

328007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**MORTE INDUZIDA POR LY294002 PARA O ESTUDO DA
VULNERABILIDADE SELETIVA EM CULTURAS
ORGANOTÍPICAS DE HIPOCAMPO DE RATO**

Ana Paula Horn

ORIENTAÇÃO: Dr. Guido Lenz e Dra. Christianne G. Salbego

Trabalho apresentado como conclusão de curso para obtenção do título de
Bacharel em Biologia Molecular, Celular e Funcional

Porto Alegre, maio de 2002.

BIO
BIO
148

Nº. Sól.
Registro
Nº. Op.
Data
Nº. Chamada

Agradecimentos:

Aos meus pais pelo amor, carinho, incentivo e exemplo;
Ao Ivan pelo amor e paciência;
Aos meus familiares pela força e compreensão;
Ao Guido pela acolhida, exemplo, amizade e excelente orientação;
À Chris pela amizade, orientação e ajuda;
Ao Rod pelo exemplo e coragem;
À Carol, Fernanda, Rodrigo e Andressa, minhas primeiras parcerias no lab.;
À Lauren pelo exemplo, amizade e ajuda;
Ao Augusto por toda a ajuda, compreensão, ensinamentos e amizade;
A todos os colegas do lab. que de alguma forma contribuíram para esse trabalho e para minha formação;
A todos os professores que tive ao longo do curso, pelos conhecimentos que pude adquirir;
Aos colegas Cris, Dani, Ema, Mel, Ana C., Ana P., Rafael e Gui pela amizade e risadas;
A todos que passaram pela minha vida nesses anos e contribuíram para o meu crescimento;
Ao Jorge e à Fabiana por aceitarem avaliar o trabalho;
E a todos que eu possa ter esquecido...

MORTE INDUZIDA POR LY294002 PARA O ESTUDO DA VULNERABILIDADE SELETIVA EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE HIPOCAMPO DE RATO

HORN A. P.*, GEYER A. B.*, VALENTIM L. M.*, SALBEGO C.G.** AND LENZ G.*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, 90035-003, Brasil.

** autor para correspondência

Endereço para correspondência: C. G. Salbego

Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,
90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.
Tel: +55-51-3316-5562
FAX: +55-51-3316-5535
e-mail: salbego@zaz.com.br

Abreviaturas:

AKT: "Cellular homolog of v-AKT oncogene"

Caspase: "cysteine aspartatic acid protease"

CA1: "Cornus Ammonis 1"

CREB: "cAMP response element-binding protein"

DG: "Dentate Gyrus"

FKHR: "Forkhead in rhabdomyosarcoma"

GSK3: "Glycogen Synthase Kinase 3"

HBSS: "Hanks balanced salt solution"

IKK: "Inhibitor of NF κ B"

MEM: "Minimum Essential Medium"

NF κ B: "Nuclear factor kappa B"

IP: Iodeto de Propídeo

POG: Privação de Oxigênio e Glicose

PI3K: "Phosphoinositide-3 Kinase"

Z-DEVD-FMK: Z-Asp(OMe)-

Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F

DEVD-MCA: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA

Resumo:

A cultura organotípica de hipocampo tem sido usada como modelo para o estudo de mecanismos de morte celular *in vitro*. Adotamos este modelo na tentativa de estudar proteínas envolvidas na vulnerabilidade seletiva das regiões CA1 e DG do hipocampo. Para a investigação do envolvimento da via da PI3K na vulnerabilidade as culturas foram tratadas com LY294002, inibidor da via, nas doses 10 μ M e 50 μ M e a resposta foi monitorada com iodeto de propídeo, um corante de exclusão de células sadias visualizado em microscopia de fluorescência, e ensaio da atividade das caspases 3 e 7. Após administração de LY294002 constatamos, para ambas as doses testadas, um grande aumento na morte celular da estrutura em cultivo, com uma intensidade dependente da dose administrada. O DG mostrou-se mais sensível que o CA1 nas primeiras horas de observação. Na dose de 50 μ M houve um considerável aumento na atividade da caspase 3 e 7 nas regiões estudadas, principalmente no DG. O inibidor de caspase Z-DEVD-FMK reduziu a atividade da caspase 3 na dose de 50 μ M de LY294002, mas não foi capaz de inibir a morte celular de uma forma geral. Esses resultados sugerem uma grande importância da via da PI3K nessas regiões, pois a sua inibição induz morte por apoptose, aparentemente também ocorrendo uma grande morte por necrose. A região do DG mostrou-se mais sensível que a região do CA1, sugerindo uma maior necessidade da via da PI3K nesse local, possivelmente contribuindo para a maior resistência do DG a outros insultos como, por exemplo, a POG.

