, 1978.

MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology**. *Pharmacol Rev* ;43:109-42, 1991.

MORLEY P, HOGAN MJ, HAKIM AM. **Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection**. *Brain Pathol* 4: 37-47, 1994.

MORRIS, R. G. **Spatial localization does not require the presence of local cues**. *Learn. Motiv.*, v. 12, p. 239-260, 1986.

MOSKOWITZ MA, KIWAK KJ, HEKIMIAN K, LEVINE L. **Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion**. *Science*. May 25; 224(4651): 886-9, 1984.

MYTILINEOU C. **Selegiline protects dopamine neurons from the neurotoxicity effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion**. *J Neurochem*; 45: 1951-3, 1985.

NAGATA S, GOLSTEIN P. **The Fas death factor**. *Science*, 247:1449-56, 1995.

NAKAJIMA W, ISHIDA A, LANGE M S, GABRIELSON K L, WILSON M A, MARTIN L J, BLUE M E AND JOHNSTON M V. **Apoptosis Has a Prolonged Role in the Neurodegeneration after Hypoxic Ischemia in the Newborn Rat**. *J Neurosci.*; 20(21): 7994-8004, 2000.

NAKASE H, HEIMANN A, URANISHI R, RIEPE MW, KEMPSKI O. **Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor**. *Neurosci Lett* ; 290:105-8, 2000.

NAMURA S, ZHU J, FINK K, ENDRES M, SRINIVASAN A, TOMASELLI KJ . **Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia**. *J Neurosci*, 18:3659-3668, 1998.

NAOI M, MARUYAMA W, YAGI K, YODIM M. **Anti-apoptotic function of L-deprenyl (Selegiline) and related compounds**. *Neurobiology (Bp).*;8(1):69-80, 2000.

NI B, WU X, SU Y, STEPHENSON D, SMALSTIG EB, CLEMENS J, PAUL SM. **Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons**. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:248-256, 1998.

- NICHOLSON, DW, ALI, A., THORNBERRY, NA, VAILLANCOURT, JP, DING, CK. **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis** Nature, 376: 37-43, 1995.
- NICKEL R, SCHULZE G, SZELENYI I. **Effect of enantiomers of deprenyl (Selegiline) and amphetamine on physical abuse liability and cortical electrical activity in rats.** Neuropharmacol 29: 983-92, 1990.
- NICOLL, R. A. & MALENKA, R. C. **Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus.** Nature, v. 377, p. 115-117, 1995.
- NIEUWENHUYS, R. In: **Chemoarchitecture of the brain.** Berlin: Spriger-Verlag, 1985.
- NISHIZAWA Y. **Glutamate release and neuronal damage in ischemia.** Life Sci ;69:369-81, 2001.
- NOWAK JR. TS, CARTY ER, LUST WD, PASSONNEAU JV. **An in vitro amino acid incorporation method for assessing the status of in vivo protein synthesis in the rat hippocampal slice: the role of calcium and NMDA receptor activation.** Brain Res,136:285-92, 1984.
- NOWAKOWSKA E, KUS K, CHODERA A, RYBAKOWSKI J. **Investigating potential anxiolytic, antidepressant and memory enhancing activity of deprenyl.** J Physiol Pharmacol.;52(4 Pt 2):863-73, 2001.
- NUTALL, SL.; MARTIN U, SINCLAIR, AJ, KENDALL MJ. **Glutathione in sickness and in health.** Lancet; 351(9103):645-6, 1998.
- O'NEIL BJ, KRAUSE GS, WHITE, BC. **Thymine glycols and pyrimidine dimers in brain DNA during post-ischemic reperfusion.** Resuscitation, 21: 41-55, 1991
- OGAWA S, KOGA S, KUWABARA K - **Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels.** Am J Physiol; 262: 546-54, 1992.
- O'KEEFE J, DOSTROVSKY J. **The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.** Brain Res.; 34(1):171-5, 1971.
- OLFSSON J, GOTTFRIES CG, ROOS BE. **Changes in brain catecholamines in patients with dementia of Alzheimer type.** Br J Psychiatr, 134: 216-23, 1979.

