



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO 17 β -ESTRADIOL EM FATIAS DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATO SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE

ZAMIN, L. L.*; CIMAROSTI, H.**; HORN, A. P.**; FROZZA, R. L.*; BUZIN, L.*; NASSIF, M. C.*; SALBEGO C. G.¹

*Bolsista de Iniciação Científica, **Mestranda,***Doutoranda PPGBioq., ¹Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

TRABALHO PREMIADO COM O 1º LUGAR NO XXIV CAPEC, APRESENTADO PELA PRIMEIRA AUTORA

RESUMO: O cérebro é dependente de um fluxo sanguíneo contínuo para suplemento de glicose e oxigênio. A isquemia cerebral resulta na degeneração celular e perda da sua funcionalidade. Culturas organotípicas representam um modelo *in vitro* que permite estudar o dano cerebral isquêmico. Neste trabalho nós investigamos o efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol num modelo de isquemia *in vitro*. Para mimetizar um insulto isquêmico, fatias de cultura organotípica foram expostas à privação de oxigênio e glicose (POG) usando uma câmara anaeróbica desenvolvida em nosso laboratório. A morte celular foi quantificada pela captação de iodeto de propídio. Houve uma diminuição na incorporação de iodeto de propídeo nas fatias submetidas à POG que receberam tratamento agudo e crônico com 17 β -estradiol (10 nM). Para examinar um possível mecanismo pelo qual 17 β -estradiol previne a morte celular foi avaliado o imunoc conteúdo da enzima pGSK-3 β por *Western Blotting*. Esta enzima ativa vias que levam à morte celular e é inibida por fosforilação. O tratamento agudo e crônico com 17 β -estradiol aumentou a fosforilação de GSK-3 β nas fatias controles e nas submetidas à POG. Esses resultados sugerem que esta é uma possível via pela qual o 17 β -estradiol atua como neuroprotetor, visto que a fosforilação de GSK-3 β inibe sua ação apoptótica.

UNITERMOS: isquemia cerebral, 17 β -estradiol, cultura organotípica, hipocampo, GSK-3 β , neuroproteção

ABSTRACT: EVALUATION OF THE POTENTIAL NEUROPROTECTION OF THE 17 β -ESTRADIOL IN ORGANOTYPIC SLICE CULTURES OF RAT HIPPOCAMPUS EXPOSED TO OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION. The brain is highly dependent on continuous blood flow for oxygen and glucose supply. Brain ischemia results in cellular degeneration and loss of function. Organotypic cultures are an *in vitro* model, which allows the study of the events and mechanisms underlying ischemic brain damage. Here we investigated the neuroprotective effect of 17 β -estradiol in an *in vitro* model of ischemia. To mimic an ischemia, organotypic hippocampal slice cultures were exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD), using an anaerobic chamber developed in our laboratory. Cellular death was quantified by measuring uptake of propidium iodide (PI). A decrease in incorporation of PI was observed in OGD slices both acute and chronic 17 β -estradiol (10 nM) treatment indicating a neuroprotective effect. To examine a possible mechanism by which estradiol prevents cellular death we evaluate the immunoc content of pGSK-3 β by western blot analysis. This enzyme has been shown to trigger cellular death. We have found that acute and chronic treatment with 17 β -estradiol increased the phosphorylation of GSK-3 β in the control and OGD slices. These findings might suggest that this is a possible pathway by which 17 β -estradiol acts as neuroprotective agent, once the phosphorylation of GSK-3 β inhibits its apoptotic action.

KEYWORDS: cerebral ischemia, 17 β -estradiol, organotypic culture, hippocampus, GSK-3 β , neuroprotection

1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas afetam um amplo espectro da população e, na maioria dos casos, levam à incapacidade física e/ou mental. Dentre essas doenças do Sistema Nervoso Central podem ser destacadas as desordens cerebrovasculares que são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Nos Estados Unidos, aproximadamente 600.000 casos são registrados por ano, onde foi estimado um custo total (direto e indireto) de 43 bilhões de dólares em 1998 (21). Acredita-se que no Brasil a importância do problema seja da mesma magnitude.

