

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS EM FATIAS DE  
HIPOCAMPO DE RATO SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E  
GLICOSE**

**GISELE HANSEL**

Orientador:

Prof. Dr. DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
– Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção de título de Mestre em Bioquímica

**PORTO ALEGRE**

**2009**

**À minha família,  
em especial meu pai e minha mãe por todo apoio e incentivo, e por me  
ensinar que o mais gratificante é trabalhar naquilo que te realiza pessoal  
e profissionalmente.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Diogo, um exemplo de amor à ciência e a vida, por ter me iniciado no mundo da pesquisa, acreditando na minha capacidade e no meu trabalho, proporcionando um ótimo convívio profissional e pessoal. Ensinando que cada um tem seu tempo para descobrir o prazer de fazer ciência.

Ao professor Luís Valmor Portela (mais conhecido como Roska) por me incentivar e proporcionar grandes oportunidades nos momentos estressantes do meu trabalho. Também, por criar um ambiente de trabalho descontraído e engraçado, mostrando que é possível conciliar trabalho e descontração no mesmo ambiente.

A todos os meus amigos dos laboratórios 24, 26 e 28 que sempre estiveram dispostos com muita paciência e amizade a ajudar nos meus experimentos. Agradeço muito ao Olavo por me incluir nos seus projetos de pesquisa, a paciência do Jean em me ensinar várias metodologias e estatísticas e as agradáveis brigas com o Giordano, nas vastas discussões filosóficas.

A todos os meus colegas e amigos da “gangue” dos 28, em especial à Ana Elisa, Catiele, Débora, Fernanda, Giana, Júlia, Marcelo e Victor que por críticas, incentivos, festas e discussões filosóficas em barzinhos pela cidade... auxiliam no meu crescimento profissional e pessoal. E que, principalmente me ensinaram o verdadeiro significado de “grupo de trabalho”. À Denise pela plena dedicação e ajuda em todos os experimentos realizados neste trabalho. Não se esquecendo do João e da Luísa, que neste momento não estão neste laboratório, mas foram muito importantes.

A todos os meus amigos, em especial à Luana e à Aracélli, pela compreensão e amizade, suportando muitas vezes meu mau humor, meu egoísmo, minhas angústias e minha ausência durante estes quase dois anos.

A minha família, em especial meus pais, minha avó, meus irmãos e minha sobrinha por todo o apoio, compreensão, amor, carinho e afago que foi essencial neste período.

Em especial, ao meu namorado Leonardo, por sempre acreditar em mim, por “aguentar” todas as minhas crises e chilikues nos momentos difíceis,

me acalmando e incentivando. Agradeço por toda a sua disponibilidade, paciência e mimo durante esse período.

À equipe do biotério, que foi essencial na realização de todos os trabalhos desta dissertação.

À secretaria de pós-graduação, principalmente à Cléia, que estava sempre disposta de solucionar todos os problemas existentes.

À equipe do Instituto de Cardiologia, a em especial a Liz que teve participação essencial neste trabalho.

Ao CNPq bolsa de mestrado concedida e aos demais órgãos que apóiam a pesquisa em nosso país.

E finalmente a todos que não foram citados aqui, tanto do departamento de Bioquímica da UFRGS quanto aos amigos de meu convívio, que de uma forma ou de outra, também prestaram a sua valiosa contribuição para a concretização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	I
<b>ABSTRACT</b> .....	II
<b>INDICE DE FIGURAS E TABELAS</b> .....	III
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	IV
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>II. OBJETIVO</b> .....	06
<b>III. ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	07
HANSEL G., RAMOS D.B., LEITE M.C., MOREIRA J.D., GONÇALVES C.A., PORTELA L.V., SOUZA D.O. Neurochemical parameters for evaluation of OGD effects on acute rat hippocampal slices. Artigo a ser submetido para o periódico Brain research	
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>V. CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>VI. PERSPECTIVAS</b> .....	50
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51

## RESUMO

Mesmo a isquemia sendo a terceira causa de morte em países industrializados, os mecanismos relacionados a esta doença ainda continuam polêmicos e obscuros. Utilizou-se a técnica de privação de oxigênio e glicose (OGD) em fatias do hipocampo de rato para investigar parâmetros mitocondriais, neurais, astrogliais e metabólicos no período de isquemia e durante o período de reoxigenação. Os resultados mostraram uma diminuição na atividade mitocondrial durante o período isquêmico que foi mantido durante todo o período de reoxigenação. Analisando o sobrenadante destas fatias submetidas à OGD, foi observado que os níveis de LDH, NSE e GFAP se elevaram. Com relação aos níveis de lactato, verificou-se sua diminuição durante todos os períodos. Os níveis de S100B estavam elevados somente durante o período de reoxigenação. Este aumento pode ser tanto um mecanismo de neuroproteção desta proteína frente ao insulto ou ainda uma liberação por dano celular astrocitário. Além disso, foi observado um grande aumento nos níveis de glutamato durante a isquemia e este aumento retornou no período de reoxigenação. Por fim, houve uma diminuição na captação de glutamato somente no período de reoxigenação. Todos estes resultados podem ser consequência de uma hiper-estimulação dos receptores glutamatérgicos devido ao insulto isquêmico. Em resumo, nosso estudo mostrou alterações em diversos parâmetros neuroquímicos específicos tanto no período isquêmico quanto na reoxigenação, mostrando que cada tipo celular, reage diferentemente frente ao insulto isquêmico na técnica de OGD *in vitro*.

**Palavras-chave:** captação de glutamato, enolase neurônio específica (NSE), isquemia, privação de oxigênio e glicose (OGD), proteína glial fibrilar ácida (GFAP), S100B.

## **ABSTRACT**

Stroke is the third cause of mortality in industrialized countries, and the mechanisms related to this disease are polemic and unclear. Oxygen and glucose deprivation (OGD) in acute rat hippocampal slices was performed to investigate mitochondrial, neural, astroglial and metabolic neurochemical parameters at different ischemic and reoxygenation periods. Results showed the mitochondrial activity decrease due energy failure during ischemic insult and reoxygenation time. In the supernatant medium, LDH, NSE and glutamate levels were increased and the lactate decrease by the lack of energy observed in the ischemic period. Parameters such as GFAP, S100B and glutamate uptake suffered alterations only at the reoxygenation period. These results have shown the vulnerability of neurons facing ischemic insult. Meanwhile, it was also observed a delayed injure of astrocytes only at reoxygenation time, which demonstrate the difference between cell types at OGD. In summary, our finding has shown altered at specific neurochemical parameters in OGD *in vitro* which features the ischemic episodes and reoxygenation periods.

**Key words:** Glutamate Uptake; Glial fibrillary acid protein (GFAP); Ischemia; neuron-specific enolase (NSE); Oxygen and glucose deprivation (OGD); S100B.

## ÍNDICE DE FIGURAS e TABELAS

### ARTIGO

<b>Table 1.</b> Glutamate levels in the supernatant from hippocampal slices.....	39
<b>Figure 1.</b> MTT in the hippocampal slices during ischemic and reoxygenation period .....	39
<b>Figure 2.</b> LDH levels at the supernatant in the hippocampal slices submitted at OGD.....	40
<b>Figure 3.</b> NSE levels at the supernatant in the hippocampal slices submitted at OGD.....	40
<b>Figure 4.</b> GFAP levels at the supernatant in the hippocampal slices submitted at OGD .....	41
<b>Figure 5.</b> S100B levels at the supernatant in the hippocampal slices submitted at OGD.....	41
<b>Figure 6.</b> lactate levels at the supernatant in the hippocampal slices submitted at OGD.....	42
<b>Figure 7.</b> Glutamate uptake in the hippocampal slices submitted at OGD.....	42



**LISTA DE ABREVIATURAS**

EAAC - 1 - Transportador de glutamato neuronal

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GLAST - Transportador de aspartato e glutamato

GLT-1 - Transportador de glutamato da Glia 1

LCR - Líquor cefaloraquidiano

LDH - Lactato desidrogenase

MCTs - Transportadores monocarboxílicos

MTT - Brometo 3(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difenil tetrazol

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase- enzima sódio, potássio ATPase

NSE - Enolase neuronal específica

OGD - Privação de oxigênio e glicose

SNC - Sistema Nervoso Central

S100B - proteína ligadora de cálcio específica de astrócito

Outras abreviaturas encontram-se detalhadas no texto.

## **I. Introdução**

O insulto cerebral isquêmico acontece quando há uma interrupção transitória ou permanente do fluxo sanguíneo, impedindo o fornecimento de glicose e oxigênio para o cérebro (Thomazi et al., 2008).

São três as principais causas naturais de isquemia: trombose, embolia e hipoperfusão sanguínea (Thomazi et al., 2008). O insulto isquêmico é a terceira causa de mortalidade nos países industrializados, perdendo apenas para o infarto cardiovascular e para o câncer. Nos Estados Unidos, este insulto é a terceira principal causa de morte, sendo diagnosticados 700.000 novos casos a cada ano. Há uma estimativa que até o ano 2020 pode ser a quarta causa de morte mundial. Existe, nos Estados Unidos, 1 milhão de internações por ano, e isso está associado a um grande gasto ao atendimento a estas vítimas. Foi estimado que nos Estados Unidos, foram gastos aproximadamente 50 bilhões de dólares no ano de 2005 (Wang et al., 2006).

Além da elevada mortalidade causada pela isquemia, 40% das pessoas que sofrem deste insulto acabam permanecendo com sequelas irreversíveis. Por esta razão as doenças cerebrovasculares são consideradas uma questão de Saúde Pública com alto impacto social, revelando resultados não satisfatórios tanto no que se refere ao tratamento e reabilitação do paciente, quando ao enorme gasto público (Diaz-Ruiz et al., 2009).

O sistema nervoso central (SNC) necessita de um contínuo suprimento de oxigênio e glicose, uma redução ou um bloqueio no fluxo sanguíneo ao cérebro leva ao dano neuronal e perda das funções cerebrais (Lipton, 1999). Mesmo em períodos relativamente curtos de tempo, a privação de oxigênio,

pode causar danos irreversíveis ao cérebro de mamíferos. (Wang et al., 2000). A disfunção mitocondrial é um dos principais danos causados pelo inadequado suporte energético. Estudos recentes sugerem que o grau de disfunção mitocondrial na isquemia cerebral pode ser um fator determinante na lesão tecidual (Dugan and Kim-Han, 2004). O efeito da hipóxia é significativo frente à função mitocondrial, reduzindo a respiração celular devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio, diminuindo assim, a atividade de diversas enzimas mitocondriais (Malthankar-Phatak et al., 2008).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (Danbolt, 2001). Esse aminoácido participa de funções importantes no sistema nervoso central tais como o processo de memória e aprendizado (Izquierdo et al., 2006), bem como na formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Ozawa et al., 1998). O glutamato exerce a sua neurotransmissão por meio da ativação de receptores ionotrópicos (canais permeáveis a íons) e receptores metabotrópicos (acoplados às proteínas G), que estão presentes nas membranas pré e pós sinápticas e também presentes nas membranas das células gliais (Ozawa et al., 1998). Após exercer os seus efeitos excitatórios o glutamato precisa ser captado da fenda sináptica.

