

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências  
Médicas**

**Mecanismos de Neuroproteção em um Modelo *In Vitro* de  
Isquemia Cerebral :**

- Uso de Inibidores de Trombina**
- Pré-condicionamento Isquêmico**

Aluna: Marlise de Castro ribeiro  
Orientadora: Ligia M. Barbosa Coutinho

Tese de Doutorado

2005

MED  
T  
WL355 R484m 2006

05907567

[000596532] Ribeiro, Marlise de Castro.  
Mecanismos de neuroproteção em um modelo in vitro de isquemia cerebral : uso de inibidores de trombina, pré-condicionamento isquêmico. 2005. 106 f.

**R484m** Ribeiro, Marlise de Castro

Mecanismos de neuroproteção em um modelo in vitro de isquemia cerebral : pré-condicionamento isquêmico, uso de inibidores de trombina / Marlise de Castro Ribeiro ; orient. Ligia Maria Barbosa Coutinho. – 2006.  
106 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Isquemia cerebral 2. Carboxipeptidase U I. Coutinho, Ligia Maria Barbosa II. Título

NLM: WL 355

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Lígia Coutinho, que tem papel importante na minha formação científica. Tive com ela os primeiros contatos com a pesquisa e o seu apoio incondicional para realizar esse projeto no exterior. Compartilho com ela agora a conclusão de mais uma etapa, na qual muito aprendi.

Ao Dr. Julien Bogousslavsky que me aceitou no seu renomado serviço de neurologia, em Lausanne, Suíça.

Aos meus colegas do laboratório de Neurologia do CHUV, em Lausanne, especialmente ao Dr. Lorenz Hirt que me acolheu com tanto carinho e ao Dr. Jérôme Badaut que teve a paciência de me ensinar ~~todas~~ as técnicas realizadas nessa pesquisa.

Ao Governo Federal Suíço por seu incentivo a estudantes estrangeiros, concedendo bolsas de estudos que propiciam esta experiência única.

Ao Alexandre, meu companheiro em todas as horas, presente em todos os momentos.

Aos meus pais, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

## SUMÁRIO

Abreviaturas -----	2
Introdução -----	3
Embasamento Teórico -----	5
Objetivos -----	17
Referências Bibliográficas -----	18
Artigo em Inglês: <i>Thrombin mediation of ischemic neuronal death</i> -----	27
Artigo em Português: <i>O papel da trombina na morte neuronal isquêmica</i> --	47
Artigo em Inglês: <i>Hypoxia/hypoglicemia preconditioning prevents</i> <i>The loss of functional electrical activity in organotypic</i> <i>Slice cultures</i> -----	67
Artigo em Português : <i>O Precondicionamento hipóxico/hipoglicêmico</i> <i>previne a perda da atividade elétrica funcional</i> <i>em culturas organotípicas</i> -----	86

## ABREVIATURAS

ACM - artéria cerebral média

AITs - acidentes isquêmicos transitórios

AVC - acidente vascular cerebral

bcl-2 – gene leucemia/linfoma de células B

CA1/CA3- Corno de Amon 1/3

EDTA- etilendiaminotetraacetico acido

HSP72 - 72 kDa, *heat shock proteins*

IDT – inibidor direto de trombina

NMDA – N-metil-D-aspartato

PAR - receptores de protease ativada

PCI- pré-condicionamento isquêmico

PI- iodo propiônico

PN-1 - Protease-Nexina 1

PNPP- p-Nitrophenyl Phosphate

POG - privação de oxigênio e glicose

SNC - sistema nervoso central

## 1. INTRODUÇÃO

O AVC isquêmico é uma importante causa de incapacidade em adultos e é a terceira causa de morte em nações industrializadas (1). No entanto, suas opções terapêuticas são ainda reduzidas. Nas últimas duas décadas, tem-se dado atenção especial a fármacos neuroprotetores em isquemia cerebral. Contudo, os bons resultados obtidos em laboratório não foram observados nos ensaios clínicos (2,3).

Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* são necessários para determinar a cascata de eventos fisiopatológicos que sucedem a isquemia e para testar novos fármacos neuroprotetores. Os modelos *in vitro* são vantajosos pela fácil acessibilidade, e as culturas organotípicas de hipocampo são particularmente úteis por manter certos aspectos do hipocampo *in vivo* (4-6).

No pré-condicionamento isquêmico cerebral, uma isquemia inicial subletal aumenta a resistência neuronal à subsequente isquemia mais severa. Apesar de numerosos estudos, os mecanismos envolvidos e a importância clínica desse fenômeno ainda não são completamente entendidos (7,8).

A trombina possui um efeito duplo na morte e na sobrevivência celular: em altas concentrações, promove a morte neuronal apoptótica em culturas de astrócitos e de neurônios, enquanto em baixas concentrações induz à neuroproteção (9). Inibidores de trombina como a hirudina e a protease nexina-1 (PN-1) vêm sendo pesquisados como neuroprotetores em isquemia e em situações nas quais a trombina exerce papel deletério, respectivamente (10-12).

Com o objetivo de melhor compreender os mecanismos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico cerebral e de pesquisar o envolvimento da trombina na fisiopatologia da isquemia cerebral, testamos dois mecanismos de neuroproteção, o pré-condicionamento isquêmico e a inibição de trombina através da hirudina e da PN-1. O modelo experimental utilizado foi o de culturas organotípicas hipocampais submetidas à privação combinada de oxigênio e glicose (POG).

## 2. EMBASAMENTO TEÓRICO

O acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico representa uma importante causa de incapacidade e é a terceira causa de morte em países industrializados (1). Cerca de 700.000 AVCs ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, o que corresponde a um evento a cada 45 segundos. Destes, 150.000 resultam em morte e 88% são eventos isquêmicos. Estima-se que, desse total, 500.000 correspondam a primeiros eventos e 200.000 a eventos recorrentes (13).

No Brasil, considerando dados estatísticos oficiais de 2002, o AVC de todos os tipos aparece como primeira causa de mortalidade, com 87.344 óbitos, e a doença coronariana como segunda causa, com 81.505 óbitos. Esse padrão foi mais evidente em mulheres do que em homens e também foi mais observado em regiões onde o nível de pobreza é maior, como região norte, nordeste e centro-oeste (14). Com o envelhecimento progressivo da população, é provável que o número de AVCs aumente substancialmente, já que esse evento é altamente relacionado com a idade (15).