Palavras-chave: vulnerabilidade seletiva, hipocampo, apoptose, LY294002

Título: Via da PI3K na vulnerabilidade do hipocampo.

Introdução:

A apoptose, ou morte celular programada, é um mecanismo fisiológico, mas que pode estar aumentado quando a célula é exposta a condições desfavoráveis. É um tipo de morte que não envolve resposta inflamatória, sendo geralmente dependente da ativação de proteases específicas denominadas caspases (Leist and Jäättela, 2001). A maioria das proteínas pró-apoptóticas é constitutiva nas células e precisa ser constantemente inibida. Uma das vias que participa desse processo de proteção ao insulto é a via da PI3K que, além de induzir a proliferação, bloqueia a apoptose em vários níveis (Yuan and Yankner, 2000 and Brunet *et al.* 2001). A PI3K ativa a proteína AKT (Hemmings, 1997), que interage com GSK3, fosforilando-a e inativando-a (Pap and Cooper, 1997); com caspase 9, fosforilando-a e impedindo que essa seja clivada, impossibilitando assim a ativação da caspase 3 (Cardone *et al.*, 1998); com BAD, mantendo-a fosforilada e impedindo com que essa atue sobre a mitocôndria provocando a liberação do citocromo c (Datta *et al.*, 1997); com FKHR, que é o fator de transcrição do receptor Fas, inibindo-o e fazendo com que Fas deixe de ser transcrito (Brunet *et al.*, 1999); com p53, inibindo sua atividade transcricional que originaria produtos pró-apoptóticos (Yamaguchi *et al.*, 2001); com IKK, permitindo a ativação de NF κ B (Ozes *et al.*, 1999); e com CREB, aumentando a transcrição direcionada por esse fator (Du and Montminy, 1998). Isto indica que essa é uma via bastante importante na regulação do processo apoptótico.

O hipocampo é formado por regiões com diferentes populações de neurônios que possuem diferentes respostas a insultos (Siegel *et al.*, 1999). Frente à isquemia, a região CA1 mostrou-se mais sensível e a região do giro denteado (DG) mostrou-se mais resistente (Schmidt-Kaster, 1991), sugerindo a existência de respostas diferentes no impedimento da morte celular dessas duas regiões, possivelmente com diferentes proteínas envolvidas no processo (Kitagawa *et al.*, 1999 and Yano *et al.*, 2001). Inibidores de caspases já se mostraram

neuroprotetores frente ao insulto isquêmico, sugerindo que, além de necrose, esse tipo de insulto é capaz de induzir a apoptose (Ray *et al.*, 2000). Sendo a via da PI3K uma via antiapoptótica, o objetivo principal do trabalho foi investigar o envolvimento dessa na vulnerabilidade seletiva do hipocampo.

A cultura organotípica vem sendo utilizada como um modelo para estudos de morte celular *in vitro*, uma vez que conserva as características do tecido, preservando as interações neurônio-glia (Gähwiler *et al.*, 1997). Com o objetivo de melhor entender o processo de vulnerabilidade seletiva de neurônios hipocâmpais após o dano, usamos esse modelo de cultura para o estudo do envolvimento da via de sinalização da AKT/PKB no processo de resistência. Para tanto usamos o inibidor da via da PI3K, LY294002, na tentativa de observar diferenças na morte celular das áreas CA1 e DG.

