

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Investigação de proteínas envolvidas na vulnerabilidade
seletiva do hipocampo**

ANA PAULA HORN

Orientadora

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO

Co-orientador

GUIDO LENZ

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2004

“There is no field of basic cell biology and cell pathology that is more confusing and more unintelligible than is the area of apoptosis versus necrosis.”

E. Farber, 1994.

DEDICO

A minha falecida mãezinha, que desde cedo me ensinou a lutar para conseguir realizar meus sonhos...

Ao meu pai, que tem sido meu exemplo a seguir...

Ao Ivan, que tanto amo e que, mesmo de longe, participou de todo esse trabalho...

Agradecimentos

À Chris e ao Guido, meus pais científicos, por todo o apoio, exemplo, dedicação, amizade e confiança;

Ao Rod, por ter me acolhido tão bem no laboratório e ter sido para mim um grande exemplo de pesquisador;

Ao Augusto e à Lauren Valentim, que comigo começaram este trabalho e dos quais hoje sinto muita falta;

À minha bolsista Daniéli, que sempre esteve presente quando eu mais precisei, agradeço o apoio e a amizade;

Ao pessoal do laboratório 37: Carol, Andressa, Rudimar, Melissa, Alexandre, Helena, Lauren Zamin, Luciane, Fabrício, Christine e Sirlene pelas conversas, risadas e apoio durante todo esse tempo;

À Cecília e à Verlaine, pela dedicação e cuidado com o material que usamos no dia-a-dia;

Ao Seu Valdemar, sempre presente na hora certa;

À Fabiana e à Michele que, carinhosamente, muito me ajudaram com o ensaio das caspases;

Ao pessoal do laboratório do Centro de Biotecnologia, onde foram realizados os ensaios de caspases;

A todos os colegas, professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS, um excelente centro de formação de pesquisadores;

Em especial: CAPES e PROPESQ/UFRGS.

Índice

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. As doenças neurodegenerativas.....	1
1.2. A isquemia cerebral.....	1
1.2.1. Eventos envolvidos na morte celular após isquemia.....	3
1.2.2. A morte celular.....	6
1.2.2.1. Os tipos de morte celular.....	6
1.2.2.1.1. As caspases.....	9
1.2.2.1.2. As vias de ativação das caspases.....	10
1.2.2.1.3. A apoptose independente de caspases.....	13
1.2.3. Morte celular e isquemia.....	13
1.2.3.1. A vulnerabilidade seletiva do hipocampo.....	14
1.2.3.2. Modelos experimentais de isquemia.....	15
1.2.3.2.1. Modelos <i>in vivo</i>	15
1.2.3.2.2. Modelos <i>in vitro</i>	16
1.3. As proteínas de interesse.....	17
1.3.1. A proteína AKT.....	17
1.3.1.1. A via da PI3K e a fosforilação da AKT.....	18
1.3.1.2. Funções da AKT no bloqueio da apoptose.....	20
1.3.1.3. Alterações na AKT após isquemia.....	22
1.3.2. As proteínas de choque térmico (HSPs).....	22
1.3.2.1. A HSP27.....	23
1.3.2.2. A HSP70.....	26
1.3.2.3. As proteínas de choque térmico e a isquemia.....	27
2. Objetivos.....	28
3. Materiais e métodos.....	29
3.1. Materiais.....	29
3.1.1. Animais.....	29
3.1.2. Reagentes e Materiais.....	29
3.1.2.1. Cultura organotípica.....	29
3.1.2.2. Privação de oxigênio e glicose e tratamento.....	30
3.1.2.3. Eletroforese e imunodeteção.....	30

3.1.2.4. Ensaio de caspases.....	30
3.2. Métodos.....	31
3.2.1. A cultura organotípica.....	31
3.2.2. A privação de oxigênio e glicose.....	33
3.2.3. O tratamento com LY.....	34
3.2.4. Avaliação da morte celular por análise da incorporação de iodeto de propídeo e microscopia de fluorescência.....	35
3.2.5. Quantificação da incorporação de iodeto de propídeo.....	36
3.2.6. Separação das áreas CA1 e DG do hipocampo.....	36
3.2.7. A dosagem de proteínas.....	38
3.2.8. Ensaio de caspases.....	38
3.2.9. Eletroforese unidimensional e eletrotransferência.....	39
3.2.10. Imunodeteção.....	40
3.2.11. Análise estatística.....	41
4. Resultados.....	42
4.1. A morte celular em resposta à POG é seletiva.....	42
4.2. Estará a via da PI3K envolvida na vulnerabilidade seletiva do hipocampo?.....	44
4.2.1. O inibidor da via e a incorporação de IP.....	44
4.2.2. O inibidor da via e a ativação de caspases.....	48
4.2.3. A proteína AKT participa desse processo?.....	51
4.3. Estarão HSP27 e HSP70 envolvidas na vulnerabilidade seletiva do hipocampo?.....	54
5. Discussão.....	58
6. Conclusões.....	64
7. Perspectivas.....	65
8. Artigo submetido.....	66
9. Referências Bibliográficas.....	84

Resumo

Uma das principais características do hipocampo após a isquemia é a vulnerabilidade diferencial das células da região CA1 e DG à morte celular. Os neurônios granulares do DG são resistentes, enquanto que os neurônios piramidais da região CA1 são mais sensíveis. Nosso objetivo nesse estudo foi investigar o possível envolvimento da via de sinalização celular PI3K, uma via que possui efeito proliferativo e antiapoptótico, e das proteínas de choque térmico (HSPs) no fenômeno da vulnerabilidade seletiva. Para isso foram usadas culturas organotípicas de hipocampo de ratos Wistar de 6-8 dias. As culturas foram tratadas com o inibidor da PI3K, LY294002 (LY), nas doses 10 μ M e 50 μ M. A morte celular foi quantificada pela medida da incorporação de iodeto de propídeo e da atividade das caspases 3 e 7. Alterações na fosforilação e no imunocontéudo das proteínas foram obtidas com o uso de anticorpos específicos. Os resultados mostraram que a região do DG parece responder de forma tempo dependente e precocemente à presença da droga, sugerindo uma importância da via nessa região. Para investigar se a proteína AKT, uma cinase ativada por PI3K, estava envolvida na vulnerabilidade seletiva das células às condições de privação de oxigênio e glicose (POG), medimos a fosforilação e o imunocontéudo dessa cinase após 60 minutos de POG seguida dos tempos de recuperação de 30 minutos, 6 horas e 24 horas. Nenhuma alteração foi observada nesses parâmetros, sugerindo que, nesse caso, a fosforilação da AKT não está envolvida na vulnerabilidade seletiva. Quando o imunocontéudo da HSP27 e da HSP70 foi investigado após as condições de POG em ambas as áreas do hipocampo, não foi observada nenhuma alteração na HSP27 nos tempos de recuperação escolhidos. Por outro lado, observou-se aumento no imunocontéudo da HSP70 em ambas as regiões 24 horas após a exposição às condições de POG, sendo este maior no CA1. Quando as quantidades das HSPs nas duas regiões em condições basais foram comparadas, observou-se que ambas estão em maior quantidade na região do DG. Esta diferença poderia estar relacionada com a resistência à morte celular observada no DG, uma vez que, possuindo maior quantidade HSPs, estas poderiam atuar como protetoras contra a morte. Esses resultados sugerem que a via de sinalização da PI3K pode estar envolvida na vulnerabilidade seletiva observada no hipocampo em resposta à condições de POG, e esta não envolve alterações na fosforilação da AKT. Por outro lado, HSP27 e HSP70 podem estar envolvidas no fenômeno da vulnerabilidade seletiva, protegendo o DG das lesões.

Abstract

One of the main characteristics of hippocampus after ischemic episodes is the different vulnerability to cell death of cells from CA1 and from DG areas. DG granular neurons are resistant while CA1 pyramidal neurons are more vulnerable. Our intent in this study was to investigate a possible involvement of PI3K pathway and HSPs in the selective vulnerability phenomenon. For these purposes we used organotypic hippocampal cultures from 6-8 days old Wistar rats. Our first focus was PI3K, a known proliferative and antiapoptotic pathway. The cultures were exposed to treatment with LY294002 (LY), a PI3K inhibitor, in doses 10 μ M and 50 μ M. Cellular death was assessed by propidium iodide uptake and measurement of caspase 3 and 7 activity. The results showed an effect time and dose dependent, always with earlier cellular death in DG area, suggesting the importance of this pathway in this region. To investigate if AKT protein, a downstream kinase in PI3K pathway, was involved in selective vulnerability of cells after oxygen and glucose deprivation (OGD) conditions, we measured the phosphorylation and immunoccontent of this protein after 60 minutes of OGD, followed by 30 minutes, 6 hours and 24 hours of reperfusion. No alterations were observed in this parameters, suggesting that, in this case, phosphorylation of AKT is not involved in the selective vulnerability. When we investigate HSP27 and HSP70 immunoccontent after OGD conditions in both areas of hippocampus, we observed no alterations in HSP27 in these reperfusion times. Interestingly, HSP70 showed an immunoccontent increase in both areas 24 hours after the insult, with higher levels in CA1 area. Comparing basal level of HSPs in CA1 and DG we observe that both proteins are higher in DG area. The difference could explain why DG area is more resistant to cell death, once there are more HSPs blocking cell death. These results are pointing that PI3K is involved in selective vulnerability of hippocampus in a way that does not require AKT phosphorylation. On the other hand, HSP27 and HSP70 may be involved in this phenomenon, protecting DG from insults.

Lista de Figuras

Figura 1: Cascata neurotóxica na isquemia e na recirculação.....	5
Figura 2: Principais etapas das mortes apoptótica e necrótica.....	7
Figura 3: Proposta de classificação da morte celular.....	8
Figura 4: Principais vias de sinalização da apoptose.....	12
Figura 5: Modelo do mecanismo de ativação de AKT/PKB por fatores de crescimento.....	19
Figura 6: Vias de sinalização da proteína AKT.....	21
Figura 7: Resumo esquemático da fosforilação e das atuações da proteína HSP27 em resposta a estresse.....	25
Figura 8: Possíveis alvos das proteínas HSP27 e HSP70 na atenuação da morte celular.....	27
Figura 9: Ratos Wistar utilizados nos experimentos.....	29
Figura 10: Preparo da placa de cultivo e retirada do hipocampo.....	33
Figura 11: Nitrogenação do meio de POG e a câmara de anóxia utilizada.....	33
Figura 12: Representação esquemática dos cortes para a separação das regiões CA1 e DG do hipocampo.....	36
Figura 13: Aparelho para eletroforese unidimensional em mini-géis e aparelho de eletrotransferência (blotter semi-dry).....	40
Figura 14: Incorporação de iodeto de propídeo ao longo do tempo em fatias de hipocampo de ratos expostas a condições de POG por 40 minutos.....	43
Figura 15: Representação temporal da morte celular induzida pelo tratamento com as doses 10 μ M e 50 μ M de LY.....	45
Figura 16: Curva de tempo da quantificação da incorporação de IP às regiões CA1 e DG de culturas organotípicas de hipocampo tratadas com 10 μ M de LY.....	46

Figura 17: Curva de tempo da quantificação da incorporação de IP às regiões CA1 e DG de culturas organotípicas de hipocampo tratadas com 50 μ M de LY.....	47
Figura 18: Medida da atividade das enzimas caspase 3 e 7 após 22 horas de tratamento com LY nas doses 10 μ M e 50 μ M.....	49
Figura 19: Medida da atividade das enzimas caspase 3 e 7 nos tempos 9 horas e 22 horas após o tratamento com LY na dose 50 μ M.....	50
Figura 20: Imunodeteção da fosforilação e do imunocontéudo da proteína AKT.....	52
Figura 21: Relação fosforilação/imunocontéudo da proteína AKT nas regiões CA1 e DG do hipocampo.....	53
Figura 22: Imunodeteção das proteínas HSP27 e HSP70 nas regiões CA1 e DG do hipocampo.....	55
Figura 23: Imunocontéudo da proteína HSP70 nas regiões CA1 e DG do hipocampo.....	56
Figura 24: Imunocontéudo da proteína HSP27 nas regiões CA1 e DG do hipocampo.....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1. Meio de cultivo.....	32
Tabela 2. HBSS.....	32
Tabela 3. Meio de POG.....	34
Tabela 4. Solução de Krebs-Ringer.....	37
Tabela 5. Solução de lise para eletroforese unidimensional (Solução A).....	37
Tabela 6. Solução de lise para eletroforese unidimensional (Solução B).....	38
Tabela 7. Solução tampão para o ensaio de caspases.....	39

Lista de Abreviaturas

- AIF: fator indutor de apoptose
- AKT: homóloga celular ao oncogene viral v-AKT
- Apaf-1: protease ativadora do fator apoptótico-1
- Bcl-2: oncogene da célula B (*B cell leukemia oncogene*)
- CA: corno de Ammon (*Cornus Ammonis*)
- Caspase: protease com cisteína no sítio ativo e capaz de clivar outras proteínas após resíduos de aspartato (*Cysteine-dependent aspartate-specific protease*)
- CREB: proteína responsiva ao AMPc (cAMP response element-binding protein)
- Daxx: proteína associada ao domínio de morte Fas
- DEVD-MCA: substrato da caspase 3 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA
- DG: giro denteado (*Dentate Gyrus*)
- DMSO: dimetil sulfóxido
- ERK: cinase regulada por sinais extracelulares
- FKHR: (*Forkhead in rhabdomyosarcoma*)
- GSK3: Glicogênio sintase cinase 3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*)
- HBSS: solução salina balanceada de Hanks
- HSE: elemento de choque térmico
- HSF: fator de choque térmico
- HSP: proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
- IAP: proteína inibidora da apoptose
- ICAD: inibidor da deoxiribonuclease ativada por caspase
- IKK: cinase do inibidor de NF- κ B

IP: iodeto de propídio

JNK: cinase Jun N-terminal (*Jun N-terminal kinase*)

LY: LY294002, inibidor da PI3K

MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos

MAPKAPK2: proteína cinase ativada pela proteína cinase ativada por mitógenos

MEM: meio essencial mínimo

NF κ B: fator nuclear kappa B (*Nuclear factor kappa B*)

NGF: fator de crescimento neuronal

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

PDK: proteína cinase dependente de fosfoinositóis-3

POG: privação de oxigênio e glicose

PI3K: fosfoinositol-3 cinase (*Phosphoinositide-3 Kinase*)

PKC: proteína cinase C

PRAK: proteína cinase ativada/regulada pela p38

PTEN: fosfatase da PI3K

RTK: receptor tirosina cinase

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

TNF: fator de necrose tumoral

Z-DEVD-FMK: inibidor de caspase 3 Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F

1. Introdução

1.1. As doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas afetam as qualidades que fazem a vida dos seres humanos tão especial, como a memória, a cognição, a fala, a personalidade e os movimentos especializados (PRICE, 1999). Dentre essas doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), podemos destacar as desordens cerebrovasculares, a epilepsia, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla. Algumas dessas doenças são comuns enquanto outras são menos freqüentes, sendo que em conjunto elas afetam um grande segmento da população e, na maioria dos casos, levam à incapacidade física e/ou mental. Para cada uma dessas doenças, na maioria das vezes, apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis.

Felizmente, nos últimos anos, avanços significativos têm sido feitos no sentido de esclarecer os aspectos genéticos e os mecanismos celulares e moleculares de algumas dessas doenças, bem como no sentido de desenvolver modelos *in vivo* e *in vitro*, fundamentais para os estudos da grande variedade de mecanismos patogênicos envolvidos nas desordens do SNC. Basicamente, as linhas de pesquisa nesse campo visam a identificação de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos tratamentos que possam ser testados em modelos experimentais e, subseqüentemente, em pacientes, sendo para isso de grande valor as interações entre a neurociência básica e a aplicada (PRICE, 1999).

1.2. A isquemia cerebral

A isquemia cerebral, que pode ser a causa do popularmente conhecido acidente vascular cerebral (AVC) ou derrame, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Ela está intimamente ligada a uma variedade de fatores de risco como hipertensão, hipercolesterolemia e

diabete (PRICE, 1999). Contudo, muitos pacientes que sofrem a isquemia sobrevivem e experimentam as conseqüências do dano por anos e anos, muitas vezes a nível emocional, motor ou intelectual. Este grupo requer muitos cuidados e tratamentos médicos. Apesar dos constantes esforços, nenhum sintoma precoce ou tratamento que conduza à prevenção da ocorrência ou redução das conseqüências clínicas da isquemia foi encontrado (JUURLINK & SWEENEY, 1997).

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de energia limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por essa razão, o cérebro é mais vulnerável ao dano isquêmico do que os outros tecidos. O tipo mais freqüente de isquemia em humanos é a **isquemia focal**, que é definida como a interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do cérebro. Outro tipo é a **isquemia global**, que resulta da interrupção transitória do fluxo sanguíneo para todo o cérebro, como ocorre durante uma parada cardíaca. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, a volta da circulação sanguínea pode aumentar ainda mais a morte neuronal, especificamente nas áreas mais vulneráveis do cérebro (SIEGEL *et al.*, 1993; TAYLOR *et al.*, 1996).

Os derrames causam sérias incapacitações permanentes, com cerca de 600.000 pessoas sofrendo um novo ou recorrente derrame a cada ano. Um estudo com a população norte americana mostrou que três milhões de pessoas são permanentemente incapacitadas por lesões isquêmicas, sendo que 31% dos sobreviventes necessitam de ajuda para cuidarem de si mesmos, 20% necessitam de ajuda para caminhar, 71% tem a capacidade vocal diminuída quando examinados em uma média de 7 anos após a lesão, e 16% precisam ser sustentados pelo governo. Direta e indiretamente essas lesões custaram em 1998 aproximadamente 43,3 bilhões de dólares (WHITE *et al.*, 2000). No Brasil não existem dados estatísticos classificados e organizados sobre o tema, como os que são apresentados para os Estados Unidos.

Baseados nesse quadro podemos perceber a importância dos estudos nessa área, sempre na tentativa de diminuir a morbidade e as seqüelas dos pacientes vítimas de isquemia cerebral. Como citado anteriormente, até o momento não existe um protocolo terapêutico efetivo que melhore as condições de vida desses pacientes, instigando-nos ainda mais na busca de compostos neuroprotetores e na tentativa de compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal pós-isquêmica.

1.2.1. Eventos envolvidos na morte celular após isquemia

Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, sozinhos ou combinados, levam ao dano neuronal pós-isquêmico: aumento de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, formação de radicais livres e acidose láctica (TAYLOR *et al.*, 1996; JUURLINK & SWEENEY, 1997; DIRNAGL *et al.*, 1999; FRANTSEVA *et al.* 2001).

Quando os estoques de energia esgotam-se (sendo o ATP depletado pelo uso e não sintetizado devido a falta de oxigênio na cadeia respiratória), o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização. Conseqüentemente, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são ativados e aminoácidos excitatórios são liberados no espaço extracelular, particularmente o glutamato (DE KEYSER *et al.*, 1999). Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores, são bloqueados, aumentando ainda mais o acúmulo de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular. A ativação de receptores glutamatérgicos leva ao aumento do cálcio intracelular pela abertura direta de canais de cálcio (receptores ionotrópicos), pela ligação aos receptores ligados a proteínas G (receptores metabotrópicos) e favorecendo a saída do Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Como resultado da ativação glutamatérgica, íons Na^+ e Cl^- entram nos neurônios através de canais iônicos, juntamente com a água, levando a um inchamento das células – o edema (DIRNAGL *et al.*, 1999).

O aumento no Ca^{2+} intracelular, um dos principais segundos mensageiros das células, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, causando

danos no tecido através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases e outras enzimas que causam danos em vários locais da célula, levando-a à morte (MITANI *et al.*, 1993). Alguns exemplos que podem ser citados aqui são: a ativação da fosfolipase A₂ e da ciclooxygenase gera radicais livres esgotando os estoques de antioxidantes, aumentando o dano através de peroxidação lipídica e danos na membrana; o aumento do óxido nítrico gerado pela enzima óxido nítrico sintase, que, nessas condições, também promove danos ao tecido e pode levar à apoptose e a ativação de calpaínas, proteínas ativadas por cálcio que podem ativar as catepsinas lisossomais que, uma vez ativadas, são responsáveis pela ruptura da organela e proteólise do material citoplasmático (SWEENEY *et al.*, 1995; PHILLIS *et al.*, 1996; IADECOLA, 1997; YAMASHIMA, 2000).

Como podemos observar, a liberação excessiva de glutamato e o aumento do cálcio intracelular são dois eventos iniciais e cruciais na morte celular por lesão isquêmica. Combinados principalmente com a falta de ATP culminam no quadro que pode ser observado na figura 1, que nos mostra um panorama geral do que ocorre durante a isquemia e na recirculação sanguínea.

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado (recirculação), a disponibilidade de oxigênio aumenta, bem como as reações bioquímicas que geram radicais livres. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres após a lesão (FRANTSEVA *et al.*, 2001). Outro componente do dano celular é a inflamação, que causa liberação de citocinas, contribuindo para a severidade da lesão (ASHENER, 1998).

A inibição da síntese de proteínas parece estar relacionada com a falta de ATP e a consequente morte neuronal, uma vez que a morte nas áreas vulneráveis é precedida por uma severa inibição na síntese protéica, e a restauração da síntese previne a injúria neuronal (HOSSMANN, 1993).

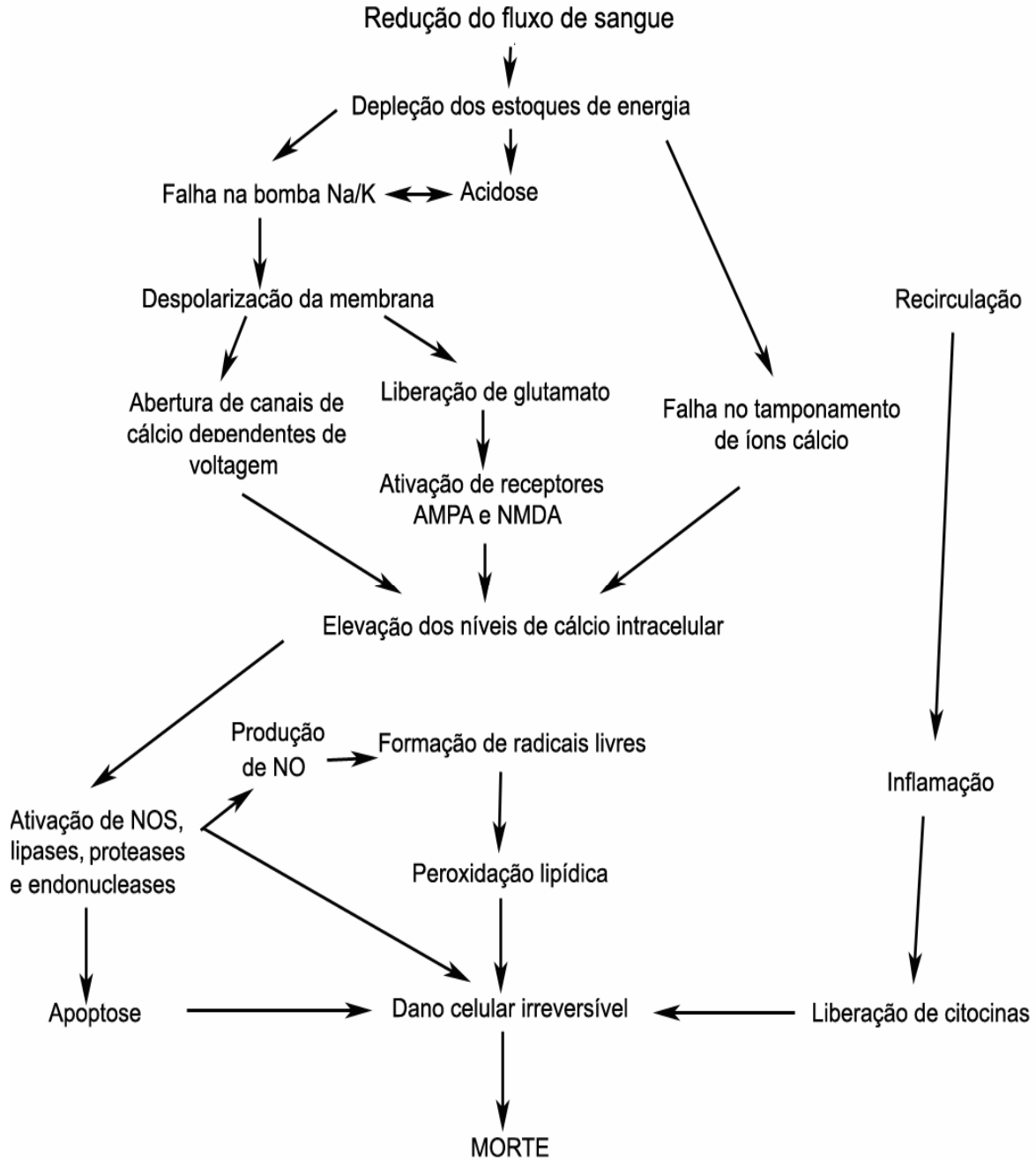


Figura 1: Cascata neurotóxica na isquemia e na recirculação. Alguns eventos principais são: despolarização descontrolada, excitação por glutamato, aumento de cálcio intracelular, geração de radicais livres, ativação de enzimas e inflamação. Adaptada de DE KEYSER *et al.*, 1999.