Qualquer mecanismo que interfira na não captação deste glutamato na fenda sináptica após a neurotransmissão, resulta em excesso de estimulação dos receptores de glutamato (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001), levando a excitotoxicidade. Eventos isquêmicos estão envolvidos nesta excitotoxicidade glutamatérgica. Para que esse excesso de glutamato no meio extracelular não cause danos às células, há um mecanismo de transporte

deste neurotransmissor para o interior das células, este mecanismo é feito principalmente pelos astrócitos (Danbolt, 2001).

Os transportadores de glutamato são divididos de acordo com a sua localização no sistema nervoso central em GLAST e GLT-1, presentes predominantemente nas membranas das células gliais, EAAC1, EAAT4 e EAAT5 presente nas membranas dos neurônios, EAAT4 (expresso nos dendritos das células de Purkinje no cerebelo) e o EAAT5 (Galvan et al., 2006).

Durante a isquemia cerebral, a depleção de ATP no interior das células prejudica a capacidade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase remover o íon  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}_2^+$  da célula (Mattson, 2000), resultando em despolarização da membrana e liberação de glutamato. Como os transportadores são acoplados ao  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase a captação de glutamato acaba sendo prejudicada (Danbolt, 2001).

Uma estrutura que é bastante acometida durante o insulto isquêmico é o hipocampo. O hipocampo é uma importante região do SNC envolvida em diversas funções cognitivas como a formação de memória e aprendizado (Izquierdo et al., 2006). A principal região afetada pela isquemia e pela hipoperfusão é a CA1 (Cárdenas et al., 2000).

Sabe-se que o sistema glutamatérgico tem uma participação fundamental no insulto isquêmico, mas o mecanismo envolvido sobre esta doença ainda encontra-se polemico e controverso (Cardenas et al., 2000; Dugan and Kim-Han, 2004; Wang et al., 2000). Por isso, muitos grupos vêm desenvolvendo técnicas *in vivo* e *in vitro* para compreender os mecanismos envolvidos nesse fenômeno (Lipton, 1999).

Uma técnica bastante utilizada é a OGD. Esta técnica mimetiza um insulto isquêmico *in vitro* permitindo a avaliação de parâmetros agudos em

fatias de tecido cerebral. A técnica consiste em utilizar fatias de tecidos (no caso desta dissertação foi utilizada fatias de hipocampo de ratos de 400 $\mu$ M de espessura) que são submetidas a uma privação de glicose e oxigênio, mimetizando o processo isquêmico durante um determinado período de tempo. Após este período estas fatias são re-encubadas, desta vez na presença de glicose e oxigênio (período de reoxigenação). Avaliando, assim, tanto parâmetros que ocorrem durante o insulto isquêmico como durante o período de reoxigenação (Moreira et al., 2009; Strasser and Fischer, 1995). Podem-se utilizar diversos parâmetros de avaliação, dentre os quais se cita: a atividade mitocondrial, a morte celular, a secreção de proteínas responsáveis por uma neuromodulação frente ao dano, a reação metabólica do tecido frente ao insulto e a atividade do sistema de neurotransmissão.

É imprescindível descobrir o mecanismo individual de cada célula frente ao insulto isquêmico. Estudos envolvendo astrócitos mostram que eles são peças-chave para desvendar os mecanismos envolvidos nesta doença (Dugan and Kim-Han, 2004). Duas proteínas astrócitárias parecem estar diretamente envolvidas neste processo. S100B é uma proteína ligante de cálcio que é expressa em astrócitos. Esta proteína possui muitas funções intracelulares, estando envolvida na regulação e na proliferação celular, e na plasticidade do citoesqueleto. Sabe-se que a S100B é secretada por mecanismo ainda desconhecido, possuindo um efeito neurotrófico sobre os neurônios, protegendo-os contra excitotoxicidade, estresse oxidativo e promovendo a modulação da neurotransmissão (Nardin et al., 2009; Rathbone et al., 1999).

Outra proteína que é muito estudada frente às injúrias do SNC é a GFAP. Esta é uma proteína de filamento encontrada em astrócitos adultos, e

covalentemente modificada por fosforilação, especialmente em locais específicos sobre o N-terminal. É esta modificação que modula a plasticidade dos filamentos dos astrócitos. Como se trata de uma proteína específica, é amplamente utilizada como marcador de astrogliose e ativação astrócitária em diversos danos no SNC (Tramontina et al., 2007).

Diversos estudos mostram que injúrias cerebrais causam aumento de S100B e GFAP em LCR e em soro, sendo que este aumento está diretamente relacionado com a gravidade do insulto (Herrmann and Ehrenreich, 2003; Herrmann et al., 2003; Oses et al., 2004). Doenças psiquiátricas como esquizofrenia e distúrbios bipolares também mostraram uma elevação de S100B em soro (Lara et al., 2001; Machado-Vieira et al., 2002).

Conhecer os mecanismos envolvidos no processo de depleção de energia no SNC é de grande valor, viabilizando, numa perspectiva positiva para o futuro, o desenvolvimento de drogas que possam reverter os efeitos maléficos deste insulto; e desta forma, promovendo uma melhor qualidade de vida ao pacientes.

## II. Objetivo

Uma vez que os efeitos da privação de oxigênio e glicose no sistema nervoso central (SNC) são as maiores causas de injúria cerebral e que os dados na literatura sobre este dano são controversos, através deste trabalho objetiva-se a avaliação de diversos parâmetros neuroquímicos na técnica *in vitro* de OGD em fatias de hipocampo de rato. Em especial, parâmetros celulares específicos como S100B, GFAP e NSE na intenção de verificar diferentes comportamentos celulares frente ao insulto isquêmico.

### **III. ARTIGO CIENTÍFICO**

HANSEL G., RAMOS D.B., LEITE M.C., MOREIRA J.D., GONÇALVES C.A., PORTELA L.V., SOUZA D.O. Neurochemical parameters for evaluation OGD effects on acute rat hippocampal slices. Artigo a ser submetido para o periódico Brain research.



Neurochemical parameters for evaluation of OGD effects on acute rat hippocampal slices

Gisele Hansel<sup>1</sup>, Denise Barbosa Ramos, Marina Concli Leite, Júlia Dubois, Luís Valmor Portela, Carlos Alberto Gonçalves, Diogo Onofre Souza.

Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup>Corresponding author: Gisele Hansel,  
Avenida Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre-RS-  
Brazil. Tel.: +55-51-33085559, Fax: +55-51-3308-5540/55-51-3308-5535;  
E-mail: gihansel@gmail.com

## **Abstract**

Stroke is the third cause of mortality in industrialized countries, and the mechanisms related to this disease are polemic and unclear. Oxygen and glucose deprivation (OGD) in acute rat hippocampal slices was performed to investigate mitochondrial, neural, astroglial and metabolic neurochemical parameters at different ischemic and reoxygenation periods. Our results have shown that the mitochondrial activity decrease due energy failure during ischemic insult and reoxygenation time. In the supernatant medium, LDH, NSE and glutamate levels were increased and the lactate decrease by the lack of energy observed in the ischemic period. Parameters like GFAP, S100B and glutamate uptake suffered alterations only at the reoxygenation period. These results have shown the vulnerability of neurons facing ischemic insult. Meanwhile, it was also observed a delayed injure of astrocytes only at reoxygenation time, which demonstrate the difference between cell types endurance in OGD. In summary, our finding has shown altered at specific neurochemical parameters in OGD *in vitro* which features the ischemic episodes and reoxygenation periods.

Key words: Glial fibrillary acid protein (GFAP); Glutamate Uptake; Ichemia; neuron-specific enolase (NSE); Oxygen and glucose deprivation (OGD); S100B.

## **Introduction**

Stroke is the third cause of disability and mortality in industrialized countries and the major cause of brain damage (Diaz-Ruiz et al., 2009; Thomazi et al., 2008). There is a estimative that 40% of people that suffered this disease have reversible and irreversible consequences, making the stroke a Public health problem (Diaz-Ruiz et al., 2009).

The central nervous system (CNS) needs a continuous supply of oxygen and glucose. A reduction or a blockage of blood flow to the brain leads to neural damage and impairment of brain functions (Lipton, 1999). The hippocampus is an important region of CNS involved in most brain functions, such as memory and learning (Izquierdo and Medina, 1997). Eventual damage in this structure, like hypoxic-ischemic insult, may cause serious consequences, mainly CA1 region (Cardenas et al., 2000).

Glutamate is the principal excitatory neurotransmitter in the CNS involved in several brain functions (Danbolt, 2001). Nevertheless, the increase in glutamate levels in the synaptic cleft results in an over-stimulation of glutamate receptors (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Maragakis and Rothstein, 2001), leading to excitotoxicity. This situation is involved in several brain disorders, including ischemic events. Thus, the glutamate uptake is essential to prevent the excitotoxicity occasioned

by high concentrations of extracellular glutamate in the synaptic cleft. Maintain glutamate below at toxic levels is one of mainly roles of glia cells, which is obtained by the activity of high affinity sodium-dependent glutamate transporters, present in especially in astrocytes (Anderson and Swanson, 2000; Chen and Swanson, 2003; Danbolt, 2001). There are three important glutamate transporters in the rat hippocampus, neuronal (EAAC1) and astrocytic (GLAST and GLT-1) transporters that remove glutamate from the extracellular space (Danbolt, 2001).

Glutamatergic system has an essential involvement in ischemic insult, but the mechanism involved over this disease is under debate, and various studies are trying to understand this event (Cardenas et al., 2000; Dugan and Kim-Han, 2004; Wang et al., 2000). Therefore, many groups have been developed techniques *in vivo* and *in vitro* to understand all the mechanisms involved in this phenomenon. Thus, in this present study, we applied the *in vitro* methodology of oxygen and glucose deprivation (OGD) in acute rat hippocampal slices to evaluate specific parameters that are able to show difference between neuronal cell types.