Materiais e Métodos:

Cultura Organotípica de Hipocampo:

A cultura organotípica das fatias de hipocampo foi preparada de acordo com Stoppini *et al.* (1991). As fatias foram obtidas de hipocampo de ratos Wistar, de 6 a 8 dias de idade. O hipocampo foi dissecado e foram feitos cortes transversais de 400 μm usando o "McIlwain tissue chopper". As fatias foram colocadas em solução salina de Hanks (HBSS, mg/mL): 6.5 glicose, 0.14 CaCl_2 , 0.4 KCl, 8 NaCl, 0.06 KH_2PO_4 , 0.048 Na_2HPO_4 , 0.1 MgCl_2 , 0.1 MgSO_4 , 25 mM Hepes, 1% fungizona e 36 $\mu\text{L}/100$ mL gamicina, pH 7.2, para serem separadas. O cultivo foi feito em membranas Millicell (Millipore), distribuindo-se 6 fatias em cada membrana. As membranas foram colocadas em placas de 6 poços (Cell Culture Cluster, Costar) com 1 mL de meio de cultura, que consistia de 50% de Minimum Essential Medium (MEM, Gibco), 25% de HBSS (Gibco) e 25% de soro de cavalo inativado por calor (Gibco). Esse meio foi suplementado com 6.5 mg/mL glicose, 1 mM glutamina, 25 mM Hepes, 4 mM NaHCO_3 , Fungizona (1%) e

garamicina (36 μ L/100 mL), pH 7.3. As culturas foram mantidas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e os experimentos foram realizados após 14 dias de cultivo.

Tratamento com LY294002:

Após 14 dias em cultivo as culturas foram tratadas com LY294002 (Calbiochem) em diferentes concentrações (10 μ M e 50 μ M) para o estudo do efeito dessa droga sobre a morte celular nas diferentes regiões do hipocampo. Seis horas antes do tratamento o soro do meio de cultura era reduzido de 25% para 2,5%. Quando necessário, o inibidor da caspase 3, Z-DEVD-FMK (Enzyme System Products), foi adicionado 1 hora antes do tratamento e mantido durante todo o período de observação.

Privação de oxigênio e glicose (POG):

Após 14 dias em crescimento e 6 horas com o meio com soro reduzido para 2,5%, as culturas foram submetidas à privação de oxigênio e glicose, para simulação de uma isquemia, conforme Strasser and Fischer, 1995, com algumas modificações. O meio de cultura foi trocado por 1 mL de solução de Hanks sem glicose por 15 minutos. Em seguida esse foi trocado por um meio semelhante, mas que foi previamente gaseificado com nitrogênio por 30 minutos. A POG foi feita numa câmara de anóxia, durante 40 min, a 37°C. Na seqüência o meio de cultura foi recolocado e a placa foi mantida na incubadora para a recuperação por 22 horas, sendo fotografada a cada 4h.

Quantificação do dano celular:

O dano celular foi medido por análise da fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo - IP- (Calbiochem), um marcador que é excluído de células saudáveis, sendo capaz de penetrar em

membranas não íntegras e ligar em ácidos nucleicos, tornando-se assim fluorescente e podendo ser observado (Macklis and Madison, 1990). O iodeto de propídeo (7,5 μ M) foi adicionado no momento do tratamento e as culturas foram observadas a cada 4h, durante 21h, em microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 300), usando o filtro padrão de rodamina. As imagens foram capturadas e analisadas usando o software "Scion Image" (<http://www.scioncorp.com>). A área acima do "background" foi determinada usando a opção "density slice" e foi comparada com a área total para obtenção do percentual do dano. Foi feita a média de todos os controles e essa foi descontada dos tratamentos.