A isquemia cerebral é caracterizada por uma redução severa ou por um bloqueio completo do fluxo sanguíneo ao cérebro. O “derrame” é a interrupção focal do suprimento de sangue para uma parte do cérebro. Outro exemplo consiste na diminuição transitória do fluxo de sangue para o cérebro inteiro (isquemia global) como ocorre durante uma parada cardíaca (8).

Devido à própria natureza da injúria cerebral isquêmica a lesão resultante é produto da combinação de vários processos fisiopatológicos que interagem de forma complexa. Os principais processos envolvidos são deficiência energética, perda da homeostase iônica celular, acidose, aumento nos níveis de cálcio intracelular e excitotoxicidade mediada por radicais livres (7). É principalmente durante o período de restabelecimento do fluxo sanguíneo à área afetada que ocorre a geração de grandes quantidades de radicais livres, os quais são espécies altamente reativas que promovem dano a lipídios, DNA, carboidratos e proteínas, contribuindo significativamente para a injúria neuronal (29). Até o presente momento, não há qualquer protocolo terapêutico clinicamente eficaz para a prevenção e/ou tratamento das lesões isquêmicas.

Como modelo para o estudo da isquemia cerebral, uma alternativa para a experimentação animal *in vivo* pode ser o uso de sistemas *in vitro* como as culturas organotípicas de hipocampo de ratos expostas à privação de oxigênio e glicose (POG). Este modelo consiste na colocação das culturas hipocâmpais em presença de meio livre de glicose, dentro de uma incubadora com atmosfera anaeróbia (3,4). Os modelos *in vitro* são simples de utilizar e reproduzem vários aspectos da isquemia *in vivo* parecendo ser adequados para a análise de mecanismos envolvidos na morte celular isquêmica em geral, bem como para a investigação de drogas com potencial neuroprotetor. No laboratório, onde se desenvolveu este trabalho, este modelo vem

sendo amplamente utilizado para avaliar o potencial de drogas neuroprotetoras, entre elas o lítio (5) e o extrato de cava-cava (*Piper metisticum*) (manuscrito em preparação).

Os estrógenos são hormônios esteróides que exercem um amplo espectro de efeitos por todo o organismo, incluindo o Sistema Nervoso Central. O potencial efeito neuroprotetor dos estrógenos tem ganhado crescente atenção nos últimos anos e vem sendo alvo de constantes estudos. Dados epidemiológicos demonstraram que fêmeas na pré-menopausa exibem uma menor suscetibilidade ao dano causado pela isquemia do que machos e fêmeas pós-menopausa (14,26). Isto pode ser devido ao fato de que fêmeas pré-menopausa possuem níveis mais altos de estrógenos circulantes, principalmente o 17 β -estradiol. Além disso, o uso de estrógenos pela terapia de reposição hormonal parece diminuir o risco e a severidade de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (37), Parkinson (28) e esquizofrenia (9) e parece melhorar a memória e a cognição (38).

Recentes estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que os estrógenos têm efeito neuroprotetor contra vários insultos tóxicos, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo e toxicidade mediada pelo peptídeo β -amilóide (12), principal componente protéico das placas senis encontrada na doença de Alzheimer. Entretanto, o mecanismo da neuroproteção mediada pelo estradiol está apenas começando a ser elucidado (39).

O efeito neuroprotetor do estradiol pode ser mediado através de mecanismos dependentes ou independentes da ativação dos receptores estrogênicos α e β . Além disso, podem exercer efeitos a nível genômico e não genômico. Os receptores α e β são amplamente distribuídos no Sistema Nervoso Central e, quando ativados, podem levar à alteração da expressão de alguns genes, podendo aumentar a expressão de neurotrofinas e seus receptores e diminuir a expressão de receptores de glutamato (9). Além disso, o estradiol pode ativar diretamente vias de sinalização sem o envolvimento dos receptores (9), e, entre outros, atuar como potente antioxidante diminuindo a peroxidação lipídica (22).