Visando à melhora do prognóstico neurológico no AVC isquêmico, uma variedade de novas estratégias farmacológicas para neuroproteção em isquemia tem sido desenvolvida. A definição de neuroproteção nem sempre é simples; porém, em geral, é uma intervenção não necessariamente farmacológica que objetiva limitar o volume do infarto, principalmente por inibir o aumento de cálcio intracelular, impedir a ativação de radicais livres e diminuir a morte celular apoptótica ou necrótica (2,16). Durante a isquemia cerebral,



ocorre uma série de eventos bioquímicos que ocasionam despolarização, ativação dos canais de cálcio e aumento excessivo de aminoácidos excitatórios, especialmente o glutamato. A ativação dos receptores de glutamato acarreta influxo de cálcio intracelular, ativação de enzimas intracelulares e morte neuronal. O maior conhecimento desses eventos fisiopatológicos que sucedem a isquemia cerebral resultou em um grande número de candidatos a agentes neuroprotetores, a grande maioria testada com sucesso em modelos animais (2,3,16,17). Todavia, embora se mostrem eficazes em modelos experimentais, nenhum desses agentes farmacológicos provou ser neuroprotetor em ensaios clínicos até o presente momento (16,17).

Os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* de isquemia cerebral conseguem reproduzir com certa fidedignidade o que acontece em seres humanos e, por isso, são bastante usados para delinear uma série de eventos patológicos complexos que se seguem à isquemia cerebral transitória ou permanente, bem como para testar novas drogas protetoras em isquemia cerebral (3,17).

Os modelos *in vivo* são utilizados tanto para se estudar a fisiopatologia da isquemia cerebral quanto novas estratégias terapêuticas. Atualmente, existem modelos que tentam assemelhar-se o máximo possível com as condições clínicas humanas, como modelos de isquemia global ou transitória, trombótica ou embólica, hipertensiva ou animais com comorbidades. A vantagem desse sistema é que ele pode reproduzir a isquemia sob condições ideais, controlando-se possíveis variáveis capazes de modificar os resultados, como severidade, duração ou localização do evento isquêmico, eliminando a variabilidade inerente à situação clínica. Entretanto, esses modelos sofrem

influências sistêmicas e vasculares que podem afetar diretamente os neurônios. Assim, prefere-se os modelos *in vivo* para verificar a eficácia de uma droga e os modelos *in vitro* para examinar os mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal isquêmica (2,3,18,19).

Os modelos *in vitro* são sistemas simplificados, porém específicos, de mecanismos de dano neuronal. As vantagens de trabalhar diretamente com as células ou com o tecido *in vitro* consistem na fácil acessibilidade, além de testar rapidamente agentes químicos ou estudar *in situ* produtos do metabolismo do tecido em questão. O controle de variáveis como temperatura, nesse tipo de modelo, é muito mais fácil e não há interferência de mecanismos homeostáticos compensatórios. O uso de anestésicos também é dispensável, evitando-se, assim, problemas com depressão do sistema nervoso central (SNC) (20,21).

A maior parte dos estudos de hipoxia cerebral que utilizam cultura de células tem sido realizada com culturas primárias de neurônios hipocâmpais de roedores, neurônios granulares do cerebelo ou neurônios neocorticais. Esses neurônios ou são isolados em meio de cultura específica, ou são cultivados junto com astrócitos. A cultura celular é de fácil acesso a microscopia, histologia e eletrofisiologia. No modelo de isquemia *in vitro*, as culturas celulares são submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG) (3,21). Na POG, as células ou os tecidos são submetidos a hipoxia em uma câmara umidificada em meio de cultura hipoglicêmico (21).

As culturas organotípicas, ou culturas de “fatias” ou cortes cerebrais, mantêm a estrutura do tecido, as interações celulares e a maior parte das respostas celulares observadas no cérebro intacto após isquemia experimental,

como a despolarização do tipo depressão alastrante (20,22), e têm sido uma alternativa para estudar a morte neuronal induzida por modelos excitotóxicos (23), hipoglicêmicos (23) e por privação combinada de glicose e oxigênio, esta mimetizando uma situação de isquemia (24).

As culturas organotípicas de hipocampo são modelos particularmente viáveis para estudar isquemia cerebral *in vitro*, porque retratam certos aspectos da isquemia *in vivo*, como a vulnerabilidade dos neurônios de CA1 – e, em menor grau, de CA3 – à POG e também oferecem a vantagem de preservar as conexões sinápticas intrínsecas encontradas *in vivo* (4-6). Esse tipo de cultura demonstra-se um excelente complemento entre os modelos de isquemia *in vivo* e as culturas celulares. No entanto, não pode imitar a isquemia real por não sofrer influências do fluxo sangüíneo ou hormonal. Além disso, por não envolver o fluxo sangüíneo, toda intervenção terapêutica que visa ao aumento da reperfusão não pode ser estudada por esse sistema. Do mesmo modo, a inexistência de edema cerebral ou de reações inflamatórias pós-isquemia impedem a pesquisa de tais eventos através desse modelo (18,22).

O pré-condicionamento isquêmico cerebral é um fenômeno experimental caracterizado por episódios breves de isquemia cerebral não-neurotóxicas que reduzem significativamente a perda neuronal, seguindo a um segundo episódio mais prolongado e severo de isquemia. Esse fenômeno é também chamado de tolerância isquêmica e representa provavelmente uma resposta celular a certos tipos ou níveis de lesão (7,8). Primeiramente observado no miocárdio, o pré-condicionamento isquêmico hoje é bem estabelecido em muitos modelos animais de isquemia cerebral, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (7,25-28).

No passado, a maior parte dos estudos em pré-condicionamento cerebral sugeria que eram necessárias várias horas para o desenvolvimento da tolerância isquêmica (29). Em trabalhos recentes, porém, sugere-se que um tempo curto de pré-condicionamento seja suficiente, semelhante ao que ocorre com o miocárdio (30,31). Atochin et al. (30) demonstraram, em um modelo animal de isquemia focal, que três episódios de apenas 5 minutos de pré-condicionamento diminuíram o tamanho do infarto e os défices neurológicos dos camundongos pré-condicionados.

Acredita-se que existam duas janelas de pré-condicionamento: uma que ocorre muito rapidamente (dentro de 1 hora) e uma que se desenvolve lentamente (em alguns dias). A diferença entre essas duas janelas é que a neuroproteção induzida pela primeira é transitória (8,29). Tem-se levantado a hipótese de que essas diferentes janelas de pré-condicionamento podem refletir diferentes mecanismos de neuroproteção: a primeira provocando mudanças no metabolismo celular e a segunda modificando a expressão de determinados genes (8).