## **2. Experimental procedure**

### **2.1. Animals**

Wistar male adult rats (60-80 days-old) were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with water and commercial food pellets *ad libitum*. Institutional protocols for experiments with animals were designed to minimize suffering and to limit the number of animals killed.

### **2.2. Oxygen glucose deprivation experiment**

Rats were decapitated and their hippocampi were quickly isolated and transverse sections (400  $\mu\text{m}$ ) were prepared using a McIlwain tissue chopper. The hippocampal slices were maintained in a separate 24-well culture plate (one slice/well). All the slices were preincubated for 30 min in a modified phosphate buffer solution containing 120mM NaCl, 3.1mM KCl, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 18mM PO<sub>4</sub> and 10mM glucose (pH 7.4) at 37 °C in the culture incubator (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). The slices were divided in two groups: control slices and Oxygen and glucose deprivation slices. The oxygen glucose deprivation (OGD) method was based on the methodology described by Strasser and Fischer (Strasser and Fischer, 1995) with modification (Moreira et al., 2009). After preincubation period, control slices were washed twice and incubated in

another modified phosphate buffer solution (115mM NaCl, 3.1mM KCl, 1.2mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 18mM PO<sub>4</sub> and 10mM glucose (pH 7.4), at 37 °C in the culture incubator for 30 or 60 min. The OGD slices were washed twice with the same buffer solution, but without glucose (OGD medium) and incubated for the same period as control slices at 37°C in an anaerobic chamber (saturated with N<sub>2</sub>). Thereafter, the medium of both plates was changed to phosphate buffer solution with glucose (reoxygenation period) and maintained until 3 hours in a culture incubator at 37°C.

### **2.3. MTT colorimetric assay**

Slice viability assay was performed by the colorimetric [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT, Sigma) method (Hansen et al., 1989). After the ischemic or reoxygenation time, slices were incubated with 0.5 mg/ml of MTT, followed by incubation at 37°C during for 45 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide and measured at 560 and 630 nm. The results were expressed as absorbance.

### **2.4. Lactate dehydrogenase assay**

Membrane damage was determined by measuring lactate dehydrogenase (LDH) released into the medium (Koh and Choi, 1987). After the ischemic or reoxygenation

period, LDH activity was determined using a LDH kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

The product of LDH Activity released into the medium was quantified as U/mg protein.

### **2.5. NSE release assay**

Neuron-specific enolase (NSE) is a specific neuronal enzyme used as a marker of neuronal damage. NSE was measured using an eletrochemiluminescent assay kit. It consists of a double sandwich assay that uses an anti-NSE antibody bound with ruthenium, which is the luminescent molecule. The reaction and quantification were performed using Elecsys-2010 (Roche Diagnostics Corporation) (Oses et al., 2004).

NSE levels were expressed as ng/mg protein.

### **2.6. Protein S100B assay**

S100B concentrations was measured using a enzyme linked immunosorbent assay (Diasorin® S100 ELISA Kit) in a Spectra Max M5 molecular Devices (USA). Samples and calibrators (100 µL of each) were incubated in a plate already coatedwith anti-S100B antibody. The S100 ELISA is a two-site, one-step, enzyme linked immunosorbent assay. In the assay calibrators, controls and unknown samples react simultaneously with 2 solid phase capture antibodies and a detector antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) during the incubation in the microtiter wells for 2 hours. After a washing step a TMB chromogen (Tetramethylbenzidine) is added and the

reaction is allowed to proceed for 15 minutes. The enzyme reaction is stopped by adding a Stop Solution and the absorbance is measured at 450 nm. S100B concentrations were derived by comparison with the calibration curve based on the total absorbance for each given calibrator provided with the assay. All determinations were carried out within the same experiment. The S100B calibration curve was linear up to 5 µg/L, and the CVs for duplicates across the entire concentration range for the calibrators and samples were 5%. The detection limit of the assay is 0.03 µg/L. The samples are expressed as ug/mg protein.

## **2.7. GFAP assay**

Glial fibrillary acid protein (GFAP) is the major intermediate filament protein in mature astrocytes (Inagaki et al., 1994), it was used as marker of astrogliosis in several situations involving brains disease. The ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100 uL samples (from medium of slices) overnight at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 2 h, and was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. The color reaction with o-phenylenediamine (OPD) was measured at 492 nm. GFAP were measured as ng/mg protein. The method was described by Tramontina et al (2007).



## **2.8. Lactate assay**

After the ischemic and reoxygenation period, lactate was measured using a lactate kit (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Minas Gerais, Brazil). The lactate was quantified as mmol/mg protein.

## **2.9. Glutamate levels**

High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed with supernatant aliquots to quantify glutamate levels (according to Joseph and Marsden, 1986). Samples were derivatized with o-phthalaldehyde and separation was carried out with a reverse phase column (Supelcosil LC-18, 250 mm× 4.6 mm, Supelco) in a Shimadzu Instruments liquid chromatograph (50 µL loop valve injection). The mobile phase flowed at a rate of 1.4 mL/ min and column temperature was 24 °C. Buffer composition is A: 0.04 mol/L sodium dihydrogen phosphate monohydrate buffer, pH 5.5, containing 20% of methanol; B: 0.01 mol/L sodium dihydrogen phosphate monohydrate buffer, pH 5.5, containing 80% of methanol. The gradient profile was modified according to the content of buffer B in the mobile phase: 0% at 0.00 min, 25% at 13.75 min, 100% at 15.00–20.00 min, 0% at 20.01–25.00 min. Absorbance was read at 360 nm and 455 nm, excitation and emission respectively, in a Shimadzu fluorescence detector. Samples of 50 µL were used and concentration was expressed in µ/mg protein.

### **2.10. Glutamate uptake**

Glutamate uptake was performed as previously described (Thomazi et al., 2004). After ischemic and reoxygenation period, the slices were preincubated with 300uL at 37°C for 15 min, followed by the addition of 100 μM [3H] glutamate. Incubation was interrupted after 5 min removal of the medium and washed twice with 1 mL of ice-cold HBSS. Slices were, immediately lysed with addition of 0.5N NaOH. Sodium independent uptake was determined using N-methyl-D-glutamine instead of sodium chloride at 4 °C. Results (Na<sup>+</sup>- dependent uptake) were considered as the difference between the total uptake and the Na<sup>+</sup>-independent uptake. Both uptakes were performed in triplicate. Incorporated radioactivity was measured using a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

### **2.11. Protein determination**

Determination of protein was assessed using Pierce® BCA Protein Assay Kit (Smith et al., 1985). The experiments were performed in triplicate.

### **2.12. Statistic analysis**

Data are expressed as mean ± S.E.M. by two-way ANOVA, when F test was significantly followed by Bonferroni post hoc test. Analyses were performed with the

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15.0) software. Differences were considered statistically significant, if  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1. OGD effects on mitochondrial activity (MTT):**

Figure 1 (two-way ANOVA: for OGD  $F_{2,82}=97.98$ ,  $P<0.0001$ ; for TIME,  $F_{5,82}=13.8$ ,  $P<0.001$ ; for OGD\*TIME  $F_{10,82}=1.3$ ,  $P=0.243$ ) illustrates cell viability by MTT assay. A decrease in cell viability occurred only after OGD 60 min ( $p<0.001$ ). After the ischemic periods, the medium was changed by a reoxygenation medium (all the groups with glucose and oxygen), and the mitochondrial activity remained impaired in the OGD 60 group compared to control ( $p<0.001$  for all times,) and to OGD 30 min (in some times,  $P<0.05$ ). In the control group there was no variation during all the reoxygenation time.

#### **3.2. OGD effects on cell membrane permeability (LDH levels in the medium)**

The membrane permeability, measured by LDH activity in the medium, is illustrated in Figure 2 (two-way ANOVA: for OGD  $F_{2,177}=22.06$ ,  $P<0.0001$ ; for TIME,  $F_{5,177}=18.72$ ,  $P<0.001$ ; for OGD\*TIME  $F_{10,177}=3.19$ ,  $P=0.0009$ ). After OGD 60 min, there was a significant increase in the LDH levels ( $p<0.01$ ). LDH levels increased from 60 minutes of reoxygenation ( $P<0.05$ ;  $p<0.001$ ) in OGD 60 min. OGD 30 min had the same profile, but from 120 minutes ( $p<0.01$ ). In the control group there was no variation during all the reoxygenation time.

### **3.3. OGD effects on neuronal damage (NSE levels in the medium)**

Neuronal damage is illustrated in Fig. 3. It shows that NSE levels at supernatant hippocampal slice was OGD and time dependent of (Fig. 3; two-way ANOVA: for OGD  $F_{2,97}=46.52$ ,  $P<0.0001$ ; for TIME,  $F_{5,97}=21.24$ ,  $P<0.001$ ; for OGD\*TIME  $F_{10,97}=7.49$ ,  $P<0.0001$ ). NSE levels increased at in OGD 60 min compared at to control and OGD 30 min respectively. After changing the medium, the NSE levels increased from 60 minutes of reoxygenation ( $p<0.001$ ). In the control group there was also an increase in the NSE levels ( $p<0.05$ ).

### **3.4. OGD effects on astrocytic activity/damage (S100B and GFAP levels in the medium)**

Fig. 4 indicates that the increase in S100B levels was OGD and time dependent (two-way ANOVA: for OGD  $F_{2,106}=12.68$ ,  $P<0.0001$ ; for TIME,  $F_{5,106}=12.38$ ,  $P<0.001$ ; for OGD\*TIME  $F_{10,106}=4.32$ ,  $P<0.0001$ ). There was no variation in S100B levels by OGD. During the reoxygenation period there was an increase in S100B levels in the OGD 60, from 120 min ( $p<0.01$ ) compared to the control group. In OGD 30 min and control groups there was no variation during all the reoxygenation time.

Figure 5 (two-way ANOVA: for OGD  $F_{2,141}=60,54$ ,  $P<0.0001$ ; for TIME,  $F_{5,141}=53.09$ ,  $P<0.001$ ; for OGD\*TIME  $F_{10,141}=10.71$ ,  $P<0.0001$ ) illustrate the GFAP levels in the medium. There was no variation in GFAP levels by OGD. GFAP was not detectable before 60 minutes of reoxygenation in the 3 groups. From 60 min of reoxygenation the OGD 60 min group became higher than OGD 30 min and control groups ( $p<0.05$ ). And

at 180 min, the GFAP levels increased significantly in OGD 30 compared to control group.