1.2.2. A Morte celular

1.2.2.1. Os tipos de morte celular

Há pelo menos três tipos de morte celular já bem descritos: apoptose, necrose e autofagia. A apoptose pode ser dividida em dois subtipos: clássica e independente de caspases, que são proteínas explicadas a seguir.

A necrose é caracterizada pelo extravasamento do material intracelular devido a um aumento no volume da célula. Pode ser observado um intenso dano às organelas e a ruptura dos lisossomos (YAKOVLEV & FADEN, 2004). É uma resposta a estímulos muito agressivos, como, por exemplo, exposição a altas concentrações de agentes tóxicos. Nesse caso, há uma intensa resposta inflamatória no local, oriunda da liberação de citocinas. Ainda não se tem certeza se esse tipo de morte é sinalizada (LEIST & JÄÄTELÄ, 2001). As principais diferenças entre a apoptose e a necrose podem ser visualizadas na Figura 2.

A autofagia é uma via regulada de degradação celular, podendo ser de organelas (para o “turnover” das organelas) ou da célula inteira. É conhecida por ocorrer em momentos de privação de nutrientes, quando a célula “elimina” organelas para, assim, gastar menos energia com elas. Podem ser visualizados lisossomos ou vacúolos com bicamadas em seu interior, sugerindo a presença de membranas celulares nessa estrutura (KLIOSKY & EMR, 2000).

Existe uma grande discussão quanto às tentativas de caracterização dessas mortes. Atualmente o que parece estar sendo o consenso é que existe uma graduação entre a apoptose clássica e a necrose, onde são visualizadas apenas algumas características, nunca todas.

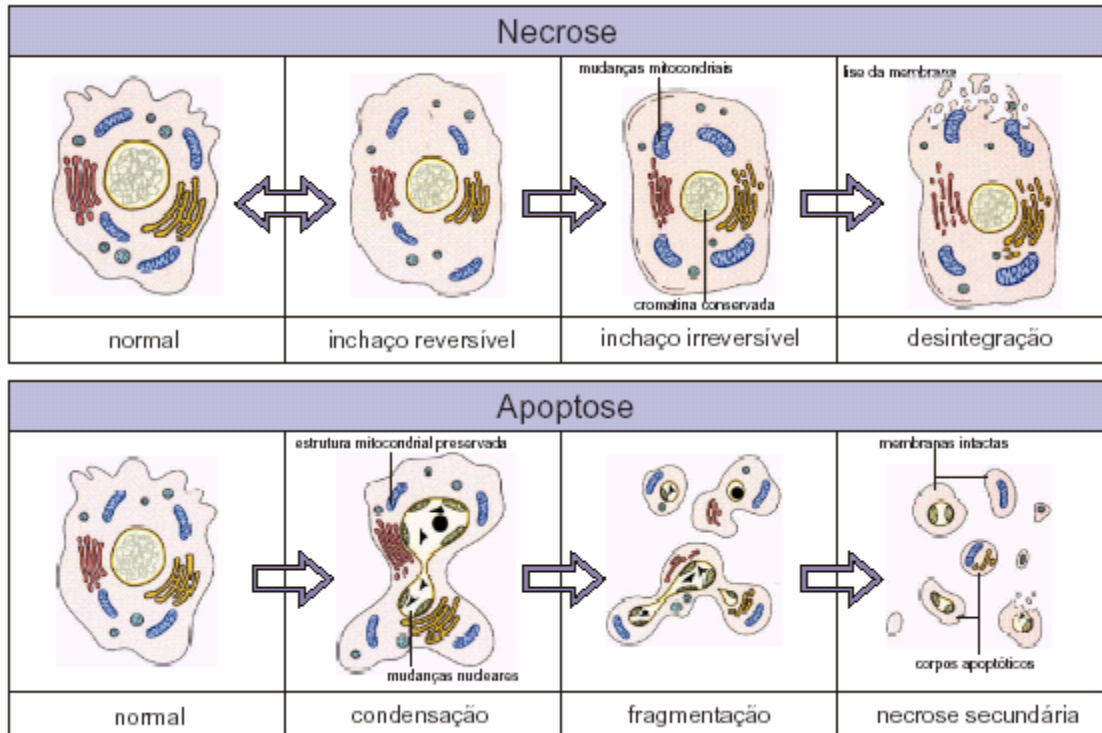


Figura 2: Principais etapas das mortes apoptótica e necrótica, mostrando as principais diferenças desses dois processos. Adaptada de www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose.pdf.

Uma das novas propostas de caracterização da morte é a de VAN CRUCHTEN & VAN DEN BOECK, 2002. Os autores apresentam o termo “oncosis”, que definem como a morte celular caracterizada por aumento de volume celular. No esquema abaixo, o autor apresenta-nos a seguinte classificação, baseada na morfologia celular: há dois tipos de morte que a célula pode iniciar, apoptose e oncosis. Na apoptose observa-se uma diminuição do volume da célula, enquanto que na oncosis observa-se um aumento nesse volume. O termo necrose seria aplicado aos dois tipos, no estágio final dessas mortes. A figura 3 ilustra essa proposta. Isso nos mostra o quanto ainda há discussões nessa área.

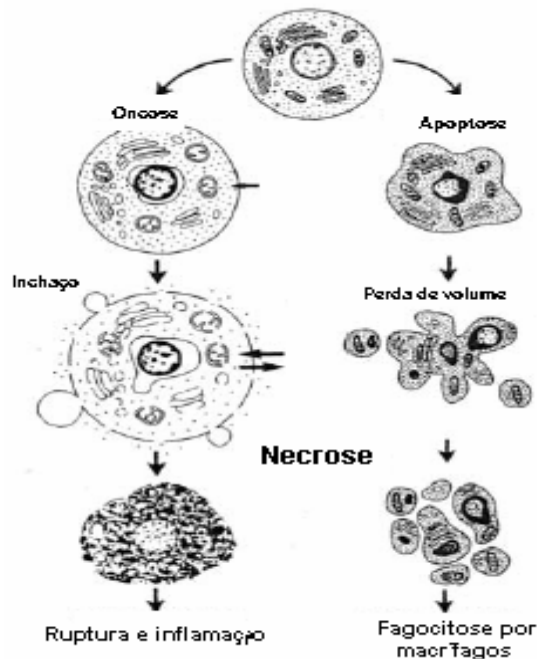


Figura 3: Proposta de classificação da morte celular, adaptada de VAN CRUCHTEN & VAN DEN BOECK, 2002.

O processo de morte controlado pela própria célula é chamado de **morte celular programada** (MCP). Ela oferece um controle crucial sobre o número total de células do organismo, que é essencial para a manutenção da homeostase (LEWIN, 2001). O termo morte celular programada, que erroneamente é utilizado como sinônimo de apoptose, abrange todos os tipos de MCP (incluindo a autofagia e, talvez, a necrose), sendo a apoptose apenas um dos tipos.

Existem falhas que evitam que a célula entre em apoptose, culminando principalmente em tumores e doenças autoimunes, e falhas que ocasionam um aumento na apoptose, ocasionando, por exemplo, as doenças degenerativas. A AIDS é um exemplo de apoptose descontrolada no sistema imunológico, assim como um insulto isquêmico é um exemplo de um grande aumento da morte de células neuronais por serem privadas temporariamente de oxigênio e glicose. Acredita-se que essas falhas na maquinaria apoptótica da célula sejam responsáveis por aproximadamente 70% das doenças. Cada célula contém os

componentes da rota apoptótica e está sujeita à regulação do balanço entre a ativação e a repressão da morte celular em um determinado momento (KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

Como características da apoptose temos: condensação da cromatina e intensa fragmentação do DNA em segmentos de tamanho proporcional, perda de volume celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos, que serão fagocitados por macrófagos. Como podemos ver, esse é um processo sinalizado, silencioso e limpo, onde a resposta inflamatória não é desencadeada (LEWIN, 2001; LOVE, 2003; YAKOVLEV & FADEN, 2004).

A ocorrência ou não da apoptose dependerá do estado metabólico da célula (é um processo que necessita grandes quantidades de ATP), do genótipo dessa célula, do estado de diferenciação que ela se encontra e do tipo e intensidade do dano sofrido. É uma mudança no genótipo que fará com que genes sejam silenciados ou sejam constitutivamente expressos.

A apoptose pode ser desencadeada por uma série de estímulos, incluindo remoção de fatores essenciais de crescimento, tratamento com glicocorticóides, irradiação λ , ativação de certos receptores, lesão excitotóxica, etc. (LEWIN, 2001). Todos esses insultos disparam a chamada cascata bioquímica de sinalização, que começará a ser apresentada agora.

1.2.2.1.1. As caspases

A indução do processo apoptótico clássico dá-se pela ativação de cisteíno-proteases denominadas caspases. Essas enzimas são específicas para substratos contendo aspártico, clivando a ponte peptídica seguinte a esse resíduo, e a sua atividade proteolítica deve-se a uma cisteína polarizada na cadeia lateral. São sintetizadas na forma de pró-enzimas, sendo ativadas por clivagem da cadeia polipeptídica. São constitutivas e sua ativação dispara a apoptose, necessitando, por esse motivo, uma constante inibição (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

Até o presente momento 14 isoformas de caspase já foram identificadas e, dessas, aproximadamente dois terços estão envolvidas com a morte, estando o

restante envolvidas com processos inflamatórios. As caspases que estão envolvidas com a apoptose podem ser divididas em dois grupos: as indutoras (caspases 8 e 9), que são as que dão início à cascata proteolítica e as efetoras (caspases 3, 6 e 7), que clivam substratos específicos, responsáveis pelas características próprias desse tipo de morte (fragmentação do DNA, condensação da cromatina, perda de volume e desestruturação do citoesqueleto, etc.) (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; GRAHAN & CHEN, 2001; YAKOVLEV & FADEN, 2004). A figura 4 permite uma melhor visualização do papel dessas proteínas.

1.2.2.1.2. As vias de ativação das caspases

A ativação das vias de sinalização da apoptose dá-se tanto por agentes internos quanto por agentes externos à célula. Alguns dos componentes da cascata bioquímica da apoptose podem ser visualizados na figura 4. A via extrínseca de apoptose é disparada quando um sinal externo liga em receptores específicos (Fas, TNF), disparando a sinalização mediada por esses receptores. Eles possuem domínios que, uma vez ativados, recrutam a caspase 8 (iniciadora), levando a sua dimerização e conseqüente auto-ativação. A ativação da caspase 8, por sua vez, leva à clivagem de caspases 3, 6 e 7 (executoras), que clivam substratos específicos como ROCK (envolvida na morfologia celular), ICAD (envolvida com a fragmentação do DNA), dentre outras (GRAHAN & CHEN, 2001; YAKOVLEV & FADEN, 2004).

A via intrínseca é disparada por sinais vindos de dentro da célula. Como exemplo podemos citar uma exposição à radiação λ , que ativa uma proteína chamada p53, capaz de ativar Bax, uma proteína pró-apoptótica com a função de auxiliar na despolarização da membrana da mitocôndria e na liberação de citocromo c. Uma vez no citosol, o citocromo c liga-se às proteínas Apaf-1 e caspase 9, formando um complexo denominado apoptossomo (revisado em ADRAIN & MARTIN, 2001). Esse apoptossomo tem a função de ativar a caspase 9 presente nele e, posteriormente, clivar as caspases 3, 6 e 7 para que essas

clivem seus substratos específicos (YUAN & YANKNER, 2000; GRAHAN & CHEN, 2001; LOVE, 2003; YAKOVLEV & FADEN, 2004).

Vemos que sinais oriundos de diferentes condições são capazes de ativar, por diferentes vias, a mesma maquinaria, que cliva os mesmos substratos e, por isso, possui as mesmas características. É interessante observarmos que, através da clivagem e ativação da proteína pró-apoptótica Bid, um membro da família Bcl-2, essas vias extrínscica e intrínscica encontram-se, reforçando-se e amplificando o sinal (ADRAIAN & MARTIN, 2001; KAUFMANN & HENGARTNER, 2001). A apoptose está sempre pronta para ser iniciada, por isso um controle que a “silencie” é muito importante. Como principais proteínas antiapoptóticas temos a Bcl-2 e a Bcl-XL, que constantemente evitam que a membrana da mitocôndria seja despolarizada; as IAPs, que se ligam nas caspases e impedem a sua clivagem e conseqüente ativação; a AKT, capaz de inibir proteínas como Bad (que liga na mitocôndria conseguindo despolarizá-la), caspase 9, FKHR (que é o fator de transcrição do receptor Fas, estando assim a sua transcrição diminuída), entre outras (YUAN & YANKNER, 2000; YAKOVLEV & FADEN, 2004) .

No momento em que a mitocôndria é despolarizada, além da saída do citocromo c para a formação do apoptossomo temos a saída de outras proteínas tais como DIABLO, AIF (fator indutor de apoptose) e endonuclease G. Foi demonstrado um envolvimento da proteína DIABLO na inibição das IAPs, sendo, portanto, uma proteína pró-apoptótica, deixando as caspases livres para serem ativadas. A proteína AIF acredita-se estar envolvida na apoptose independente de caspases, promovendo condensação da cromatina e clivagem de DNA em fragmentos de alto peso molecular. A endonuclease G está envolvida com a replicação do DNA mitocondrial e, quando sai da mitocôndria, parece estar envolvida com a clivagem internucleossomal do DNA (LI *et al.*, 2001; YAKOVLEV & FADEN, 2004). É por isso que é tão difícil querer caracterizar um tipo de morte específico. É preciso aceitar que muitos eventos podem estar acontecendo ao mesmo tempo, com muitas vias ativadas (misturando assim suas características), e que a morte que está acontecendo deve mesmo ser uma graduação entre um extremo (apoptose) e outro (necrose).

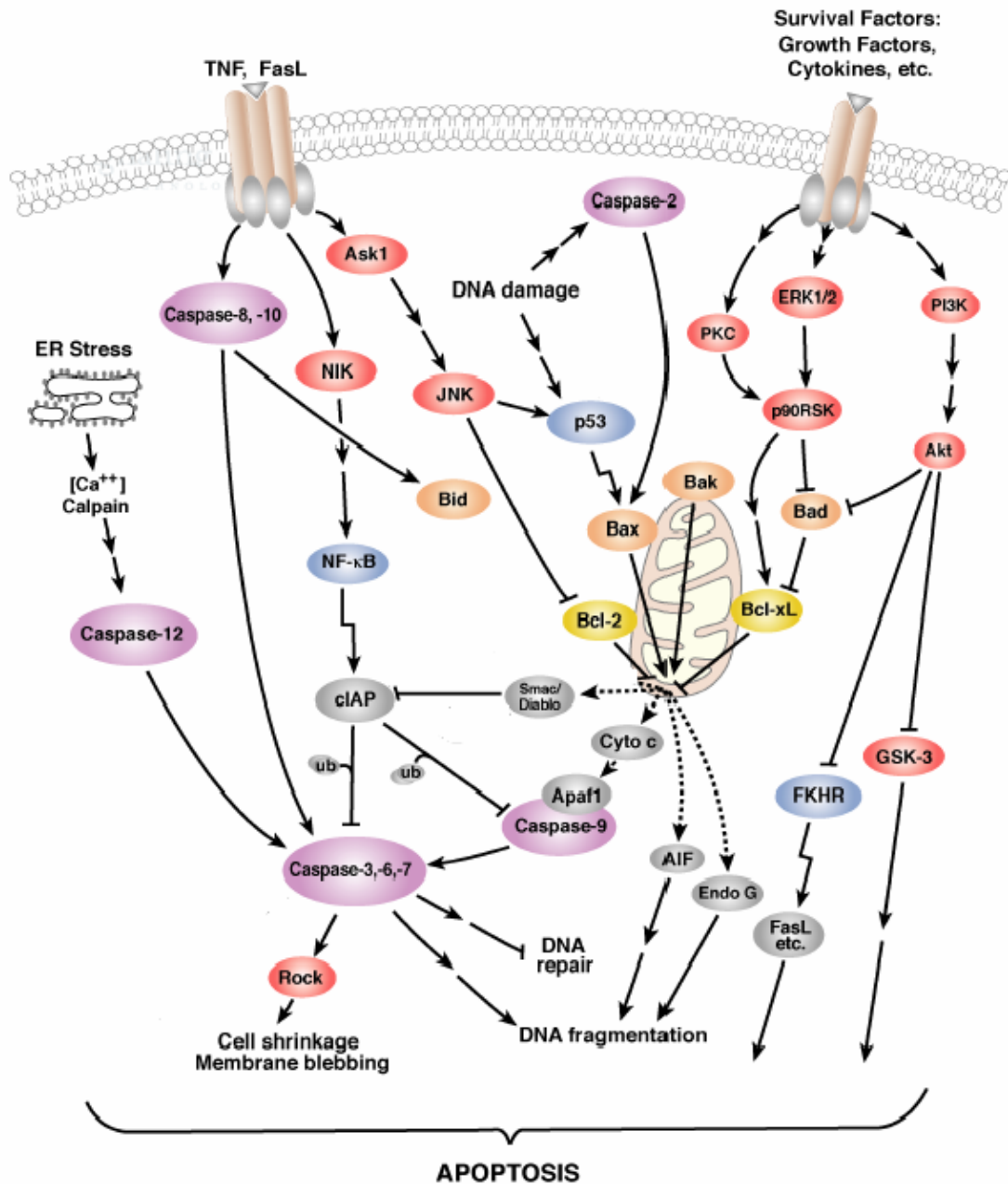


Figura 4: Principais vias de sinalização da apoptose. Adaptada da página <http://www.cellsignal.com>.

AIF: fator indutor de apoptose; AKT: homóloga celular ao oncogene viral v-AKT; Apaf-1: protease ativadora do fator apoptótico-1; IAP: proteína inibidora da apoptose; GSK3: Glicogênio sintase cinase 3; PI3K: fosfoinositol-3 cinase; Bcl-2: oncogene da célula B.

É importante salientar que a figura 4 mostra-nos apenas um esquema. Possivelmente essas proteínas não estão todas presentes na mesma célula e no mesmo momento.

1.2.2.1.3. A apoptose independente de caspases

Em alguns modelos animais foi observado que a inibição de caspases não impedia a morte celular. Embora as características da apoptose estivessem presentes nessas células, as caspases pareciam não ser cruciais nesse processo. A partir desses dados, algumas vias de morte independentes das caspases já foram descritas:

- liberação de AIF da mitocôndria (que pode ser visualizado na figura 4);
- ativação de serino proteases como AP24 que, quando inibidas, provocam uma proteção contra a morte mais eficiente que a conseguida com um inibidor de caspases (TORRIGLIA *et al.*, 2000);
- ativação de endonuclease G, uma nuclease capaz de clivar a cromatina em fragmentos internucleossomais (LI *et al.*, 2001);
- ativação da rota calpaína/catepsina que, uma vez ativada por excesso de cálcio, promove a ruptura do lisossomo e o extravasamento do seu conteúdo, responsável pela digestão dos constituintes. Nesse momento o cálcio acaba também ativando uma série de outras proteínas, responsáveis pelas características ditas “apoptóticas” nas células em questão (YAMASHIMA, 2000).

1.2.3. Morte celular e isquemia

A morte celular depois de uma isquêmica pode ser imediata ou tardia. Ainda não há um consenso entre o tipo de morte que ocorre após a lesão isquêmica. Utilizando modelos *in vivo*, alguns pesquisadores observaram apenas necrose (COLBOURNE *et al.*, 1999; YAMASHIMA, 2000), enquanto outros observaram

necrose combinada com apoptose ou apenas apoptose (ZENG & XU, 2000; CAO *et al.*, 2001; NIWA *et al.*, 2001; ZHAN *et al.*, 2001). Utilizando o modelo de cultura organotípica, foi observada a presença de necrose nas fatias (NAGANSKA & MATYLA, 2001), mas também foi visualizada a ativação de caspases (CHO *et al.*, 2004) e que, na presença de inibidores de caspases, o dano poderia ser amenizado (RAY *et al.*, 2000).

De um lado temos os pesquisadores que acreditam que a morte celular pós-isquêmica seja do tipo necrose ou, no máximo, apoptose independente de caspases (COLBOURNE *et al.*, 1999; YAMASHIMA, 2000; LOETSCHER *et al.*, 2001) e, de outro, pesquisadores que acreditam que grande parte da morte nesse quadro ocorre por apoptose com ativação das caspases (RAY *et al.*, 2000; GRAHAM & CHEN, 2001; NAGANSKA & MATYLA, 2001; LOVE, 2003; CHO *et al.*, 2004).

1.2.3.1. A vulnerabilidade seletiva do hipocampo

Populações de células que se encontram próximas no cérebro podem apresentar uma vulnerabilidade diferente a equivalentes intensidades de isquemia. Apesar de, atualmente, saber-se muito sobre a anatomia, a fisiologia e a bioquímica do SNC, ainda resta muito a descobrir sobre as causas dessa vulnerabilidade diferenciada de populações específicas em resposta a esse tipo de lesão. O dano depois da isquemia global ocorre principalmente na região CA1 do hipocampo e, em menor extensão, em certas sub-regiões do neocórtex, tálamo e estriato (SCHREIBER & BAUDRY, 1995).

No hipocampo, as células piramidais da região CA1 são sensíveis, enquanto as células piramidais da região vizinha CA3 são resistentes. No giro denteado (DG) as células granulares são resistentes, enquanto no hilo somente uma sub-população de células parece ser vulnerável (HSU *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 2000). Depois de 20-30 minutos de isquemia *in vivo* no rato, as áreas CA1, CA2 e o hilo são afetadas, enquanto as células das regiões CA3 e DG permanecem aparentemente normais. Os neurônios da região CA1 e do hilo são,

talvez, os mais vulneráveis de todo o cérebro. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue a seqüência: CA1, hilo> CA2> CA3> DG. É importante ressaltar que, apesar de os neurônios morrerem depois da lesão, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do cérebro (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Essa morte diferencial já foi demonstrada tanto *in vivo* (ORDY *et al.*, 1993; HSU *et al.*, 1994; VALENTIM *et al.*, 2001) quanto *in vitro* (BERNAUDIM *et al.*, 1998; CIMAROSTI *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2003).

Morte celular tardia: Outra característica fascinante da isquemia cerebral global é que nenhum dano significativo é observado até 3 ou 4 dias depois da lesão. Este fenômeno é conhecido como “*morte celular tardia*” (HSU *et al.*, 1994; BARTUS *et al.*, 1998; KIRINO, 2000). As duas populações de células vulneráveis do hipocampo não sofrem degeneração de maneira semelhante. As do hilo do giro denteado degeneram dentro de 24 horas, enquanto as células piramidais da região CA1 não morrem até 3-4 dias depois do insulto. A vulnerabilidade seletiva e o atraso no início da degeneração das células da região CA1 sugerem a presença de alguns neurônios ainda viáveis que podem estar comprometidos, mas ainda deixam uma janela de oportunidade para intervenção farmacológica alguns dias depois da isquemia (ORDY *et al.*, 1993).

Os fatores que determinam essa seletividade ainda são um mistério. Alguns estudos mostram a expressão diferencial de algumas proteínas como Bcl-2 e Bcl-XL, principalmente expressas nas regiões CA3 e giro denteado e Bax, especialmente expressa na região CA1 (GRAHAN & CHEN, 2001). Apesar desses achados, ainda há muito que pesquisar nesse campo.

1.2.3.2. Modelos experimentais de isquemia

1.2.3.2.1. Modelos *in vivo*

Os modelos experimentais de isquemia *in vivo* podem ser globais, quando afetam todo o cérebro, ou focais, quando afetam uma pequena região;

permanentes quando sem recirculação sanguínea ou transitórios quando seguidos da recirculação.

Isquemia cerebral global: Há muitas causas da isquemia cerebral em humanos, incluindo trauma e/ou ataque cardíaco. Nos modelos experimentais para a isquemia cerebral global são interrompidos os grandes vasos extracranianos, simulando distúrbios circulatórios globais que acontecem durante um ataque cardíaco ou hipotensão severa (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991). O modelo experimental mais usado nesse caso é o da oclusão dos 4 vasos (4VO), que inclui a cauterização das artérias vertebrais seguida de oclusão temporária das artérias carótidas comuns (FAROOQUI, 1994; VALENTIM *et al.*, 1999).