Outro mecanismo proposto para a neuroproteção exercida pelo estradiol é que ele é um potente vasodilatador, o que promove uma melhora na circulação sanguínea após um insulto isquêmico, levando a uma diminuição no tamanho da lesão (18).

Recentemente foi encontrado que tratamento de neurônios corticais com estradiol estimulam a fosforilação de Akt/PKB (*Akt/ Protein Kinase B*), um efetor imediatamente *downstream* da via PI-3K (*phosphatidylinositol-3kinase*), que protegeu as células da neurotoxicidade induzida por glutamato (17), sugerindo que a cascata da PI-3K pode estar envolvida na neuroproteção induzida por estradiol. Além disso, estradiol ativa a cascata das MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (4) que como a via da PI-3K, pode fosforilar e inativar proteínas promotoras da morte celular como a GSK-3 β (*glycogen synthase kinase - 3 β*). O papel da GSK na indução da apoptose ainda não está bem elucidado (20). Porém tem sugerido que a ativação de GSK inibe importantes fatores de transcrição envolvidos na sobrevivência celular como fatores de choque térmico (HSF-1 – *Heat Shock Factor*) cuja ativação aumenta a expressão de proteínas de choque térmico (HSP – *Heat Shock Protein*) (15).

Em vista do que foi mencionado, este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol em fatias de cultura organotípica hipocampais de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG) bem como seu efeito na fosforilação de GSK-3 β .

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura de fatias hipocampais

A cultura de fatias organotípicas foi preparada de acordo com o método de Stoppini e col. (30). Foram utilizados ratos Wistar de 6 a 8 dias de idade. Os ratos tiveram seus cérebros removidos, os hipocampus dissecados e fatiados transversalmente em um fatiador de tecidos Mcllwain chopper, resultando em fatias de 400 μ m de espessura. As fatias foram separadas em solução de sais equilibrada de Hanks (HBSS-*Hank's balanced salt solution*) suplementada com 25 mM de HEPES (*N-2-hydroxyethyl piperazine N-2-ethanesulfonic acid*), 1 % de fungizona e 36 μ L/100 mL de garamicina (pH 7,2). Seis fatias foram colocadas em uma membrana de cultivo Millicell[®]-CM e transferidas para uma placa de cultivo de seis poços contendo 1 mL de meio de cultivo consistindo de 50 % de meio mínimo essencial (MEM-*Minimum Essential Media*), 25 % de soro de cavalo e 25 % de HBSS suplementado com (final mM): glicose 6, glutamina 2, HEPES 25 e NaHCO₃ 4 (pH 7,3). Fungizona (1 %) e garamicina (36 μ L/100 mL) foram adicionadas ao meio. As placas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5 % CO₂. O meio foi trocado a cada 3 dias. As fatias foram cultivadas durante 14 dias. O pré-tratamento foi iniciado no sétimo dia após o início da cultura adicionando o 17 β -estradiol (10 nM em DMSO 0,01 %) ao meio de cultivo e este

correspondeu ao grupo tratado cronicamente com estradiol (EC).

2.2 POG

Após 14 dias *in vitro*, as culturas foram expostas à POG (19). A indução da POG foi baseada no método descrito por Strasser e Fisher (31), com algumas modificações (5). Cada membrana foi transferida para uma placa estéril e lavada duas vezes com o meio POG composto de (mM): CaCl₂ 1,26; KCl 5,36; NaCl 136,89; KH₂PO₄ 0,44; Na₂HPO₄ 0,34; MgCl₂ 0,49; MgSO₄ 0,44; HEPES 25 (pH 7,2), sendo que na última troca, as membranas permaneceram neste meio por 15 min. As membranas foram então deixadas em 1 mL de meio POG por 15 min. Depois disso, o meio foi trocado por um meio POG que havia sido previamente nitrogenado durante 30 min. Três membranas foram processadas em paralelo, correspondendo aos três grupos experimentais: **EC** – Grupo tratado cronicamente, onde 17 β -estradiol foi adicionado ao meio no sétimo dia de cultivo; **EA** – Grupo tratado agudamente onde o 17 β -estradiol foi adicionado ao meio POG no momento da indução da lesão; **DMSO** – O veículo (DMSO 0,01 %) foi adicionado ao meio POG no momento da lesão. Na seqüência as placas contendo as membranas foram transferidas para uma câmara anaeróbia, que foi fechada e preenchida com nitrogênio. Durante o procedimento a temperatura foi mantida em 37 °C. As culturas foram mantidas nestas condições por 60 min. Depois do período de POG, as culturas foram removidas da câmara, as membranas foram lavadas duas vezes com HBSS e recolocadas em meio de cultivo. As fatias previamente tratadas com 17 β -estradiol receberam a droga durante o período de recuperação que foi de 24 h.