ONODERA H, KOGURE K. **Calcium antagonist, adenosine A1, and muscarinic bindings in rat hippocampus after transient ischemia.** Stroke 21: 771-776, 1990.

OU-YANG, YB, KRISTIÀN T, MELLERGARG P, SIESJÖ BK. **The influence of pH on glutamate- and depolarization-induced increases of intracellular calcium concentration in cortical neurons in primary culture.** Brain res 646: 65-72, 1994.

PACKARD MG, MCGAUGH JL. **Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems.** Behav Neurosci. 1992 Jun; 106(3): 439-46.

PARK WS, CHANG YS, LEE M. **Effects of hyperglycemia or hypoglycemia on brain cell membrane function and energy metabolism during the immediate reoxygenation-reperfusion period after acute transient global hypoxia-ischemia in the newbrn piglet.** Brain Res ; 901:102-8, 2001.

PARKINSON STUDY GROUP. **Effects of tocoferol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease.** N Engl J Med 328: 176-83, 1993.

PATEL T, GORES GJ. **Apoptosis and hepatobiliary disease.** Hepatology; 21:1725-41, 1995.

PATEL T. **Apoptosis in hepatic pathophysiology.** Clin Liver Dis ;4:295-317, 2000.

PATERSON IA, BARBER AJ, GELOWITZ DL, VOLL C. **(-)Deprenyl reduces delayed neuronal death of hippocampal pyramidal cells.** Neurosci Biobehav Ver 21: 181-186, 1997.

PEREZ-PINZON MA, SICK TJ, ROSENTHAL M. **Mechanism(s) of mitochondrial hyperoxidation after global cerebral ischemia.** Adv Exp Med Biol.;471:175-80, 1999.

PESSAYRE D, HAOUZI D, FAU D, ROBIN MA, MANSOURI A, BERSON A. **Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis.** J Hepatol; 31:760-70, 1999.

PITTMAN RN, WANG S, DIBENEDETTO AJ, MILLS JC. **A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death.** J Neurosci 13:3669-3680, 1993.

- PLUTA, R., A. S. LOSSINSKY, M. J. MOSSAKOWSKI, L. FASO, AND H. M. WISNIEWSKI. **Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats.** *Acta Neuropathol.* 83: 1–11, 1991.
- POOL JL. **Aneurysms of the anterior communicating artery, bifrontal craniotomy, and routine use of temporary clips.** *J Neurosurg* ;18:98, 1961.
- POU S, POU W S, BREDT D S, SNYDER S H, ROSEN GM. **Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase.** *J Biol Chem* ;267:24173-6, 1992.
- PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. **Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia.** *Ann Neurol*; 11:491-8, 1982.
- PULSINELLI WA, BRIERLEY JB. **A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unesthetised rat.** *Stroke* ; 10:267-72, 1979.
- PULSINELLI, W. A., AND A. M. BUCHAN. **The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation.** *Stroke* 19: 913–914, 1988.
- PULSINELLI, W. A., D. E. LEVY, AND T. E. DUFFY. **Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia.** *Ann. Neurol.* 11: 499–509, 1982.
- PUURUNEN K, JOLKKONEN J, SIRVIO J, HAAPALINNA A, SIVENIUS J. **Selegiline combined with enriched-environment housing attenuates spatial learning deficits following focal cerebral ischemia in rats.** *Exp Neurol.* ;167(2):348-55, 2001.
- RABL H, KHOSCHSORUR G, HAUSER H, PETEK W, ESTERBAUER H. **Diminished production of malondialdehyde after carotid artery surgery as a result of vitamin administration.** *Med Sci Res* ; 24:777-80, 1996.
- RAICHLE M E, **The pathophysiology of brain ischemia.** *Ann Neurol* 13: 2-10, 1983.
- RAO AM, HATCHER JF, DEMPSEY RJ. **Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanism of CDP-choline neuroprotection.** *J Neurochem* ; 75:2528-35, 2000.