Atividade das Caspase 3 e 7:

Decorridas 22h do tratamento as membranas foram lavadas 3 vezes com Krebs Ringer (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, Na-Hepes 25 mM, glicose 12 mM e CaCl₂ 1mM, pH 7.4) e as fatias foram separadas em CA1 e DG com o auxílio de bisturis. As amostras foram lisadas em PBS (Na₂HPO₄ 0.0004 mg/mL, NaCl 0.008 mg/mL, KCl 0.0002 mg/mL, pH 7.4) com triton X-100 0,2%. Após dosagem das proteínas pelo método de BCA (Pierce) foi realizado o ensaio fluorogênico com o substrato DEVD-MCA (Peptide Institute), específico para as caspases 3 e 7. Foram aplicadas 30 μ g de amostra e a concentração final de substrato foi de 0,02mM. O tampão de ensaio consistia de Sacarose 0.1g/mL, CHAPS 0.001g/mL, BSA 0.0001g/mL e Hepes-NaOH 0.024 g/mL, pH 7.5. A cinética de hidrólise do substrato foi monitorada em fluorímetro de microplacas, com excitação de 370 nm e emissão a 460 nm. Os resultados estão expressos em fmol de substrato hidrolizado/ μ g/minuto.

Análise estatística:

Os experimentos foram realizados no mínimo 2 vezes (ensaio da caspase) ou 6 vezes (incorporação de IP) e estão apresentados em média \pm desvio padrão. Os dados foram

analisados pelo teste t pareado ou teste t para amostras independentes. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e discussão:

O tratamento das fatias hipocâmpais com o LY294002, um inibidor da via da PI3K e, conseqüentemente da proteína AKT, induziu a morte nas culturas quando administrado nas doses de $10\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$ (figuras 1A e 1B). Ao contrário do que pode ser observado após POG, onde a região do CA1 é mais sensível e a região do DG é mais resistente (figura 1D), o tratamento com a droga induz uma morte mais rápida no DG, sugerindo uma maior sensibilidade dessa área. A região do CA1 também se mostrou responsiva, porém de uma forma mais lenta (figuras 1A e 1B). Quando as culturas foram tratadas com LY294002 na dose $50\mu\text{M}$ e Z-DEVD-FMK não foi observada redução na morte celular em nenhuma das regiões estudadas (figura 1C). A morte diferencial induzida pelo LY294002 e por 40 minutos de POG pode ser visualizada na figura 2.

Para a investigação do tipo de morte induzida pelo LY294002 realizaram-se ensaios de atividade das caspases 3 e 7, principais efetoras do processo apoptótico clássico (figuras 3 e 4). Na dose de $10\mu\text{M}$ o LY294002 não foi capaz de induzir a ativação das caspases. Quando administrado na dose de $50\mu\text{M}$ induziu a ativação, sendo observada uma maior atividade no DG. Frente a POG parece não ter havido resposta das caspases, sugerindo que em nosso modelo a morte induzida pela POG foi em sua grande parte necrótica ou independente de caspases. Quando comparamos a ativação em CA1 e em DG após tratamento com a droga vimos que no DG há muito mais atividade de caspase, novamente sugerindo uma maior sensibilidade dessa área ao tratamento com LY294002 na dose de $50\mu\text{M}$ (figura 3).

Para investigação do tempo necessário para a ativação das caspases as fatias foram lisadas 9h e 22h após o tratamento (figura 4). Foi observado um aumento progressivo na

atividade das caspases, sempre maior na região do DG. Concluímos que o LY294002 é capaz de induzir apoptose em culturas organotípicas de hipocampo, sendo a ativação das caspases progressiva e sempre maior no DG.

Dados na literatura indicam que o iodeto de propídeo não é um marcador de apoptose. Woltman *et al.*, 2001, mostraram que na fase inicial de apoptose não há incorporação de IP, por não haver exposição do DNA. Portanto, podemos concluir que há também indução de necrose quando as culturas são tratadas com LY294002. Além da necrose há presença de apoptose, o que pode ser visualizado no ensaio das caspases 3 e 7. E pelo fato de IP não ser um bom marcador de apoptose, não conseguimos observar reversão da morte apoptótica na microscopia de fluorescência quando tratamos as culturas com z-DEVD-FMK, inibidor da caspase 3, uma vez que a técnica parece só detectar necrose e fases muito tardias de apoptose.