Apesar de bastante documentados em modelos experimentais, os mecanismos precisos do pré-condicionamento isquêmico cerebral não são completamente conhecidos. Entretanto, existem vários candidatos a possíveis indutores, transmissores e efetores da tolerância isquêmica. Durante a fase precoce ou de indução, o NMDA, os receptores de adenosina, as HSP72 (72 kDa, *heat shock proteins*) e os radicais livres de oxigênio são ativados (8,32-34).

Puisieux et al. (32) observaram, em um modelo *in vivo* de pré-condicionamento com oclusão de artéria cerebral média (ACM), que houve

uma indução precoce do estresse oxidativo, sugerindo que esse pode ser o mecanismo que inicia a cascata de eventos celulares que levam à tolerância isquêmica. Na fase de transmissão, proteínas quinases, fatores de transcrição e alguns genes parecem transmitir o sinal de resposta à isquemia (8,28,35). Essas duas primeiras fases, chamadas em conjunto fase precoce de proteção, duram algumas horas após o início do estímulo. Na terceira fase, chamada efetora, haveria um remodelamento genético, com expressão e supressão de múltiplos genes, incluindo a regulação de genes antiapoptóticos, como bcl-2 (35,36).

Stenzel-Poore et al. (36) demonstraram, em oito camundongos, que o pré-condicionamento isquêmico, através da oclusão da ACM por 15 minutos, diminuiu a expressão de 47 dos 61 genes estudados, além de suprimir vias metabólicas e respostas imunes. Essas alterações encontradas foram semelhantes às observadas em animais que hibernam, situação na qual também há diminuição do fluxo sanguíneo e redução de oxigênio.

A importância clínica desse evento ainda é controversa, mas Moncayo et al. (37) observaram que a história de acidentes isquêmicos transitórios (AITs) prévios ao AVC seria um fator de melhor prognóstico e de melhor recuperação, sugerindo que os pacientes acometidos apresentariam tolerância isquêmica. Neste estudo, o tempo de duração do AIT influenciou no prognóstico. AITs com duração entre 10 e 20 minutos tiveram um melhor prognóstico do que aqueles com duração menor que 10 minutos ou maior que 20 minutos.

Moncayo et al. levantaram a hipótese, para esses achados, de que um AIT de até 20 minutos pode corresponder ao “tempo crítico” para desencadear os fenômenos de pré-condicionamento isquêmico em humanos, enquanto um

AIT de menos de 10 minutos seria muito breve e insuficiente para ativar os mecanismos envolvidos na tolerância isquêmica. Curiosamente, estudos experimentais também demonstram diferentes níveis de neuroproteção quando se alteram os tempos de pré-condicionamento (38,39). Weih et al. (40) também demonstraram uma menor severidade de défices neurológicos em pacientes com história prévia de AIT; porém, diferentemente de Moncayo et al., não levaram em consideração o tempo de duração do AIT.

Mais recentemente, Wegener et al. (41) investigaram o fenômeno da tolerância isquêmica em 65 pacientes com AVC isquêmico. Observaram que os pacientes com história prévia de AIT tinham um volume de infarto menor, medidos por ressonância magnética (RM) por difusão, e défices clínicos menores do que aqueles sem história de AIT.

Apesar dos estudos clínicos citados acima, o AIT é um fator de risco bem reconhecido para AVC isquêmico, com a mesma importância de outros fatores de risco para doença cerebrovascular isquêmica. O risco anual para AVC após AIT está entre 1 e 15%, com um risco relativo (RR) variando entre 2 a 5 vezes (42).

A trombina, uma protease sérica gerada a partir de seu precursor, a protrombina, é imediatamente produzida em sítios de lesões vasculares. Seu papel na hemostasia e na trombose é bem conhecido; no entanto, a trombina também está envolvida em respostas proliferativas e inflamatórias associadas a situações normais e patológicas (43). O SNC é exposto à trombina quando há quebra da barreira hematoencefálica. Isso ocorre em situações de trauma de cranioencefálico, AVC isquêmico ou hemorrágico (44).

Estudos com culturas de células neuronais têm demonstrado uma ampla variedade de respostas dessas células à trombina. Ela induz um processo de retração em células de neuroblastomas (45), é mitogênica para astrócitos (46) e induz a síntese e a secreção do fator de crescimento de nervo (47) e da endotelina-1 (48). Recentemente, demonstrou-se que a trombina causa duas respostas que indicam um importante papel dessa protease em patologias do SNC: 1) promove a morte celular por mecanismos apoptóticos a altas concentrações em culturas de astrócitos e neurônios hipocâmpais e 2) induz neuroproteção a baixas concentrações nas mesmas células (9,44,49). A trombina exerce essas funções através da família de receptores acoplados à proteína-G (50).

Essa família de receptores de protease ativada (PAR) contém quatro membros, de PAR-1 a PAR-4. Destes, PAR-1 e PAR-3 são ativados por trombina a baixa e alta concentração, respectivamente. PAR-4 é ativado por trombina e tripsina, enquanto PAR-2 é ativado por tripsina (50,51). Vários estudos têm relatado a presença dos quatro subtipos de PAR no cérebro (44,50,51,52). Strigow et al. (52) observaram uma abundante expressão, principalmente de PAR-1, em culturas organotípicas de hipocâmpos, assim como em córtex e amígdala de ratos. Essa expressão aumentou significativamente após isquemia experimental *in vitro*, sobretudo de PAR-1 a PAR-3. No entanto, sabe-se que as proteases ativadas são encontradas em outras regiões do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico (51).

Recentes estudos têm envolvido a trombina, seus receptores e seus inibidores em múltiplas funções no SNC, tomando parte em um delicado processo entre neurodegeneração e neuroproteção durante eventos

inflamatórios, vasculares e degenerativos. Relatos atuais também relacionam a trombina com a cascata das caspases, enzimas envolvidas na apoptose. Smirnova et al. (53) observaram que, após tratamento com trombina, a caspase-3 é ativada em culturas primárias de motoneurônios.