### **3.5. OGD effects on lactate levels in the medium**

Lactate levels are illustrated at Fig. 6 (two-way ANOVA: for OGD  $F_{2,120}=131.13$ ,  $P<0.0001$ ; for TIME,  $F_{5,120}=83.64$ ,  $P<0.001$ ; for OGD\*TIME  $F_{10,120}=15.27$ ,  $P<0.0001$ ). OGD for 30 and 60 min significantly decreased the lactate levels ( $p<0.001$ ), compared with the control group; During reoxygenation times the levels in control group became higher than in OGD groups only from 60 min.

### **3.6. OGD effects on glutamatergic parameters (glutamate uptake and glutamate levels in the medium)**

Glutamate levels in the medium at pos ischemic period were described at Table 1. OGD strongly increased the glutamate levels. In the beginning of the reoxygenation these levels returned to control, increasing in all groups, more markedly in the OGD 60 min group.

Glutamate uptake is illustrated at Fig. 7 (for OGD:  $F_{2,115}=27.89$ ,  $P<0.0001$ ). OGD did not affect the glutamate uptake; however, from 60 minutes of reoxygenation, the uptake decreased in the OGD 60 min group.

#### 4. Discussion

Several types of animal models have been developed to investigate the consequences of ischemic insults, aiming to reduce the morbidity and to understand the mechanism involved in this brain damage (Buyukuysal, 2005; Lipton, 1999). The OGD method was applied to evaluate several neurochemical parameters in acute rat hippocampal slices at ischemic and reoxygenation periods. This experimental model has been used as an *in vitro* method to mimic ischemic conditions; however, specific neurochemical parameters affected by this *in vitro* insult is theme of recent investigation trying to understand the neurochemical parameters involved in the neurotoxicity of OGD. Thus, this study was directed to identify various simultaneous neurochemical parameters for evaluation OGD effects on acute adult rat hippocampal slices at ischemic and reoxygenation period. The several parameters here used were mitochondrial activity, membrane permeability and metabolic parameters, as well as specific (neuronal and/or astrocytic) cell parameters searching to identify types of neural cells sensitive to damage caused by OGD.

By submitting hippocampal slices of adult rats to *in vitro* ischemic insult, here it was shown that OGD decreased the mitochondrial activity (MTT), extracellular lactate levels, increased the extracellular levels of glutamate, of LDH, of NSE, without

affecting the extracellular levels of S100B and GFAP, and the glutamate uptake. By comparing the time of OGD insult, 60 min was more effective than 30 min, when measuring the MTT intensity, the levels of LDH and NSE. Thus, these data could indicate that astrocytes were less affected than neurons. This assumption is based on the fact that the markers of astrocyte injury/activity (S100B and GFAP extracellular levels and glutamate uptake) were not affected by ischemic period. Additionally, a marker of neuronal damage (extracellular NSE levels) strongly increased by OGD injury. Other markers (MTT, and extracellular levels of glutamate, LDH and lactate) were also affected by OGD; as they can be considered as general markers of activity, their variations can not exclude any type of cell affected by OGD.

Other point to be considered is the effect of reoxygenation on these same parameters. As the medium was changed after OGD and before reoxygenation, the OGD effects can be considered “abolished” when starting the reoxygenation. MTT levels remained lower in OGD 60 min since the beginning of reoxygenation, pointing that the OGD effect on mitochondrial activity remained for all the time studied after the insult. Other parameters evaluated however presented different patterns. The extracellular levels of glutamate, LDH, NSE, and lactate, which were affected by OGD, were similar to the control at the beginning of the reoxygenation and became altered during the course of the reoxygenation (even with not the same intensity). The parameters that were not



affected by OGD (extracellular levels of S100B and GFAP, and glutamate uptake) were similar to the control at the beginning of the reoxygenation (with a specific exception of the S100B levels in the OGD 60 min, at 15 min of reoxygenation), becoming altered in the course of the reoxygenation. It is noteworthy that the GFAP levels, which were high in the 3 groups and not affected by OGD, were not detectable in the first 30 min of reoxygenation, pointing the GFAP levels could be considered an impressive marker of damage of the slices preparation.

The ischemic insult cause a decrease of cell metabolic energetic by the omission of oxygen and glucose, which limits the mitochondrial activity. Recent studies suggest that, in fact, the degree of mitochondrial dysfunction in cerebral ischemia may be a critical determinant of the final extent of tissue injury (Dugan and Kim-Han, 2004). It has been shown that this decrease activity by the energy absence can leads membrane depolarization, causing cell dead by apoptosis or necrosis, depending on the intensity of ischemia (Iijima, 2006).

LDH is a cytoplasmatic enzyme present in all cell types. It is measured extracellularly as a marker of plasmatic cell membrane permeability (Koh and Choi, 1987). Several groups have been suggested that LDH assay is not suitable for acute brain preparations, because its release is slow related to deterioration of cellular morphology (Buyukuysal,

2005; Izumi et al., 2001). However, here its levels seem to be a very good marker of OGD effects in hippocampal slices from adult rats.

Hippocampal neurons are extremely vulnerable at ischemic insult (Dugan and Kim-Han, 2004). Studies show that hypoxic induced an initial hyperpolarization, followed by a slow depolarization, what may represent an irreversible damage (Wang et al., 2000). NSE, a neuronal specific protein, is released by leakage through injured neuronal cell membrane, being considered a sensible marker of brain damage in acute and chronic CNS injuries (Moreira et al., 2009; Oses et al., 2004). The NSE cellular specificity may be used to understand the involvement neuronal damage in OGD.

Astrocytes have an important role at the hypoxic-ischemic injury. As we tried to investigate astrocytic parameters involved in the OGD insult, we measured two specific astrocytic proteins: S100B and GFAP. S100B is a calcium binding protein predominantly expressed and secreted by astrocytes. (Marenholz et al., 2004), that has intracellular and extracellular important functions (Donato, 2001; Van Eldik and Wainwright, 2003). Our data concerning S100B levels corroborate other studies that indicate an increase of S100B at brain trauma and acute ischemia. This elevation probably occurs to the over secretion or release from damaged/reactive cells (Tramontina et al., 2006). Other works have been showed that acute increments of

S100B may improve neurogenesis, particularly in the hippocampus (Kleindienst and Ross Bullock, 2006). GFAP is the major intermediate filament protein in mature astrocytes. Its intracellular characteristics are used as a marker of astrogliosis and astrocytes activation in several situations involving brain injury, like trauma, stroke or genetic disorders (Tramontina et al., 2007). Many studies have reported that extracellular GFAP and S100B could be good markers for at the ischemic insult in LCR and serum (Herrmann et al, 2003; Gazzolo et al, 2009). These results corroborate with our results, indicating astrocytic damage at the reoxygenation period at the group exposed at OGD. An interesting aspect of GFAP levels was the evidence that its release occurs due slice preparation, not an effect of OGD procedure.

One of the most important astrocytes roles is maintaining of extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels (Anderson and Swanson, 2000; Chen and Swanson, 2003; Danbolt, 2001). At ischemic insult, this ability may be impaired and became crucial to the neuronal survival (Stanimirovic et al., 1997). Increase of extracellular glutamate levels may reflect the lack of energy caused by the omission of glucose and oxygen at the OGD, resulting in loss of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, causing membrane depolarization, which triggers glutamate release. This elevation in the supernatant cause glutamate receptors over-stimulation and this implicate in neuronal damage (Buyukuysal, 2005; Pellegrini-Giampietro et al., 1990). This hypothesis

corroborates our results about glutamate uptake. Slices submitted to OGD had a decrease of glutamate uptake after 60 minutes of reoxygenation period. The astrocytes glutamate transporters (GLAST and GLT-1) are coupled to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. With the OGD insult, the ability of glutamate uptake was impaired, decreasing the glutamate uptake (Danbolt, 2001).

Glucose was believed to be the main energy substrate for neurons, until Schurr et al showed that lactate is an important energy substrate to the neuronal cells too. Lactate can support normal synaptic function in rat hippocampal slices (Schurr et al., 1997; Schurr, 2006), and its production during ischemia may be used as a substrate for energy metabolism. (Pellerin and Magistretti, 1994) proposed their astrocyte–neuron lactate shuttle hypothesis, in line with the idea that lactate can be used by neurons. Our results showed that the lactate levels decrease significantly by OGD. Studies *in vitro* showed, on hippocampal slices, that lactate produced during hypoxia, can be used after hypoxia, is preferential to glucose during the reoxygenation period and is protective against glutamate excitotoxicity (Schurr et al., 1997; Schurr et al., 1999). One possible explanation for a lactate decrease at reoxygenation could be the preferential consumption of lactate when adenosine triphosphate stores are depleted. This hypothesis may explain the decrease of lactate levels at the supernatant at the groups submitted at OGD. The expression of MCTs (monocarboxylate transporters), which are

necessary for lactate internalization, has been shown to be influenced by ischemia, decreasing in some cells and increasing in others (Pierre and Pellerin, 2005).

Summarizing, the present results suggest that the OGD method is an adequate method to mimic “acute ischemic insult” *in vitro*. If we compare the ischemic insult, 60 min was more effective than 30 min, at MTT, LDH and NSE, lactate and glutamate parameters. Thus, these data could indicate that ischemic insult affects the cell energetic state, changing the parameters like MTT, lactate and glutamate. At the reoxygenation period, MTT remained lower all the period. The parameters like glutamate, LDH, NSE and lactate became different from the control after 60 minutes of reoxygenation. Interesting to note that parameters connected by astrocyte activity, like S100B, GFAP and glutamate uptake, that were not affected by OGD, began to increase after 60 minutes of reoxygenation. This procedure presupposes that neurons are more vulnerable to acute ischemic insult than astrocytes, and astrocyte damage is delayed.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) –Brazil, CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos – IBN-Net # 01.06.0842-00) and INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection.

## References:

- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32, 1-14.
- Buyukuysal, R.L., 2005. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*. 47, 580-8.
- Cardenas, A., Moro, M.A., Hurtado, O., Leza, J.C., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bodelon, O.G., Bosca, L., Lizasoain, I., 2000. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem*. 74, 2041-8.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 137-49.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 65, 1-105.
- Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Carvajal-Sotelo, J., Ortiz-Plata, A., Espino-Solis, G.P., Mendez-Armenta, M., Montes, S., Monroy-Noyola, A., 2009. Neuroprotective Effect of DAHK Peptide in an Occlusive Model of Permanent Focal Ischemia in Rats. *Neurochem Res*.

- Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.
- Dugan, L.L., Kim-Han, J.S., 2004. Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia. *J Bioenerg Biomembr.* 36, 317-21.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 119, 203-10.
- Iijima, T., 2006. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res.* 55, 234-43.
- Inagaki, M., Nakamura, Y., Takeda, M., Nishimura, T., Inagaki, N., 1994. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* 4, 239-43.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68, 285-316.
- Izumi, Y., Izumi, M., Benz, A.M., Zorumski, C.F., 2001. Lactate dehydrogenase release is facilitated by brief sonication of rat hippocampal slices and isolated retinas following acute neuronal damage. *J Neurosci Methods.* 108, 49-55.



- Joseph MH, Marsden CA. Amino acids and small peptides. In: Lim CK, editor. HPLC of small peptides. Oxford: IRL Press; 1986. p. 13–27.
- Kleindienst, A., Ross Bullock, M., 2006. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma*. 23, 1185-200.
- Koh, J.Y., Choi, D.W., 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*. 20, 83-90.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 79, 1431-568.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2001. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol*. 58, 365-70.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W., Fritz, G., 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*. 322, 1111-22.
- Moreira, J.D., Knorr, L., Thomazi, A.P., Simao, F., Battu, C., Oses, J.P., Gottfried, C., Wofchuk, S., Salbego, C., Souza, D.O., Perry, M.L., Vinade, L., 2009. Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J Nutr Biochem*.
- Oses, J.P., Leke, R., Portela, L.V., Lara, D.R., Schmidt, A.P., Casali, E.A., Wofchuk, S., Souza, D.O., Sarkis, J.J., 2004. Biochemical brain markers and purinergic

- parameters in rat CSF after seizure induced by pentylenetetrazol. *Brain Res Bull.* 64, 237-42.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M., Carla, V., Moroni, F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 10, 1035-41.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 10625-9.
- Pierre, K., Pellerin, L., 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem.* 94, 1-14.
- Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1997. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res.* 744, 105-11.
- Schurr, A., Payne, R.S., Tseng, M.T., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1999. The glucose paradox in cerebral ischemia. New insights. *Ann N Y Acad Sci.* 893, 386-90.
- Schurr, A., 2006. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 142-52.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76-85.

- Stanimirovic, D.B., Ball, R., Durkin, J.P., 1997. Glutamate uptake and Na,K-ATPase activity in rat astrocyte cultures exposed to ischemia. *Acta Neurochir Suppl.* 70, 1-3.
- Strasser, U., Fischer, G., 1995. Protection from neuronal damage induced by combined oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures by glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 687, 167-74.
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev.* 125, 475-81.
- Thomazi, A.P., Boff, B., Pires, T.D., Godinho, G., Battu, C.E., Gottfried, C., Souza, D.O., Salbego, C., Wofchuk, S.T., 2008. Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Res.* 1188, 233-40.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Goncalves, D., Tramontina, A.C., Souza, D.F., Frizzo, J.K., Nardin, P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Goncalves, C.A., 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 31, 815-20.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andrezza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007.

Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods*. 162, 282-6.

Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 21, 97-108.

Wang, J., Chambers, G., Cottrell, J.E., Kass, I.S., 2000. Differential fall in ATP accounts for effects of temperature on hypoxic damage in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 83, 3462-72.

### Legend of table and Figures:

**Table 1.** Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $\mu\text{mol/mg}$  protein) of 5–10 animals per group in triplicate. Symbols represent: \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  when compared with their control; <sup>a</sup> $p < 0.01$  when compared with its OGD 30 min group; <sup>b</sup> $p < 0.001$  compared with pos ischemic period with all the reoxygenation period; <sup>c</sup> $p < 0.001$  reoxygenation period (180 min) compared with another control reoxygenation periods; <sup>d</sup> $p < 0.001$  reoxygenation period (180min) compared with another OGD 30min reoxygenation period; <sup>e</sup> $p < 0.001$  reoxygenation period compared with 15 and 30 min at the OGD 60 min group.

**Figure 1.** MTT in hippocampal slices. Slices were incubated for 30 or 60 min in the control or in OGD buffer and submitted until 3 hours of reoxygenation. The values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (absorbance) of 4-9 animals per group in triplicates. Symbols represent: \*\*\* $p < 0.001$  compared with the respective controls; <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  and <sup>c</sup> $p < 0.001$  compared with the OGD 30 min group.

**Figure 2.** LDH activity in hippocampal slices. The values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (U/mg protein) of 5-18 animals per group in triplicates. Symbols represent: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with their respective controls; <sup>a</sup> $p < 0.05$  compared with its OGD 30 min group.

**Figure 3.** NSE levels in supernatant from hippocampal slices. The values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (ng/mg protein) of 5-10 animals per group in duplicates. Symbols represent: \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 compared with their controls; <sup>a</sup>p< 0.05 and <sup>b</sup>p< 0.001 compared with their OGD 30 min group; <sup>c</sup>p< 0.05 compared with its 15, 30 and 60 reoxygenation periods; <sup>d</sup>p< 0.05 compared with their 15, 30 and 60 reoxygenation periods; <sup>e</sup>p< 0.001 compared with their 15 and 30 reoxygenation period.

**Figure 4.** S100B levels in the supernatant hippocampal slices. The values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (ng/mg protein) of 4-10 animals per group. Symbols represent: \*\*\*p<0.001 and \*\*p<0.01 compared with their respective control; <sup>a</sup>p<0.05 compared with their OGD 30 min; <sup>b</sup>p<0.001 compared with all other 60 OGD min.

**Figure 5.** GFAP levels in the supernatant of hippocampal slices. The values were showed as mean  $\pm$  S.E.M. (ng/mg of protein) of 5-10 animals per group. Symbols represent: \*\*\*p<0.001 compared with its respective control; <sup>a</sup>p< 0.05 and <sup>b</sup>p< 0.001 compared with their OGD 30 min group; <sup>c</sup>p<0.001 compared with all other reoxygenation period (control group); <sup>d</sup>p<0.001 compared with their reoxygenation periods; <sup>e</sup>p<0.05 compared with all other reoxygenation periods; <sup>f</sup>p<0.05 for all its reoxygenation periods; <sup>g</sup>p<0,001 compared with their 15, 30 and 60 reoxygenation periods. ND: not detectable.

**Figure 6.** Lactate levels in the supernatant of hippocampal slices. The data was showed as mean  $\pm$  S.E.M. (mmol/mg protein) of 4-10 animals per group in triplicates. Symbols represent: \*\*\* $p < 0.001$  compared with their respective controls <sup>a</sup> $p < 0.001$  compared with their OGD 30 min group.

**Figure 7.** Glutamate uptake by hippocampal slices. Data were represented as mean  $\pm$  S.E.M. (nmol/mg protein/min) of 5-10 animals per group in triplicate. Symbols represent: \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with their respective controls; <sup>a</sup> $p < 0.05$  compared with its OGD 30 min group.

**Table 1. Glutamate levels in the supernatant from hippocampal slices.**

	<b>Control</b>	<b>OGD 30 min</b>	<b>OGD 60 min</b>
<b>Pos ischemic period:</b>	6.9 ± 0.9	108.8 ± 12.5***, b	121.4 ± 8.5***, b
<b>Reoxygenation period:</b>			
<b>15 min</b>	4.6 ± 0.4	4.0 ± 0.8	6.8 ± 0.5
<b>30 min</b>	3.5 ± 0.4	5.7 ± 0.9	8.9 ± 2.2
<b>60 min</b>	5.1 ± 1.0	7.1 ± 0.9	20.7 ± 2.3**
<b>120 min</b>	5.4 ± 0.5	9.2 ± 1.4	22.3 ± 2.3**
<b>180 min</b>	11.8 ± 1.3 <sup>c</sup>	20.1 ± 2.6 <sup>d</sup>	38.5 ± 5.2***, a, c