Após a realização de POG nas culturas, observamos um grande aumento na morte da região CA1, como observado por outros autores (Schmidt-Kaster, 1991 e Cimarosti *et al.*, 2001). Não observamos ativação das caspases 3 e 7 após esse tipo de insulto, sugerindo que a grande parte da morte celular induzida por POG é necrose ou apoptose independente de caspases, como sugerido por Loetscher *et al.*, 2001.

Mais estudos são necessários para comprovação do envolvimento da via da AKT na vulnerabilidade seletiva do hipocampo. Nossos resultados sugerem o seu envolvimento e indicam uma importância maior dessa via na região do DG, possivelmente uma das responsáveis pela resistência do DG a outros insultos como, por exemplo, a POG.

Referências:

- Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J. and Greenberg M. E. (1999) Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Brunet A., Datta S.R. and Greenberg M. (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-AKT signaling pathway. *Current Opinion on Neurobiology* **11**, 297-305.
- Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. and Reed J. C. (1998), Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321.
- Cimarosti H., Rodnigh R., Tavares A., Paiva R., Valentim L., Rocha E. e Salbego, C. (2001) An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neuroscience Letters* **315**, 33-36.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. and Greenberg M. E. (1997) Akt Phphorylation of BAD Couples Survival Signal to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* **91**, 231-241.
- Du K. and Montminy M. (1998) Creb Is a Regulatory Target for The Protein Kinase Akt/Pkb. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 32377-32379.
- Gähwiler B. H., Capogna M., Debanne D., McKinney R. A. and Thompson S. M. (1997) Organotypic Slice Cultures: A Technique has Come of Age. *TINS* **20**, 471-477.
- Heming B.A. (1997) Akt signiling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* **275**, 628-630.

- Laake J. H., Haug F., Wieloch T. and Ottersen O. P. (1999) A Simple *in vitro* Model of Ischemia Based on Hippocampal Slice Cultures and Propidium Iodide Fluorescence. *Brain Research Protocols* **4**, 173-184.
- Leist M. and Jäättelä M. (2001) Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews – Molecular Cell Biology*. **2**, 1-10.
- Loetscher H., Niederhauser O., Kemp J. and Gill R. (2001) Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? *DDT* **6**, 671-680.
- Macklis, J.D. and Madison R.D. (1990) Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci. Methods* **31**, 43-46.
- Ozes O. N., Mayo L. D., Gustin J. A., Pfeffer S. R., Pfeffer L. M. and Donner D. B. (1999) NF κ B Activation by Tumour Necrosis Factor Requires the Akt Serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85.
- Pap M. and Cooper G. M. (1998) Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 19929-19932.
- Ray, A.M., Owen D.E., Evans M.L., Davis J.B. and Benham, C.D. (2000) Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in organotypic hippocampal slices. *Brain Research* **876**, 62-69.
- Schmidt-Kastner R. and Freund T.F. (1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* **40**, 599-636.
- Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fischer S.K. and Uhler M.D. (1999) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects*. Sixth Edition. Lippincott-Raven.
- Stoppini L., Buchs P. A. and Muller D. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* **37**, 173-82.
- Strasser U. and Fischer G. (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in

organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods* **57**, 177-186.

Woltman A.M., Figter J.W., Kamerling S.W.A., van der Kooij S.W., Paul L.C., Daha M.R. and van Kooten C. (2001) Rapamycin induces apoptosis in monocyte- and CD34-derived dendritic cells but not in monocytes and macrophages. *Blood* **98**, 174-180.

Yamaguchi A., Tamatani M., Matsuzaki H., Namikawa K., Kiyama H., Vitek M. P., Mitsuda N. and Tohyama M. (2001) Akt Activation Protects Hippocampal Neurons from Apoptosis by Inhibiting Transcriptional Activity of p53. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 5256-5264.