O co-tratamento com inibidores de caspases preveniu completamente a degeneração e a morte neuronal induzida por altas doses de trombina (51). Nesse contexto, a trombina também pode estar envolvida na fisiopatologia do AVC isquêmico. Masada et al. (54) observaram que o pré-tratamento com baixas doses de trombina, antes de uma isquemia cerebral severa em um modelo *in vivo*, reduz o dano isquêmico, relatando que baixas doses de trombina funcionariam como um fator de tolerância isquêmica ou como um pré-condicionador isquêmico. Além disso, os inibidores de trombina atenuam a morte neuronal após isquemia cerebral em modelos *in vivo* (10,55,56).

Os receptores de trombina igualmente parecem ter um papel na isquemia cerebral. Rohatgi et al. (51) demonstraram um aumento da expressão do PAR-1 RNA mensageiro após isquemia transitória focal, enquanto Junge et al. (57) detectaram uma redução significativa do volume do infarto em camundongos *knockout* para PAR-1 após isquemia transitória focal, indicando um papel neurodegenerativo de PAR-1 durante o AVC.

Os inibidores diretos de trombina (IDT) também vêm sendo estudados em modelos experimentais de AVC isquêmico. Eles se constituem em uma nova classe de anticoagulantes que se ligam diretamente à trombina e bloqueiam sua interação com seus substratos. Alguns IDTs, como hirudinas recombinantes, bivalirrudinas e ximelagatran, estão sendo submetidos a



estudos clínicos fase III para prevenção e tratamento de trombose arterial e venosa (58-60).

Enquanto a heparina inibe indiretamente a trombina através da sua ligação com a antitrombina, formando o complexo fibrina-heparina-trombina, os IDTs ligam-se ao sítio ativo ou sítio catalítico da própria molécula de trombina (58). Devido à sua ação independente da antitrombina, os IDTs podem inibir a trombina ligada à fibrina ou os produtos de degradação da fibrina. Além disso, têm um efeito antiplaquetário por reduzirem a ativação de plaquetas intermediada por trombina (58-60).

A hirudina é um polipeptídeo anticoagulante de 65 aminoácidos derivado da glândula salivar das sanguessugas (*Hirudo medicinalis*), liga-se a trombina em seu sítio ativo e forma um complexo estequiométrico irreversível 1:1 com a mesma (58,60). Karabiyikoglu et al. (10) demonstraram que injeções intracerebrais de hirudina promovem proteção em um modelo de oclusão transitória de artéria cerebral média em ratos, observada através da redução do volume de infarto no núcleo caudado e em testes neurológicos para avaliação de défices focais. Observaram também um aumento da imunorreatividade da trombina no hemisfério lesado entre 4 e 24 horas após a isquemia, sugerindo um papel deletério da protease na lesão isquêmica.

Striggow et al. (9), em um modelo de pré-condicionamento isquêmico *in vivo*, observaram que a neuroproteção foi perdida quando os animais foram tratados com hirudina antes de serem expostos à isquemia, sugerindo que a trombina pode estar envolvida na morte e na sobrevivência neuronal pós-isquemia cerebral.

A protease nexina-1 (PN-1), também conhecida como nexina derivada de glia, é uma serpina de 44 kDa sintetizada e excretada por células gliais e neuronais. Inibe a atividade de muitas proteases séricas, incluindo a trombina e o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), e esta função pode ser neuroprotetora em situações patológicas nas quais a trombina exerce um papel deletério (11,12). Turgeon et al. (62) demonstraram que o tratamento com PN-1 em embriões de galinha promove a sobrevivência e o crescimento de motoneurônios espinhais pós-apoptose natural ocorrida nessa fase e também seguindo a axotomia traumática em ratos. Essas observações reforçam a idéia de que o balanço entre as proteases séricas e as serpinas pode estar envolvido na regulação das células neuronais no desenvolvimento normal e em situações patológicas (12,62).

A produção ou não de trombina no SNC ainda é controversa. A detecção dos seus receptores, a família PAR, já foi relatada (44,50,51,52), principalmente em áreas vulneráveis à isquemia (51). No entanto, seu precursor, a protrombina, foi observado em culturas neuronais por alguns autores (63,64), ao passo que outros não conseguiram comprovar sua expressão no SNC (65,66). Sinnreich et al. (67) observaram, em culturas neuronais e em culturas organotípicas de hipocampo, que a expressão de protrombina nessas culturas dependia de fatores sangüíneos. Este trabalho sugere que nem os neurônios nem a glia podem ativar ou secretar protrombina no SNC de camundongos adultos.

O papel da trombina na fisiopatologia do AVC isquêmico cerebral ainda é desconhecido. Sabe-se que, durante a isquemia, a trombina pode ser neuroprotetora ou neurodegenerativa, dependendo da sua concentração, da

intensidade e da duração do insulto (51). Além disso, demonstrou-se que inibidores diretos de trombina são neuroprotetores em modelos *in vivo* de isquemia cerebral (10,55,56) e que há um aumento da expressão do PAR RNA mensageiro após insulto isquêmico (52,57). Esses achados sugerem uma participação da trombina na cascata de eventos que se sucedem à isquemia cerebral. Compreender o real papel da trombina na lesão isquêmica é fundamental para um melhor entendimento da fisiopatologia do AVC e para o planejamento de futuros neuroprotetores.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Determinar se o pré-condicionamento isquêmico e a inibição de trombina diminuem a morte neuronal de culturas organotípicas hipocámpais submetidas à privação de oxigênio e glicose.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.1 Determinar, a partir de um modelo *in vitro* de isquemia cerebral, um padrão de pré-condicionamento isquêmico, mensurando a severidade do insulto através da avaliação da função neuronal pela eletrofisiologia e da viabilidade celular pela fluorescência com iodo propiônico (PI).

4.2 Observar, também em modelo de isquemia *in vitro*, se a hirudina induz uma neuroproteção, testando-se doses crescentes da substância e visualizando-se a morte neuronal através de fluorescência com PI.

4.3 Testar a neuroproteção através da PN-1 e compará-la com os resultados obtidos com a hirudina.

4.4 Verificar se existe um aumento da expressão da trombina após isquemia, através do Western-Blot, e se a trombina tem um papel relevante na morte neuronal isquêmica.