2.3 Quantificação da morte celular

A morte celular foi quantificada pela análise das imagens da captação do corante Iodeto de propídio (IP) (5,25). Após 23 h de recuperação, 7,5 μ M de IP foi adicionado ao meio de cultura, e estas incubadas por 1 h. O IP é excluído de células saudáveis, porém quando as células perdem a integridade da membrana, ele entra, liga-se ao DNA e torna-se altamente fluorescente. As culturas foram então observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300) usando um filtro rodamina. As fatias foram fotografadas e analisadas usando o programa Scion Image (www.scioncorp.com). A área fluorescente detectada foi quantificada, e então comparada com a área correspondente a CA1 (*Cornus Ammonis*1) total para obter a porcentagem do dano (34).

2.4 Western blotting

Após as imagens serem obtidas as fatias foram lisadas (SDS *Stopping Solution* 4 % - SDS 4 %, EDTA 2.1 mM, Tris 50 mM). Uma alíquota foi tirada para a dosagem de proteínas e no restante foi adicionado β -mercaptoetanol na concentração final 2 % (33). As amostras foram analisadas por eletroforese minigel SDS-PAGE 12 % (*sodium dodecil sulfate - polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Trinta e cinco microgramas de proteína de cada amostra foram aplicadas no gel. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose usando um sistema de transferência semi-seco (Bio-Rad Trans-Blot SD). As membranas foram bloqueadas e incubadas com o anticorpo primário (p-GSK-3 β , 1:1000, Cell Signaling) durante 18 h. Após duas lavagens, a membrana foi incubada por 2 h com o anticorpo secundário (*anti-rabbit IgG* conjugado a peroxidase, 1:1000, Amersham). A quimioluminescência (ECL-*Enhanced Chemio Luminescence*) foi detectada usando um filme de raios-X. A porcentagem da intensidade da banda foi analisada usando o programa OptiQuant. Para cada experimento, o grupo teste foi referido ao controle não-tratado, que foi considerado 100 %.

2.5. Análise dos Dados

A comparação entre os grupos experimentais foi feita pelo teste estatístico ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Duncan. Todos os dados estão representados como \pm S.E.M.

3 RESULTADOS

3.1 – Efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol

Para examinar o efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol utilizaram-se fatias de cultura organotípica de hipocampo de rato exposta à POG por 60 min. A morte celular foi quantificada pela medida da incorporação do iodeto de propídio (IP). O IP é um composto polar que só entra na célula se esta estiver com a membrana danificada. Dentro da célula, ele liga-se aos ácidos nucléicos e torna-se vermelho fluorescente. O IP tem sido usado como indicador de integridade neuronal e viabilidade celular (6). Foi observada uma diminuição significativa da incorporação do IP nas fatias submetidas à POG tanto nos tratamentos crônicos quanto nos agudos com 17 β -estradiol (10 nM) (71 % and 78 %, respectivamente) quando comparados às fatias POG que receberam apenas o veículo (Fig. 1). Esses resultados indicam um efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol. Não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos das fatias controles, indicando que não houve efeito tóxico.