REYMANN, K. **Mechanisms underlying synaptic long-term potentiation in the hippocampus: Focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases.** Functional Neurology, v. 8, p. 7-32, 1993.

REYNOLDS G P **Deprenyl is metabolized to methamphetamine in man.** Br J Clin Pharmac: 6: 542-4, 1978.

RICE JE, VANNUCCI RC, BRIERLEY JB. **The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat.** Ann Neurol 9:131-141, 1981.

RIEDEL, G. **Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory.** Trends in Neurosci., v. 19, p. 219-224, 1996.

ROBERTO LENT. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência,** Ed. Atheneu, 588-616,2001.

ROBERTS S, MORELOS BS. **Role of ribonuclease action in phenyl-alanine-induced disaggregation of rat cerebral polyribosomes.** J Neurochem, 26:387-400,1976.

RODRIGO J, ALONSO D, FERNANDEZ AP. **Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation.** Brain Res ; 909:20-45, 2001.

ROOZENDALL, B. & McGAUGH, J. L. **Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in na inhibitory avoidance task.** Neurobiol. Learn. Mem., v. 65, p. 1-8, 1996.

ROTH E. **The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury.** Curr Op Clin Nutr Metab Care; (1):97-99, 1998.

SAIRANEN T, CARPEN O, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, PAETAU A, TURPEINEN U, KASTE M, LINDSBERG PJ. **Evolution of cerebral tumor necrosis factor-alpha production during human ischemic stroke.** Stroke ;32(8):1750-8, 2001.

SANO M, ERNESTO C, THOMAS RG, KLAUBER MR, SCHAFER K, GRUNDMAN M, WOODBURY P, GROWDON J, COTMAN CW, PFEIFFER E, SCHNEIDER LS, THAL LJ. **A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study.** N Engl J Med.;336(17):1216-22, 1997.

SCHENK, F. & MORRIS, R. G. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. **Exp. Brain Res.**, v. 58, p. 11-28, 1985.

SCHMID, A., KOCH, M., SCHNITZLER, H., -U. **Conditioned pleasure attenuates the startle response in rats.** Neurobiol. Learn. Mem., v. 64, p. 1-3, 1995.

SCHOENBERG BS, MELLINGER JF, SCHOENBERG DG. **Cerebrovascular disease in infants and children: a study of incidence, clinical features and survival.** Neurology 28: 763-768, 1978.

SCHULZ JB, WELLER M, MATTHEWS RT, HENEKA MT, GROSCURTH P, MARTINOUC JC, LOMMATZSCH J, VON COELLN R, WULLNER U, LOSCHMANN PA, BEAL MF, DICHGANS J, KLOCKGETHER T. **Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia.** Cell Death Differ 5:847-857, 1998.

SCHULZ JB, WELLER M, MOSKOWITZ MA. **Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases.** Ann Neurol. ;45(4):421-9, 1999.

SCIOTTI VM, ROCHE FM, GRABB MC, VAN WYLEN DG. **Adenosine receptor blockade augments interstitial fluid levels of excitatory amino acids during cerebral ischemia.** J Cereb Blood Flow Metab.;12(4):646-55, 1992.

SEBESTYEN G Y **Acute toxicity of Selegiline.** Budapest, junho 1975.

SEBESTYEN G Y **Subacute toxicity of Selegiline in rats using 80 mg/kg (provocative dose).** Budapest julho 1977a.

SEBESTYEN G Y. **Six months chronic toxicity study of Selegiline in beagle dogs.** Budapest, agosto 1977b.

SECCOMBE JF, SCHAFF HV - **Reperfusion injury. In: Vasoactive Factors Produced By The Endothelium: Physiology and Surgical Implications.** Austin: R.G. Landes ; 27-41, 1994.

SEIF-EL-NASR M, ABD-EL-FATTAH AA. **Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischemia: effect of ginkgo biloba extract.** Pharmacol Res ; 32:273-8, 1995.