Isquemia cerebral focal: Neste modelo são interrompidas artérias cerebrais específicas, afetando somente uma pequena parte do cérebro. O modelo mais comum é a oclusão da artéria cerebral média (MCA)(FAROOQUI, 1994; LOETSCHER *et al.*, 2001).

1.2.3.2.2. Modelos *in vitro*

As técnicas *in vitro* são ferramentas importantes para o estudo de diversas doenças neurodegenerativas, por serem um modelo mais simples para estudos moleculares do que o animal *in vivo* (PRINGLE *et al.*, 1997a). As culturas organotípicas têm tornado-se uma importante alternativa para estudar a morte neuronal induzida por excitotoxinas (ABDEL-HAMID & TYMIANSKI, 1997), hipóxia (PRINGLE *et al.*, 1997b), hipoglicemia (TASKER *et al.*, 1992) e hipóxia/hipoglicemia para simular a isquemia (BERNAUDIN *et al.*, 1998; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

Esse modelo de culturas foi desenvolvido em 1981 por Gähwiler e foi modificado por Stoppini e colaboradores em 1991. Basicamente, trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo, sobre uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo assim permanecer por diversas semanas. Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter

a organização do tecido *in vivo* como, por exemplo, a organização existente no hipocampo (STOPPINI *et al.*, 1991; GÄHWILER *et al.*, 1997). A idade dessas culturas é denotada em EPD, dia pós-natal equivalente (*equivalent postnatal day*), o qual corresponde à idade que o animal tinha quando as fatias foram preparadas e colocadas em cultivo somado ao número de dias de permanência *in vitro* (BRUCE *et al.*, 1995).

"Isquemia" *in vitro*: A cultura organotípica de hipocampo pode ser submetida a um modelo experimental que simula as condições de isquemia *in vivo*, a qual chamamos de privação de oxigênio e glicose (POG). Esse método consiste em expor as culturas a um meio sem glicose e a uma atmosfera saturada de nitrogênio. Essas condições simulam a falta de fluxo sanguíneo da isquemia (LAAKE *et al.*, 1999; BREDER *et al.*, 2000).

As culturas organotípicas de hipocampo são uma excelente alternativa para o estudo da isquemia cerebral, pois essas culturas mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (STRASSER E FISCHER, 1995; LAAKE *et al.*, 1999; NORABERG *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

1.2. As proteínas de interesse

1.3.1. A proteína AKT

A serina/treonina proteína cinase B (PKB) foi identificada independentemente em 1991 por 3 diferentes grupos. Dois grupos identificaram a cinase pela sua homologia estrutural com PKC (73%) e PKA (68%), vindo daí os nomes PKB e RAC-PK (related to the A and C kinases). Ao mesmo tempo, a cinase foi identificada como o produto do oncogene viral v-Akt, surgindo então o nome AKT. A nomenclatura RAC-PK é evitada para que não haja confusão com a Rac GTPase, membro da família Rho. Os nomes AKT e PKB são igualmente usados (DOWNWARD, 1998).

Além de possuir um domínio cinásico serina/treonina, a PKB/AKT contém um domínio de homologia a plecstrina (PH domain) na sua porção amino terminal (aminoácidos 1 a 106). O domínio cinásico estende-se do aminoácido 148 até o aminoácido 411, com a região da cauda carboxi-terminal (aminoácidos 412-480) representando o resto da proteína (COFFER *et al.*, 1998; DOWNWARD, 1998).

A proteína PKB/AKT é ativada em resposta a tratamentos com estímulos de crescimento, incluindo PDGF (Platelet-derived growth factor), EGF (Epidermal growth factor), insulina, trombina, NGF (Nerve growth factor) e bFGF (basic fibroblast growth factor). Muitos estudos indicam que a cinase de lipídeos PI3K (Phosphoinositide 3-OH kinase) está envolvida na regulação da PKB/AKT. Foi visto que sua ativação é dependente da sua fosforilação nos resíduos 308 e 473 (KOHN *et al.*, 1996; BELHAM *et al.*, 1999), como descrito abaixo.

1.3.1.1. A via da PI3K e a fosforilação da AKT

A PI3K é formada por duas subunidades: p85 (regulatória) e p110 (catalítica). As subunidades estão dissociadas e juntam-se no momento da ativação, quando ela é capaz de fosforilar fosfoinosítídeos (PtdIns) na posição 3 do anel inositol, gerando PtdIns3P, PtdIns(3,4)P₂ e PtdIns(3,4,5)P₃. Os primeiros estudos que sugeriram que a AKT era ativada pela PI3K basearam-se em duas observações:

1. A ativação de AKT induzida por fatores de crescimento pôde ser completamente bloqueada por wortmanina, um inibidor de PI3K;
2. O ponto de mutação do receptor de fator de crescimento que evita a ativação de PI3K também inibe a ativação da AKT (COFFER *et al.*, 1998).

A figura 5 mostra-nos um modelo de ativação da AKT por fatores de crescimento. Tomando como exemplo um receptor tirosina cinase, podemos observar que a fosforilação dos resíduos de tirosina é necessária para a ligação da subunidade p85 da PI3K no receptor. Essa ligação dá-se através do domínio SH2 da proteína. Isso faz com que a subunidade p110 da PI3K junte-se ao

complexo, formando a proteína e desencadeando a fosforilação dos fosfoinosítídeos de membrana (PtdIns3P, PtdIns(3,4)P₂ e PtdIns(3,4,5)P₃). Essa fosforilação sinaliza para as PDKs 1 e 2, que são recrutadas para o local. Essas proteínas possuem ativação constitutiva e são capazes de fosforilar a AKT em dois diferentes sítios (BELHAM *et al.*, 1999). Estudos mostram que PDK1 fosforila AKT1 na treonina308, sendo essa fosforilação dependente de Ca²⁺ (YANO *et al.*, 1998), enquanto que PDK2 fosforila na serina473, parecendo que a fosforilação nos dois sítios é necessária para a completa ativação de AKT (COFFER *et al.*, 1998; DATTA *et al.*, 1999). A fosforilação da AKT pode ser melhor compreendida baseando-se na figura 5.

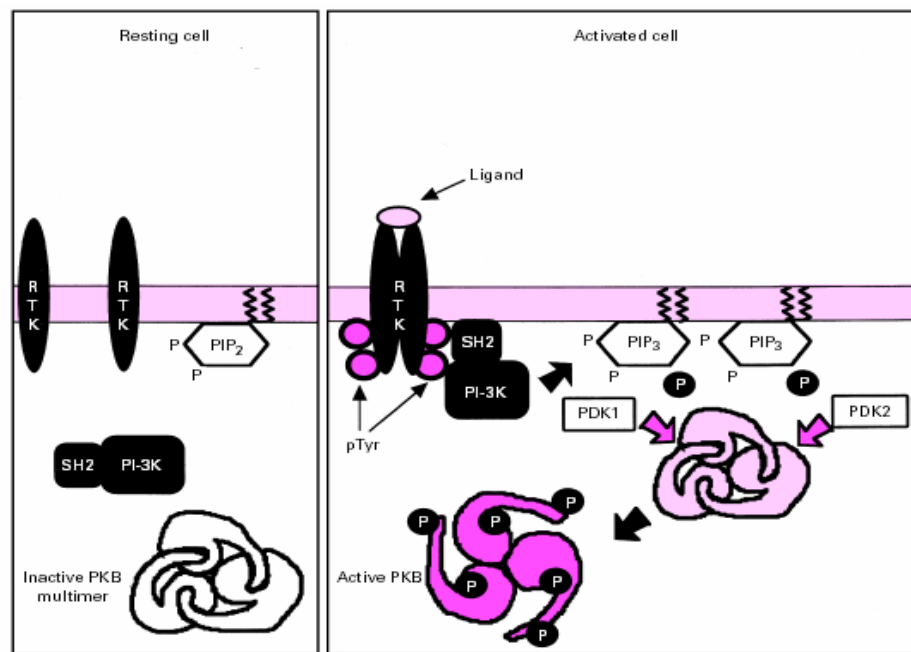


Figura 5: Modelo do mecanismo de ativação de AKT/PKB por fatores de crescimento. Adaptado de COFFER, 1998.

AKT/PKB: homóloga celular ao oncogene viral v-AKT; PDK: proteína cinase dependente de fosfoinositóis-3; PI3K: fosfoinositol-3 cinase; RTK: receptor tirosina cinase.

A principal fosfatase capaz de inativar a cascata da PI3K é a PTEN, já tendo sido mostrado que a sua deficiência leva a um aumento na fosforilação e na atividade da AKT (SUN *et al.*, 1999). Outra forma de inativação da AKT é sua

clivagem por caspase 3, o que anula seus efeitos antiapoptóticos (FRANÇOIS & GRIMES, 1999).

Uma via alternativa que pode ser disparada pela ativação de PI3K é a via da PDK1, que, além da AKT, possui substratos como PKC, p70S6K e ERK, capazes de aumentar a transcrição de genes que codificam proteínas de sobrevivência (BELHAM *et al.*, 1999; KIS *et al.*, 2003). Parece que uma vez ativada, essa via comporta-se sempre como uma via em prol da sobrevivência da célula.

1.3.1.2. Funções da AKT no bloqueio da apoptose

Estando a via da PI3K ativada, a apoptose é bloqueada de várias maneiras. A AKT é capaz de regular proteínas envolvidas no processo da apoptose (COFFER, *et al.*, 1998; DOWNWARD, 1998; DATTA *et al.*, 1999; YUAN & YANKNER, 2000). Já foi demonstrada a interação da AKT com as seguintes proteínas:

- (1) FKHR, que é um fator de transcrição do receptor Fas, inibindo-o e fazendo com que esse receptor deixe de ser transcrito, diminuindo assim a estimulação da apoptose por estímulos como FasL e TNF (BRUNET *et al.*, 1999);
- (2) BAD, mantendo-a fosforilada e impedindo com que essa atue sobre a mitocôndria provocando a liberação do citocromo c e conseqüente disparo da apoptose (DATTA *et al.* 1997);
- (3) Caspase 9, fosforilando-a e impedindo que ela seja clivada, impedindo assim a clivagem e ativação da caspase 3 (CARDONE *et al.*, 1998);
- (4) GSK3 β , fosforilando-a e inativando-a para também por essa via bloquear a morte (PAP AND COOPER, 1998).

A AKT também é capaz de interagir com proteínas como tais como a cinase do inibidor de NF- κ B (IKK), fosforilando-a e liberando o fator de transcrição NF- κ B (OZES *et al.*, 1999) e com a proteína responsiva ao cAMP (CREB), aumentando a transcrição direcionada por esses fatores (DU AND MONTMINY, 1998). Também

é capaz de fosforilar a eNOS, ativando-a e levando à produção de óxido nítrico (NO), um importante sinalizador celular (FULTON *et al.*, 1999). As interações podem ser melhor visualizadas na figura 6.

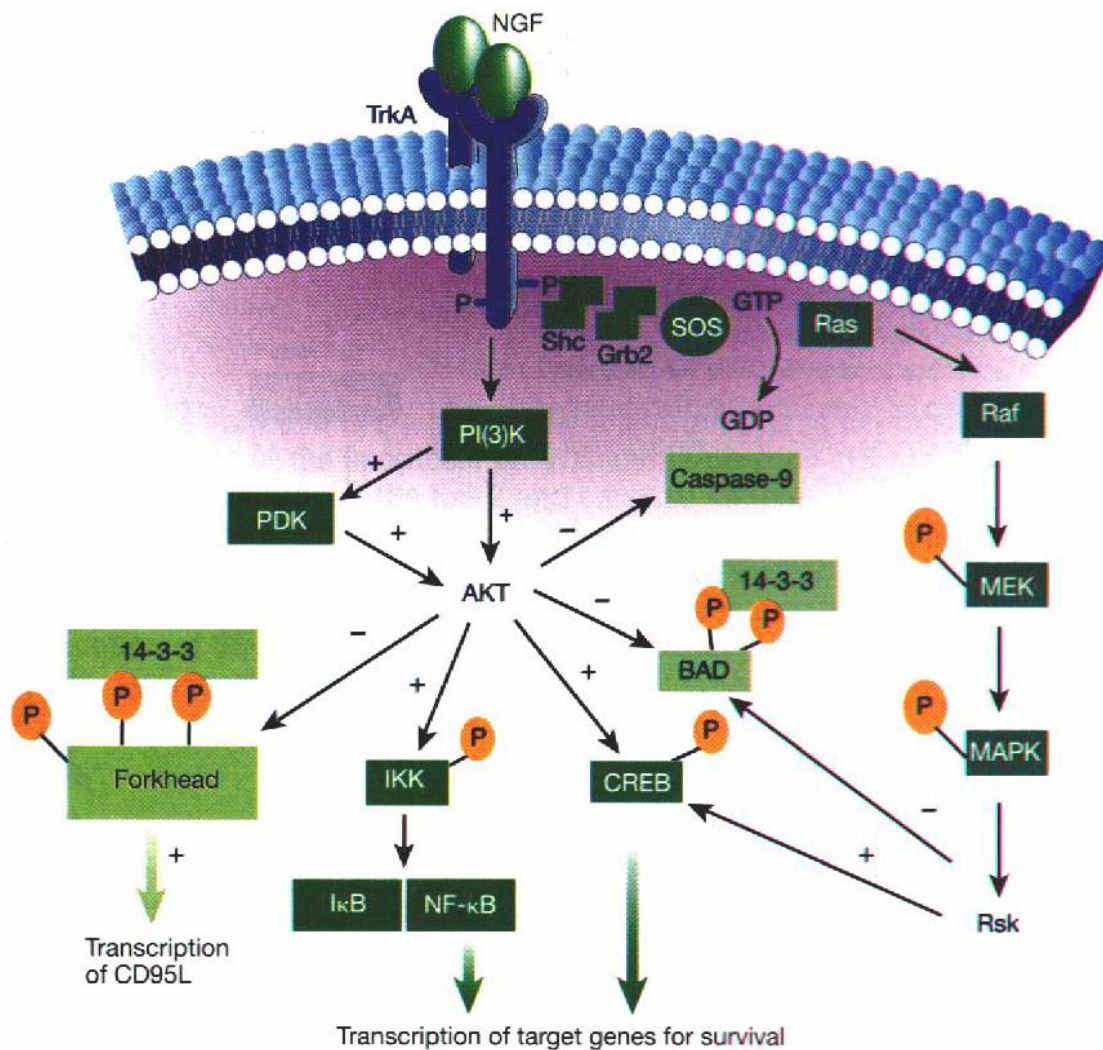


Figura 6: Vias de sinalização da proteína AKT. Adaptada de YUAN & YANKNER, 2000.

AKT/PKB: homóloga celular ao oncogene viral v-AKT; PDK: proteína cinase dependente de fosfoinositól-3; PI3K: fosfoinositol-3 cinase; NGF: fator de crescimento neuronal; IKK: cinase do inibidor de NF-κB; NFκB: fator nuclear kappa B; CREB: proteína responsiva ao cAMP; MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos.

Dessa forma a proteína AKT pode atuar frente à indução de lesão celular como a falta de fatores de crescimento, por exemplo, diminuindo a morte celular.

A partir desses dados surgiu o nosso interesse no estudo de um possível envolvimento da via da PI3K→AKT na resistência às lesões observada em algumas áreas, em especial o DG. Uma proteína que possui tantos alvos anti- e pró-apoptóticos pode estar envolvida na ausência de apoptose observada nessa região. O conhecimento das proteínas envolvidas na atenuação da morte celular, assim como a modulação dessas proteínas é essencial para que se chegue a um tratamento que reduza o dano nos pacientes que sofreram a isquemia.

1.3.1.3. Alterações na AKT após isquemia

Alguns autores, utilizando modelos *in vivo* de isquemia, já demonstraram alterações na fosforilação da proteína AKT no hipocampo, utilizando tanto ratos (OUYANG *et al.*, 1999; FRIGULS *et al.*, 2001; JANELIDZE *et al.*, 2001) quanto “gerbils” (NAMURA *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2001; KAWANO *et al.*, 2002).

A maioria dos trabalhos que investigaram o envolvimento da proteína AKT na lesão isquêmica observaram alteração na fosforilação da AKT em serina473 nos mais variados tempos após a lesão. O que parece ser um consenso é que essa fosforilação volta aos níveis basais após 24 horas de recuperação e que o imunoconteúdo da proteína não é alterado nesse tempo. Quando a fosforilação em treonina308 foi investigada, não se observou nenhuma alteração (KITAGAWA *et al.*, 2002).

1.3.2. As proteínas de choque térmico (HSPs)

As proteínas de choque térmico (HSPs) formam um grupo diversificado de proteínas, sendo encontradas em bactérias, plantas e animais (SHARP *et al.*, 1999). São classificadas em seis famílias, de acordo com seu peso molecular: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e pequenas HSPs, dentre estas a HSP27 (JOLLY & MORIMOTO *et al.*, 2000). Essas proteínas podem ser

constitutivas ou induzíveis, sendo encontradas nos mais diferentes compartimentos da célula. As proteínas HSP90 e HSP60 são constitutivas, enquanto que a HSP70 e a HSP27, além de serem constitutivas, também são induzíveis por estresses como calor, estresse oxidativo, isquemia, etc. (SHARP *et al.*, 1999; GARRIDO *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2003).

As HSPs atuam como chaperonas moleculares. Dentre as principais funções dessas proteínas, podemos citar:

- 1) Importam proteínas para o interior da célula;
- 2) Guiam a conformação de proteínas do citosol, do retículo endoplasmático e da mitocôndria;
- 3) Degradam as proteínas instáveis;
- 4) Dissociam complexos protéicos;
- 5) Previnem a agregação de proteínas;
- 6) Controlam a atividade de proteínas reguladoras e
- 7) Remodelam proteínas com a conformação alterada (SAMALI & ORRENIUS, 1998; GARRIDO *et al.*, 2001).

As condições e agentes capazes de induzir as HSPs o fazem através do fator de choque térmico (HSF) que, uma vez ativado, é translocado para o núcleo e liga-se ao elemento de choque térmico (HSE), que, por sua vez, ativa a transcrição dos genes que codificam as HSPs. Essa indução é transitória: uma vez cessado o estímulo, a maquinaria deixa de ser ativada (SAMALI & ORRENIUS, 1998).

1.3.2.1. A HSP27

A HSP27 é um dos membros do grupo das pequenas proteínas de choque térmico, que protege vários tipos celulares contra o estresse. No SNC de mamíferos, ela é uma proteína constitutiva, expressa basicamente em astrócitos (KATO *et al.*, 1995). A atividade da HSP27 pode ser regulada de duas maneiras: através do aumento de expressão em condições estressantes e por fosforilação (MEHLEN *et al.*, 1996; MEHLEN *et al.*, 1997; BRUEY *et al.*, 2000a).

A fosforilação da HSP27 é mediada por duas proteínas cinases, a MAPKAP cinase-2 e a PRAK, ambas ativadas pela via de transdução de sinal responsiva a estresse, a p38MAPK. Esta, quando ativada, desencadeia uma cascata de fosforilação de proteínas que leva à ativação da MAPKAP cinase-2 e da PRAK; estas, por sua vez, levam à fosforilação da HSP27 (STOKOE *et al.*, 1992; LARSEN *et al.*, 1997; NEW *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 2001).

Quando defosforilada, a HSP27 forma grandes agregados intracelulares de até 800 kDa. A fosforilação altera a estrutura quaternária da proteína, formando agregados menores como dímeros e tetrâmeros (LAMBERT *et al.*, 1999; ROGALLA *et al.*, 1999). A HSP27 desempenha diferentes funções dentro da célula de acordo com seu estado de fosforilação, como pode ser observado na Figura 7.

As funções da HSP27, relacionadas com a proteção celular, são:

Chaperona: Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que os oligômeros de HSP27 atuam dentro das células como chaperonas, evitando a desnaturação das proteínas ou auxiliando a renaturação (LEROUX *et al.*, 1997; GUO E COOPER, 2000). Rogalla e colaboradores (1999) demonstraram que a fosforilação da HSP27 leva à diminuição dos agregados intracelulares, e isto diminui a sua capacidade de evitar a desnaturação da citrato sintase *in vitro*, mostrando que a atividade chaperona da HSP27 depende da sua organização em oligômeros.

Modulação dos Filamentos de Actina: Quando defosforilada, a HSP27 forma pequenos oligômeros, geralmente dímeros ou tetrâmeros, que parecem ser responsáveis pela modulação dos filamentos de actina. A HSP27 liga-se à região terminal da actina. Quando a HSP27 é fosforilada em resposta ao estresse ela desliga-se da actina e permite a polimerização, a modulação da estabilidade e a reorganização dos filamentos (LAVOIE *et al.*, 1993; LAVOIE *et al.*, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1998).

Modulação do processo apoptótico: Estudos recentes têm mostrado que a HSP27 pode ser um bloqueador da apoptose em diversas etapas do processo, o que poderia explicar as várias atividades protetoras exercidas pela proteína (GARRIDO *et al.*, 1999; BRUEY *et al.*, 2000b; CHARETTE *et al.*, 2000; PANDEY

et al., 2000; KATO *et al.*, 2001). A expressão aumentada de HSP27 protege neurônios contra a falta de fatores tróficos, um conhecido indutor de apoptose (WAGSTAFF *et al.*, 1999) e inibe a ativação das pró-caspases 9 e 3 (GARRIDO *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000; BRUEY *et al.*, 2000a). Nestes dois casos, não há informações sobre o estado de fosforilação da proteína. Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que a HSP27 pode bloquear a apoptose induzida pelo receptor Fas, mas precisa estar fosforilada para que isso aconteça (CHARETTE & LANDRY, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000). A figura 7 mostra as atuações da HSP27.

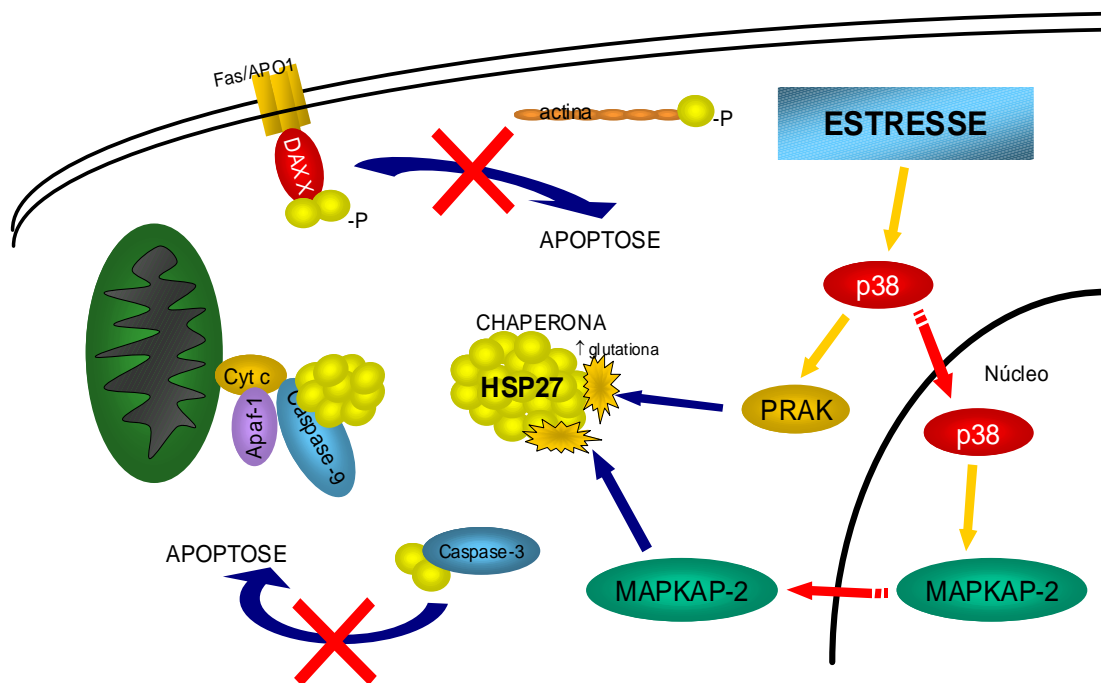


Figura 7: Resumo esquemático da fosforilação e das atuações da proteína HSP27 em resposta a estresse.

Apaf-1: protease ativadora do fator apoptótico-1; Daxx: proteína associada ao domínio de morte Fas; HSP27: proteína de choque térmico 27, MAPKAPK2: proteína cinase ativada pela proteína cinase ativada por mitógenos; PRAK: proteína cinase ativada/regulada pela p38.

Diante de funções tão amplas e tão importantes para a sobrevivência das células, cada vez mais a HSP27 vem despertando a atenção de pesquisadores interessados em neuroproteção.