Yano S., Morioka M., Fukunaga K., Kawano T., Hara T., Kai, Y., Hamada J., Miyamoto E. and Uschio Y. (2001) Activation of Akt/Protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 Subfield of gerbil hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21**, 351-360.

Yuan J. and Yankner .A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802-809.

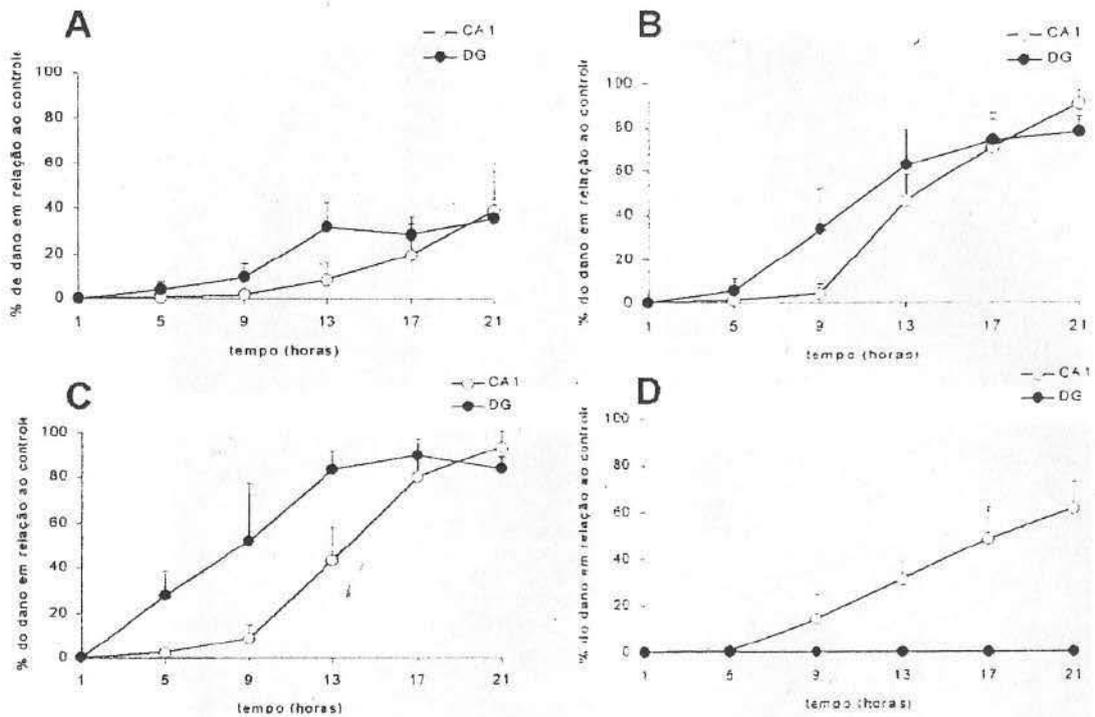


Figura 1: Morte celular induzida por LY294002. Iodeto de propídeo foi adicionado ao meio de cultura e as fatias foram monitoradas através de microscopia de fluorescência. **A)** as fatias foram tratadas com 10µM da droga (n=9), **B)** 50µM (n=9), **C)** 50µM na presença de Z-DEVD (n=6) ou **D)** foram submetidas a 40 minutos de POG (n=6). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão e representam a % do dano em relação a área de CA1 ou DG. Foi feita a média de 12 controles e esta foi descontada de todos os tratamentos nos diferentes tempos analisados.