SEIF-EL-NASR M, MAHRAN LG, EL-ABHAR HS, KHALIFA AE, EL-DENSHARY ESM. **Possible neuroprotective effects of melatonin against ischaemia/reperfusion insult in rat brain.** *Med Sci Res* ; **27**: 605–8, 1999.

SEMKOVA I, WOLZ P, SCHILLING M, KRIEGISTEIN J. **Selegiline enhances NGF synthesis and protects central nervous system neurons from excitotoxic and ischemic damage.** *Eur J Pharmacol* 315: 19-30, 1996.

SHAHEEN AA, ABD-EL-FATTAH AA, SEIF-EL-NASR M. **Influence of verapamil on the efficacy of vitamin-E in preventing the ischemia-reperfusion-induced biochemical dearrangement in cerebral cortex of rat.** *Arzneim Forsch - Drug Res.* ;46: 670-3, 1996.

SHIH JC. **Molecular basis of human MAO-A and MAO-B.** *Neuropsychopharmacol* 4: 1-7, 1991.

SIESJO BK, AGARDH CD, BENGTSSON F. **Free radicals and brain damage.** *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* ;1(3):165-211, 1989.

SIESJO BK. **Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment.** *Neurosurg.*; 77(3):337-54, 1992.

SIMPSON L L. **Evidence that Selegiline, a type B monoamine oxidase inhibitor, is an indirectly acting sympathomimetic amine.** *Biochem Pharmacol*, 22: 1591-5, 1977.

SMITH, M.-L., G. BENDEK, N. DAHLGREN, I. ROSEN, T. WIELOCH, AND B. K. SIESJO. **Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model.** *Acta Neurol. Scand.* 69: 385–401, 1984b.

SMITH, M.-L., R. N. AUER, AND B. K. SIESJO. **The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2–10 min of forebrain ischemia.** *Acta Neuropathol.* 64: 319–332, 1984a.

SONG DK, MALMSTROM T, KATER SB, MYKLES DL. **Calpain Inhibitors block Ca^{+2} – induced suppression of neurite outgrowth in isolated hippocampal pyramidal neurons.** *J Neurosci Res.* ;39:474-81, 1994.

SOSSIN, W. S. **Mechanisms for the generation of synapse specificity in long-term memory: The implications of a requirement for transcription.** *Trends in Neurosci.*, v. 19, p. 215-218, 1996

SQUIER MKT, MILLER ACK, MALKINSON AM, COHEN JJ. **Calpain activation in apoptosis.** J Cell Physiol ;159:229-37, 1994.

SQUIRE LR, ZOLA SM. **Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems.** Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 26; 93(24): 13515-22, 1996.

SQUIRE, L. R. **Memory and Brain.** Oxford: Oxford Univ. Press, 1987.

STAUBLI, U., THIBAUT, O., DILORENZO, M., LYNCH, G. **Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory.** Behav. Neurosci., v. 103, p. 54-60, 1989.

STHAL RF, DEUTSH E, FISHER CA, WARSAW DS, ADDONAZIO VP - **Cardiac ischemia and endothelial function in the isolated rabbit heart.** J Surg Res ; 47: 97-104, 1989.

STRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM. **Apoptosis signaling.** Annu Rev Biochem.;69:217-45, 2000.

STRIJBOS, P. J. L. M., M. J. LEACH, AND J. GARTHWAITE. **Vicious cycle involving Na channels, glutamate release and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation.** *J. Neurosci.* 16: 5004–5013, 1996.

SUGIMURA T, SAKO K, TOHYAMA Y, YONEMASU Y. **Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia.** Brain Res ; 808:313-6, 1998.

SUTHERLAND, R. J., WHISHAW, I. Q., KOLB, B. **A behavioral analysis of spatial localization following electrolytic, kainate-or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat.** Behav. Brain Res., v. 7, p. 133-153, 1983.

SUTHERLAND, R. J., WHISHAW, I. Q., REGEHR, J. C. **Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat.** J. Comp. Physiol. Psychol., v. 96, p. 563-573, 1982.