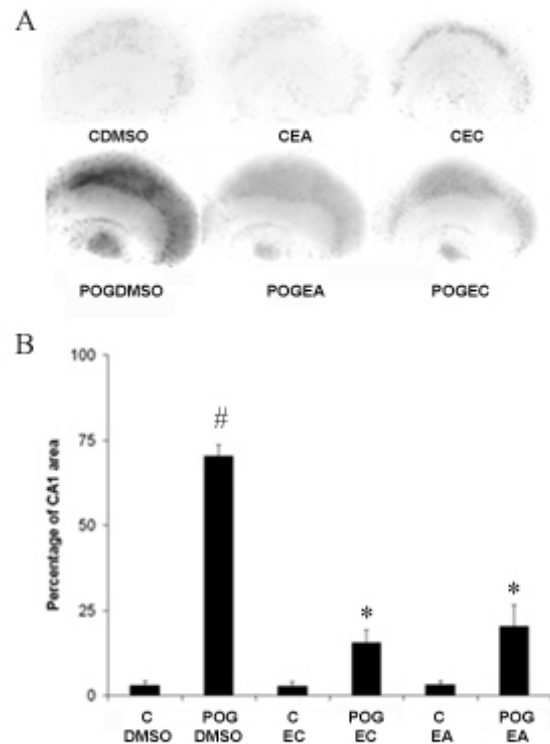


Figura 1- Efeito do 17 β -estradiol no dano celular induzido por POG de 60 min em culturas organotípicas de hipocampo. (A) Imagens representativas das culturas. (B) Análise quantitativa da incorporação de IP na área de CA1. C – Controle, POG – Fatias expostas à privação de oxigênio e glicose, EC – Tratamento crônico com 17 β -estradiol, EA – Tratamento agudo com 17 β -estradiol. DMSO – Tratamento com dimetilsulfóxido (Veículo). * Significativamente diferente da POG DMSO e das fatias controles. # Significativamente diferente dos demais grupos. As barras representam S.E.M (n=15), P<0,05. (ANOVA de uma seguida e teste de Duncan)

3.2 Efeito 17 β -estradiol na fosforilação da GSK-3 β

Devido ao fato da GSK-3 β ser substrato da via da PI-3K e da MAPK, ambas ativadas por estrógenos (11), resolveu-se investigar se o tratamento com estrógenos tem algum efeito no estado de fosforilação da GSK-3 β . Esta enzima quando fosforilada tem sua atividade pró-apoptótica inibida. Para isto utilizaram-se anticorpos específicos num sistema *Western blotting*. Foi observado que o tratamento crônico com 17 β -estradiol aumentou a fosforilação da GSK-3 β nas fatias controle e nas fatias submetidas à POG (28 % e 23 % respectivamente). O mesmo foi observado no tratamento agudo, onde o aumento na fosforilação da GSK-3 β nas fatias controle foi de 29 % e nas submetidas à POG 34 % quando comparadas às

fatias controles que receberam apenas o veículo. As fatias expostas à POG tratadas com DMSO não diferiram significativamente das fatias controle que receberam este tratamento (Fig. 2).