1.3.2.2. A HSP70

Assim como a HSP27, a HSP70 também possui ação antiapoptótica frente a situações de estresse celular (GARRIDO *et al.*, 2001). Em resposta ao choque térmico em culturas de células hipocâmpais, a HSP70 aumentou a sobrevivência tanto de neurônios quanto de células gliais, sugerindo-se sua presença em ambos os tipos celulares (SATO *et al.*, 1996).

Dentre as atuações da proteína na proteção contra a morte celular, já foram identificados os seguintes alvos:

- 1) Ligação em APAF-1, impedindo a formação do apoptossomo (complexo caspase 9 / APAF-1 / citocromo c), bloqueando assim a via clássica de apoptose (BEERE *et al.*, 2000);
- 2) Ligação e inativação da proteína AIF, liberada da mitocôndria após estresse, diminuindo assim a apoptose independente de caspases (CANDÉ *et al.*, 2002);
- 3) Inibição da via da cinase Jun N-terminal (JNK), uma MAPK responsiva a estresse e com ações pró apoptóticas, dessa forma impedindo a continuação do estímulo por esse caminho (GABAI *et al.*, 1997; MOSSER *et al.*, 1997; GABAI *et al.*, 1998);
- 4) Interação com o fator de transcrição p53, diminuindo seus efeitos após o estresse (JOLLY & MORIMOTO, 2000; GARRIDO *et al.*, 2001; ZYLICZ *et al.*, 2001).

A figura 8 mostra de uma forma simplificada os alvos das proteínas HSP27 e HSP70.

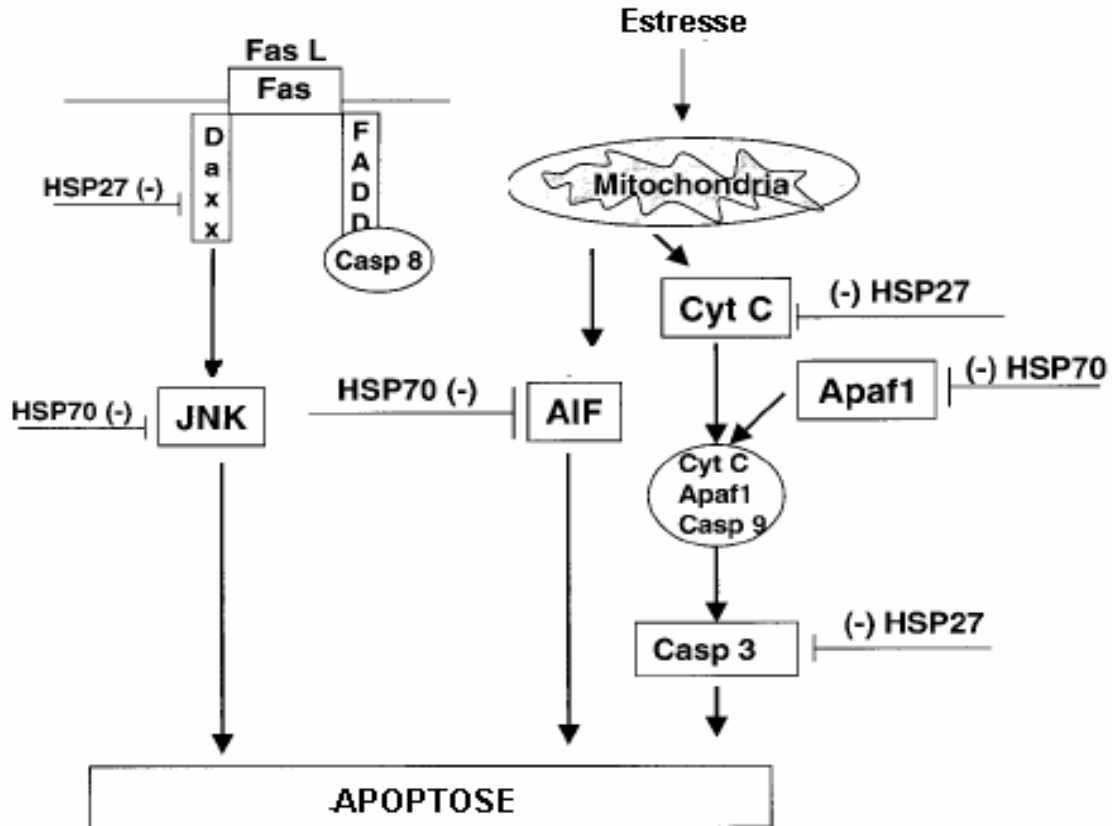


Figura 8: Possíveis alvos das proteínas HSP27 e HSP70 na atenuação da morte celular. Adaptada de GARRIDO *et al.*, 2001.

Apaf-1: protease ativadora do fator apoptótico-1 Daxx: proteína associada ao domínio de morte Fas; HSP: proteína de choque térmico; AIF: fator indutor de apoptose, JNK: cinase Jun N-terminal.

1.3.2.3. As proteínas de choque térmico e a isquemia

Estudos anteriores já demonstraram um aumento da expressão de HSP27 (KATO *et al.*, 1994; CIMAROSTI *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2003) e da HSP70 (KATO *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 2001) após a isquemia. O aumento da expressão dessas proteínas parece estar relacionado à proteção das células nesse tipo de lesão.

2. Objetivos:

O objetivo geral do trabalho foi:

- Estudar as possíveis diferenças moleculares que justifiquem a vulnerabilidade seletiva observada no hipocampo frente a lesão isquêmica.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Obter uma curva temporal da morte celular de culturas organotípicas expostas à privação de oxigênio e glicose;
- Estudar o envolvimento da via de sinalização da PI3K → AKT/PKB na vulnerabilidade seletiva do hipocampo em culturas organotípicas de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose;
- Estudar alterações nas proteínas de choque térmico HSP27 e HSP70 nas diferentes regiões do hipocampo em culturas organotípicas de ratos expostas à privação de oxigênio e glicose.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Animais

Para esse estudo foram utilizados ratos Wistar de 6 a 8 dias de idade (figura 9), procedentes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética a qual responde o Departamento.



Figura 9: Ratos Wistar utilizados nos experimentos

3.1.2. Reagentes e materiais

3.1.2.1. Cultura organotípica

As membranas (30 mm) e as placas de 6 poços, todas descartáveis e estéreis, foram provenientes, respectivamente, da Millicell® – CM, Millipore e da Cell Culture Cluster, Costar®.

As soluções MEM, HBSS e soro de cavalo, para o meio de cultivo, foram provenientes da Gibco. Bicarbonato de sódio (Merck), glicose (Merck), HEPES (Sigma), fungizona (Gibco) e garamicina (Schering-Plough).

Os meios de cultivo e as demais soluções foram esterilizados por filtração com filtros Millex® –GS (0,22 μm), Millipore. A água destilada deionizada era proveniente do aparelho Milli-Q.

3.1.2.2. Privação de oxigênio e glicose e tratamento com LY

Os sais para a confecção dos meios para POG foram CaCl_2 (Merck), KCl (Merck), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Reagen), Na_2HPO_4 (Nuclear), MgCl_2 (Isofar) e MgSO_4 (Riedel).

O iodeto de propídeo (IP) foi proveniente da Sigma e o LY da Calbiochem.

3.1.2.3. Eletroforese e imunodeteção

Acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amônio, β -Mercaptoetanol, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS), Tris hidroximetilaminometano (Tris), tetrametil-etilenodiamina (TEMED), glicina e Tween-20 foram provenientes da Sigma. NaOH, metanol, NaCl e glicerol foram da Merck. Os filmes de raios-X (13X18cm, X-Omat) e as soluções para sua revelação foram da Kodak.

A membrana de nitrocelulose, o anticorpo secundário anti-rabbit peroxidase e os reagentes para a reação de ECL foram provenientes da Amershan. Os anticorpos para anti-pAKT (serina 473) e AKT total foram provenientes da Cell Signalling e os anticorpos para HSP27 e HSP70 da Stressgen.

3.1.2.4. Ensaio de caspases

Os reagentes Triton X-100, CHAPS e BSA foram adquiridos da Sigma e a Sacarose da Synth. As microplacas pretas para leitura da fluorescência foram provenientes da NUNC™ Brand Products.

O inibidor de caspase 3 Z-DEVD-FMK foi proveniente da Enzyme System Products e o substrato das caspases 3 e 7 Ac-DEVD-AMC da Peptide Institute. A

fluorescência foi captada pelo aparelho f-max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation).

3.2. Métodos

3.2.1. A Cultura organotípica

As culturas organotípicas de fatias hipocampais foram preparadas de acordo com o método proposto por STOPPINI e colaboradores (1991). Como interface entre as fatias e o meio de cultivo, foram utilizadas membranas de 30 mm de diâmetro, estéreis, porosas (0,4 μm) e de baixa ligação a proteínas (figura 10).

O meio de cultivo foi uma mistura das soluções MEM (*Minimum Essential Media*) na proporção 50%, HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) na proporção 25% e soro de cavalo na proporção 25%. A essa mistura eram adicionados bicarbonato de sódio 4 mM, HEPES 25 mM, glicose 36 mM, fungizona 1% e gentamicina 36 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ (Tabela 1). O pH do meio era ajustado em 7,3 e, posteriormente, era filtrado em filtros descartáveis, em condições estéreis.

Após a esterilização do material, 1 mL de meio de cultivo foi colocado em cada poço da placa de 6 poços, seguido de 1 membrana (Figura 10). Ratos de entre 6 e 8 dias de idade (3 por placa) foram decapitados, as cabeças imediatamente colocadas em placa de Petri e levadas para a capela de fluxo laminar. Todos os passos seguintes foram realizados dentro da capela, sob estritas condições assépticas. Cada cérebro foi rapidamente removido, os hipocampos dos dois hemisférios dissecados (Figura 10), sendo colocados sobre o disco de Teflon de um fatiador de tecido McIlwain (The Mickle Laboratory Engineering Co). Fatias transversais de 400 μm de espessura foram seccionadas e transferidas para uma placa de Petri contendo HBSS (Tabela 2), pH 7,2, previamente esterilizado, onde foram gentilmente separadas com o auxílio de pincéis.

Tabela 1. Meio de cultivo

COMPOSTO	CONC.
MEM	50%
Soro de cavalo	25%
HBSS	25%
Bicarbonato	4 mM
HEPES	25 mM
Glicose	36 mM
Glutamina	2 mM
Fungizona	1%
Gentamicina	36 μ L/100mL

As fatias da região dorsal do hipocampo foram selecionadas e transferidas para as membranas dentro dos poços da placa de cultivo, usando-se, para isso, uma pipeta Pasteur de plástico, estéril e descartável, de ponta larga. Em cada membrana foram colocadas seis fatias, sendo duas fatias de cada animal.

Tabela 2. HBSS

COMPOSTO	CONC.
CaCl ₂	1,26 mM
KCl	5,36 mM
NaCl	136,89 mM
Glicose	36,08 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄	0,34 mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,49 mM
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,44 mM
HEPES	25 mM
Fungizona	1%
Gentamicina	36 μ L/100mL

Ao final, o meio de cultivo era trocado e a placa de seis poços transferida para uma incubadora a 37°C, com atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. Nesse ambiente, as fatias de hipocampo foram cultivadas por 14 dias, com trocas do meio a cada três dias.



Figura 10: Preparo da placa de cultivo e retirada do hipocampo.

3.2.2. A privação de oxigênio e glicose

Após os 14 dias em cultivo, os poços a serem expostos à POG foram aleatoriamente escolhidos e transferidos para outra placa estéril, onde foram feitas três lavagens com um meio denominado meio de privação de oxigênio e glicose (meio POG) (Tabela 3), previamente filtrado. Na última lavagem, o meio era deixado por 15 minutos com a finalidade de promover a depleção dos estoques de glicose, uma vez que as células em presença de oxigênio e ausência de glicose metabolizam seus estoques internos. A seguir, o meio era rapidamente trocado por outro de idêntica composição, porém nitrogenado para promover a substituição do oxigênio presente. Para isso, o meio POG foi borbulhado com nitrogênio durante 30 minutos antes de ser utilizado (Figura 11).



Figura 11: Nitrogenação do meio de POG e a câmara de anóxia utilizada.

A placa foi então colocada em uma câmara de anóxia, a qual era imediatamente fechada e o oxigênio retirado por esgotamento com N₂ (Figura 11). O conjunto foi mantido dentro de uma estufa a 37°C por 40 ou 60 minutos. (LAAKE, *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2003).

Tabela 3. Meio de POG

COMPOSTO	CONC.
CaCl ₂	1,26 mM
KCl	5,36 mM
NaCl	136,89 mM
Sacarose	36,08 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄	0,34 mM
MgCl ₂	0,49 mM
MgSO ₄	0,44 mM
HEPES	25 mM

Decorridos 40 ou 60 minutos, a placa era retirada da câmara de anóxia, o meio POG rapidamente removido e as membranas lavadas duas vezes com HBSS, previamente esterilizado. A seguir, as membranas eram transferidas para a placa de cultivo original juntamente com os controles e o meio de cultivo era trocado em todos os poços. Finalmente, a placa era transferida para a incubadora, onde permanecia por 24 horas, correspondentes ao período de recuperação. Na vigésima terceira hora após a exposição a POG o corante Iodeto de Propídeo (IP) na concentração final de 7,5 µM era adicionado ao meio de cultivo, ficando em contato com o tecido durante a última hora do período de recuperação. Ao final, as fatias foram observadas ao microscópio de fluorescência com luz ultravioleta e fotografadas, conforme descrito adiante. Para os experimentos de obtenção de uma curva de incorporação de iodeto após a POG, o corante era adicionado imediatamente após o término da lesão.

3.2.3. O tratamento com LY

Após 14 dias em cultivo, as culturas foram tratadas com LY, inibidor da PI3K. O meio de cultivo foi trocado por outro similar, porém com apenas 2,5% de soro de cavalo, 6 horas antes do tratamento. A redução faz-se necessária para atenuar a ativação das vias de sinalização, uma vez que sua quantidade para o cultivo (25%) é muito alta.

As doses utilizadas no trabalho foram 10 μM e 50 μM . O LY permaneceu no meio de cultivo durante as 22 horas de observação. A droga foi diluída em DMSO, o qual foi adicionado também aos poços controle. Quando necessário, o inibidor de caspase Z-DEVD-FMK foi adicionado na dose 30 μM , 1 hora antes do tratamento com o LY, sendo também mantido durante o período de observação. O IP 7,5 μM foi adicionado juntamente com o LY, permanecendo na cultura durante todo o período de monitoramento.

3.2.4. Avaliação da morte celular por análise da incorporação de iodeto de propídeo e microscopia de fluorescência

O dano celular nas Culturas Organotípicas foi avaliado usando-se o corante de exclusão Iodeto de Propídeo (IP), que é excluído de células saudáveis. Com a perda da integridade da membrana, o corante entra rapidamente nas células, liga-se ao DNA exposto, e adquire uma coloração vermelho brilhante fluorescente quando exposto a luz ultravioleta. A entrada de IP na célula é um indicativo de dano significativo na membrana (MACKLIS & MADISON, 1990).

As culturas foram analisadas 21 horas (no caso dos experimentos com LY) ou 24 horas (no caso da POG) pós-lesão, com objetiva de 4X. Para registrar a emissão de fluorescência do IP usou-se um microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE 300). Os comprimentos de onda de excitação e emissão do IP são, respectivamente, 545 e 610 nm. Para isto foi utilizado filtro G-2A, que permite a passagem de comprimentos de onda entre 510-560 nm, para excitação, e

bloqueia comprimentos de onda abaixo de 590 nm, para emissão (adaptado de NORABERG *et al.*, 1999).

As imagens fluorescentes foram captadas com câmara digital Sound Vision Inc. Wayland. MA. acoplada ao microscópio.

3.2.5. Quantificação da incorporação de iodeto de propídeo

As imagens das fatias hipocâmpais foram analisadas com o programa de análise de imagens **Scion Image** (www.scioncorp.com).

A morte celular foi expressa como percentagem do dano (BREDEER *et al.*, 2000), o qual foi obtido circulando-se a área total das regiões CA1 e DG separadamente, e mensurando-se a densidade integrada da área (opção *density slice*), a qual quantifica somente os níveis de fluorescência acima da fluorescência de fundo (*background*). Considerava-se a medida da área total como 100% e a área fluorescente (densidade integrada) como área de CA1 ou DG lesionada.

3.2.6. Separação das áreas CA1 e DG do hipocampo

Após serem fotografadas com o IP, as membranas foram cuidadosamente lavadas com solução de Krebs-Ringer gelado (Tabela 4). Com o auxílio de um pincel com cerdas bastante finas, as fatias hipocâmpais foram retiradas da membrana de cultivo e transferidas para uma placa de Petry, onde, usando-se um bisturi, foram separadas as regiões CA1 e DG, conforma mostrado na figura 12. Todo esse procedimento foi realizado no gelo.

As regiões eram transferidas para tubos identificados usando-se uma pipeta Pasteur de plástico com quantidades suficientes de solução Krebs-Ringer. O excesso de solução era retirado das amostras e essas eram lisadas na solução específica para cada ensaio.

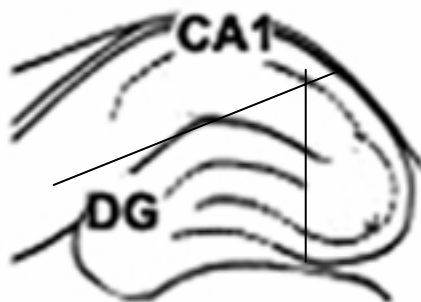


Figura 12: Representação esquemática dos cortes para a separação das regiões CA1 e DG do hipocampo.

Tabela 4. Solução de Krebs Ringer

COMPOSTO	CONC.
NaCl	124 mM
KCl	4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
Na-HEPES (pH 7,4)	25 mM
Glicose	12 mM
CaCl ₂	1 mM

A solução de lise para o ensaio de caspases era uma solução tamponada fosfato (PBS) e Triton X-100 0,2% gelado. As amostras foram lisadas em 60 μ L dessa solução, dissociadas com seringas de 1 mL, centrifugadas a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante foi separado e congelado.

Tabela 5. Solução de lise para eletroforese unidimensional (Solução A)

COMPOSTO	CONC.
SDS	4%
EDTA	2,1 mM
Tris	50 mM

A composição da solução de lise para a eletroforese encontra-se na tabela 5. As amostras foram lisadas em 40 μ L de Solução A, aquecidas a 100° C por 10 minutos, dissociadas com seringa e foram retirados 10 μ L para a dosagem de proteínas. Após a retirada da alíquota adicionou-se 12 μ L da Solução B (Tabela 6),

juntamente com 5% de β -mercaptoetanol, agitou-se e as amostras foram congeladas.

Tabela 6. Solução de lise para eletroforese unidimensional (Solução B).

COMPOSTO	CONC.
Glicerol	40%
Tris	50 mM
Água (Milli-Q)	q.s.
Azul de bromofenol	q.s.

3.2.7. A dosagem de proteínas

Nas amostras utilizadas para o ensaio de caspase utilizou-se o método do BCA (Pierce) para a dosagem de proteínas, pois a presença de Triton X-100 nessas amostras impede a utilização do método de Lowry, comumente usado em nosso laboratório.

Nas amostras a serem submetidas a eletroforese as proteínas eram quantificadas pelo método de Peterson (PETERSON, 1977).

3.2.8. Ensaio de caspases

Placas pretas de 96 poços foram utilizadas para o ensaio. Em cada poço era adicionado o tampão de ensaio (Tabela 7), pH 7,5; 30 μ g de proteína da amostra e o substrato das caspases 3 e 7 (Ac-DEVD-AMC) numa concentração final de 20 μ M. A presença de caspases ativadas na amostra irá clivar o substrato entre o aspartato e a AMC, liberando a fluorescência da AMC, que pode ser captada em fluorímetro usando-se um comprimento de onda de excitação de 370 nM e um comprimento de onda de emissão de 460 nM. Foi usado um fluorímetro de microplacas f-max Microplate Reader para a leitura. O tempo de leitura foi de 2 horas, com intervalos de 30 segundos. Durante esse período, as amostras foram mantidas a 37°C.

Para o cálculo da atividade das caspases, foram utilizadas as equações de reta do resultado dado pelo aparelho ($y = ax + b$), assumindo-se a inclinação da

reta igual a velocidade de clivagem. Os resultados estão expressos em fmol de substrato clivado/ μ g de proteína/minuto.

Tabela 7. Solução tampão para o ensaio de caspases

COMPOSTO	CONC.
Sacarose	0,1 g/mL
CHAPS	0,001 g/mL
BSA	0,0001 g/mL
HEPES-NaOH	0,024 g/mL

3.2.9. Eletroforese e eletrotransferência

Para a eletroforese unidimensional foram utilizados mini-géis de poliacrilamida, na concentração de 12% em acrilamida. Em cada poço foram aplicados o correspondente a 35 μ g de proteína das amostras. Para isso utilizou-se o sistema de mini-géis da Bio Rad (Figura 13) e as condições de corrida foram 110 V e 80 mA, em um tempo aproximado de 1 hora e 30 minutos.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose através do sistema semi-seco (*semidry electroblotter*, Trans-blot RD®, Bio Rad) (Figura 13). O sistema foi montado sobre o ânodo do aparelho da seguinte forma: duas folhas de papel filtro Watman N° 3, a membrana de nitrocelulose, o gel contendo as proteínas de interesse e, novamente, duas folhas de papel filtro. As folhas de papel e a nitrocelulose apresentavam a mesma dimensão do gel a ser transferido e todos foram previamente embebidos em tampão Bjerrum (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%). A membrana de nitrocelulose permaneceu 15 minutos neste tampão, para hidratar, e o gel foi apenas brevemente mergulhado. Bolhas de ar entre os papéis e entre o gel e a membrana foram evitadas com o auxílio de um tubo de ensaio molhado em tampão. Sobre este sistema foi colocado o cátodo.

As condições de transferência foram as seguintes: 15 V de voltagem, 1,5 mA /cm² de corrente e 60 minutos (Figura 13).

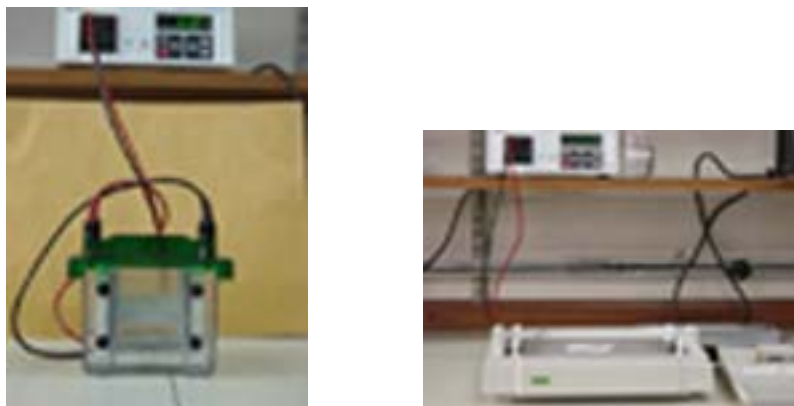


Figura 13: Aparelho para eletroforese unidimensional em mini-géis e aparelho de eletrotransferência (blotter semi-dry).

3.2.10. Imunodeteção

Após a eletrotransferência, a membrana de nitrocelulose era incubada com solução de M-T-TBS (*milk*-Tween-TBS), que consiste de 5% de leite em pó desnatado sem qualquer suplementação vitamínica e de sais (Elegê) em tampão Tris (Tris 20 mM, NaCl 500 mM adicionado de 0,05% de Tween-20; pH 7,5) por, no mínimo, 3 horas. Esta etapa serve para bloquear os poros da nitrocelulose, impedindo a ligação inespecífica de anticorpos. Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes de 5 minutos com T-TBS. A seguir, foram incubadas com o primeiro anticorpo, que poderia ser: anti-pAKT (serina473) (1:1000), anti-AKT (1:1000), anti-HSP27 (1:1000) ou anti-HSP70 (1:1000), por 12 horas em média, sob agitação suave. Os anticorpos foram diluídos em M-T-TBS. Após a incubação com o primeiro anticorpo, as membranas de nitrocelulose foram novamente lavadas três vezes, por 5 minutos T-TBS para a colocação do segundo anticorpo.

Para os três primeiros anticorpos primários procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-IGg de coelho conjugado a peroxidase (1:1000) por 2 horas. Para o anticorpo da HSP70, usou-se o anticorpo secundário anti-IGg de camundongo conjugado a peroxidase também na concentração 1:1000 e pelo mesmo período de incubação. Logo após, as membranas foram lavadas cinco

vezes de 5 minutos com T-TBS e permaneceram em TBS até a reação de ECL (Enhanced Chemiluminescence), logo na seqüência.

O método do luminol utilizado na reação de ECL serve para a identificação da reação: a peroxidase reage com o reagente de luminol e emite luz, a qual pode ser medida pela impressão do filmes de raio-X. Após serem revelados, os filmes foram escaneados e quantificados utilizando-se o programa OptQuant[®] Packard. O valor obtido fornece a quantidade relativa da proteína imunodetectada.