## 5. REFERÊNCIAS

1. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx* (2004) 1: 36-45.
2. Cheng, Y.D., Al-Khoury, L. and Zivin, J.A., Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure, *NeuroRx*, 1 (2004) 36-45.
3. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development, *Stroke*, 30 (1999) 2752-8.
4. Laake JH, Haug FM, Wieloch T and Ottersen OP: A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc* (1999) 4 :173-184
5. Noraberg J, Kristensen BW and Zimmer J.: Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* (1999) 3 : 278-290
6. Schurr, A., Reid, K.H., Tseng, M.T., West, C. and Rigor, B.M., Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro, *Brain Res*, 374 (1986) 244-8.
7. Xu, G.P., Dave, K.R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T.J. and Perez-Pinzon, M.A., Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures, *Brain Res*, 952 (2002) 153-8.
8. Schaller B and Graf: Cerebral ischemic preconditioning- an experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? *J Neurol* (2002) 249: 1503-1511

9. Striggow, F., Riek, M., Breder, J., Henrich-Noack, P., Reymann, K.G. and Reiser, G., The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 2264-9.
10. Karabiyikoglu M, Hua Y, Keep RF, Ennis SR and Xi G : Intracerebral hirundin injection attenuates ischemic damage and neurologic deficits without altering local cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* (2004) 24(2): 159-166
11. Mansuy, I.M., van der Putten, H., Schmid, P., Meins, M., Botteri, F.M. and Monard, D., Variable and multiple expression of Protease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development, *Development*, 119 (1993) 1119-34.
12. Smith-Swintosky, V.L., Zimmer, S., Fenton, J.W., 2nd and Mattson, M.P., Protease nexin-1 and thrombin modulate neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and sensitivity to glucose deprivation-induced injury, *J Neurosci*, 15 (1995) 5840-50.
13. Heart Disease and Stroke Statistics- Update 2005- American Heart Association/ American Stroke Association- *Learn and Live*: 1-63
14. Lotufo, P.A., Stroke in Brazil: a neglected disease, *Sao Paulo Med J*, 123 (2005) 3-4.
15. Wolf PA, Kannel WB, D'agostino RB: Epiemiology of stroke. In GinsbergMD and Bogousslavsky J (ed.). *Cerebrovascular Disease- Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 1ed.Maden:Blackell Science, (1998): 834-835

16. Wahlgren, N.G. and Ahmed, N., Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies--the need for new approaches, *Cerebrovasc Dis*, 17 Suppl 1 (2004) 153-66
17. Hoyte, L., Kaur, J. and Buchan, A.M., Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials, *Exp Neurol*, 188 (2004) 200-4.
18. Alonso de Lecinana, M., Diez-Tejedor, E., Carceller, F. and Roda, J.M., Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed? *Cerebrovasc Dis*, 11 Suppl 1 (2001): 20-30.
19. Ginsberg MD, Busto R. Small animal model of global and focal cerebral ischemia. In GinsbergMD and Bogouslavsky J (ed.). *Cerebrovascular Disease- Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 1ed.Maden:Blackell Science, (1998): 14-35.
20. Stoppini, L., Buchs, P.A. and Muller, D., A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, *J Neurosci Methods*, 37 (1991) 173-82.
21. Borsello, T., Clarke, P.G., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D.F., Bogouslavsky, J. and Bonny, C., A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia, *Nat Med*, 9 (2003) 1180-6.
22. Sick T, Somjen GG. Tissue slice. In GinsbergMD and Bogouslavsky J (ed.). *Cerebrovascular Disease- Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 1ed.Maden:Blackell Science, (1998): 137-56
23. Vornov JJ, Tasker RC and Coyle JT: Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA and kainite neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures. *Exp Neurol* (1991) 114:11-22

24. Bernaudin M, Nouvelot A; Mackenzie ET and Petit E: Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. *Exp Neurol* (1998) 150. 30-39
25. Cimarosti, H., Jones, N.M., O'Shea, R.D., Pow, D.V., Salbego, C. and Beart, P.M., Hypoxic preconditioning in neonatal rat brain involves regulation of excitatory amino acid transporter 2 and estrogen receptor alpha, *Neurosci Lett*, 385 (2005) 52-7
26. Dowden, J. and Corbett, D., Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures, *Stroke*, 30 (1999) 1240-6.
27. Corbett, D. and Crooks, P., Ischemic preconditioning: a long-term survival study using behavioural and histological endpoints, *Brain Res*, 760 (1997) 129-36.
28. Chen, J. and Simon, R., Ischemic tolerance in the brain, *Neurology*, 48 (1997) 306-11.
29. Perez-Pinzon, M.A., Neuroprotective effects of ischemic preconditioning in brain mitochondria following cerebral ischemia, *J Bioenerg Biomembr*, 36 (2004) 323-7.
30. Atochin, D.N., Clark, J., Demchenko, I.T., Moskowitz, M.A. and Huang, P.L., Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases, *Stroke*, 34 (2003) 1299-303.
31. Centeno, J.M., Orti, M., Salom, J.B., Sick, T.J. and Perez-Pinzon, M.A., Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices, *Brain Res*, 836 (1999) 62-9.



32. Puisieux, F., Deplanque, D., Bulckaen, H., Maboudou, P., Gele, P., Lhermitte, M., Lebuffe, G. and Bordet, R., Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase, *Brain Res*, 1027 (2004) 30-7.
33. Pringle, A.K., Angunawela, R., Wilde, G.J., Mephram, J.A., Sundstrom, L.E. and Iannotti, F., Induction of 72 kDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23 (1997) 289-98
34. Pringle, A.K., Thomas, S.J., Signorelli, F. and Iannotti, F., Ischaemic preconditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72), *Brain Res*, 845 (1999) 152-64.
35. Dirnagl, U., Simon, R.P. and Hallenbeck, J.M., Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection, *Trends Neurosci*, 26 (2003) 248-54.
36. Stenzel-Poore, M.P., Stevens, S.L., Xiong, Z., Lessov, N.S., Harrington, C.A., Mori, M., Meller, R., Rosenzweig, H.L., Tobar, E., Shaw, T.E., Chu, X. and Simon, R.P., Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states, *Lancet*, 362 (2003) 1028-37.
37. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M and van Melle G: Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* (2000) 54: 2089-2094
38. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Kuwabara, K., Tagaya, M., Ohtsuki, T., Hata, R., Ueda, H., Handa, N., Kimura, K. and Kamada, T., 'Ischemic tolerance'