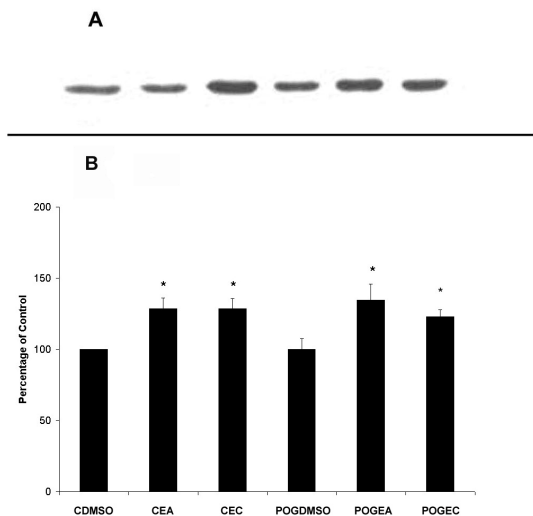


Figura 2 – Efeito do 17 β -estradiol na porcentagem de GSK-3 β fosforilada. (A) Imagem representativa do imunocônteuo de pGSK-3 β . (B) Análise quantitativa do imunocônteuo de pGSK-3 β . Os Dados são expressos como porcentagem das fatias controle tratadas com o veículo (100%). C – Controle, POG – Fatias expostas à privação de oxigênio e glicose, EC – Tratamento crônico com 17 β -estradiol, EA – Tratamento agudo com 17 β -estradiol. DMSO – Tratamento com dimetilsulfóxido (Veículo). *Significativamente diferente das fatias controles e POG tratadas com DMSO. As barras representam S.E.M. (n=7) P<0,05. (ANOVA de uma via seguida do teste de Duncan)

4 DISCUSSÃO

Nos últimos 100 anos, com o avanço da ciência e da tecnologia, houve um aumento na expectativa de vida, principalmente das mulheres. Conseqüentemente elas estão aumentando a proporção de suas vidas na fase hipoestrogênica da menopausa, o que pode contribuir para um aumento dos riscos da ocorrência de disfunções cognitivas e de uma variedade de doenças cognitivas (38). As doenças neurológicas afetam a qualidade de vida que faz o ser humano ser tão especial e, portanto, uma droga que seja neuroprotetora contra estas doenças, como hipóxia-isquemia, quando encontrada, terá um grande valor clínico.

Recentemente foi demonstrado, *in vitro*, que os estrógenos exercem efeitos neuroprotetores contra a neurotoxicidade que resulta da privação

de soro (13), dano causado pelo peptídeo β -amilóide(1) e tratamento com agonistas de NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) (2). Além disso, o 17 β -estradiol tem sido amplamente estudado *in vivo*, onde tem demonstrado efeito protetor em ambos os sexos (18).

Embora muitos estudos tenham demonstrado o efeito neuroprotetor do 17 β -estradiol, seu preciso mecanismo de ação ainda não está bem elucidado (17).

Neste trabalho, foram confirmados achados prévios que mostram que o 17 β -estradiol tem efeito neuroprotetor para a cultura organotípica de hipocampo exposta à privação de oxigênio e glicose. Os resultados aqui expressos demonstraram que o tratamento com 17 β -estradiol atenua a morte celular neste modelo. Como indicado pela análise da incorporação de IP, as fatias POG que receberam tratamento crônico e agudo tiveram uma redução de 78 e 71 % respectivamente da extensão da lesão quando comparadas com as fatias POG que receberam apenas o veículo. O 17 β -estradiol não exerceu nenhum efeito nas fatias controle o que demonstra que esta dose não teve efeitos tóxicos.

Para examinar um possível mecanismo pelo qual o 17 β -estradiol reduziu a morte celular foi examinado seu efeito na fosforilação da GSK-3 β . Recentemente foi demonstrado que um inibidor desta enzima reduziu a morte celular em neurônios causados pela inibição de PI-3K ou privação de soro (23). Dados da literatura têm demonstrado que os estrógenos estimulam as vias da PI-3K e das MAPK. Ambas vias são responsáveis por fosforilar e inativar a GSK-3 β . Neste trabalho foi encontrado que o tratamento agudo e crônico com 17 β -estradiol aumentou a fosforilação da GSK-3 β tanto nas fatias controles quanto nas submetidas à POG. Esses resultados sugerem que esta pode ser uma possível via pelo qual o 17 β -estradiol atua como agente neuroprotetor, uma vez que a fosforilação da GSK-3 β inibe sua ação apoptótica.