As amostras de poços controle e de poços POG foram analisadas sempre em uma mesma membrana de nitrocelulose, permitindo que seus valores pudessem ser comparados.

3.2.11. Análise estatística

Os resultados desse trabalho foram analisados utilizando-se o teste estatístico ANOVA, seguido do Teste de Tukey. Quando foram comparadas fatias controle com fatias que sofreram POG usou-se o teste t de Student. Os valores de $p < 0,05$ e $p < 0,001$ foram considerados significativos. O valor de n variou com os experimentos, estando sempre indicado nas figuras.

4. Resultados

4.1. A morte celular em resposta à POG é seletiva

Dados da literatura e achados do nosso laboratório indicam uma maior morte celular na região CA1 do hipocampo após sua exposição a condições de POG. Para a caracterização dessa morte, culturas organotípicas de hipocampo foram expostas à condição de POG por 40 minutos e monitoradas com iodeto de propídio durante o período de recuperação, em intervalos de 4 horas, totalizando 21 horas. O IP foi adicionado ao término da POG e permaneceu no meio de cultura. Os resultados representam a diferença de incorporação de IP entre a fatia exposta à POG e a fatia controle.

Na figura 14 observa-se a incorporação de IP ao longo do tempo após 40 minutos de POG. Podemos perceber um percentual muito alto de morte na região CA1 (62% da área total de CA1 em 21 horas), que começa em 9 horas, sendo que 13 horas após a lesão já se observa um aumento significativo de 26% de células com IP incorporado. A região do giro denteado não apresentou morte celular, confirmando os dados da literatura.

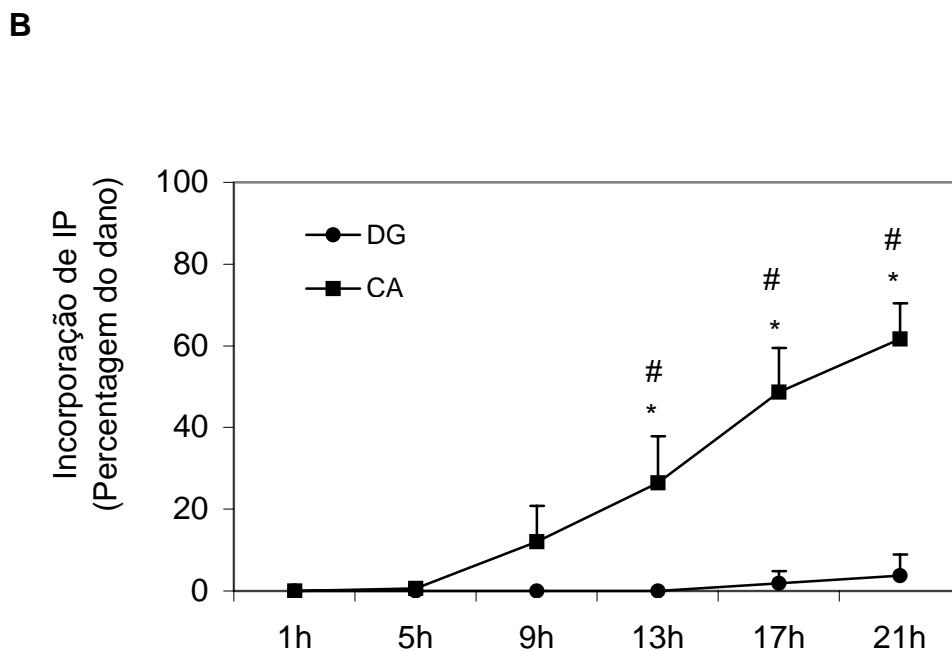
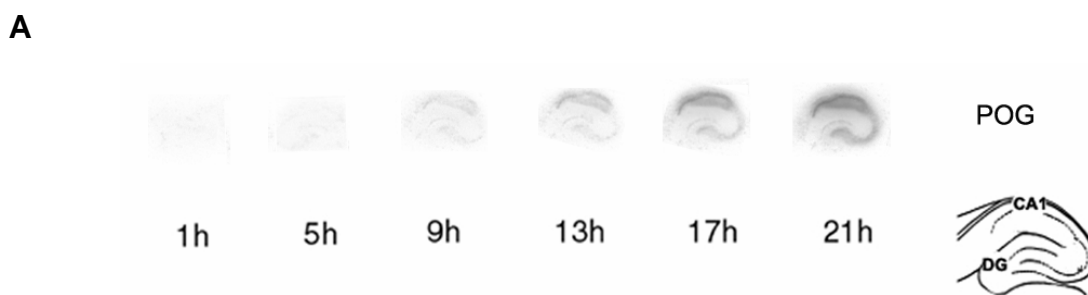


Figura 14: Incorporação de iodeto de propídeo ao longo do tempo em fatias de hipocampo de ratos após exposição a condições de POG por 40 minutos. **A.** Figura representativa das fotos com o passar do tempo. **B.** Curva de incorporação de IP ao longo do tempo.

Os resultados estão expressos em porcentagem do dano em cada região e estão representados como a média \pm desvio padrão ($n=6$). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguida do teste de Tukey.

O asterisco (*) indica diferenças significativas (para $p < 0,05$) em relação ao tempo 1 hora e o sinal # indica diferenças significativas (para $p < 0,05$) entre CA1 e DG.

4.2. Estará a via da PI3K envolvida na vulnerabilidade seletiva do hipocampo?

4.2.1. O inibidor da via e a incorporação de IP

Para investigar o possível envolvimento da via da PI3K no fenômeno da vulnerabilidade seletiva observada no hipocampo, as culturas foram tratadas com um inibidor da via, o LY, e a morte celular foi acompanhada pela observação da incorporação de IP durante 21 horas.

A figura 15 é representativa e mostra fotomicrografias das culturas nos diferentes tempos de tratamento com LY nas concentrações 10 μM e 50 μM . Como pode ser visto, a morte no giro denteado (seta) inicia-se precocemente quando comparada a CA1, nas duas doses testadas. Note que o controle permanece apenas com o nível basal de incorporação, mostrando que o IP não é tóxico às culturas durante esse tempo de exposição.

As figuras 16 e 17 mostram os gráficos da quantificação da incorporação de iodeto após tratamentos com LY 10 μM e LY 50 μM . O valor da quantificação das fatias controle foi novamente descontado do valor da quantificação da incorporação de IP nas fatias tratadas. Os resultados mostram uma incorporação que se inicia antes no giro denteado tanto para a dose de 10 μM (13h em DG *versus* 17 horas em CA1) quanto para a dose de 50 μM (9 horas em DG *versus* 13 horas em CA1). Em 21 horas de tratamento com as doses 10 μM e 50 μM de LY, as regiões CA1 (43% e 92%, respectivamente) e DG (33% e 75%, respectivamente) apresentaram resultados similares de incorporação do corante, mostrando uma intensa morte celular (quanto mais escura a figura, maior a morte), principalmente quando tratadas com a dose de 50 μM . Quando o inibidor da caspase 3 foi adicionado juntamente com o LY 50 μM , observou-se um perfil semelhante ao do tratamento sem o inibidor (dados não mostrados).

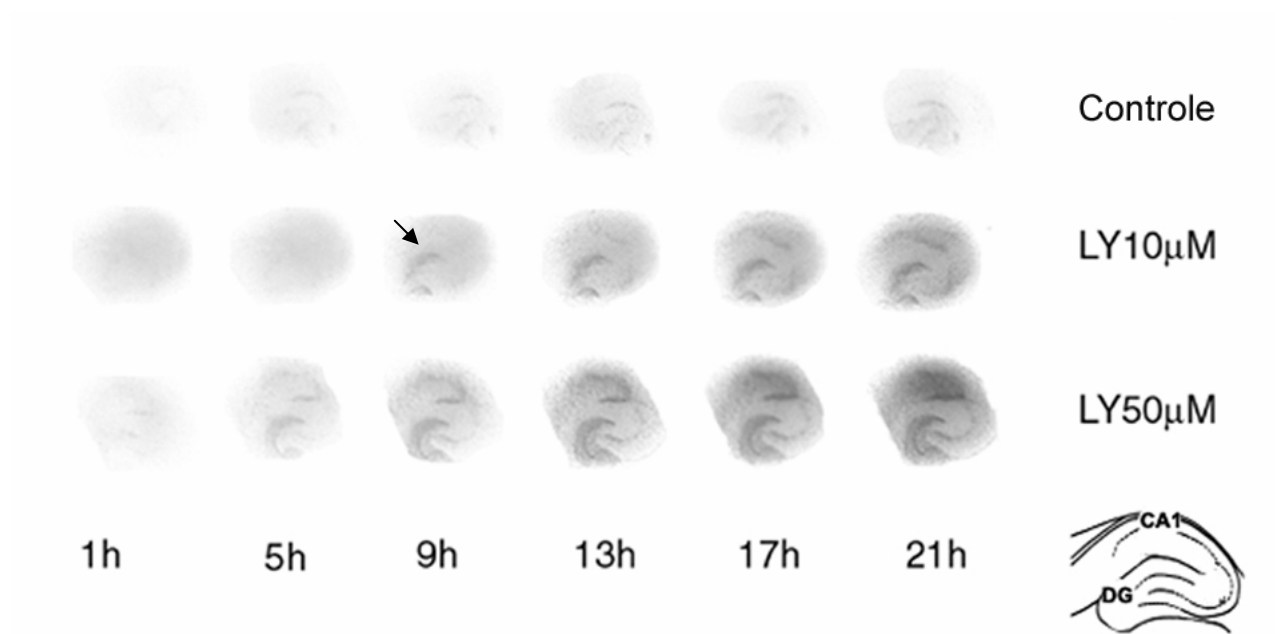


Figura 15: Representação temporal da morte celular induzida pelo tratamento com as doses 10 µM e 50 µM de LY.

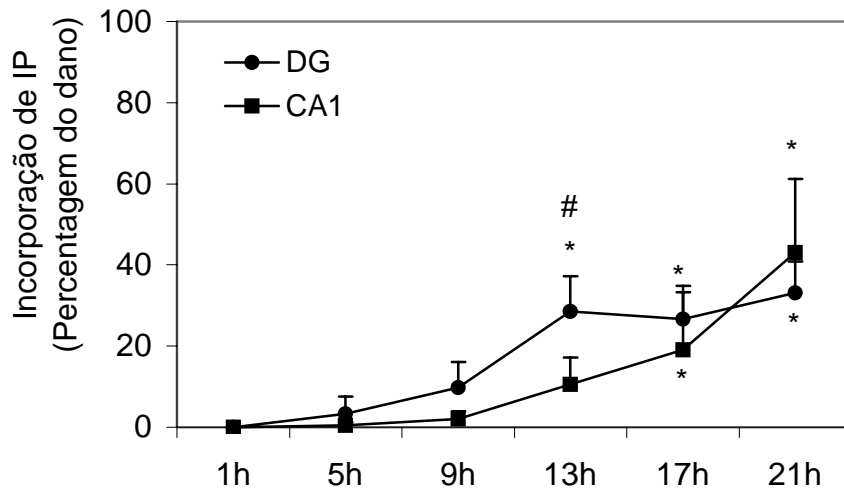


Figura 16: Curva de tempo da quantificação da incorporação de IP às regiões CA1 e DG de culturas organotípicas de hipocampo tratadas com 10 μ M de LY.

Os resultados estão expressos em percentagem do dano em cada região e estão representados como a média \pm desvio padrão (n=7). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguida do teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O asterisco (*) indica diferenças em relação ao tempo 1 hora e o sinal # indica diferenças entre CA1 e DG.

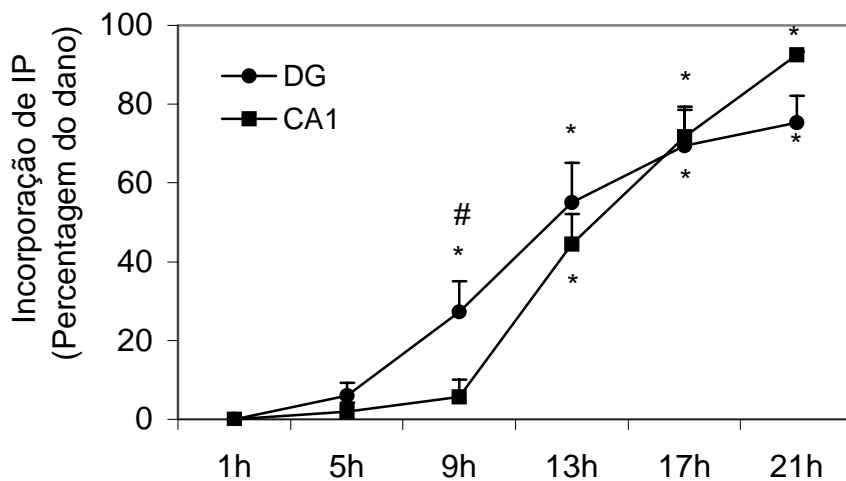


Figura 17: Curva de tempo da quantificação da incorporação de IP às regiões CA1 e DG de culturas organotípicas de hipocampo tratadas com 50 μ M de LY.

Os resultados estão expressos em porcentagem do dano em cada região e estão representados como a média \pm desvio padrão (n=5). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguida do teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O asterisco (*) indica diferenças em relação ao tempo 1 hora e o sinal # indica diferenças entre CA1 e DG.

4.2.2. O inibidor da via da PI3K e a ativação de caspases

Realizamos o ensaio enzimático da ativação de caspases para investigar a morte celular induzida pelo LY.

A figura 18 mostra-nos a ativação das caspases 3 e 7 após o tratamento com LY nas doses 10 μM e 50 μM . Note que apenas a dose de LY 50 μM induz a ativação dessas caspases após 22 horas de tratamento. Como esperado, a ativação foi maior no giro denteado. Quando administrado juntamente com o LY 50 μM , o inibidor de caspase 3 Z-DEVD-FMK diminuiu a ativação desta nas duas regiões, confirmando a observação da ativação de caspases nesse tratamento.

A figura 19 mostra-nos a quantificação da atividade de caspases 3 e 7 induzida pelo LY 50 μM nos tempos 9 horas e 22 horas de exposição à droga. Como podemos perceber, no tempo de 22 horas observa-se ativação nas duas regiões estudadas, ao passo que em 9 horas só encontramos ativação no giro denteado. Esses resultados coincidem com a incorporação de IP onde observamos que, em 9 horas, apenas o DG demonstrava marcação com o corante (Figura 17).

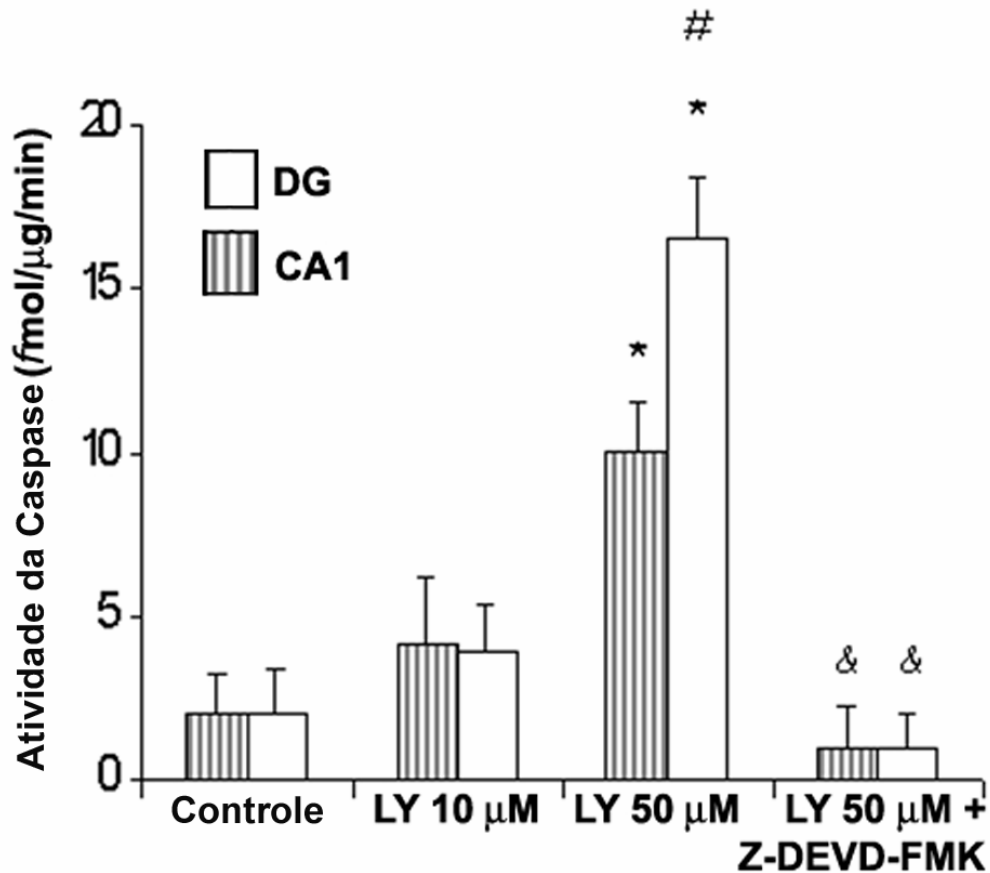


Figura 18: Medida da atividade das enzimas caspase 3 e 7 após 22 horas de tratamento com LY nas doses 10 μM e 50 μM .

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão, sendo $n=3$ experimentos. O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguida do teste de Tukey.

O asterisco (*) indica diferenças em relação ao controle; o sinal # indica diferenças entre CA1 e DG e o sinal & indica diferença em relação ao tratamento com LY 50 μM sozinho, para $p < 0,05$.

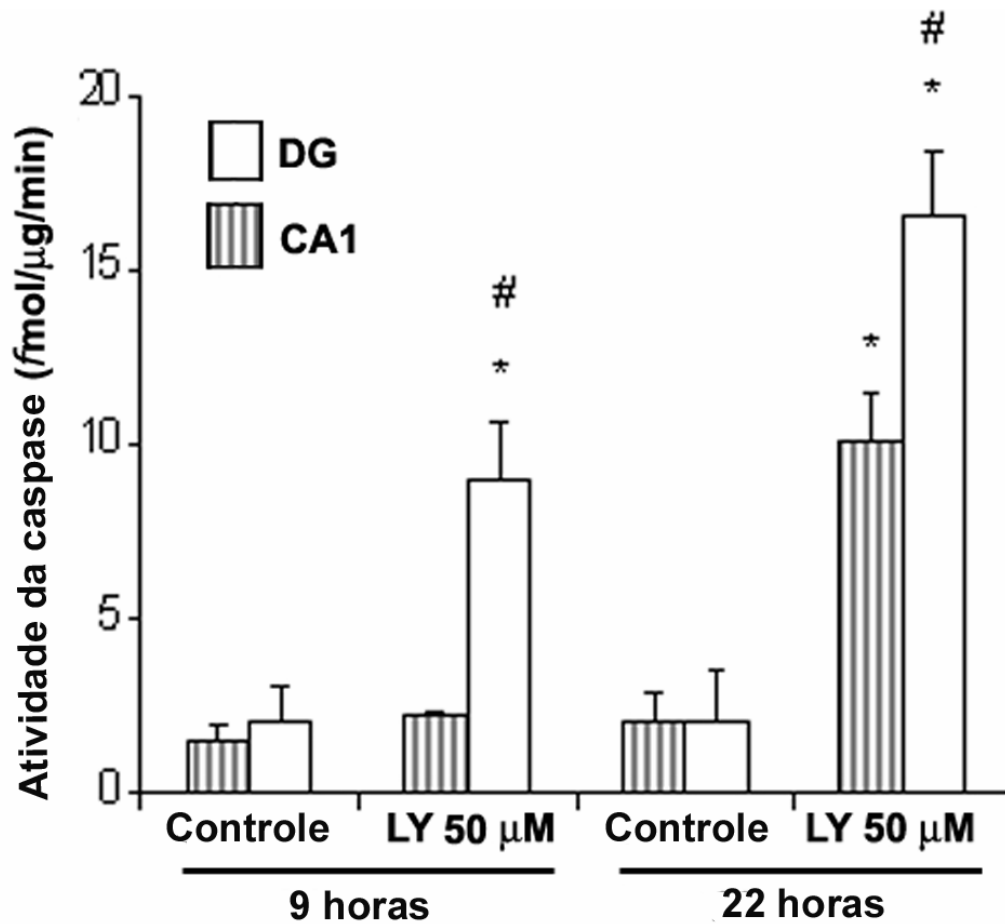


Figura 19: Medida da atividade das enzimas caspase 3 e 7 nos tempos 9 horas e 22 horas após o tratamento com LY na dose 50 μM.

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão, sendo n=3 experimentos. O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguida do teste de Tukey.

O asterisco (*) indica diferenças em relação ao controle e o sinal # indica diferenças entre CA1 e DG, para $p < 0,05$.

4.2.3. A proteína cinase AKT participa desse processo?

Convencidos de um possível envolvimento da via que envolve a PI3K na vulnerabilidade seletiva das culturas, o passo seguinte foi investigar um de seus alvos: a proteína antiapoptótica AKT. Escolhemos uma lesão por POG de duração 60 minutos para o estudo das possíveis alterações nessa proteína.

Foram analisados diferentes tempos de recuperação (30 minutos, 6 horas e 24 horas), como mostrado nas figuras 20 e 21. Os resultados mostraram que tanto a fosforilação quanto o imunoconteúdo da AKT não são alterados após 60 minutos de POG seguida de nenhum dos tempos estudados.

A figura 21 mostra a quantificação da relação da fosforilação com o imunoconteúdo, mais uma vez mostrando que não há alteração em nenhum dos tempos estudados, assim como não se observam diferenças entre as duas regiões analisadas. As bandas correspondentes às amostras do controle foram consideradas como 100% e as demais foram quantificadas em função daquelas.

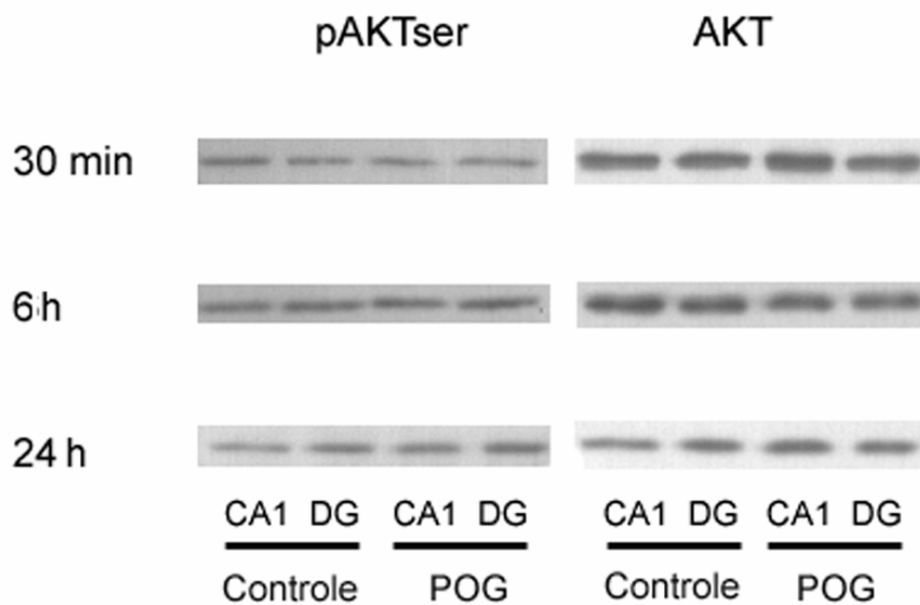


Figura 20: Imunodeteccção da fosforilação e do imunoconteúdo da proteína AKT. Representação dos *immunoblottings* que imunoidentificaram a fosforilação em serina (pAKTser) e o imunoconteúdo da proteína AKT nas regiões CA1 e DG do hipocampo após submissão das culturas à condição de POG por 60 minutos, seguida dos tempos 30 minutos, 6 horas e 24 horas de recuperação.