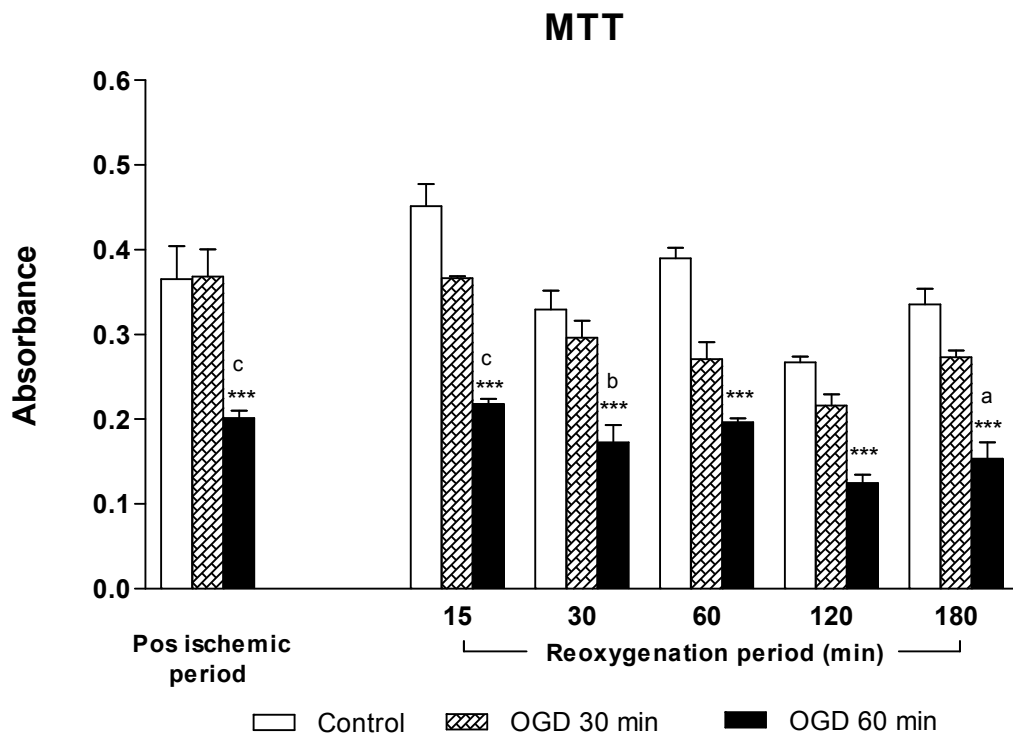


Figure 1



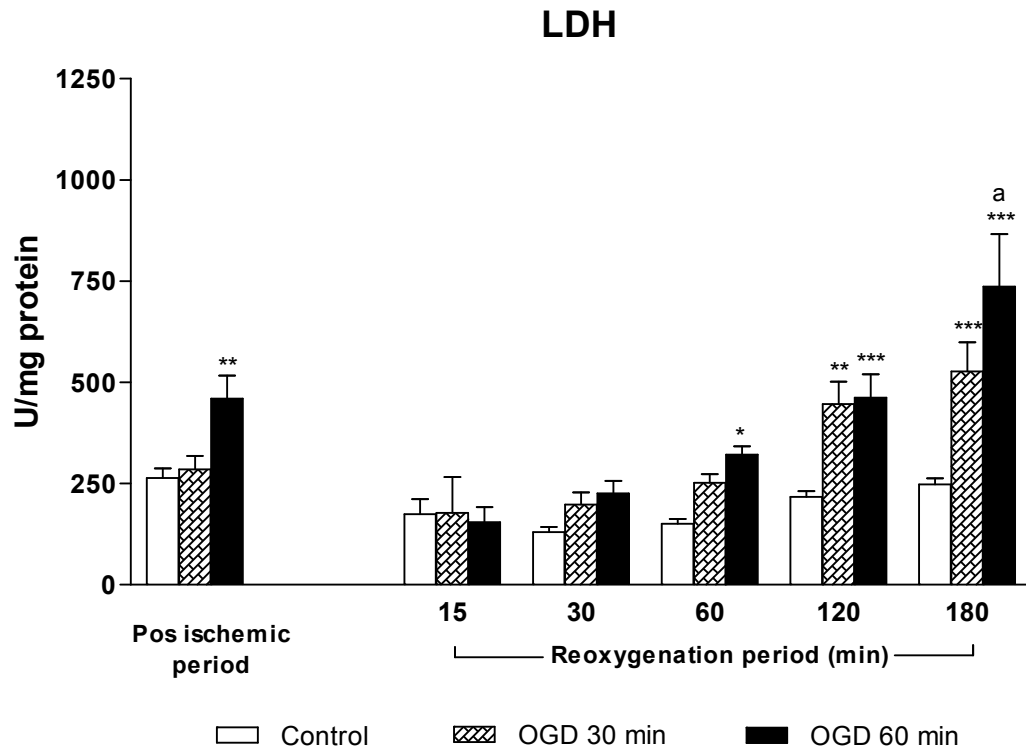


Figure 2

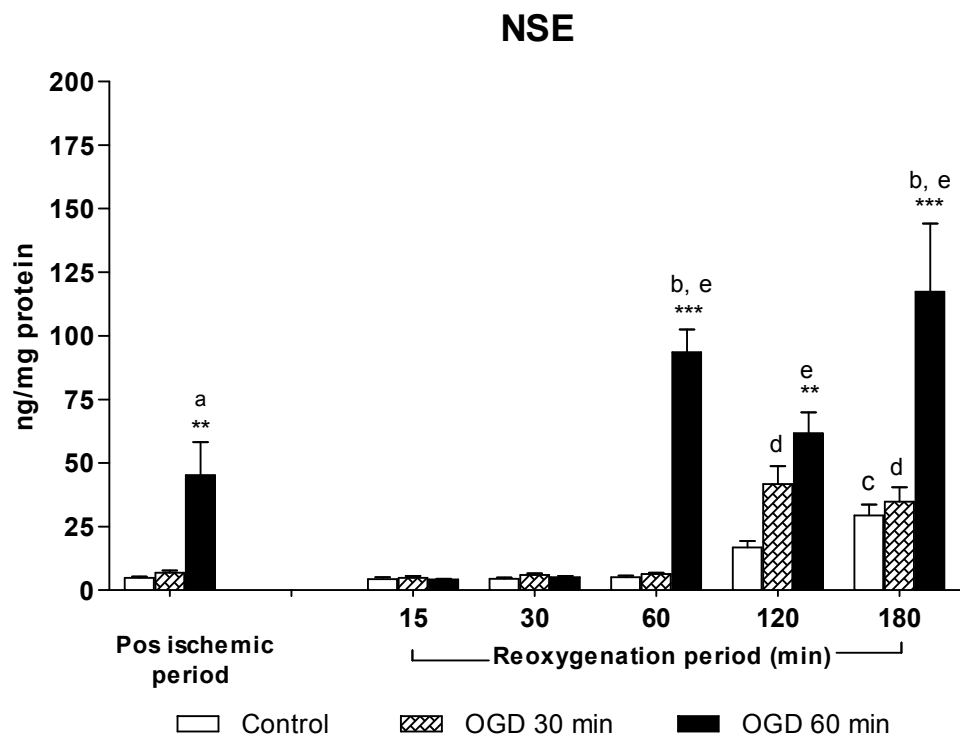


Figure 3

### S100B

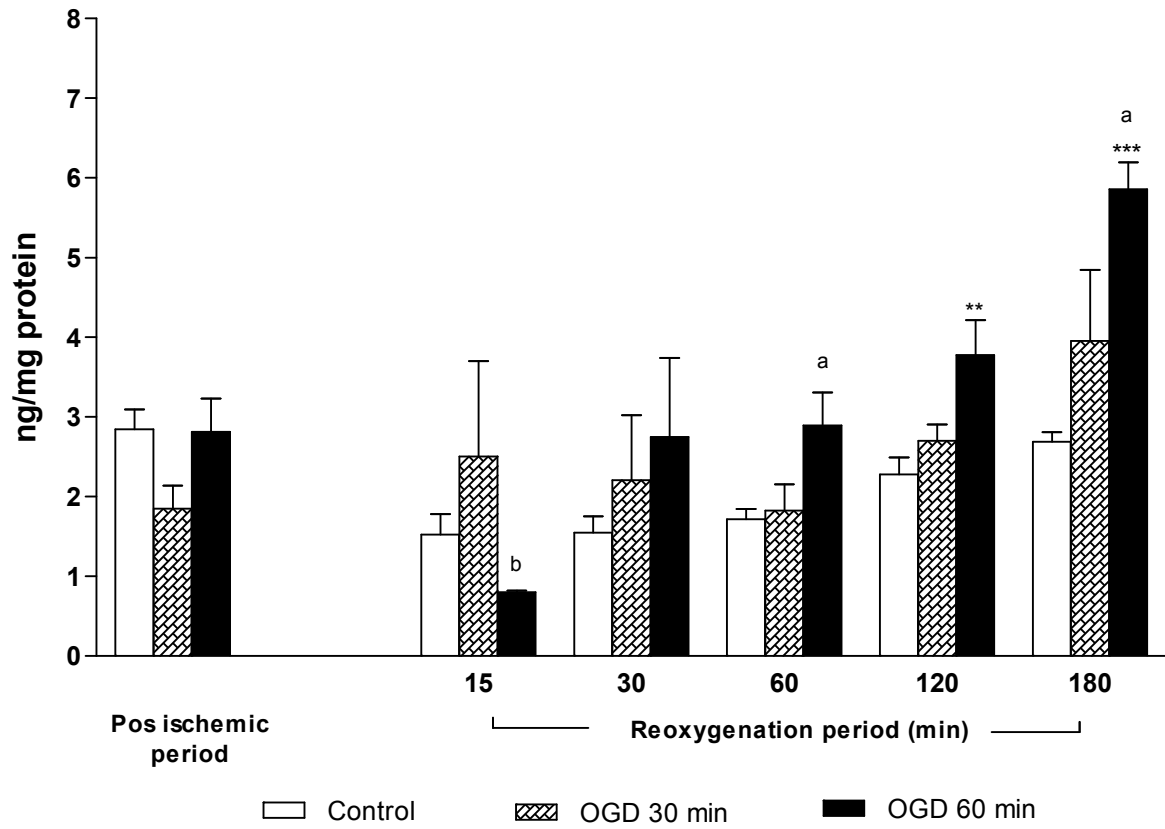


Figure 4

### GFAP

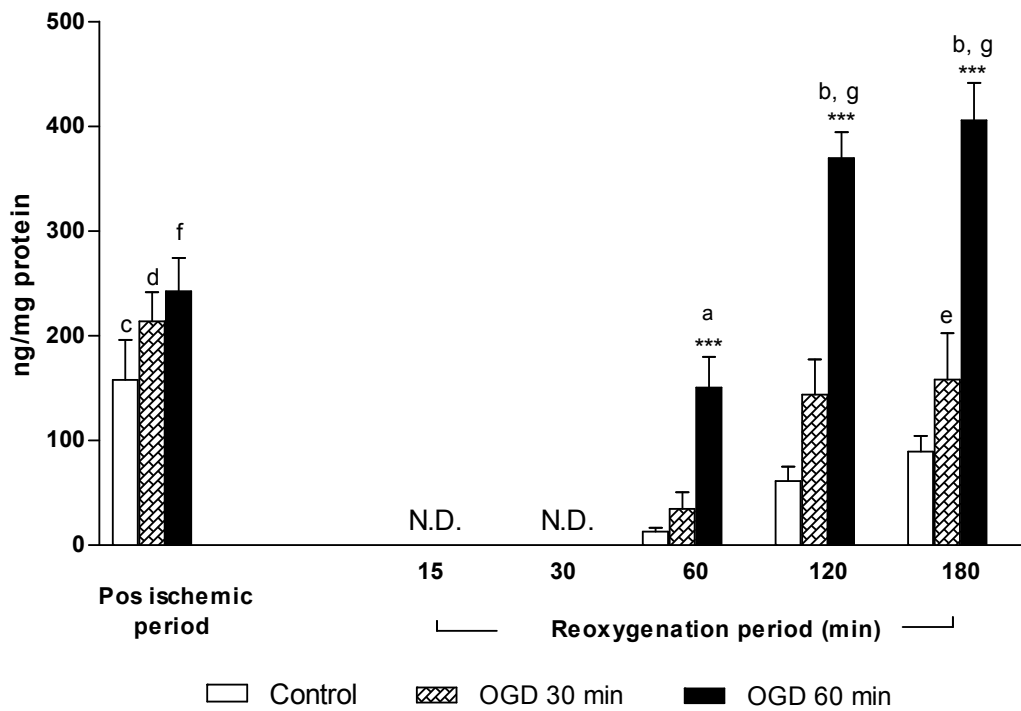


Figure 5

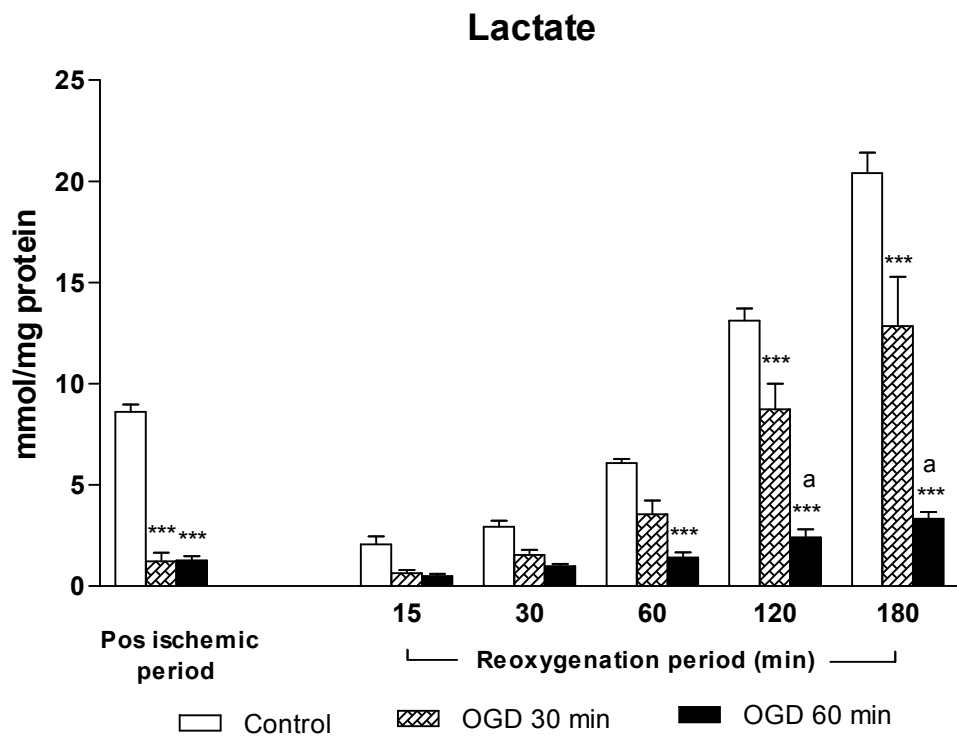


Figure 6

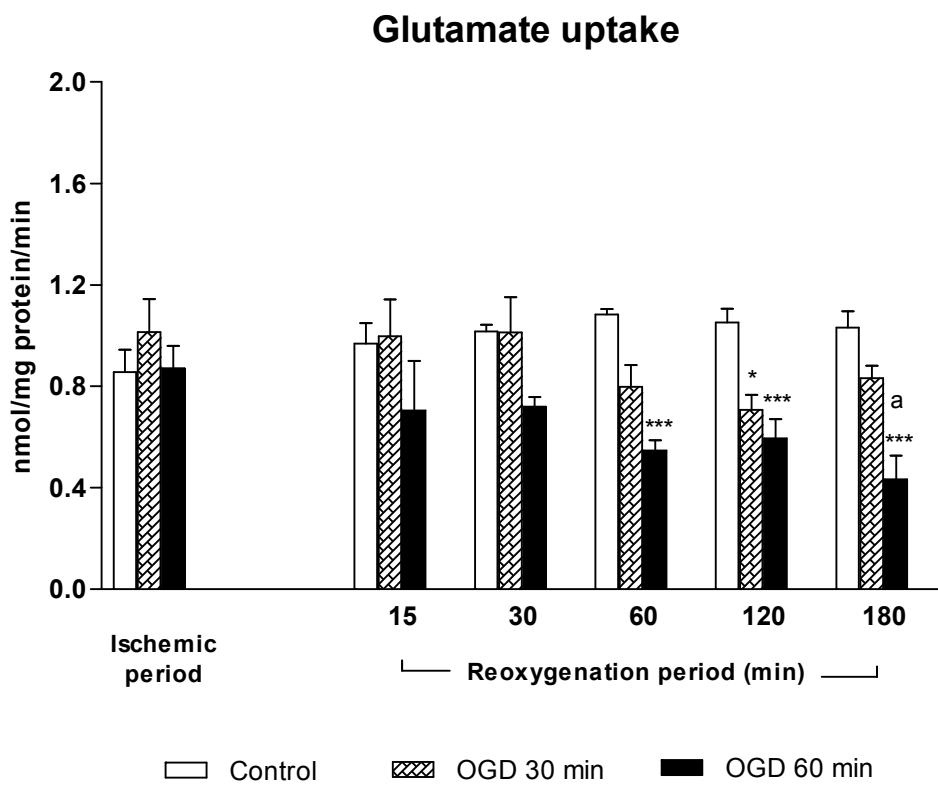


Figure 7

#### IV. Discussão

Doenças cerebrovasculares como embolia, trombose e hipoperfusão possuem grande prevalência, principalmente em pessoas de meia idade (Thomazi et al., 2008). Estas doenças acabam resultando em uma redução de energia pela falta de glicose e oxigênio no SNC levando a uma considerável incidência de morte e seqüelas irreversíveis em pessoas que sofreram o insulto (Diaz-Ruiz et al., 2009). Na tentativa de reduzir a mortalidade e tentar conhecer os mecanismos envolvidos nesta lesão, vários modelos animais, tanto *in vivo* como *in vitro* vêm sendo desenvolvidos (Buyukuysal, 2005; Lipton, 1999). O método *in vitro* de privação de glicose e oxigênio vem sendo utilizado já há algum tempo com o intuito de estudar mecanismos agudos envolvidos no dano isquêmico e no período de reoxigenação em diversas estruturas cerebrais (Buyukuysal, 2005; Moreira et al., 2009).

Estudos mostram que, durante o insulto isquêmico, o hipocampo é uma das regiões cerebrais mais afetadas, sendo a região CA1 a mais sensível à privação de energia (Cardenas et al., 2000). Este dano acaba prejudicando diversas funções cognitivas que envolvem o hipocampo como memória e aprendizado (Izquierdo et al., 2006). Para tentar entender o dano isquêmico foram avaliados vários parâmetros neuroquímicos em fatias de hipocampo de ratos durante o período de ODG, assim como no período de reoxigenação. Este modelo experimental tem sido utilizado como um método *in vitro* para simular condições de isquemia, porém os parâmetros neuroquímicos específicos afetados por esse insulto configuram tema de recente investigação.

Assim, este estudo foi direcionado à identificação simultânea de diversos parâmetros neuroquímicos, avaliando seus efeitos agudos da OGD em fatias de hipocampo de ratos adultos. Desta forma, foram utilizados parâmetros que avaliassem a atividade mitocondrial, a permeabilidade de membrana e alguns parâmetros metabólicos. Também foram utilizados parâmetros celulares específicos para neurônios e astrócitos, com o propósito de se identificar a vulnerabilidade celular específica causada pela OGD.

Os resultados mostraram que durante o período de OGD as fatias de hipocampo apresentaram diminuição da atividade mitocondrial dosada por MTT, diminuição nos níveis extracelulares de lactato, aumento nos níveis extracelulares de glutamato, e liberação aumentada de LDH e de NSE. A OGD não afetou os níveis de S100B, GFAP e de captação de glutamato.

Comparando o tempo de insulto da OGD com parâmetros como MTT, LDH e NSE, fatias expostas 60 minutos da isquemia tiveram uma resposta muito mais acentuada à isquemia que as fatias que foram expostas à somente 30 minutos. Estes dados indicam que as células astrocíticas foram menos afetadas pela OGD do que os neurônios. Isto foi evidenciado quando visualizamos que os marcadores de atividade (S100B) e de lesão astrócítica (GFAP) não foram afetados pelo período de isquemia; ao contrário do marcador de lesão neuronal (NSE) que teve seus níveis elevados de forma acentuada neste período.