- phenomenon detected in various brain regions, *Brain Res*, 561 (1991) 203-11.
39. Simon, R.P., Niiro, M. and Gwinn, R., Prior ischemic stress protects against experimental stroke, *Neurosci Lett*, 163 (1993) 135-7.
40. Weih, M., Kallenberg, K., Bergk, A., Dirnagl, U., Harms, L., Wernecke, K.D. and Einhaupl, K.M., Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*, 30 (1999) 1851-4.
41. Wegener, S., Gottschalk, B., Jovanovic, V., Knab, R., Fiebach, J.B., Schellinger, P.D., Kucinski, T., Jungehulsing, G.J., Brunecker, P., Muller, B., Banasik, A., Amberger, N., Wernecke, K.D., Siebler, M., Rother, J., Villringer, A. and Weih, M., Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study, *Stroke*, 35 (2004) 616-21.
42. Sacco, R.L., Risk factors for TIA and TIA as a risk factor for stroke, *Neurology*, 62 (2004) S7-11.
43. Vaughan, P.J., Pike, C.J., Cotman, C.W. and Cunningham, D.D., Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults, *J Neurosci*, 15 (1995) 5389-401.
44. Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW et al. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci*. (1997) 17:5316-5326
45. Gurwitz, D. and Cunningham, D.D., Neurite outgrowth activity of protease nexin-1 on neuroblastoma cells requires thrombin inhibition, *J Cell Physiol*, 142 (1990) 155-62

46. Cavanaugh, K.P., Gurwitz, D., Cunningham, D.D. and Bradshaw, R.A., Reciprocal modulation of astrocyte stellation by thrombin and protease nexin-1, *J Neurochem*, 54 (1990) 1735-43.
47. R Neveu, I., Jehan, F., Jandrot-Perrus, M., Wion, D. and Brachet, P., Enhancement of the synthesis and secretion of nerve growth factor in primary cultures of glial cells by proteases: a possible involvement of thrombin, *J Neurochem*, 60 (1993) 858-67
48. Ehrenreich, H., Costa, T., Clouse, K.A., Pluta, R.M., Ogino, Y., Coligan, J.E. and Burd, P.R., Thrombin is a regulator of astrocytic endothelin-1, *Brain Res*, 600 (1993) 201-7.
49. Donovan FM, Cunningham DD. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem*. (1998) 273:12746-12752
50. Rohatgi, T., Henrich-Noack, P., Sedehizade, F., Goertler, M., Wallesch, C.W., Reymann, K.G. and Reiser, G., Transient focal ischemia in rat brain differentially regulates mRNA expression of protease-activated receptors 1 to 4, *J Neurosci Res* (2004) 273-9.
51. Rohatgi, T., Sedehizade, F., Reymann, K.G. and Reiser, G., Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain, *Neuroscientist*, 10 (2004) 501-12
52. Striggow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J., Krug, M., Reymann, K.G. and Reiser, G., Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia, *Eur J Neurosci*, 14 (2001) 595-608.

53. Smirnova, I.V., Zhang, S.X., Citron, B.A., Arnold, P.M. and Festoff, B.W., Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons, *J Neurobiol*, 36 (1998) 64-80.
54. Masada, T., Xi, G., Hua, Y. and Keep, R.F., The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats, *Brain Res*, 867 (2000) 173-9.
55. Ohyama, H., Hosomi, N., Takahashi, T., Mizushige, K. and Kohno, M., Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia, *Brain Res*, 902 (2001) 264-71.
56. Mima, T., Jin, Y.J., Hirayama, T., Mostafa, M.G. and Mori, K., Argatroban, a thrombin inhibitor, decreased mortality after 10 min of forebrain ischemia in the gerbil, *Neurosci Lett*, 279 (2000) 93-6.
57. Junge, C.E., Sugawara, T., Mannaioni, G., Alagarsamy, S., Conn, P.J., Brat, D.J., Chan, P.H. and Traynelis, S.F., The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 13019-24.
58. Di Nisio, M., Middeldorp, S. and Buller, H.R., Direct thrombin inhibitors, *N Engl J Med*, 353 (2005) 1028-40.
59. Halperin, J.L., Ximelagatran: oral direct thrombin inhibition as anticoagulant therapy in atrial fibrillation, *J Am Coll Cardiol*, 45 (2005) 1-9.
60. Palagummi, P., Saltzman, H. and Ezekowitz, M., Direct thrombin inhibitors: stroke prevention in atrial fibrillation and potential anti-inflammatory properties, *Am Heart J*, 149 (2005) S32-5.

61. Markwadt F: The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res* (1994) 741 1-23
62. Turgeon, V.L. and Houenou, L.J., Prevention of thrombin-induced motoneuron degeneration with different neurotrophic factors in highly enriched cultures, *J Neurobiol*, 38 (1999) 571-80.
63. Weinstein, J.R., Gold, S.J., Cunningham, D.D. and Gall, C.M., Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA, *J Neurosci*, 15 (1995) 2906-19.
64. Riek-Burchardt, M., Striggow, F., Henrich-Noack, P., Reiser, G. and Reymann, K.G., Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors, *Neurosci Lett*, 329 (2002) 181-4.
65. Jamison, C.S. and Degen, S.J., Prenatal and postnatal expression of mRNA coding for rat prothrombin, *Biochim Biophys Acta*, 1088 (1991) 208-16.
66. Soifer, S.J., Peters, K.G., O'Keefe, J. and Coughlin, S.R., Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development, *Am J Pathol*, 144 (1994) 60-9.
67. Sinnreich, M., Meins, M., Niclou, S.P., Suidan, H.S. and Monard, D., Prothrombin overexpressed in post-natal neurones requires blood factors for activation in the mouse brain, *J Neurochem*, 88 (2004) 1380-8.

## THROMBIN MEDIATION OF ISCHEMIC NEURONAL DEATH

Marlise de Castro Ribeiro<sup>1</sup>, MD

Jérôme Badaut<sup>2</sup>, PhD

Melanie Price<sup>1</sup>, PhD

Marita Meins<sup>3</sup>, MS

Julien Bogousslavsky<sup>1</sup>, MD

Denis Monard<sup>3</sup>, PhD

Lorenz Hirt<sup>1</sup>, MD

1. Neurology Service, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland, phone +41 21 314 11 83

2. Neurosurgery Service, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland phone +41 21 314 21 20

3. Friedrich-Miescher Institut for Biomedical Research, Basel, Switzerland, phone +41 61 697 66 58

*Correspondence to:* Lorenz Hirt,

Neurology Service, BH 19 208, CHUV

1011 Lausanne, Switzerland

Tel +41 21 314 12 68; Fax +41 21 314 12 44; email [Lorenz.Hirt@chuv.ch](mailto:Lorenz.Hirt@chuv.ch)