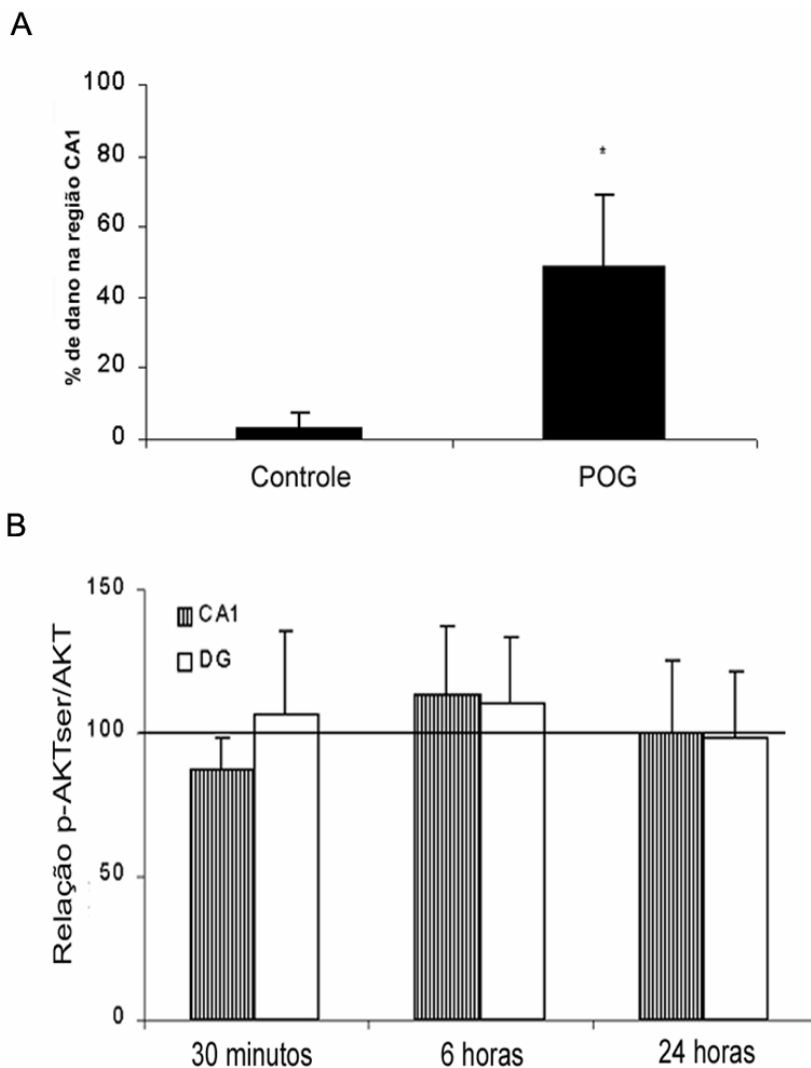


Figura 21: Relação fosforilação/imunoconteúdo da proteína AKT nas regiões CA1 e DG do hipocampo. Quantificação da relação fosforilação/imunoconteúdo da proteína AKT (pAKTser/AKT) nas regiões CA1 e DG do hipocampo após exposição das culturas à condição de POG por 60 minutos, seguida dos tempos 30 minutos, 6 horas e 24 horas de recuperação. O gráfico A mostra-nos o percentual de dano na região CA1 24 horas após a POG, garantindo-nos o estresse sofrido pelas culturas.

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão, sendo $n=5$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA, que não indicou diferença significativa entre os grupos.

4.3. **Estarão HSP27 e HSP70 envolvidas na vulnerabilidade seletiva do hipocampo?**

Para investigar o envolvimento de duas importantes proteínas de choque térmico, HSP70 e HSP27, na vulnerabilidade seletiva, as culturas organotípicas foram expostas, como anteriormente, à POG durante 60 minutos. O imunoconteúdo dessas proteínas foi determinado nos tempos de 6 horas e 24 horas de recuperação, como mostrado na figura 22. Observe também que, quando CA1 e DG são comparados em condições basais, a quantidade de proteína (tanto HSP70 quanto HSP27) presente no giro denteado é sempre maior, o que parece acontecer também após a POG. A comparação entre os tempos 6 horas e 24 horas está dificultada, pois se tratam de experimentos independentes.

A figura 23 mostra-nos um gráfico da quantificação do imunoconteúdo de HSP70 nos dois tempos de recuperação analisados. Após 24 horas de recuperação é possível visualizar um aumento significativo no imunoconteúdo das duas regiões, sendo este muito maior no CA1. Como nesses gráficos o controle CA1 e o controle DG foram tomados como 100%, não é possível visualizarmos a diferença basal que encontramos nas duas regiões, como visto na figura 22.

Na figura 24 temos um gráfico similar ao anterior, porém mostrando o imunoconteúdo da proteína HSP27 nas mesmas condições. Como vemos, não há alteração significativa dessa proteína nas duas regiões nos tempos analisados. Novamente os controles foram considerados como 100%.

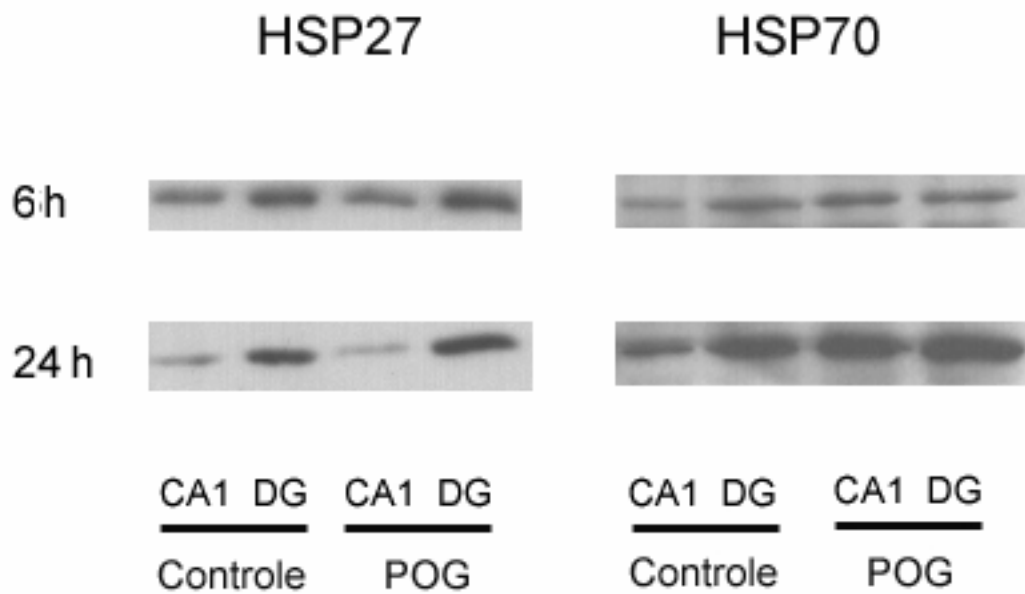


Figura 22: Imunodeteccão das proteínas HSP27 e HSP70 nas regiões CA1 e DG do hipocampo. Representação dos *imunoblottings* que imunoidentificaram as proteínas HSP27 e HSP70 nas regiões CA1 e DG do hipocampo após submissão das culturas à condição de POG por 60 minutos, seguida dos tempos 6 horas e 24 horas de recuperação.

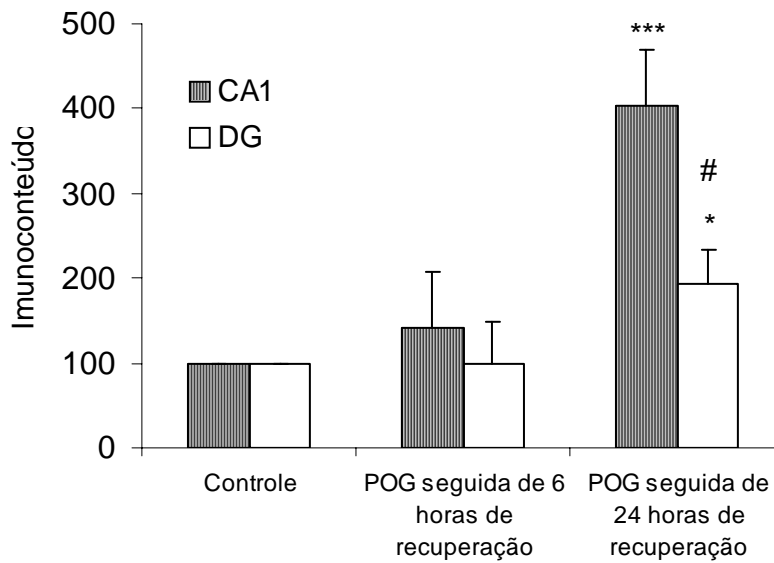


Figura 23: Imunoconteúdo da proteína HSP70 nas regiões CA1 e DG do hipocampo. Quantificação do imunoconteúdo da proteína HSP70 nas regiões CA1 e DG do hipocampo após exposição das culturas à condição de POG por 60 minutos, seguida dos tempos 6 horas e 24 horas de recuperação.

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão, sendo $n=6$ (tempo de 6 horas) ou $n=4$ (tempo de 24 horas). O teste estatístico utilizado foi ANOVA seguida do teste de Tukey.

O asterisco (*) indica diferença em relação ao controle ($p < 0,05$); os três asteriscos (***) indicam diferença em relação ao controle ($p < 0,001$) e sinal # indica diferenças entre as duas regiões ($p < 0,01$).

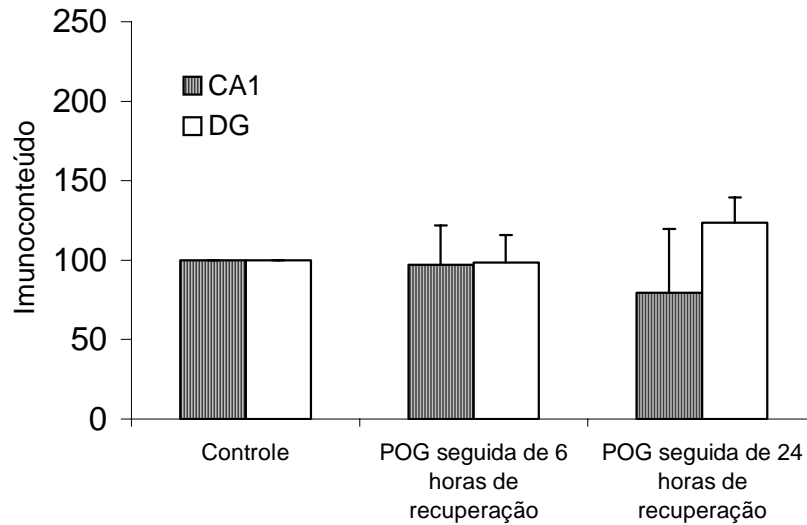


Figura 24: Imunoconteúdo da proteína HSP27 nas regiões CA1 e DG do hipocampo. Quantificação do imunoconteúdo da proteína HSP27 nas regiões CA1 e DG do hipocampo após exposição das culturas à condição de POG por 60 minutos, seguida dos tempos 6 horas e 24 horas de recuperação.

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão, sendo $n=6$. O teste estatístico utilizado foi ANOVA, que não indicou diferença entre os grupos.

5. Discussão

O DG é a região do hipocampo mais resistente a isquemia, excitotoxinas, hipóxia e hipoglicemia (TASKER *et al.*, 1992; ABDEL-HAMID & TYMIANSKI, 1997; PRINGLE *et al.*, 1997b; BERNAUDIN *et al.*, 1998), vindo daí o nosso interesse nas suas características bioquímicas. Com o objetivo de estudar as diferenças entre as regiões CA1 e DG, nossa primeira pergunta foi: sabendo que o DG é mais resistente, será que a via da PI3K é mais ativa nessa região?

O primeiro passo do trabalho foi a realização de uma curva de tempo de análise da morte celular após a POG no nosso modelo. Em trabalhos anteriores no nosso laboratório (CIMAROSTI *et al.*, 2001; VALENTIM *et al.*, 2003) foram analisadas as alterações no período 24 horas pós-lesão, visando a morte celular tardia observada após o dano isquêmico.

No presente trabalho o objetivo foi avaliar o efeito da POG sobre proteínas também na fase anterior à morte celular, sendo para isso necessário o estabelecimento de uma curva de tempo de recuperação, para caracterizar o período de início da morte.

Para isso realizamos a experiência descrita na figura 14. Os resultados mostraram que em 13 horas de recuperação após o término da POG já é possível observar uma morte significativa em CA1, confirmando que nosso modelo realmente apresenta um desenvolvimento do quadro pós-isquêmico precoce em relação ao modelo *in vivo*, onde a morte em CA1 ocorre do 2º ao 4º dia após as condições isquêmicas (ORDY *et al.*, 1993; DIRNAGL *et al.*, 1999).

Com base nos resultados da curva de tempo, escolhemos os tempos de recuperação de 30 minutos, 6 horas e 24 horas após a exposição às condições de POG para a análise das proteínas de interesse. Os tempos mais curtos (30 minutos e 6 horas) foram testados principalmente para investigar alterações na fosforilação da proteína cinase AKT, e o tempo mais longo (24 horas) para possíveis alterações no imunoconteúdo desta. Alguns autores já mostraram alteração na fosforilação da proteína AKT em ser473 após a isquemia *in vivo*, sempre em períodos inferiores a

6 horas de recuperação (OUYANG *et al.*, 1999; NAMURA *et al.*, 2000; FRIGULS *et al.*, 2001; JANELIDZE *et al.*, 2001; KAWANO *et al.*, 2002).

Para responder à pergunta descrita no primeiro parágrafo nosso alvo foi a via de sinalização que envolve a PI3K, conhecidamente uma via antiapoptótica. Vários trabalhos já mostraram interações principalmente da proteína AKT, substrato da PI3K, com vias indutoras de morte, inibindo caspase 9, BAD, FKHR, GSK3, dentre outras (COFFER *et al.*, 1998; DOWNWARD, 1998; DATTA *et al.*, 1999). A figura 6 mostra algumas dessas interações.

Os resultados deste trabalho com LY mostraram que a inibição da via PI3K→AKT induz morte tanto nos neurônios da área CA1 quanto nos neurônios do DG, embora a cinética de morte no DG seja mais rápida. Os resultados visualizados nas figuras 15 a 19, mostraram uma maior sensibilidade do DG à inibição da via da PI3K, sugerindo que ela possa ser importante para a resistência e sobrevivência dessa região. O efeito do LY foi dose e tempo dependente.

Os resultados com a incorporação do IP mostraram que, após 21 horas de tratamento, as duas regiões parecem apresentar o mesmo percentual de morte (Figuras 15 a 17), sugerindo que a morte esteja ocorrendo na mesma intensidade, tanto nos neurônios piramidais de CA1 quanto nos neurônios granulares do DG. O que parece acontecer é uma morte precoce no DG quando comparado ao CA1, para ambas as doses testadas.

Para confirmar a possível diferença na resposta entre CA1 e DG ao tratamento com LY, realizamos o ensaio fluorogênico da atividade das caspases 3 e 7 (Figuras 18 e 19). Esse ensaio mostrou que, para a dose de LY 50 μ M, há atividade de caspases 3 e 7 na região CA1 em 22 horas, mas que é menor que a observada no DG, permitindo-nos sugerir que a apoptose no DG está ocorrendo em maior intensidade. A figura 19 mostra que em 9 horas de tratamento com LY 50 μ M essas caspases estão ativadas apenas no DG, confirmando os resultados obtidos com o IP (Figura 17). É interessante notar que, quando foi usado o inibidor da caspase 3 (efetora), observou-se uma reversão completa da ativação das caspases.

Com base nos resultados anteriores foram formuladas as perguntas: 1. Será que a via da PI3K é a via antiapoptótica mais importante do DG? Há mais vias atuantes em CA1, que fazem com que ele seja mais resistente à inibição da via da PI3K? e 2. Será que a PI3K é a via mais importante nas duas regiões, estando num nível basal mais alto no DG, possibilitando assim sua morte precoce quando este é exposto ao inibidor?

Na tentativa de responder à segunda pergunta realizamos experiências para investigar a proteína cinase AKT (Figuras 20 e 21), substrato muito bem descrito da PI3K (COFFER *et al.*, 1998). As culturas foram expostas a POG e investigamos alterações na fosforilação e no imunoconteúdo da proteína AKT nas duas regiões do hipocampo: CA1 e DG. Contudo, nenhuma alteração foi encontrada nessa proteína após 60 minutos de POG seguida de nenhum dos tempos de recuperação analisados (Figura 21). O imunoconteúdo e a fosforilação basal em CA1 e DG é semelhante nas duas regiões (Figura 20), levando-nos à conclusão que ambas possuem as mesmas condições de serem protegidas da morte celular por essa proteína.

Como referido anteriormente, muitos pesquisadores já mostraram alterações na proteína AKT após isquemia *in vivo* utilizando ratos (OUYANG *et al.*, 1999; FRIGULS *et al.*, 2001; JANELIDZE *et al.*, 2001) ou “gerbils” (NAMURA *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2001; KAWANO *et al.*, 2002). No presente trabalho, utilizando um modelo *in vitro* que simula a isquemia *in vivo*, não observamos alterações nessa proteína. Acreditamos que a resposta para essa discrepância seja o fato das condições de cultura serem por si só um ambiente que ativa essas vias, deixando-as com um nível basal bastante alto. Em adição, a quantidade de soro utilizada (25%) pode estar superativando essas vias. Entretanto, a redução do soro durante a recuperação, adotada por alguns autores, pode induzir um estresse ainda maior. Já vimos em nosso laboratório que 2,5% de soro nessas culturas por 24 horas aumentam a fosforilação da AKT em serina473.

Em um estudo utilizando culturas de neurônios hipocampais expostas a glutamato, Kitagawa e colaboradores (KITAGAWA *et al.*, 2002) mostraram aumento na fosforilação da AKT em serina473 nos tempos 15 minutos e 60 minutos após a

excitotoxicidade induzida pelo glutamato. A fosforilação retornou aos níveis normais em 3 horas. Os autores não observaram alteração na fosforilação da AKT em treonina308 e, curiosamente, alterações na atividade da proteína, mostrando que não basta fosforilação em serina473 para que a proteína exerça sua função, embora a fosforilação deste resíduo seja uma condição indispensável para a atividade da AKT (KITAGAWA *et al.*, 2002). Como não observamos alteração na fosforilação, pressupomos que a atividade dessa proteína não está sendo aumentada pela POG em nosso modelo.

Nossos resultados sugerem que a AKT pode não estar envolvida na resistência do DG à POG, embora a maior sensibilidade do DG ao tratamento com o inibidor da PI3K seja um indício de que uma via ativada pela PI3K esteja envolvida na vulnerabilidade seletiva. Outras proteínas podem estar envolvidas na neuroproteção regulada por PI3K, entre as quais encontra-se a proteína PDK-1, capaz de interagir com vias como PKC, ERK e com a proteína p70S6K, que podem proteger a célula principalmente ativando a transcrição de genes capazes de codificar proteínas que atenuam a morte, como, por exemplo, MnSOD (MÄNTYMAA *et al.*, 2000; KIS *et al.*, 2003). Potencialmente essas outras vias ativadas por PI3K, que não a da AKT, podem estar envolvidas na proteção dos neurônios granulares presentes na região do DG, protegendo-o da morte celular induzida por POG. Possivelmente essas vias envolvem PKC, ERK e p70S6K, justamente pela sua capacidade de responder aos estresses protegendo a célula.

Como já revisado na introdução, vários estudos demonstraram que as HSPs, principalmente a HSP27 e a HSP70, são induzidas por estresse. Essas proteínas possuem atividade antiapoptótica frente a estresses em geral (GABAI *et al.*, 1997; GARRIDO *et al.*, 1999; BEERE *et al.*, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2001; CANDÉ *et al.*, 2002), podendo assim proteger as células da morte celular. Baseados nesses dados surgiu mais uma pergunta: estarão as HSPs 27 e 70 envolvidas na resistência do DG às condições de POG?

Conforme visto na figura 24, não foram observadas alterações no imunoconteúdo da proteína de choque térmico HSP27 após a exposição das culturas organotípicas de hipocampo a 60 minutos de POG seguida dos tempos de

6 horas e 24 horas de recuperação. Esse resultado não nos permite descartar que essa proteína esteja envolvida na vulnerabilidade seletiva, uma vez que seu estado de fosforilação também é importante e pode estar relacionado a sua atividade antiapoptótica (GARRIDO *et al.*, 1999; CHARETTE *et al.*, 2000). Valentim e colaboradores mostraram em 2003 que períodos curtos de privação de oxigênio e glicose (5, 10 e 20 minutos), visando o pré-condicionamento isquêmico, levam ao aumento do imunocontéudo da HSP27 tanto em CA1 quanto em DG, sendo observada uma diminuição no estado de fosforilação dessa proteína em CA1 e, ao contrário, um aumento da sua fosforilação em DG, o que sugere que a fosforilação esteja envolvida na capacidade protetora dessa proteína (VALENTIM *et al.*, 2003). Infelizmente não foi possível o estudo da fosforilação da HSP27 nesse trabalho. O porquê de não termos encontrado nenhuma alteração no imunocontéudo após a lesão por 60 minutos de POG ainda é uma incógnita. A variabilidade entre as amostras era bastante grande, refletindo uma limitação técnica.

Analisando a proteína HSP70, observamos um aumento do seu imunocontéudo na região CA1 24 horas após a lesão, sendo esse aumento muito maior do que o seu aumento observado no DG (Figura 23). Isso nos leva a pensar que o estresse provocado pelas condições de POG é maior em CA1, fazendo com que a expressão dessa HSP seja muito maior. O fato da HSP70 ser encontrada tanto em neurônios quanto em células gliais (SATO *et al.*, 1996) faz com que seu aumento seja significativo quando comparado ao da HSP27, que se especula exista principalmente nos astrócitos (KATO *et al.*, 1995). Esses resultados estão de acordo com a observação de outros pesquisadores, que mostraram que a HSP70 é induzida pelo estresse causado pela POG (KATO *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 2001).

Os resultados sobre o imunocontéudo em condições basais dessas duas proteínas de choque térmico permitiram-nos observar diferenças entre as regiões CA1 e DG. Observamos, para ambas as HSPs, uma quantidade basal muito maior no DG (Figura 22). Com base nesses resultados, sugerimos que a presença constitutiva maior dessas proteínas na região do DG possa estar relacionada com a resistência observada nessa região em resposta às lesões.

As HSPs, conforme descrito na literatura, são capazes de bloquear a morte celular interagindo com proteínas indutoras da morte em vários pontos da via apoptótica (GABAI *et al.*, 1997; GARRIDO *et al.*, 1999; BEERE *et al.*, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2001; CANDÉ *et al.*, 2002). Dentre essas proteínas podemos citar o fator indutor de apoptose (AIF), o citocromo c, a caspase 9, a protease ativadora do fator apoptótico-1 (APAF-1), a caspase 3, dentre outras (GARRIDO *et al.*, 1999; BEERE *et al.*, 2000; BRUEY *et al.*, 2000b; PANDEY *et al.*, 2000; CANDÉ *et al.*, 2002). Como outros autores já demonstraram o envolvimento dessas proteínas na morte induzida pela isquemia (RAY *et al.*, 2000; CAO *et al.*, 2001; NIWA *et al.*, 2001; ZHAN *et al.*, 2001; CHO *et al.*, 2004), as HSPs podem realmente estar envolvidas no processo de resistência observado no DG e, conseqüentemente, envolvidas na vulnerabilidade seletiva do hipocampo.

6. Conclusões

Nossos resultados permitiram que chegássemos às seguintes conclusões:

- A morte celular após exposição da cultura organotípica de hipocampo às condições de POG ocorre apenas no CA1, começando por volta de 13 horas após a indução da lesão;
- Em nosso modelo tanto a região CA1 quanto a região do DG mostraram-se sensíveis à inibição da via da PI3K;
- O giro denteado é mais sensível à inibição da via da PI3K que a região do CA1, sugerindo-se que o DG seja mais dependente dos efeitos antiapoptóticos dessa via;
- A proteína cinase AKT não mostrou alterações no seu estado de fosforilação e no seu imunoconteúdo após a POG nas primeiras 24 horas após a lesão, parecendo não estar envolvida na vulnerabilidade seletiva observada no hipocampo;
- O imunoconteúdo da proteína HSP70 aumenta em ambas as regiões estudadas 24 horas após a POG, sendo este aumento maior no CA1;
- A quantidade basal da HSP27 e da HSP70 é maior no DG, sugerindo-nos que sejam importantes na resistência dessa região às lesões.

7. Perspectivas

- Responder às questões: Será que a via da PI3K é a via antiapoptótica mais importante do DG? Há mais vias atuantes em CA1, que fazem com que ele seja mais resistente à inibição da via da PI3K? Para isso pretendemos utilizar também inibidores de proteínas como p38 e ERK, para ver quais seus efeitos em CA1 e DG.
- Investigar um possível envolvimento da PDK-1, também substrato de PI3K, na vulnerabilidade seletiva do hipocampo, utilizando anticorpos específicos para essa proteína, bem como para seus substratos p70S6K e ERK.

8. Artigo submetido

**ARTIGO 1: Investigation of the involvement of the PI3K pathway
in the selective vulnerability to ischaemic cell death of regions
within the rat hippocampus**

Submetido ao periódico *Neuroscience Letters* em junho de 2004.