Outro ponto a ser considerado é o efeito da reoxigenação sobre esses mesmos parâmetros. Para marcar o período de reoxigenação, após o período de isquemia o meio de incubação foi trocado em todos os grupos, retirando todos os possíveis efeitos existentes no sobrenadante. A diminuição na

atividade mitocondrial frente ao insulto isquêmico permaneceu durante todo o período de reoxigenação. Os níveis de glutamato extracelular, LDH, NSE e lactato, que foram afetados pela OGD, foram semelhantes ao controle no início da reoxigenação e tornaram-se alterados com o passar do período de reoxigenação. Parâmetros que não foram afetadas pela OGD, como os níveis de S100B e GFAP no sobrenadante e a captação de glutamato nas fatias tiveram valores semelhantes aos do controle no início da reoxigenação (com uma exceção específica dos níveis de S100B no OGD 60 minutos, a 15 minutos de reoxigenação), alterando-se no decorrer da reoxigenação. GFAP não foi detectada em ambos os grupos até 30 minutos de reoxigenação.

O insulto isquêmico causa uma diminuição do metabolismo energético celular pela omissão de oxigênio e glicose, o que limitou a atividade mitocondrial. Estudos recentes sugerem que o grau de disfunção mitocondrial na isquemia cerebral pode ser um fator determinante na lesão tecidual (Dugan and Kim-Han, 2004). Tem sido demonstrado que esta atividade diminui com a ausência de energia podendo levar a despolarização da membrana, fazendo com que células morram por apoptose ou necrose, dependendo da intensidade da isquemia (Iijima, 2006).

A LDH é uma enzima citoplasmática presente em todos os tipos de células. Por esta condição, quando ela se encontra no meio extracelular, evidencia a perda da permeabilidade da membrana celular (Koh and Choi, 1987). Diversos grupos têm sugerido que a dosagem de LDH não é adequada para técnicas de preparação cerebral aguda, como neste caso, porque sua liberação é lenta quando relacionada à deterioração da morfologia celular (Buyukuysal, 2005; Izumi et al., 2001).

Os neurônios são extremamente vulneráveis ao insulto isquêmico (Dugan and Kim-Han, 2004). Estudos mostram que a hipóxia induz uma hiperpolarização inicial, seguida por uma lenta despolarização, conduz a danos irreversíveis (Wang et al., 2000).NSE é liberado quando a permeabilidade da membrana neuronal está comprometida, sendo considerado um marcador sensível de lesões agudas e crônicas no SNC (Moreira et al., 2009; Oses et al., 2004). Esta especificidade celular dessa proteína pode ser usada para compreender os danos neuronais envolvidos durante o processo de OGD.

Os astrócitos têm um papel importante na lesão isquêmica. Com o intuito de investigar os parâmetros astrócitários dosamos duas proteínas específicas: S100B e GFAP. S100B é uma proteína de ligação de cálcio predominantemente encontrada em astrócitos (Marenholz et al., 2004). Ela possui diversas funções tanto intra quanto extracelulares de grande importância (Donato, 2001). Os dados relativos aos níveis de S100B corroboram outros estudos que indicam um aumento de S100B em trauma cerebral e isquemia aguda. Essa elevação ocorre provavelmente pela secreção de S100B, tentando proporcionar uma neurogênese principalmente no hipocampo (Kleindienst and Ross Bullock, 2006; Tramontina et al., 2006), ou uma liberação frente a morte celular (Tramontina et al., 2006).