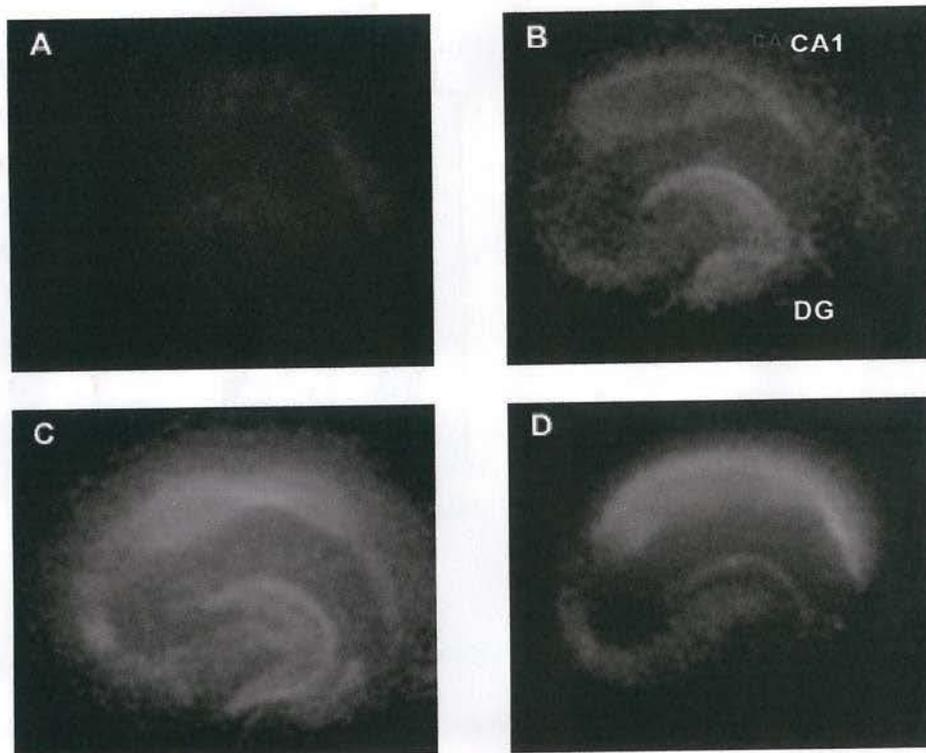


Figura 2: Microfotografias representativas das culturas organotípicas 21 horas após a exposição à LY 294002 ou à POG . A) controle; B) LY 10 μ M; C) LY 50 μ M; D) fatias expostas à 40 minutos de POG. Aumento: 40 X.