Investigation of the involvement of the PI3K pathway in the selective
vulnerability to ischaemic cell death of regions within the rat
hippocampus

Ana Paula Horn¹, Daniéli Gerhardt¹, Augusto Bencke Geyer¹, Lauren Valentim¹,
Helena Cimarosti¹, Alexandre Tavares¹, Fabiana Horn², Guido Lenz² and
Christianne Gazzana Salbego¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo I, 90035.003, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS,
Av. Bento Gonçalves, 9500-Prédio 43422, 91501.970, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author:

Christianne Gazzana Salbego¹ (salbego@terra.com.br)

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo I, 90035.003, Porto Alegre,
RS, Brazil

Phone: +55 (51) 3316.5570

FAX: +55 (51) 3316.5535

ABSTRACT

Involvement of the phosphoinositide 3-kinase pathway in the selective vulnerability of the CA1 and dentate gyrus (DG) regions of the hippocampus to ischaemia-induced cell death was investigated using organotypical cultures. Cultures were exposed to 10 μ M or 50 μ M LY294002, a PI3K inhibitor, for up to 21 hours. Propidium iodide staining and caspase 3 and 7 activity was increased in both hippocampal regions, but this occurred earlier in the DG when compared to the CA1. Other cultures were exposed to 60 minutes of oxygen and glucose deprivation. AKT phosphorylation and immunopositivity were not altered in either region, suggesting that phosphorylation of this protein at Serine473 was unrelated to the selective vulnerability to ischaemia. Our results suggest that PI3K pathway may be involved in the selective vulnerability of rat hippocampus to ischaemia, as a PI3K inhibitor differentially affected cell survival in the DG and the CA1 regions, but in an ischaemic model this did not lead to differences in AKT phosphorylation.

Key words: selective vulnerability, PI3K-AKT pathway, organotypic cultures, hippocampus, oxygen/glucose deprivation, LY294002.

The mechanisms that target specific neuronal populations for degeneration in human brain diseases remain unknown, despite many recent advances.

Selective neuronal vulnerability is a feature of neurodegenerative diseases, certain types of epilepsy and ischaemic insults [2,17]. Understanding the biochemical basis of neuronal vulnerability, therefore, has the potential to provide insight into the pathogenesis of some of the major causes of neurological morbidity and mortality across a wide range of age groups.

The hippocampus is one of the most sensitive regions of the brain to the effects of global cerebral ischaemia and within the hippocampus distinct subfields show differential vulnerability to cell death: the CA1 pyramidal neurons are vulnerable, whereas the dentate gyrus (DG) granular cells are resistant [14]. This differential pattern of damage of CA1 versus preservation of DG creates an ideal situation for comparing cell death vulnerability in areas within the same part of the brain.

Organotypic slice cultures of hippocampal tissue have been used to study neuronal death induced by treatments such as hypoxia/aglycemia, excitotoxins and neurotoxins [2,18]. This *in vitro* technique is a very useful tool for studying the physiological and pharmacological properties of neuronal circuits with the major advantages of this method being simplicity and well preserved organotypic organization of the tissue [15].

There is increasing evidence that neuronal cell death after ischaemia can be due to apoptosis caused by an unbalance in signaling events, among which the PI3K - AKT pathway is believed to be an important anti-apoptotic signal in neurons [10,19]. AKT is a downstream kinase of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in growth

factor mediated signaling cascades and phosphorylation of residues Thr-308 and Ser-473 is required for its activity. This kinase can be phosphorylated by PDK1 and PDK2 or by PI3K directly. Active AKT mediates its anti-apoptotic effects by phosphorylating, among others, Bad, caspase 9, forkhead-related transcription factors, GSK3 β , NF κ B and CREB [3,5,6].

The aim of the present study was to investigate the involvement of the PI3K - AKT pathway in the selective vulnerability to ischaemia observed in the CA1 area of the hippocampus compared with the resistant DG area. For this purpose we used organotypic hippocampal cultures. We first treated the CA1 and the DG cultures with LY294002, a PI3K inhibitor, in order to block the anti-apoptotic effects of PI3K and to determine the rates of cell death and caspase activation. We subsequently treated CA1 and DG cultures with oxygen and glucose deprivation (OGD) to compare the effects of this insult on AKT phosphorylation and protein levels.

Organotypic hippocampal cultures were prepared according to the method of Stoppini et al., 1991 [15]. Hippocampal slices were obtained from 6-8-day-old Wistar rats by removing the brain, dissecting hippocampi and making transverse slices (400 μ M), using a McIlwain tissue chopper. Slices were separated in a Hank's balanced salt solution (Gibco) supplemented with 25 mM HEPES, 1% Fungizone and 36 μ l/100ml gentamicin, pH 7.2. Six slices were placed on one Millicell culture insert (Millicell-CM, 0.4 μ m) and the inserts were transferred to a six-well culture plate (Cell Culture Cluster, Costar) with 1 ml of culture medium consisting of 50% minimum essential medium (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) and 25% HBSS (Gibco), supplemented with: glucose 36 mM, glutamine 2 mM, HEPES


25 mM and NaHCO₃ 4 mM (final concentrations). Fungizone 1% and garamicine 36 µl/100 ml were added to the medium. The pH was adjusted to 7.3 with NaOH and immediately after the solution was filtered (Millex-GS, Millipore). The plates were then placed in an incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The medium was changed every 3 days and experiments were carried out after 14 days *in vitro*.

After 14 days *in vitro* cultures were treated with LY294002 (Calbiochem) at concentrations of 10 µM or 50 µM. This drug was diluted in DMSO, which was also added to control slices. Six hours before treatment, the culture medium was replaced by a similar medium, but with 2.5% of serum. LY294002 was added and maintained in the medium during the observation period. When indicated, 30 µM of the caspase 3 inhibitor Z-DEVD-FMK (Enzyme System Products) was added 1 hour before the treatment and also maintained during the observation period.

The induction of OGD was based on the method described by Strasser and Fischer, 1995 [16] with some modifications [2]. Cultures were carefully rinsed twice with OGD medium composed of CaCl₂ 1.26 mM, KCl 5.36 mM, NaCl 136.9 mM, H₂PO₄ 0.34 mM, MgCl₂ 0.49 mM, MgSO₄ 0.44 mM, HEPES 25 mM, pH 7.2. Slices were left in 1 ml of OGD medium for 15 minutes, and then incubated in a medium with the same composition but previously bubbled with nitrogen for 30 minutes. They were transferred to an anaerobic chamber at 37°C with N₂-enriched atmosphere and left in these conditions for 60 minutes. Slices were washed twice with HBSS and returned to normal culture conditions for 30 minutes, 6 hours or 24 hours (reperfusion times).

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake [2,12,18]. PI 7.5 μ M (Sigma) was added immediately after the treatment and death was monitored during the first 21 hours, taking pictures at 1, 5, 9, 13, 17 and 21 hours after treatment. PI is excluded from healthy cells, but following loss of membrane integrity it enters cells, binds to DNA and becomes highly fluorescent. Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter. Images were captured and analyzed using Scion Image software (www.scioncorp.com). The area where PI fluorescence was detectable above background levels was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared with the total CA1 and DG area to obtain the percentage of damage.

To measure caspase activity, organotypic slices were separated into CA1 and DG areas using scalpel and brush. We were unable to separate the hilus from the DG area (insert in figure 1A). After separation, the tissue was lysed on ice-cold PBS and Triton X-100 0.2%. The extract was centrifuged at 10,000 x g for 5 minutes and supernatant was collected. Protein content was assayed by the BCA method (Pierce). For each experiment, 30 μ g of protein was incubated with a reaction buffer containing (g/ml): Sucrose 0.1, CHAPS 0.001, BSA 0.0001 and HEPES-NaOH 0.024, pH 7.5. The caspases 3 and 7 substrate Ac-DEVD-AMC (Peptide Institute) was present at a final concentration of 20 μ M. Caspases 3 and 7 cleave the substrate between aspartate and AMC, releasing the fluorescent AMC, which can be quantified by fluorimetry in a *f*max Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, California, USA), using an excitation wavelength of 370 nm

and an emission wavelength of 460 nm. The fluorescence intensity was calibrated with standard concentrations of AMC, and the caspase 3 activity was calculated using the slope of the accumulated fluorogenic product and expressed in *fmols* per minute per μg of protein. 

To investigate AKT phosphorylation and protein levels, CA1 and DG samples (35 μg) were resolved by SDS-PAGE in 12% minigels (Bio-Rad Systems). After electrophoresis minigels were blotted onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry blotting system (Bio-Rad Trans-Blot SD). The membranes were blocked overnight with 5% powdered milk in tween-Tris-buffered saline (M-T-TBS). Primary antibody was incubated overnight at 4°C in M-T-TBS (p-AKTser473, 1:1000, Cell Signalling, AKT, 1:1000, Cell Signalling). After washing, the membranes were incubated for 2 hours with secondary antibody (anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated, 1:1000, Amersham). The chemiluminescence (ECL, Amersham) was detected using X-ray films (Kodak X-Omat). The films were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using OptiQuant software. For each experiment, control was considered 100%.

All results are presented as means \pm SD. Data were analyzed by ANOVA, followed by Tukey's test. *P* values < 0.05 were taken to indicate statistical significance.

Treatment of organotypic hippocampal cultures with 10 μM or 50 μM of the PI3K inhibitor LY294002 induced cellular death as shown by propidium iodide staining (Figure 1). The effect was time and dose dependent indicating that a basal activity of this pathway is necessary for neuronal survival in the CA1 and DG areas

of the hippocampus. Contrary to excitotoxic or ischaemic-like insults, the treatment with 50 μM of LY294002 induced death earlier in DG when compared to the CA1 area, as shown by PI staining and caspase assay (Figures 1 and 2). At a dose of 10 μM of LY294002, neurons in the DG area began to die 4 hours before CA1 (13 hours and 17h hours, respectively), and with 50 μM we observed the same pattern, with DG dying by 9 hours and in the CA1 only after 13 hours (Figure 1).

In order to investigate whether LY294002 kills cells by classical apoptosis, we carried out a fluorogenic assay for the effector caspases 3 and 7. LY294002 induced caspase activity only at a dose of 50 μM , and this activity was completely inhibited in both areas by Z-DEVD-FMK, a caspase 3 inhibitor (Figure 2A). A higher caspase activity can be seen on DG region, which again began earlier than for the CA1 region. Nine hours after treatment, DG shows caspase activity whereas CA1 remains at control levels. Twenty-two hours after treatment, CA1 also shows activation of caspases, but at a significantly lower level when compared to DG (Figure 2B).

These results confirm that PI3K activity is fundamental for the signaling homeostasis that keeps neuronal cells from entering apoptosis, probably protecting both resistant and vulnerable cells from ischaemia and excitotoxicity. Furthermore, they indicate that there is no constitutive block of apoptotic mechanisms downstream of PI3K in the DG area that is responsible for its resistance to ischaemia. From the temporal differences between DG and CA1 sensitivity to PI3K inhibition, we conclude that the DG area is more sensitive to a decrease in PI3K activity, suggesting the following possibility: in DG area, the PI3K - AKT is the main

anti-apoptotic pathway, whereas in the CA1 area, other anti-apoptotic pathways are also functional, making the CA1 region more resistant to PI3K inhibition. Alternatively PI3K - AKT is the main anti-apoptotic pathway in both areas, but the DG area has a higher basal level of PI3K-AKT and a higher level of pro-apoptotic signaling mechanisms that become active on inhibition of PI3K.

In order to test these possibilities, we prepared organotypic slices of CA1 and DG and measured the levels of total AKT, as well as its phosphorylation status at Ser473, a site whose phosphorylation status closely correlates with activity of this kinase. We observed no alteration in the amount of AKT or its phosphorylation status at Ser473 at different times after OGD in CA1 or in DG (Figures 3B and 3C). This would suggest that the DG area does not have a higher basal level of PI3K/AKT signaling when compared to CA1. PI staining of the slices 24 hours after OGD confirmed cell death in the CA1 region, as shown in Figure 3A. Serum reduction and post-treatment with 25% serum over 2 hours increased pAKT by 44%, while not affecting the amount of AKT indicating that changes in pAKT would have been detected had they occurred after OGD treatment (data not shown).

Changes in phosphorylation of AKT in hippocampus after ischaemia *in vivo* was shown in a transient cerebral ischaemia model in Wistar rats, in which the phosphorylation of AKT at Ser473 decreased in the CA1 and DG areas at time zero of reperfusion, increased after 30 minutes and 6 hours of reperfusion and returned to basal level after 24 hours [7,13]. In hippocampal neuronal culture, phosphorylation in Ser473 increased after 15 minutes and 60 minutes following glutamate-induced excitotoxicity, and returned to basal level after 3 hours, with no change in phosphorylation of Thr308 or activity [9]. The reason for an absence of

change in total AKT and Ser473 observed in this study when compared to the *in vivo* study is not known. However, the results shown here indicate that there is no significant change in amount of AKT or pSer473AKT associated with ischaemic cell death. This is in agreement with recent observations that this kind of lesion induced more necrosis than apoptotic cell death in CA1 region *in vitro* [11] and *in vivo* [4].

It is possible that after OGD other effectors of PI3K than AKT are involved, such as PDK1, which can protect cells through p70S6K, PKC and ERK1/2 pathways [1,8]. This would explain the importance of PI3K in hippocampal areas and the absence of alteration in AKT after OGD stress conditions and that DG resistance is linked to pathways other than the AKT. Despite presenting differences between DG and CA1, more studies are necessary to elucidate the mechanism of selective vulnerability in the hippocampal areas.

Acknowledgments:

This work was supported by grants from the Brazilian agencies FAPERGS, PRONEX, CNPq, CAPES and PROPESQ/UFRGS. We thank Michele Bastiani for the help with caspase assay and Peter Dunkley for help with preparation of the manuscript.

REFERENCES:

- [1] Belham, C., Wu, S. and Avruch, J., Intracellular Signalling: PDK1 – A kinase at the hub of things, *Curr. Biol.*, 9 (1999) 93-96.
- [2] Cimarosti, H., Rodnight, R., Tavares, A., Paiva, R., Valentim, L., Rocha, E. and Salbego, C., An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation, *Neurosci. Lett.*, 315 (2001) 33-36.
- [3] Coffey, P.J., Jin, J. and Woodgett, J. R., Protein Kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation, *Biochem. J.*, 335 (1998) 1-13.
- [4] Colbourne, F., Sutherland, G. R., and Auer, R. N., Electron Microscopic Evidence against Apoptosis as the Mechanism of Neuronal Death in Global Ischemia, *J. Neurosci.*, 19 (1999) 4200-4210.
- [5] Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E., Cellular survival: a play in three Acts, *Gene Dev.*, 13 (1999) 2905-2927.
- [6] Downward, J., Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10 (1998) 262-267.
- [7] Kawano, T., Morioka, M., Yano, S., Hamada, J., Ushio, Y., Miyamoto, E. and Fukunaga, K., Decreased Akt activity is associated with activation of forkhead transcription factor after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22 (2002) 926-934.

- [8] Kis, A., Yellon, D. M. and Baxter, G. F., Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 Kinase and p70S6 Kinase, *J. Mol. Cell Cardiol.*, 35 (2003) 1063-1071.
- [9] Kitagawa, K., Takasawa, K., Kuwabara, K., Sasaki, T., Tanaka, S., Mabuchi, T., Sugiura, S., Omura-Matsuoka, E., Matsumoto, M. and Hori, M., Differential Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats, *Neurosci. Lett.*, 333 (2002) 187-190.
- [10] Love, S., Apoptosis and brain ischemia, *Prog Neuro-Psycoph*, 27 (2003) 267-282.
- [11] Naganska, E. and Matyla, E., Ultrastructural characteristics of necrotic and apoptotic mode of neuronal cell death in a model of anoxia in vitro, *Folia Neuropathol.*, 39 (2001) 129-139.
- [12] Noraberg, J., Kristensen, B. W. and Zimmer, J., Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures, *Brain Res. Prot.*, 3 (1999) 278-290.
- [13] Ouyang, Y., Tan, Y., Comb, M., Liu, C., Martone, M. E., Siesjö, B. K. and Hu, B., Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome c, and activation of caspase-like proteases, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 19 (1999) 1126-1135.
- [14] Schmidt-Kastner, R. and Freund, T. F., Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia, *Neuroscience*, 4 (1991) 599-636.
- [15] Stoppini, L., Buchs, P. A. and Muller, D., A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, *J. Neurosci. Methods*, 37 (1991) 173-182.

- [16] Strasser, U. and Fischer, G., Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation, *J. Neurosci. Methods*, 57 (1995) 177-186.
- [17] Valentim, L. M., Geyer, A. B., Tavares, A., Cimarosti, H., Worm, P.V., Rodnight, R., Netto, C. A. and Salbego, C. G., Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus, *Neuroscience*, 107 (2001) 43-49.
- [18] Valentim, L. M., Rodnight, R., Geyer, A. B., Horn, A. P., Tavares, A. A., Cimarosti, H., Netto, C. A. and Salbego, C. G., Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures, *Neuroscience*, 118 (2003) 379-386.
- [19] Yuan, J. and Yankner, A., Apoptosis in the nervous system, *Nature*, 407 (2000) 802-809.

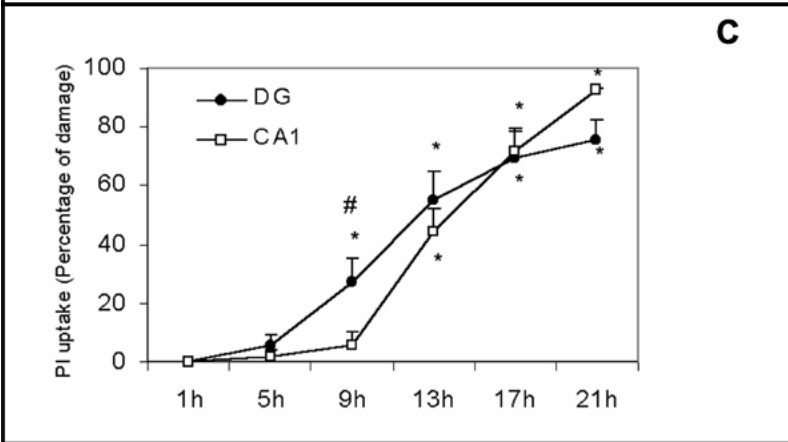
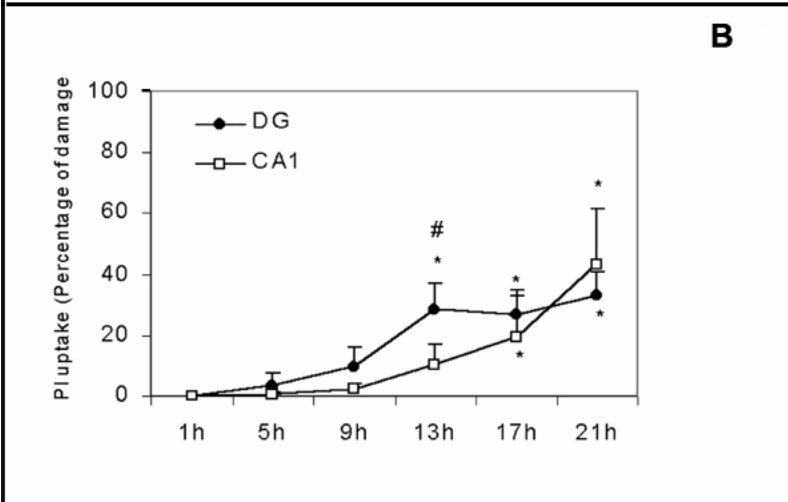
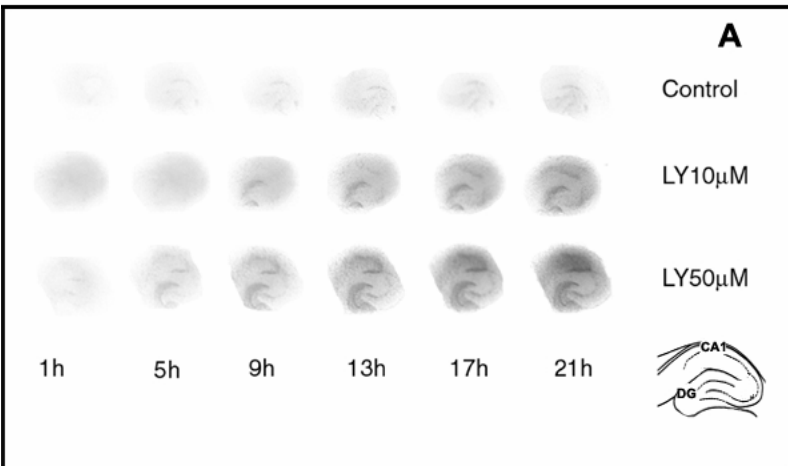
FIGURE LEGENDS:

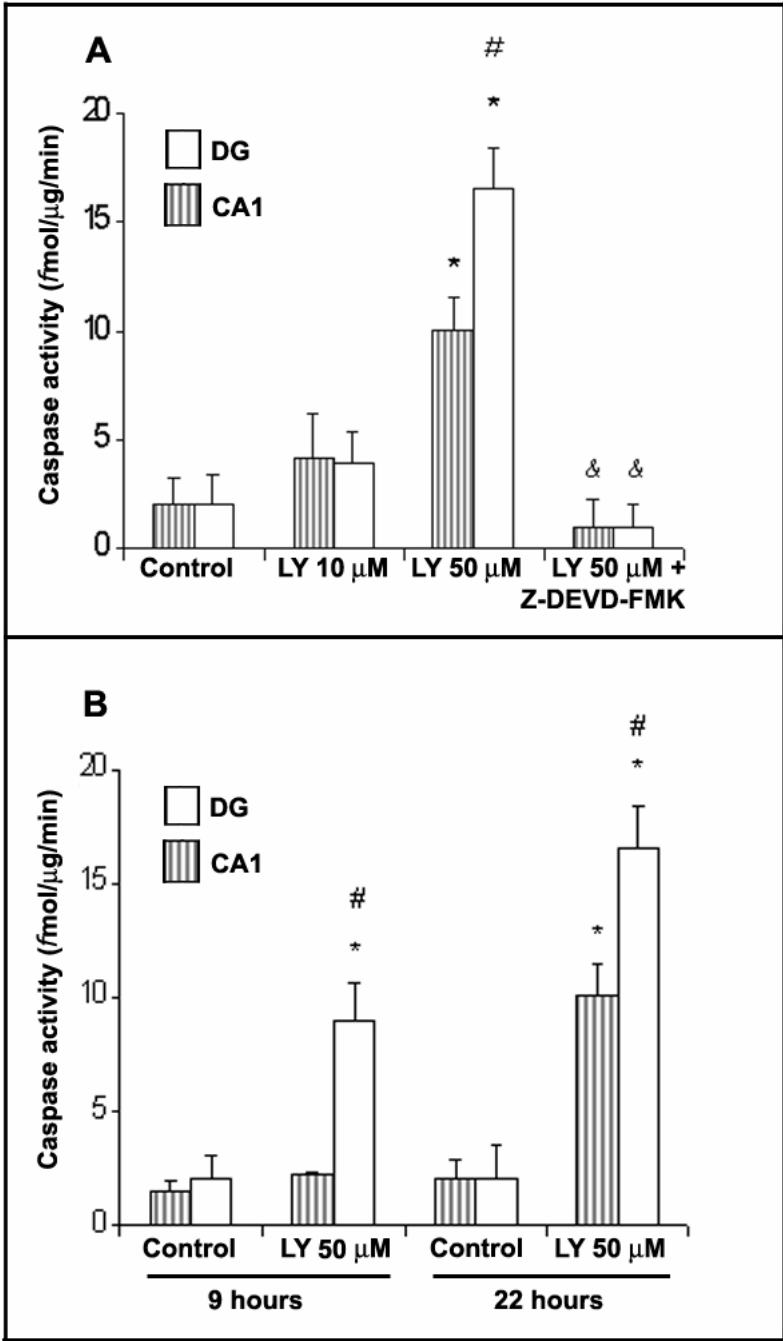
Figure 1: **A)** Representative pictures of slices stained with propidium iodide after treatment with 10 μM and 50 μM of LY294002. Magnitude: 40X. **B)** Effect of LY294002 10 μM and **C)** 50 μM in CA1 and DG areas on propidium iodide staining. Control values were subtracted from treated values and data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. Experiments were carried out at least 6 times. Values of $p < 0,01$ were considered significant. # indicates difference between CA1 and DG areas and * indicates difference from 1 hour time point.