SUURONEN T, KOLEHMAINEN P, SALMINEN A. **Protective effect of L-deprenyl against apoptosis induced by okadaic acid in cultured neuronal cells.** Biochem Pharmacol. Jun 15; 59(12): 1589-95, 2000.

SWEENEY MI. **Both adenosine release and uptake in neurons occur via a nucleoside transporter modulated by G-proteins.** Proceedings of the 38th Meeting

of the Canadian Federation of Biological Societies. June 14-17, Saskatoon, Sask. Abst. 088, 1995.

SZIRAKI I, KARDOS V, PATTHY M, PATFALUSI M, GAAL J, SOLTI M, KOLLAR E, SINGER J. **Amphetamine-metabolites of deprenyl involved in protection against neurotoxicity induced by MPTP and 2'-methyl-MPTP.** J Neural Transm Suppl.41:207-19., 1994.

SZYMONIK-LESIUK S, CZECHOWSKA G, STRYJECKA-ZIMMER M, SLOMKA M, MADRO A, CELINSKI K, WIELOSZ M. **Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication.** J Hepatobiliary Pancreat Surg. ; 10(4):309-15, 2003.

TAKAMATSU H, TSUKADA H, KAKIUCHI T, NISHIYAMA S, NODA A, UMEMURA K. **Detection of injury using PET in a monkey model of cerebral ischemia.** J Nucl Med ;41:1409-16, 2000.

TARDINI D.M.S., YOSHIDA W.B.. **Brain injury due to ischemia and reperfusion in carotid endarterectomy surgery.** J Vasc Br. ;2(2):119-28, 2003.

TATTON WG. **Selegiline can mediate neuronal rescue rather than neuronal protection.** Mov Disord 8: S20-S30, 1993.

TERASHIMA T, NAMURA S, HOSHIMARU M, UEMURA Y, KIKUCHI H, HASHIMOTO N. **Consistent injury in the striatum of C57BL/ 6 mice after bilateral common carotid artery occlusion.** Neurosurgery;43:900-8, 1998.

TERENT A, JONSSON E. **Costs of stroke in Sweden: a national perspective.** Stroke ;25:2363-2369, 1994.

TERRY, R. D. & DAVIES, P. **Dementia of the Alzheimer type.** Ann. Rev. Neurosc., v. 3, p. 77-95, 1980.

THOMAS T, MCLENDON C, THOMAS G. **L-deprenyl: nitric oxide production and dilation of cerebral blood vessels.** Neuroreport. ;9(11):2595-600, 1998.

THOMAS T. **Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease.** Neurobiol Aging.;21(2):343-8, 2000.

THOMPSON CB. **Apoptosis.** In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven;. p.813-29., 1999.

THOMPSON, R. F & KRUPA, D. J. **Organization of memory traces in the mammalian brain.** Ann. Rev. Neurosci., v. 17, p. 519-549, 1994.

TIFFANY BR, WHITE BC, KRAUSE GS. **Nuclear-envelope nucleoside triphosphatase kinetics and mRNA transport following brain ischemis and reperfusion.** Ann Emerg Med ,23:59-69,1995.

TIPTON K F. **Metabolism of aldehydes in the brain.** Essays Neurochem Neuropharmacol 1: 103-38, 1977.

TOCCO, G., DEVGAN, K., HANGE, S. A., WEISS, C. A., BAUDRY, M., THOMPSON, R. F. **Classical conditioning selectively increases AMPA receptor binding in rabbit hippocampus.** Brain Res., v. 559, p. 331-336, 1991.

TOWFIGHI J, MAUGER D, VANNUCCI RC, VANNUCCI SJ. **Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study.** Brain Res Dev Brain Res 100:149-160, 1997.

TOWFIGHI J, ZEC N, YAGER J, HOUSMAN C, VANNUCCI RC . **Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study.** Acta Neuropathol (Berl) 90:375-386, 1995.

TRAVAGLI RA, ULIVI M, WOJCIK WJ. **Gamma-Aminobutyric acid-B receptors inhibit glutamate release from cerebellar granule cells: consequences of inhibiting cyclic AMP formation and calcium influx.** J Pharmacol Exp Ther. ;258(3):903-9, 1991.