Esses resultados são importantes visto que a população está envelhecendo e a isquemia é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade entre as mulheres pós-menopausa. Isto sugere que as mulheres podem ser beneficiadas pelos efeitos protetores da terapia de reposição hormonal que utiliza baixas concentrações deste hormônio. Entender os mecanismos pelos quais os estrógenos são neuroprotetores pode ajudar na busca e na geração de novas drogas terapêuticas para tratamento e/ou prevenção das lesões isquêmicas para homens e mulheres.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ALKAYED, N.J.; HARUKUNI, I.; KIMES, A.S.; LONDON, E.D.; TRAYSTAN, R.J.; HURN, P.D. Gender-linked brain injury in experimental stroke. **Stroke**, v. 29, p. 159-165, 1998.
- (2) BI, R.; BROUTMAN, G.; FOY, M.R.; THOMPSON, R.F.; BAUDRY, M. The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathway mediate multiple effect of estrogen in hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 3602-3607, 2000.
- (3) CÁRDENAS, A.; MORO, M.; HURTADO, O.; LEZA, J.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BODELÓN, O.; BOSCA, L.; LIZASOAIN, I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **J. Neurochem.**, v. 74, p. 2041-2048, 2000.
- (4) CHENG, H.L.; FELDMAN, E.H. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-1. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14560-14565, 1998.
- (5) CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO, C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice culture of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci. Lett.**, v. 315, p. 33-36, 2001.
- (6) CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 785-789, 1995.
- (7) DAWSON, V.; DAWSON, T.J. Nitric oxide neurotoxicity. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 10, p. 179-190, 1996.
- (8) DUGAN, L.; CHOI, D. Hypoxic-ischemic Brain Injury and Oxidative Stress. IN: SIEGEL, G.L. AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; FISHER, S.K. and UHLER, M.D. (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects**. 6th. ed. Philadelphia, New York: Lippincott, Raven, 1999. Chapter 4, p.1183.
- (9) GARCIA-SEGURA, L.M.; AZCOITIA, I.; DONCARLOS, L.L. Neuroprotection by estradiol. **Prog. Neurobiol.**, v. 63, p. 29-60, 2001.
- (10) GAZZALEY, A.H.; WEILAND, N.G.; McEWEN, B.S.; MORRISON, J.H. Differential regulation of NMDA R1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 6830-6838, 1996.
- (11) GOODENOUGH, S.; SCHAFFER, M.; BEHL, C. Estrogen-induced cell signalling in a model of Alzheimer's disease. **J. Steroid Metabol.**, v. 84, p. 301-305, 2003.
- (12) GOODMAN, Y.; BRUCE, A.J.; CHENG, B.; MATTSON, M.P. Estrogen attenuate and corticosterona exarcebates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid β -peptide toxicity in hippocampal neurons. **J. Neurochem.**, v. 66, p. 1836-1844, 1996.
- (13) GREEN, P.S.; BISHOP, J.; SIMPKINS, J.W. 17α -estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 511-515, 1997.
- (14) HAWK, T.; ZHANG, Y.Q.; RAJAKUMAR, G.; DAY, A.L.; SIMPKINS, J.W. Testosterone increase and estradiol decrease middle cerebral artery occlusion lesion size in males rats. **Brain Res.**, v. 796, p. 296-298, 1998.
- (15) HE, B.; MENG, Y.H.; MIVECHI, N.F. Glycogen synthase kinase-3 β and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. **Molec. Cell Biol.**, v. 18, p. 6624-6633, 1998.
- (16) HETMAN, M.; CAVANAUGH, J.E.; KIMELMAN, D.; XIA, Z. Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 2567-2574, 2000.
- (17) HONDA, K.; SAWADA, H.; KIHARA, T.; URUSHITANI, M.; NAKAMIZO, T.; AKAIKE, A.; SHIMOHAMA, S. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. **J. Neurosci. Res.**, v. 60, p. 321-327, 2000.
- (18) HURN, P.D.; MACRAE, I.M. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 20, p. 631-652, 2000.
- (19) LAAKE, J.; HAUG, F.; WIELOCH, T.; Ottersen, O. A simple *in vitro* model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Res. Protocols**, v. 4, p. 173-184, 1993.
- (20) LI, X.; BIJUR, G.N.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase, mood stabilizers, and neuroprotection. **Bipolar Disord.**, v. 4, p. 137-144, 2002.