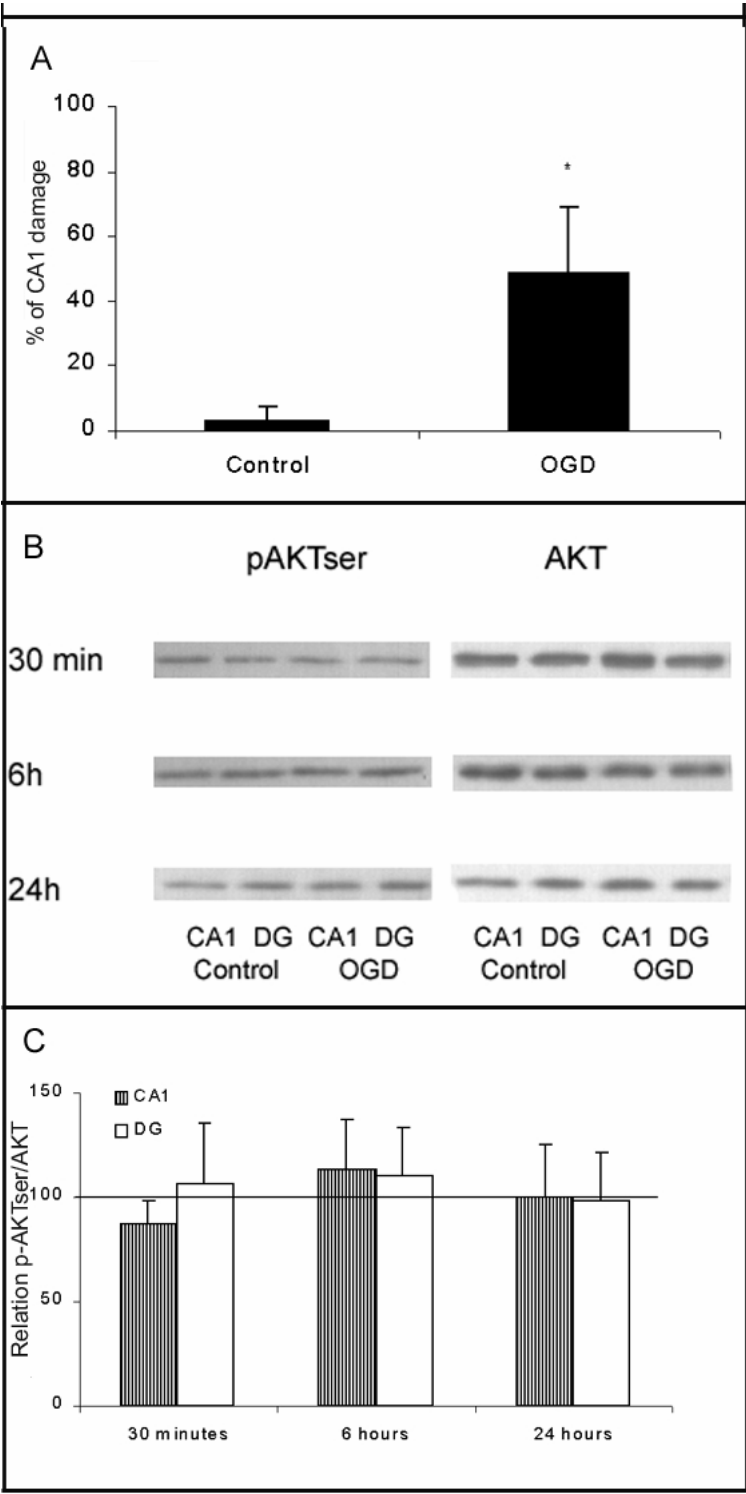
Figure 2: Caspase activity in CA1 and DG areas after treatment of organotypic hippocampal cultures with LY294002. **A)** Death induced by 50 μM of LY294002 increases with time in both areas. **B)** The effect of LY294002 is dose-dependent. The experiments were carried out 3 or 4 times. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and significance was considered $p < 0,01$.

*: different from control; # difference between CA1 and DG area; &: different from treatment with LY 50 μM alone.

Figure 3: Investigation of AKT alteration after 60 minutes OGD. **A)** Propidium iodide staining showing the percentage of damage in CA1 area. Data were analyzed by unpaired t test, $n=16$ and $p < 0,001$. **B)** Representative immunoblot of AKT and pAKTser473 in 30 minutes, 6 hours and 24 hours after OGD. **C)** Relation of pAKTser473 / AKT immunocontent in CA1 and DG areas. Values are mean \pm SD and $n=4$.







9. Referências Bibliográficas

- ABDEL-HAMID, K. M. & TYMIANSKI, M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 3538-3553, 1997.
- ADRAIN, C. & MARTIN, S. J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome c. **Trends Biochem Sci.**, v. 26, p. 390-397, 2001.
- ASCHNER, M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. **Toxicol. Lett.**, v. 102-103, p. 283-287, 1998.
- BARTUS, R. T., DEAN, R. L., MENNERICK, S., EVELETH, D., & LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Res.**, v. 790, p. 1-13, 1998.
- BEERE, H. M., WOLF, B. B., CAIN, K., MOSSER, D. D., MAHBOUBI A., KUWANA, T., TAILOR, P., MORIMOTO, R. I., COHEN, G. M. & GREEN D. R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. 469-475, 2000.
- BELHAM, C., WU, S. & AVRUCH J. Intracellular Signalling: PDK1 – A kinase at the hub of things. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 93-96, 1999.
- BERNAUDIN, M., NOUVELOT, A., MACKENZIE, E. T. & PETIT, E. Selective Neuronal Vulnerability and Specific Glial Reactions in Hippocampal and Neocortical Organotypic Cultures Submitted to Ischemia. **Exp. Neurol.**, v. 150, p. 30-39, 1998.
- BREDER, J., SABELHAUS, C., OPITZ, T., REYMANN, K. & SCHRÖDER, U. Inhibition of different pathways influencing Na⁺ homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. **Neuropharmacol.**, v. 39, p. 1779-1787, 2000.
- BRUCE, A.J., SAKHI S., SCHREIBER, S.S. & BAUDRY, M. Development of kainic acid and N-methyl-D-aspartic acid toxicity in organotypic hippocampal cultures. **Exp Neurol.**, v. 132, p. 209-219, 1995.
- BRUEY, J.M., PAUL, C., FROMENTIN, A., HILPERT, S., ARRIGO, A.-P., SOLARY, E. & GARRIDO, C. Differential regulation of HSP 27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vitro. **Oncogene**, v. 19, p. 4855-4863, 2000a.

- BRUEY, J. M., DUCASSE, C., BONNIAUD, P., RAVAGNAN, L., SUSIN, S. A., DIAZ-LATOUD, C., GURBUXANI, S., ARRIGO, A. P, KROEMER, G., SOLARY, E. GARRIDO, C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat. Cell Biol**, v. 2, p. 645-652, 2000b.
- BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M. J., LIN, M. Z., JUO, P., HU, L. S., ANDERSON, M. J., ARDEN, K. C., BLENIS, J. & GREENBERG, M. E. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. **Cell**, v. 96, p. 857-868, 1999.
- CANDÉ, C., COHEN, I., DAUGAS, E., RAVAGNAN, L., LAROCLETTE N., ZAMZAMI, N. & KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. **Biochimie**, v. 84, p. 215-222, 2002.
- CAO, G., MINAMI, M., PEI, W., YAN, C., CHEN, D., O'HORO, C., GRAHAM, S.H. & CHEN, J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 321-333, 2001.
- CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S. & REED, J. C. Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. **Science**, v. 282, p. 1318-1321, 1998.
- CHARETTE, S. & LANDRY, J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 926, p. 126-131, 2000.
- CHARETTE, S. J., LAVOIE, J., LAMBERT, H. & LANDRY, J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 7602-7612, 2000.
- CHO, S., LIU, D., FAIRMAN, D., LI, P., JENKINS, L., MCGONIGLE, P. & WOOD, A. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal cultures. **Neurochem. Int.**, v. 45, p. 117-127, 2004.
- CIMAROSTI, H., RODNIGHT, R., TAVARES, A., PAIVA, R., VALENTIM, L., ROCHA, E. & SALBEGO, C. An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci. Lett.**, v. 315, p. 33-36, 2001.
- COFFER, P.J., JIN, J. & WOODGETT, J. R. Protein Kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem. J.**, v. 335, p. 1-13, 1998.

- COLBOURNE, F., SUTHERLAND, G. R., & AUER, R. N. Electron Microscopic Evidence against Apoptosis as the Mechanism of Neuronal Death in Global Ischemia. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4200-4210, 1999.
- DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signal to the Cell-Intrinsic Death Machinery. **Cell**, v. 91, p. 231-241, 1997.
- DATTA, S. R., BRUNET, A., & GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Gene Dev.**, v. 13, p. 2905-2927, 1999.
- DE KEYSER, J., SULTER, G., & LUITEN, P. G. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 535-540, 1999.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 391-397, 1999.
- DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p. 262-267, 1998.
- DU, K. & MONTMINY, M. CREB Is a Regulatory Target for The Protein Kinase Akt/PKB. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32377-32379, 1998.
- FAROOQUI, A. A., HAUN, S. E., & HORROCKS, L. A. Ischemia and hypoxia, p. 867-883. **Basic Neurochemistry**. 5. ed., New York, Raven Press, 1994.
- FRANÇOIS, F. & GRIMES, G. M. Phosphorylation-dependent Akt cleavage in neural cell in vitro reconstitution of apoptosis. **J. Neurochem.**, v. 73, p. 1773-1776, 1999.
- FRANTSEVA, M. V., CARLEN, P. I. & VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. **Free Radical Bio Med.**, v. 31, p. 1216-1227, 2001.
- FRIGULS, B., JUSTICIA, C., PALLÀS, M. & PLANAS, A. M. Focal cerebral ischemia causes two temporal waves of Akt activation. **Neuroreport**, v. 12, p. 3381-3384, 2001.
- FULTON, D., GRATTON, J-P., MCCABE, T. J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T. F., PAPAPETROPOULOS, A. & SESSA, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein Kinase Akt. **Nature**, v. 399, p. 597-601, 1999.
- GABAI, V. L., MERIIN, A. B., MOSSER, D. D., CARON, A. W., RITS, S., SHIFRIN, V. I. & SHERMAN M. Y. Hsp70 prevents activation of stress kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 18033-18037, 1997.

- GABAI, V. L., MERIIN, A. B., YAGLOM, J. A., VOLLOCH, V. Z. & SHERMAN, M. Y. Role of HSP70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. **FEBS Lett.**, v. 438, p. 1-4, 1998.
- GÄHWILER, B.H., CAPOGNA, M., DEBANNE, D., MCKINNEY, R.A. & THOMPSON, S.M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 471-477, 1997.
- GARRIDO, C., BRUEY, J.-M., FROMENTIN, A., HAMMANN, A., ARRIGO, A. P. & SOLARY, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **FASEB J.**, v. 13, p. 2061-2070, 1999.
- GARRIDO, C., GURBUXANI, S., RAVAGNAN, L. & KROEMER G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem. Biophys. Res. Co.**, v. 286, p. 433-442, 2001.
- GRAHAM, S. H. & CHEN, J. Programmed cell death in cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 99-109, 2001.
- GUO, Z. & COOPER, F. L. An N-terminal 33-amino-acid-deletion variant of HSP25 retains oligomerization and functional properties. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, v. 270, p. 183-189, 2000.
- HOSSMANN, K. A. Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. **Prog. Brain Res.**, v. 96, p. 161-177, 1993.
- HSU, M., SIK, A., GALLYAS, F., HORVÁTH, Z. & BUSKÁKI G. Short-term and long term changes in the postischemic hippocampus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 743, p. 121-139, 1994.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 132-139, 1997.
- JANELIDZE, S., HU, B.-R., SIESJÖ, P. & SIESJÖ B. K. Alterations of Akt1 (PKB α) and p70^{S6K} in transient focal ischemia. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, p. 147-154, 2001.
- JOLLY, C. & MORIMOTO, R. I. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. **J. National Cancer Institute**, v. 92, p. 1564-1572, 2000.
- JUURLINK, B. & SWEENEY, M. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, p.121-128, 1997.

- KATO, H., LIU, Y., KOGURE, K. & KATO, K. Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. **Brain Res.**, v. 634, p. 235-244, 1994.
- KATO, H., KOGURE, K., LIU, X.H., ARAKI, T., KATO, K. e ITOYAMA, Y. Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.**, v. 679, p. 1-7, 1995.
- KATO, K., ITO, H., IWAMOTO, I., IIDA, K. & INAGUMA, Y. Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. **Cell Stress Chap.**, v. 6, p. 16-20, 2001.
- KAUFMANN, S. H. & HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends Cell Biol.**, v. 11, p. 526-534, 2001.
- KAWANO, T., MORIOKA, M., YANO, S., HAMADA, J., USHIO, Y., MIYAMOTO, E. & FUKUNAGA, K. Decreased Akt activity is associated with activation of forkhead transcription factor after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 22, p. 926-934, 2002.
- KIM, H., HUH, P. W., KIM, C., KIM, Y., PARK, E. & PARK, Y. Cerebral activation and distribution of inducible hsp110 and hsp70 mRNAs following focal ischemia in rat. **Toxicology**, v. 167, p. 135-144, 2001.
- KIRINO, T. Delayed neuronal death. **Neuropathology**, v. 20, p. S95-97, 2000.
- KIS, A., YELLON, D. M. & BAXTER, G. F. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 Kinase. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 35, p. 1063-1071, 2003.
- KITAGAWA, K., TAKASAWA, K., KUWABARA, K., SASAKI, T., TANAKA, S., MABUCHI, T., SUGIURA, S., OMURA-MATSUOKA, E., MATSUMOTO, M. & HORI, M. Differential Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 333, p. 187-190, 2002.
- KLIONSKY, D. J. & EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p. 1717-1721, 2000.
- KOHN, A. D., TAKEUCHI, F. & ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 21920-21926, 1996.
- LAAKE, J.H., HAUG, F.M., WIELOCH, T. & OTTERSEN, O.P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Res. Prot.**, v. 4, p. 173-184, 1999.

- LAMBERT, H., CHARETTE, S. J., BERNIER, A. F., GUIMOND, A. & LANDRY, J. HSP27 Multimerization Mediated by Phosphorylation-sensitive Intermolecular Interactions at the Amino Terminus. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 9378-9385, 1999.
- LARSEN, J. K., YAMBOLIEV, I. A., WEBER, L. A. & GERTHOFFER, W. T. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. L930-L940, 1997.
- LAVOIE, J. N., GINGRAS-BRETON, G., TANGUAY, R. M. & LANDRY, J. Induction of chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock: HSP27 stabilization of microfilament organization. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 3420-3429, 1993.
- LAVOIE, J. N., LAMBERT, H., HICKEY, E., WEBER, L. A. & LANDRY, J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein27. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 505-516, 1995.
- LEIST, M. & JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. 1-10, 2001.
- LEROUX, M. R., MELKI, R., GORDON, B., BATELIER, G., & CANDIDO, P.M. Structure-funcion studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24646-24656, 1997.
- LEWIN, B. **Genes VII**. In: Ciclo celular e regulação do crescimento, p. 829-835. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 2001.
- LI, L. Y., LUO, X. & WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature**, v. 412, p. 95-99, 2001.
- LOETSCHER, H., NIEDERHAUSER, O., KEMP, J. & GILL, R. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? **Drug Discov Today**, v. 6, p. 671-680, 2001.
- LOVE, S. Apoptosis and brain ischemia. **Prog Neuro-Psycoph**, v. 27, p. 267-282, 2003.
- MACKLIS, J. D. & MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Meth.**, v. 31, p. 43-46, 1990.

- MÄNTYMAA, P., SHTONEN, T., GUTTORM, T., SÄILY, M., KINULLA, V., SAVOLAINEN, E. & KOISTINEN P. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. **Brit. J. Haematol.**, v. 108, p. 574-581, 2000.
- MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ARRIGO, A. P. Small Stress Proteins as Novel Regulators Of Apoptosis Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- And Staurosporine-Induced Cell Death. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 16510-16514, 1996.
- MEHLEN, P., MEHLEN, A., GODET, J. & ARRIGO, A.-P. Hsp27 as a Switch between Differentiation and Apoptosis in Murine Embryonic Stem Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 31657-31665, 1997.
- MITANI, A., YANASE, H., SAKAI, K., WAKE, Y., & KATAOKA, K. Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 601, p. 103-110, 1993.
- MOSSER, D. D., CARON, A. W., BOURGET, L., DENIS-LAROSE, C. & MASSIE, B. Role of the human heat shock protein Hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 5317-5327, 1997.
- NAGANSKA, E. & MATYLA, E. Ultrastructural characteristics of necrotic and apoptotic mode of neuronal cell death in a model of anoxia *in vitro*. **Folia Neuropathol.**, v. 39, p. 129-139, 2001.
- NAMURA, S. , NAGATA, I., KIKUCHI, H., ANDREUCCI & ALESSANDRINI, A. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 20, p. 1301-1305, 2000.
- NEW, L., JIANG, Y., ZHAO, M., LIU, K., ZHU, W., FLOOD, L. J., KATO, Y., PARRY, G. C. N., HAN, J. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38MAP kinase. **EMBO J.**, v. 17, p. 3372-3384, 1998.
- NIWA, M., HARA, A., IWAY, T., WANG, S., HOTTA, K., MORI H. & UEMATSU, T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transiente forebrain ischemia. **Neurosci. Lett.**, v. 300, p. 103-106, 2001.
- NORABERG, J., KRISTENSEN, B. W. & ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Res. Prot.**, v. 3, p. 278-290, 1999.

- ORDY, J. M., WENGENACK, T. M., BIALOBOCK, P., COLEMAN, P. D., RODIER, P., BAGGS, R. B., DUNLAP, W. P. & KATEST, B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Exp. Neurol.**, p. 128-139, 1993.
- OUYANG, Y., TAN, Y., COMB, M., LIU, C., MARTONE, M. E., SIESJÖ, B. K. & HU, B. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome c, and activation of caspase -like proteases, **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 19, p. 1126-1135, 1999.
- OZES, O. N., MAYO, L. D., GUSTIN, J. A., PFEFFER, S. R., PFEFFER, L. M. & DONNER, D. B. NF κ B Activation by Tumour Necrosis Factor Requires the Akt Serine-threonine kinase. **Nature**, v. 401, p. 82-85, 1999.
- PANDEY, P., FARBER, R., NAKAZAWA, A., KUMAR, S., BHARTI, A., NALIN, C., WEICHSELBAUM, R., KUFE, D. & KHARBANDA, S. HSP27 functions as negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. **Oncogene**, v. 19, p. 1975-1981, 2000.
- PAP, M. & COOPER, G. M. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 19929-19932, 1998.
- PETERSON, G. L. Simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.
- PHILLIS, J. W., O'REGAN, M. H., ESTEVEZ, A. Y., SONG, D. & VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **J. Neurochem.**, v. 67, p. 1525-1531, 1996.
- PRICE, D. New order from neurological disorders. **Nature**, v. 399, p. A3-A5, 1999.
- PRINGLE, A. K., IANNOTTI, F., WILDE, G. J. C., CHAD, J. E., SEELEY, P. J. & SUNDSTROM, L. E. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. **Brain Res.**, v. 755, p. 36-46, 1997a.
- PRINGLE, A. K., ANGUNAWELA, R., WILDE, G. J., MEPHAN, J. A., SUNDSTROM, L. E. & IANNOTTI, F. Induction of 72-kDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 23, p. 289-298, 1997b.
- RAY, A. M., OWEN, D. E., EVANS, M. L., DAVIS, J. B. & BENHAM, C. D. Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 867, p. 62-69, 2000.

- ROGALLA, T., EHRNSPERGER, M., PREVILLY, X., KOTLYAROV, A., LUTSCH, G., DUCASSE, C., PAUL, C., WIESKE, M., ARRIGO, A.-P., BUCHNER, J. & GAESTEL, M. Regulation of HSP27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 18947-18956, 1999.
- SAMALI, A. & ORRENIUS, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress Chaperon.**, v. 3, p. 228-236, 1998.
- SATO, K., SAITO, H. & MATSUKI, N. HSP70 is essential to the neuroprotective effect of heat-shock. **Brain Res.**, v. 740, p.117-123, 1996.
- SCHMIDT-KASTNER, R. & FREUND, T.F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 4, p. 599-636, 1991.
- SCHNEIDER, G. B., HAMANO, H. & COOPER, L. F. In vivo evaluation of HSP27 as an inhibitor of actin polymerization: HSP27 limits actin stress fibers and focal adhesion formation after heat shock. **J. Cell Physiol.**, v. 177, p. 575-584, 1998.
- SCHREIBER, S. S. & BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus - a role for gene expression. **TINS**, v. 18, p. 446-451, 1995.
- SHARP, F. R., MASSA, S. M. & SWANSON, R. A. Heat shock protein protection. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 97-99, 1999.
- SIEGEL, G. J., AGRANOFF, B. W., ALBERS, R. W. & MOLINOFF, P. B. **Basic Neurochemistry**. New York: Raven Press, 1993.
- STOKOE, D., ENGEL, K., CAMPBELL, D. G., COHEN, P. & GAESTEL M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. **FEBS Lett.**, v. 131, p. 307-313, 1992.
- STOPPINI, L., BUCHS, P.-A. & MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous system. **J. Neurosci. Meth.**, v. 37, p. 173-182, 1991.
- STRASSER, U. & FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **J. Neurosci. Methods**, v. 57, p. 177-186, 1995.
- SUN, H., LESCHKE, R., LI, D.-M., LILIENTAL, J., ZHANG H., GAO, J., GAVRILOVA, N., MUELLER, B., LIU, X. & WU, H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p.6199-6204, 1999.

- SWEENEY, M., YAGER, J. Y., WALZ, W. & JUURLINK, B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, p. 1525-1535, 1995.
- TASKER, R. C., COYLE, J. T. & VORNOV, J. J. The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 4298-4308, 1992.
- TAYLOR, D.; OBRENOVITCH, T. P.; SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neuroch. Res.** v. 21, n. 9, p. 1013-1021, 1996.
- THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.
- TORRIGLIA, A., PERANI, P., BROSSAS, J. Y., ALTAIRAC, S., ZEGGAI, S., MARTIN, E., TRETON, J., COURTIS, Y. & COUNIS, M. F. A caspase-independent cell clearance program. The LEI/L-DNase II pathway. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 926, p. 192-203, 2000.
- VALENTIM, L. M., MICHALOWSKI, C. B., GOTTARDO, S. P., PEDROSO, L., GESTRICH, L. G., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G. & RODNIGHT, R. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunocontent in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 91, p. 1291-1297, 1999.
- VALENTIM, L. M., GEYER, A. B., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., WORM, P.V., RODNIGHT, R., NETTO, C. A. & SALBEGO, C.G. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p. 43-49, 2001.
- VALENTIM, L. M., RODNIGHT, R., GEYER, A. B., HORN, A. P., TAVARES, A. A., CIMAROSTI, H., NETTO, C. A. & SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.
- VAN CRUCHTEN, S. & VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, p. 214-233, 2002.
- WAGSTAFF, M. J. D., COLLAÇO-MORAES, Y. C., SMITH, J., BELLEROCHE, J. S., COFFIN, R. S. & LATCHMAN, D. S. Protection of Neuronal Cells from Apoptosis by Hsp27 Delivered with a Herpes Simplex Virus-based Vector. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 5061-5069, 1999.

- WHITE, B. C., SULLIVAN, J. M., DEGRACIA, D. J., O'NEIL, B. J., NEUMAR, R. W., GROSSMAN L. I., RAFOLS, J. A. & KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J. Neurol. Sci.**, v. 179, p. 1-33, 2000.
- YAKOVLEV, A. G. & FADEN, A. I. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. **NeuroRx**, v. 1, p. 5-16, 2004.
- YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Prog. Neurobiol.**, v. 62, p. 273-295, 2000.
- YANG, G., KITAGAWA, K., OHTSUKI, T., KUWABARA, K., MABUCHI, T., YAGITA, Y., TAKAZAWA, K., TANAKA, S., YANAGIHARA, T., HORI, M. & MATSUMOTO, M. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. **Brain Res.**, v. 870, p. 195-198, 2000.
- YANO, S., TOKUMITSU, H. & SODERLING, T. R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of protein-kinase-B pathway. **Nature**, v. 396, p. 584-587, 1998.
- YANO, S., MORIOKA, M., FUKUNAGA, K., KAWANO, T., HARA, T., KAI, Y., HAMADA, J., MIYAMOTO, E. & USHIO, Y. Activation of Akt/Protein Kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 351-360, 2001.
- YUAN, J. & YANKNER, A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, v. 407, p. 802-809, 2000.
- ZENG, Y.-S. & XU, Z. C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neurosci Res.**, v. 37, p. 113-125, 2000.
- ZHAN, R. Z., WU, C., FUJIHARA, H., TAGA, K., QI S., NAITO, M. & SHIMOJI, K. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 529-540, 2001.
- ZYLICZ, M., KING, F. W. & WAWRZYNOW, A. HSP70 interactions with the p53 tumor suppressor protein. **EMBO J.**, v. 20, p. 4634-4638, 2001.