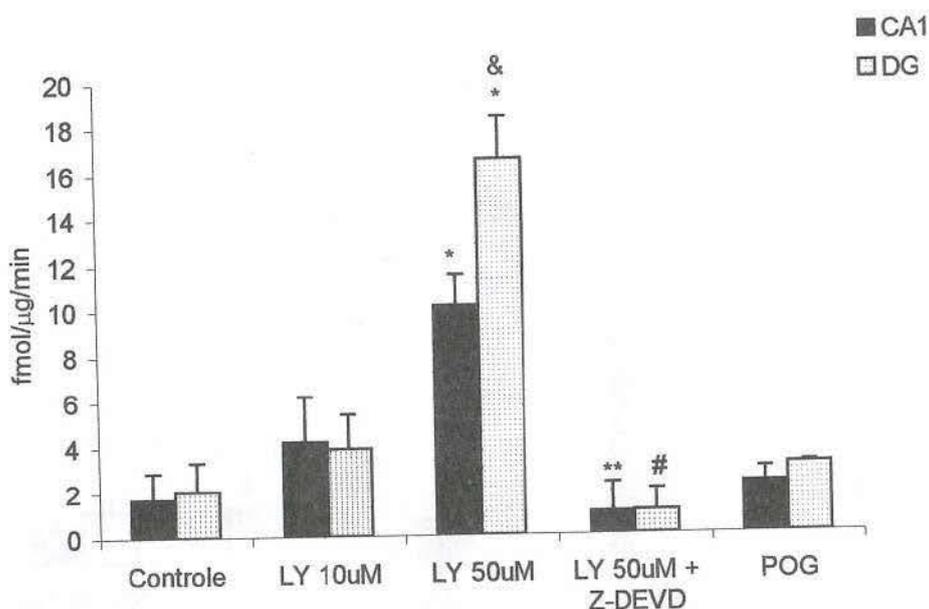


Figura 3: Atividade das caspases 3 e 7 observada 22h após tratamento com LY294002 nas doses 10 μ M e 50 μ M e após POG. Na dose de 50 μ M da droga observou-se aumento da morte tanto em CA1 quanto em DG; a adição de Z-DEVD inibiu a atividade das caspases em CA1 quanto em DG; na dose de LY 50 μ M o DG apresentou maior atividade das caspases em relação ao CA1; a POG não alterou a atividade dessas caspases.

* =CA1 e DG diferente do controle ($p < 0.01$, $n = 3$)

** =CA1 tratado com LY 50 μ M diferente de CA1 com LY 50 μ M+Z-DEVD ($p < 0.05$, $n = 2$)

=DG tratado com LY 50 μ M diferente de DG com LY 50 μ M + Z-DEVD ($p < 0.05$, $n = 2$)

& =DG diferente de CA1 em presença de LY 50 μ M ($p < 0.05$, $n = 3$).

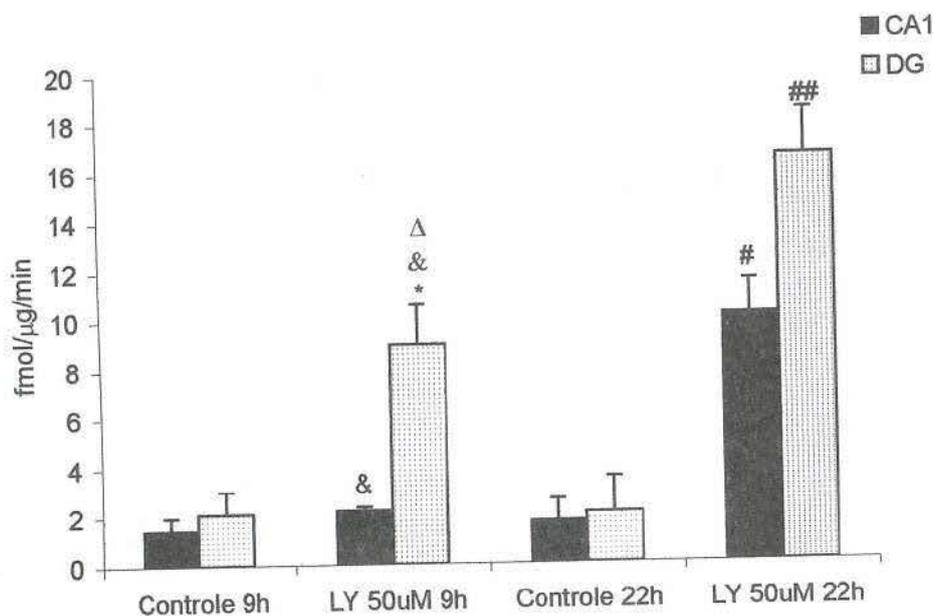


Figura 4: A atividade das caspases 3 e 7 aumenta com o passar do tempo. Após tratamento com LY294002 50 μ M as fatias foram lisadas em 9h e 22h. Foi observado um aumento na atividade em relação ao controle, tanto em 9h para o DG quanto em 22h para ambas as estruturas. O DG mostrou maior atividade em ambos os tempos.

* =DG diferente do controle 9 horas após adição da droga ($p < 0.01$, $n = 3$)

=CA1 diferente do controle 22 h após a adição da droga ($p < 0.01$, $n = 3$)

=DG diferente do controle 22 h após a adição da droga ($p < 0.001$, $n = 3$)

& =CA1 e DG 9 horas diferente de CA1 e DG 22h após adição da droga ($p < 0.01$, $n = 3$)

Δ =DG diferente de CA1 9 horas após adição da droga ($p < 0.05$, $n = 3$)