- (21) LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol. Ver.**, v. 79, p. 1431–1568, 1999.
- (22) MOOSMAN, B.; BEHL, C. The antioxidant neuroprotective effect of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 8867-8872, 1999.
- (23) 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.
- (24) PIKE, C.J. Estrogen modulates neuronal Bcl-xl expression and β -amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. **J. Neurochem.**, v. 72, p. 1552–1563, 1999.
- (25) PRINGLE, A.; ANGUNAWELA, R.; Wilde, G.; Mephram, J.; Sundstrom, L.; Iannotti, F. Induction of 72 KDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 23, p. 289–298, 1997.
- (26) RUSA, R.; ALAKYED, N.J.; CRAIN, B.J.; TRAYSTMAN R.J.; KIMES A.S.; LONDON, E.D.; KLAUS, J.; HURN, P.D. 17β -estradiol reduces stroke injury in estrogen deficient female animals. **Stroke**, v. 30, p. 1665–1670, 1999.
- (27) SAKAGUCHI, T.; OKADA, M.; KUNO, M.; KAWASAKI, K. Dual mode of N-Methyl-D-aspartate-induced neuronal death in hippocampal slice cultures in relation to N-Methyl-D-aspartate receptor properties. **Neurosci.**, v. 76, p. 411–423, 1997.
- (28) SAUNDERS-PULLMAN, R.; GODON-ELLIOTT, J.; PARIDES, M.; FAHN, S.; SAUNDERS, H.R.; BRESSMAN, S. The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. **Neurology**, v. 52, p. 1417–1421, 1999.
- (29) SINHA, K.; CHAUDHARY, G.; GUPTA, Y. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sci.**, v. 71, p. 655-665, 2002.
- (30) STOPPINI, L.; BUCHS, P.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J. Neurosci. Methods**, v. 37, p. 173-182, 1991.
- (31) 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.
- (32) SUTHERLAND C.; LEIGHTON I.A.; COHEN P. Inactivation of Glycogen synthase Kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-signaling. **Biochem. J.**, v. 296, p. 15-19, 1993.
- (33) TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; VALENTIM, L.; SALBEGO, C. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice culture of rat hippocampus. **Neuroreport**, v. 12, p. 2705–2709, 2001.
- (34) VALENTIM, L.M.; RODNIGHT, R.; GEYER, A.B.; HORN, A.P.; TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; NETTO, C.A.; SALBEGO, C.G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neurosci.**, v. 118, p. 379-386, 2003.
- (35) WANG, T.Y.; PHANG, J.M. Effect of estrogen on apoptotic pathway in human breast cancer cell line MCF-7. **Cancer Res.**, v. 55, p. 2487–2489, 1995.
- (36) WHITE, B.C.; SULLIVAN, J.M.; DEGRACIA, D.J.; BRIAN, J.; ONEIL, B.J. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J. Neurol. Sci.**, v. 179, p. 1-33, 2000.
- (37) WISE, P.M. Estrogens and Neuroprotection. **Trends Endocrinol. Metabol.**, v. 13, p. 229–230, 2002.
- (38) WISE, P.M.; DUBAL, D.B.; WILSON, M.E.; RAU, S.W.; BÖTTNER, M.; ROSEWELL, K.L. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from *in vivo* and *in vitro* studies. **Brain Res. Rev.**, v. 37, p. 313–319, 2001.
- (39) ZHANG, L.; RUBINOW, D.R.; XAING, G.; Li, B.; CHANG, Y.H.; MARIC, D.; BARKER, J.L.; MA, W. Estrogen protects against β -amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. **Neuroreport**, v.12, p. 1919–1923, 2001.

Endereço para correspondência:

Prof^ª. Dr. Christianne Gazzana Salbego
 Rua Ramiro Barcellos 2600, Anexo
 90035 003. Porto Alegre/RS
 Tel: 0-XX-51-33165569; Fax: 0-XX-51-33165565
 e-mail: <salbego@terra.com.br>

Recebido em 15.10.2003.

Aceito em 15.10.2003.

Revisto em 20.11.2003.