GFAP é a principal proteína de filamentos intermediários nos astrócitos maduros. É usado como um marcador de astrogliose e de ativação astrocitária em várias situações que envolvem lesão cerebral, como traumas, derrames ou distúrbios genéticos (Tramontina et al., 2007). Os dados mostram que houve um aumento de GFAP no período de reoxigenação, mostrando dano astrocitário. Foi encontrado um interessante resultado nos níveis de GFAP

durante o período isquêmico. Analisando todos os grupos neste período, vimos que há um maior aumento dos níveis de GFAP, provavelmente, em resposta ao corte na preparação da fatia para o experimento. Esse elevado aumento nos levou a concluir que GFAP pode ser considerado um marcador de corte celular e que durante os 30 e 60 minutos de incubação na OGD as fatias de hipocampo ainda estavam se estabilizando frente a este marcador.

Uma das principais funções astrocíticas é manter a concentração extracelular de glutamato abaixo dos níveis neurotóxicos (Anderson and Swanson, 2000; Chen and Swanson, 2003; Danbolt, 2001). No insulto isquêmico, essa capacidade pode ser prejudicada e tornar-se crucial para a sobrevivência neuronal (Buyukuysal, 2005; Stanimirovic et al., 1997). O aumento dos níveis de glutamato extracelular podem ocorrer pela depleção de energia causada pela falta de glicose e oxigênio na OGD. Essa depleção leva a inibição da enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, causando uma despolarização da membrana, que desencadeia a liberação de glutamato. Esse aumento de glutamato, causa uma hiper-estimulação dos receptores glutamatérgicos, causando a morte neuronal (Buyukuysal, 2005; Pellegrini-Giampietro et al., 1990). Esta hipótese está consubstanciada em nossos resultados, pois em nosso estudo houve um aumento dos níveis de glutamato extracelular e uma diminuição da captação.

Os principais transportadores de glutamato no astrócitos (GLAST e GLT-1) são acoplados a  $\text{Na}^+$  /  $\text{K}^+$ -ATPase (Danbolt, 2001). Este mecanismo pode explicar a queda da captação de glutamato no insulto isquêmico que foi observado após 60 minutos de reoxigenação nas fatias que foram submetidas a uma isquemia de 60 minutos.



Acreditava-se que a glicose era o principal substrato energético dos neurônios, até que Schurr et al mostraram que o lactato também é considerado um importante substrato energético para as células neuronais. O lactato consegue suprir todas as necessidades energéticas na função sináptica normal em fatias de hipocampo de ratos (Schurr et al., 1997; Schurr, 2006) e sua produção durante a isquemia pode ser utilizada como substrato para o metabolismo energético. Pellerin e Magistretti propuseram a hipótese de que exista uma lançadeira de lactato entre os astrócitos e os neurônios, e que este lactato pode ser utilizado pelos neurônios. Nossos resultados mostraram que os níveis de lactato diminuíram significativamente em período de isquemia, com 30 e 60 minutos de OGD.

Estudos em fatias de hipocampo *in vitro* mostraram que o lactato produzido durante a hipóxia pode ser utilizado preferencialmente durante o período de reoxigenação, e que isso leva a uma proteção contra a excitotoxicidade do glutamatérgica (Schurr et al., 1997; Schurr et al., 1999). Uma possível explicação para a diminuição do lactato na reoxigenação poderia ser o consumo preferencial de lactato enquanto os níveis de ATP não forem re-estabelecidos (Pellerin and Magistretti, 1994).

## V. Conclusões

A metodologia de OGD *in vitro* é uma técnica empregada para realizar insultos agudos de isquemia, mostrando ser eficaz a todos os parâmetros neuroquímicos avaliados, sendo necessário pelo menos uma hora de privação de glicose e oxigênio.

Parâmetros celulares específicos como NSE, GFAP e S100B foram de extrema importância, pois, a partir deles, conseguimos avaliar o comportamento individual de cada tipo celular frente à OGD, verificando que o neurônio é muito vulnerável quando submetido à omissão de glicose e oxigênio. Já os astrócitos possuem um dano mais lento, sendo visualizado somente após uma hora de reoxigenação.

Parâmetros que envolvem o sistema glutamatérgico (captação e liberação de glutamato no meio) estão alterados corroborando com outros dados da literatura, mostrando mais uma vez que parâmetros (captação) que envolvem astrócitos só começam a apresentar alterações tardiamente, no período de reoxigenação.

Parâmetros envolvendo o metabolismo cerebral estão alterados quando submetidos ao insulto isquêmico, como foi visto na dosagem de lactato.

GFAP, por ser um marcador de dano celular, nesta técnica, também pode ser considerado um marcador de corte celular (preparação da técnica) podendo ser utilizado para analisar a estabilização das fatias.

## **VI. Perspectivas**

1. Como diversos parâmetros que envolvem o sistema glutamatérgico estão alterados, é necessário avaliar as condições dos transportadores de glutamato, tanto os neuronais quanto astrocitários, frente à ODG;
2. Avaliar parâmetros de sinalização de morte celular, como caspase-3-clivada e fatores induzidos por hipóxia (Hif-1  $\alpha$  e Hif-1  $\beta$ ) com o objetivo de estudar os mecanismos da morte celular observada;
3. Realizar estudos com possíveis drogas que possam reverter os danos causados pelo insulto.

## VII. Referências Bibliográficas

- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. 32, 1-14.
- Buyukuysal, R.L., 2005. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*. 47, 580-8.
- Cardenas, A., Moro, M.A., Hurtado, O., Leza, J.C., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bodelon, O.G., Bosca, L., Lizasoain, I., 2000. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem*. 74, 2041-8.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 137-49.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 65, 1-105.
- Diaz-Ruiz, A., Rios, C., Carvajal-Sotelo, J., Ortiz-Plata, A., Espino-Solis, G.P., Mendez-Armenta, M., Montes, S., Monroy-Noyola, A., 2009. Neuroprotective Effect of DAHK Peptide in an Occlusive Model of Permanent Focal Ischemia in Rats. *Neurochem Res*.
- Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 33, 637-68.
- Dugan, L.L., Kim-Han, J.S., 2004. Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia. *J Bioenerg Biomembr*. 36, 317-21.

- Galvan, A., M. Kuwajima, et al. (2006). "Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function?" Neuroscience **143**(2): 351-75.
- Herrmann, M. and H. Ehrenreich (2003). "Brain derived proteins as markers of acute stroke: their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring." Restor Neurol Neurosci **21**(3-4): 177-90.
- Herrmann, M., P. Johnsson, et al. (2003). "Molecular markers of brain damage: current state and future perspectives." Restor Neurol Neurosci **21**(3-4): 75-7.
- Iijima, T., 2006. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. Neurosci Res. 55, 234-43.
- Izquierdo, I., L. R. Bevilaqua, et al. (2006). "The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings." Neurotox Res **10**(2): 113-21.
- Izumi, Y., Izumi, M., Benz, A.M., Zorumski, C.F., 2001. Lactate dehydrogenase release is facilitated by brief sonication of rat hippocampal slices and isolated retinas following acute neuronal damage. J Neurosci Methods. 108, 49-55.
- Kleindienst, A., Ross Bullock, M., 2006. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. J Neurotrauma. 23, 1185-200.
- Koh, J.Y., Choi, D.W., 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J Neurosci Methods. 20, 83-90.

- Lara, D. R., C. S. Gama, et al. (2001). "Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients." J Psychiatr Res **35**(1): 11-4.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-568.
- Machado-Vieira, R., D. R. Lara, et al. (2002). "Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study." Eur Neuropsychopharmacol **12**(3): 269-72.
- Malthankar-Phatak, G. H., A. B. Patel, et al. (2008). "Effects of continuous hypoxia on energy metabolism in cultured cerebro-cortical neurons." Brain Res **1229**: 147-54.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W., Fritz, G., 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1111-22.
- Mattson, M. P. (2000). "Apoptosis in neurodegenerative disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(2): 120-9.
- Moreira, J.D., Knorr, L., Thomazi, A.P., Simao, F., Battu, C., Oses, J.P., Gottfried, C., Wofchuk, S., Salbego, C., Souza, D.O., Perry, M.L., Vinade, L., 2009. Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats. *J Nutr Biochem.*
- Nardin, P., L. Tortorelli, et al. (2009). "S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+)." Neurochem Res **34**(9): 1603-11.

- Oses, J.P., Leke, R., Portela, L.V., Lara, D.R., Schmidt, A.P., Casali, E.A., Wofchuk, S., Souza, D.O., Sarkis, J.J., 2004. Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylentetrazol. *Brain Res Bull.* 64, 237-42.
- Ozawa, S., H. Kamiya, et al. (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* **54**(5): 581-618.
- Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, M., Carla, V., Moroni, F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 10, 1035-41.
- Pellerin, L., Magistretti, P.J., 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 10625-9.
- Rathbone, M. P., P. J. Middlemiss, et al. (1999). "Trophic effects of purines in neurons and glial cells." *Prog Neurobiol* **59**(6): 663-90.
- Schurr, A., Payne, R.S., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1997. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res.* 744, 105-11.
- Schurr, A., Payne, R.S., Tseng, M.T., Miller, J.J., Rigor, B.M., 1999. The glucose paradox in cerebral ischemia. New insights. *Ann N Y Acad Sci.* 893, 386-90.
- Schurr, A., 2006. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab.* 26, 142-52.

- Stanimirovic, D.B., Ball, R., Durkin, J.P., 1997. Glutamate uptake and Na,K-ATPase activity in rat astrocyte cultures exposed to ischemia. *Acta Neurochir Suppl.* 70, 1-3.
- Strasser, U. and G. Fischer (1995). "Protection from neuronal damage induced by combined oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures by glutamate receptor antagonists." *Brain Res* **687**(1-2): 167-74.
- Thomazi, A.P., Boff, B., Pires, T.D., Godinho, G., Battu, C.E., Gottfried, C., Souza, D.O., Salbego, C., Wofchuk, S.T., 2008. Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Res.* 1188, 233-40.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Goncalves, D., Tramontina, A.C., Souza, D.F., Frizzo, J.K., Nardin, P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Goncalves, C.A., 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 31, 815-20.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andreazza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods.* 162, 282-6.
- Wang, J., Chambers, G., Cottrell, J.E., Kass, I.S., 2000. Differential fall in ATP accounts for effects of temperature on hypoxic damage in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol.* 83, 3462-72.