TRAYSTMAN RJ, KIRSCH JR, KOEHLER RC. **Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion.** J Appl Physiol ;71:1185-95, 1991.

TRESCHER WH, ISHIWA S, JOHNSTON MV. **Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury.** Brain Dev 19:326-338, 1997.

TRUELOVE D, SHUAIB A, IJAZ S, ISHAQZAY R, KALRA J. **Neuronal protection with superoxide dismutase in repetitive forebrain ischemia in gerbils.** Free Radic Biol Med.;17(5):445-50, 1994.

ULRICH PT, KROPPENSTEDT S, HEIMANN A, KEMPSKI O. **Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flowand reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic two-vessel occlusion model in rats.** *Stroke* ; **29**: 2412–20, 1998.

UMEMURA A. **Regional difference in free fatty acids release and the action of phospholipase during ischemia in rat brain.** No To Shinkei:42:979-86,1990.

UNAL I, GURSOY-OZDEMIR Y, BOLAY H, SOYLEMEZOGLU F, SARIBAS O, DALKARA T. **Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice.** Brain Res. ;917(2):174-81, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH, **EDUCATION AND WELFARE, NATIONAL SURVEY OF STROKE**, NIH Publ. 80-2069, 1980.

VAGNOZZI R, LAZZARINO G, TAVAZZI B. **Incomplete cerebral ischemia in the rat provokes increase of tissue and plasma malondialdehyde.** Biol Trace Elem Res 1995;47:241-6, 1995.

VANELLA A, DI GIACOMO C, SORRENTI V, CAMPISI A, CASTORINA A, PINTURO R, CHIARENZA G, PEREZ-POLO JR. **Lipid peroxidation and xanthine dehydrogenase/oxidase ratio in rat cerebral cortex during post-ischemic reperfusion: effect of Ca²⁺ antagonist drugs.** In: Krieglstein J, Oberpichler H, eds. *Pharmacology of cerebral ischemia.* Stuttgart, Germany:Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 311–5, 1990.

WATERFALL AH, SINGH G, FRY JR, MARSDEN CA. **Acute acidosis elevates malondialdehyde in rat brain in vivo.** Brain Res ;712:102-6, 1996.

WATSON BD, BUSTO R, GOLDBERG WJ, SANTISO M, YOSHIDA S, GINSBERG MD. **Lipid peroxidation in vivo induced by reversible global ischemia in rat brain.** J Neurochem; 42:268-74, 1984.

WATSON BD. **Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke.** Prog Brain Res ;96:69-95, 1993.

WEIGAND MA, LAIPPLE A, PLASCHKE K, ECKSTEIN HH, MARTIN E, BARDENHEUER HJ. **Concentration changes of malondialdehyde across the cerebral vascular bed and shedding of L-selectin during carotid endarterectomy.** Stroke;30:306-11, 1999.

WHISHAW, I. Q., O'CONNOR, W. T., DUNNET, S. B. **Disruption of central cholinergic systems in the rat by basal forebrain lesions or atropine: Effects on**

feeding, sensorimotor behavior, locomotor activity and spatial navigation. Behav. Brain Res., v. 17, p. 103-115, 1985.

WHITE BC, TRIBHUWAN, RC, VANDER LANN, DJ, DEGRACIA, DJ, KRAUSE, GS, GROSSMAN, LI. **Brain mitochondrial DNA is not damaged by prolonged cardiac arrest or reperfusion.** J. Neurochem., 58: 1716-22, 1992.

WIDMANN R, KUROIWA T, BONNEKOH P. HOSSMANN K.A (¹⁴C)-Leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. J Neurochem ,56:789-96,1991.

WINBLAD, B., HARDY, J., BACKMAN, L., NILSSON, L. –G. **Memory function and brain biochemistry in normal aging and senile dementia.** In D. S. Olton, E. Gamzu & Corkin (Eds.), Memory dysfunction: An integration of animal and human research from preclinical and clinical perspectives (Annals of the New York Academy of Sciences, vol 444, New York: New York Academy of Sciences, 1985, p. 265-268.