## Abstract

Thrombin has dual effects on cell death and survival: at high concentrations it mediates apoptotic cell death in cultured astrocytes and neurons while at low concentrations it induces neuroprotection. Thrombin plays a role in ischemic cell death, as rats subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAo) were protected by the intracerebral injection of hirudin, a selective thrombin inhibitor. To separate the role of thrombin in cell death and in coagulation, we have used an *in vitro* approach to test the effect of hirudin and of protease nexin-1 (PN1), a cerebral thrombin inhibitor, on neuronal ischemia. Organotypic hippocampal slice cultures from newborn rats were subjected to oxygen (5%) and glucose (1 mmol/L) deprivation (OGD) during 30minutes, and cell death was evaluated with propidium iodide in the CA1 region. Recombinant hirudin or PN1 were administered after OGD. Thrombin expression was evaluated by Western blotting. Results: Thrombin plays an important role in ischemic neuronal death in neural tissue, as hirudin and PN1 significantly prevented neuronal death in hippocampal slices subjected to OGD. 24hours after OGD, there was a marked increase in thrombin immunoreactivity on western blots. Conclusion: Thrombin signaling contributes to ischemic damage in neural tissue, in an *in vitro* ischemia model.

**Keywords**

Organotypic hippocampal slice cultures;

Anticoagulants; thrombin;

Hirudin; Protease nexin-1;

Neuroprotection;



## Introduction

Thrombin is a serine protease best known for its role in coagulation and with dual effects on cell death and survival: it mediates apoptotic cell death at high concentrations in cultured astrocytes and hippocampal neurons and induces neuroprotection at low concentrations in the same cells (1,2).

Thrombin arises from proteolytic activation of its precursor prothrombin. Prothrombin messenger RNA has been detected in the central nervous system, and both the major thrombin receptor PAR-1 (protease activated receptor 1) and the thrombin inhibitor PN-1 (protease nexin-1) are expressed in the brain (3,4). In cerebral tissue, thrombin is responsible for part of the edema resulting from intracerebral hemorrhage (5).

Transgenic mice lacking PAR-1 develop smaller lesions than their wild type littermates when subjected to middle cerebral artery occlusion (MCAo) (6) suggesting a role for thrombin in mediating ischemic damage. The direct thrombin inhibitor argatroban was studied in a rat thrombotic distal middle cerebral artery occlusion model with i.p. administration. It was shown to reduce micro-thrombi, to improve regional cerebral blood flow, to reduce the lesion size and to improve the functional outcome (7). More recently hirudin was studied in a non-thrombotic rat stroke model (8). Hirudin is a 65 amino acid polypeptide anticoagulant from the salivary glands of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*), and is a direct and selective thrombin inhibitor, which binds to thrombin and prevents it from cleaving its substrates (9). Intracerebral injection of hirudin provides protection in a rat suture middle cerebral artery occlusion model, without influencing the cerebral blood flow, suggesting that thrombin is involved in ischemic cell death mechanisms (8). After ischemia, there was a

marked increase in thrombin immunoreactivity within the ischemic lesion (8) which could result either from the entry into the brain after disruption of the blood brain barrier or from endogenous synthesis. Increased levels of prothrombin mRNA have been detected in the brain after global cerebral ischemia in the rat suggesting that prothrombin is synthesized in the cerebral parenchyma (10).

We used an *in vitro* approach, in which the role of thrombin in the neural tissue can be separated from its role in coagulation, to determine if hirudin was able to influence cell death. We subjected organotypic hippocampal slice cultures to combined oxygen and glucose deprivation (11,12). Hirudin, even at very low concentrations provided a strong protection in this system, and recombinant PN-1, a central nervous system (CNS) thrombin inhibitor also significantly reduced neuronal death. There was a marked increase in thrombin immunoreactivity on Western blots after combined oxygen and glucose deprivation.

### **Materials and methods**

All animal experiments were conducted in accordance with guidelines of the Swiss Veterinary Office.

#### Hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared from 10-12 day-old rats (OFA Sprague Dawley, IFA CREDO, France) (11,13). Coronal sections (350  $\mu\text{m}$ ) were placed onto a sterile porous membrane unit (Millicell-CM, Millipore) in wells containing 1 ml of culture medium with 25 % horse serum, 50% MEM supplemented with HEPES and sodium bicarbonate, 25 % Hank's salt solution, L-glutamine 2 mM and D-glucose 35 mM). Cultures were grown at

33°C, 100% humidity, 5 % CO<sub>2</sub> during 4 days, and then transferred to culture medium with 15 % horse serum, containing 5mM D-glucose.

#### Oxygen and glucose deprivation on organotypic slice cultures

The oxygen and glucose deprivation (OGD) was carried out in serum free “hypoglycaemic” medium, DMEM (D5030, Sigma) supplemented by 1 mM D-glucose and 2 mM L-glutamine on hippocampal slices after 8 days of culture. This medium was equilibrated for one hour at 37 °C, in a humidified hypoxic chamber (COY, MI, USA) with a “hypoxic” atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, completed by N<sub>2</sub>. Slices were transferred into this “buffered medium” and placed in the hypoxic chamber for 30 minutes. Control cultures were placed in DMEM medium supplemented by 5 mM D-glucose and 2 mM L-glutamine for 30 minutes at 37 °C in a humid normoxic atmosphere (11,12). Cultures were then transferred into culture medium, either with 15% horse serum or without serum, at 33 °C for 24 or 48 hours. Hirudin, PN-1 or an equal volume of culture medium was added after OGD: recombinant [Lys47] leech hirudin (final concentrations 0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10 antithrombin U/ml, Sigma) was added after OGD and then removed either after one or 24 hours, in the presence of serum, or after 24 hours in absence of serum. Yeast recombinant PN-1<sup>14</sup> was added after OGD (final concentrations 0.31 mg/ml or 0.031 mg/ml) in the absence of serum but with addition of bovine serum albumin (BSA, final concentration 0.1mg/ml).

Cell death was determined in CA1 using the fluorescent viability indicator propidium iodide (PI, 50 µg/ml, 30 minutes)<sup>12</sup>. PI fluorescence emission (excitation wavelength 568 nm) was measured 24h and 48h after ischemia, using an epifluorescence microscope (Leica) with a 5X lens, coupled to a camera (Leica). PI images were acquired with standardized camera settings;

the optical density was measured with Scion image software (Scion Corp). After subtracting the background fluorescence (measured on each slice), the results were expressed as the percentage of maximal cell death occurring after submerging slices in PBS for 24 hours.