WITTER, M. P., GROENEWEGEN, H. J., LOPES DA SILVA, F. H., LOHMANN, A. H. M. **Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the rat parahippocampal region.** Prog. in Neurobiol., v. 33, p. 161-253, 1989.

WOLFMAN, C, DA CUNHA, C., JERUSALINSKY, D., LEVI DE STEIN, M. *et al.* **Habituation and inhibitory avoidance training alter brain regional levels of benzodiazepine-like molecules and are affected by intracerebral flumazenil microinjection.** Brain Res., v. 548, p. 74-80, 1991.

WONG GKT, MARSDEN PA. **Nitric oxide synthases: regulation in disease.** Nephrol Dial Transplant ;11:215-20, 1996.

WOODS BT, SCHOENE W, KNEISLEY L. **Are hippocampal lesions sufficient to cause lasting amnesia?** Neurol Neurosurg Psychiatry. 45(3):243-6. 1982

WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR . **Cell death: the significance of apoptosis.** Int Rev Cytol 68:251-306, 1980.

YAGER J, TOWFIGHI J, VANNUCCI RC. **Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat.** Pediatr Res.;34(4):525-9, 1993.

YIN, J. C. P. & TULLY, T. **CREB and the formation of long-term memory.** Curr. Opinion in Neurobiol., v. 6, p. 264-268, 1996.

- YOSHIDA WB. **Fisiopatologia da isquemia e reperfusão.** In: Maffei FHA. Doenças Vasculares Periféricas. Rio de Janeiro: MEDSI; p. 253-8, 2002.
- YOUDIM M B H ,FINBERG J P M. **Monoamine oxidase inhibitor antidepressants.** In: Grahame-Smith DH, Hippus A and Winoker H, eds. Psychopharmacolog. Amesterdan: Excerpta Medica, 37-62, 1985.
- YOUNG, A. W., AGGLETON, J. P., HELLAWELL, D. J., JOHNON, M., BROKS, P., HANLEY, J. R. **Face processing impairments after amygdalotomy.** Brain, v. 118, p. 15-24, 1995.
- YU MJ, MCCOWAN JR, SMALSTIG B, BENNETT DR, ROUSH ME, CLEMENS JA. **A phenothiazine derivative reduces rat brain damage after global or focal ischemia.** Stroke;23:1287-91, 1992.
- ZABRAMSKI JM, HAMILTON MG. **Cerebral vasospasm.** In Spetzler RF, Carter LP (eds). Neurovascular surgery. New York: McGraw-Hill, 583-601, 1994.
- ZAGREAN L, VATASESCU R, OPRICA M, NUTIU O, FERECHE D. **A comparative study of EEG suppressions induced by global cerebral ischemia and anoxia.** Rom J Physiol. Jan-Dec; 32(1-4): 39-44, 1995.
- ZANATTA, M. S., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P. K., MEDINA, J. H., QUEVEDO, J., QUILLFELDT, J. A., IZQUIERDO, I. **Squential involmnet of NMDA-dependent mechanisms in the hippocampus, amygdala, entohinal cortex and parietal cortex in memory processing.** Behav. Pharmacol., v. 6, p. 341-345, 1996.
- ZHAO W, BELAYEV L, GINSBERG MD. **Transient middle cerebral artery occlusion by intraluminal suture: II. Neurological deficits, and pixel-based correlation of histopathology with local blood flow and glucose utilization.** J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Dec;17(12):1281-90, 1997.
- ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R., AMARAL, D. G., SUZUKI, W. **Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment.** J. Neurosci., v. 9, p. 4355-4370, 1989.
- ZORNETZER, S. F. Neurotransmitter modulation and memory: A new neuropharmacological phrenology? In M. A. Lipton, A. DiMascio & K. F. Killam

(Eds.), **Psychopharmacology: A generation of progress** New York: Raven, 1978, p. 637-649.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)