#### Western blotting

After propidium iodide staining, hippocampal slice cultures were frozen in liquid nitrogen vapor. Frozen slices were transferred into ice-cold homogenization buffer (20mM Tris Acetate pH 7.0, 0.27M sucrose, 1mM EDTA, 50mM sodium fluoride, 10mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1mM sodium vanadate, 1mM Dithiothreitol, 5mM sodium pyrophosphate, 10mM PNPP, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail, Roche) and sonicated (3 slices in 100 $\mu$ L). Lysates were centrifuged at 10000g for 15 minutes. Protein extracts (10  $\mu$ g per lane) were separated by electrophoresis on denaturing 10% SDS-polyacrylamide gels (Invitrogen) and transferred onto a Hybond-P membrane (Amersham Biosciences). Membranes were incubated for 2 hours at room temperature with an antibody against thrombin (1/2000, Anti-human Thrombin Fragment IIa sheep affinity purified IgG, Affinity Biologicals Inc), followed by rabbit anti-sheep IgG, horse radish peroxidase conjugate (1:50000, Upstate) for 1 hour, and revealed by enhanced chemoluminescence (Amersham). After stripping, membranes were stained with Coomassie blue to control loading.

#### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between more than two groups were carried out by the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons (Instat, Graphpad, San Diego). P values  $<0.05$  were considered significant.

## Results

### Hirudin addition after OGD protects hippocampal slice cultures

Ischemia was modeled *in vitro* by subjecting hippocampal slice cultures to a combined oxygen and glucose deprivation (OGD) (11,12) for 30 minutes. After OGD, hirudin was added to the culture medium either for 24 hours or for 1 hour. Concentrations of hirudin of 0.1U/ml and 1U/ml for 24 hours reduced ischemic death measured at 48 hours in CA1 (respectively 12.9 $\pm$ 2.3%, n=24, p<0.01 and 15.1 $\pm$ 2.4%, n=35, p<0.001) compared to OGD alone (33.1 $\pm$ 2.9%, n = 51 Figure 1A). As hirudin is a very specific thrombin inhibitor, this first experiment suggests that active thrombin is present in these organotypic slice cultures and contributes to the ischemic damage.

When hirudin was present for only 1 hour after OGD, there was also a significant reduction of ischemic death with concentrations of 0.1U/ml and 1U/ml (respectively 18.1 $\pm$ 2.8%, n=31, p<0.05 and 15.6 $\pm$  2.5%, n=19, p<0.01) compared to OGD alone (33.1 $\pm$  2.9%, figure 1B), showing that the action of hirudin at an early time-point is sufficient to achieve protection.

In the experiments described above, the hippocampal cultures were transferred after OGD, to a culture medium containing 15% horse serum. To limit the contribution of horse serum prothrombin and activating factors, we transferred the cultures to serum free medium after OGD, added hirudin as above, and quantitated cell death after 24 hours; the earlier time point was chosen because there was an increase in non-specific cell death at 48 hours in the absence of serum. In culture conditions without serum, we also observed a significant protection with hirudin at concentrations of 0.01 U/mL (3.8 $\pm$  1.4%, n=15, p<0.01) and 0.1 U/ml (6.0 $\pm$  1.3, n=26, p< 0.05) compared to OGD alone

(14.6 $\pm$ 2.0%, n=26; Figure 2). These results, in the absence of serum, suggest that thrombin is present in organotypic slice cultures after OGD and contributes significantly to ischemic neuronal damage. Notably, the concentrations of hirudin required for neuroprotection were lower (ten fold) in the absence of serum, possibly because of reduced thrombin concentrations (figure 1).

#### Protease Nexin-1 after OGD protects hippocampal slice cultures

Yeast recombinant protease nexin-1 (PN-1) was added after OGD in serum free medium containing 0.1mg/mL of BSA. PN-1 (0.31 mg/ml) also significantly reduced neuronal death at 24 hours (6.7 $\pm$ 2.4%, n=7, p<0.05) compared to OGD alone (16.8 $\pm$ 4.5, n=11, figure 3). PN-1 is an endogenous thrombin inhibitor confirming the results obtained with hirudin.

Thrombin can be detected in hippocampal slices cultures.

Protein extracts were prepared from hippocampal slices subjected to OGD and cultured in absence of serum for 24 hours. On Western blots, there was a band corresponding in size (approximately 37kD) to recombinant mouse thrombin (Sigma, not shown). An upper doublet, corresponding in size to prothrombin or to a thrombin-inhibitor complex (approximately 70kD and 90kD)<sup>8</sup> was also present. The thrombin signal was increased after OGD (3.8 fold), suggesting in this *in vitro* system a conversion of prothrombin to thrombin in response OGD. We show an increased immunoreactivity for thrombin after OGD in homogenates from cultures of organotypic hippocampal slices cultured for 24 hours without serum, supporting our hypothesis of thrombin acting as a mediator of ischemic cell death in this system.

## Discussion

Thrombin is a complex molecule, best known for its role in coagulation, but which also plays a role in cell survival and cell death. The novelty of this work resides in the use of an *in vitro* approach to study the effect of thrombin signaling after cerebral ischemia. Previously it had been shown *in vivo* that hirudin, a potent thrombin inhibitor was inducing protection when injected intracerebrally after a middle cerebral artery occlusion in the rat, showing the importance of thrombin in ischemia (8). In our *in vitro* system, the role of thrombin in neural tissue can be separated from its role in coagulation. We found that two different thrombin inhibitors, hirudin, and PN-1, a central nervous system serine protease inhibitor both provided a strong neuroprotection when administered after OGD. The circumstance that two different thrombin inhibitors are efficient in providing protection after OGD is a strong argument that their neuroprotective action is mediated by the inhibition of thrombin. Hirudin was protective in culture conditions both with and without horse serum, while PN-1, which is inactivated by serum, was tested only in the absence of serum.

The protection conferred by both thrombin inhibitors strongly suggests that thrombin is present in our cultures and is involved in the mediation of ischemic neuronal death. To demonstrate the presence of thrombin in the cultures, we analyzed protein samples from cultures grown in serum free medium for 24 hours by Western blot. Both in cultures subjected to OGD and in control cultures, there was a band corresponding in size to. After OGD, there was an increase in intensity of the thrombin signal resulting most likely from a conversion of prothrombin to thrombin. Increased prothrombin and thrombin immunoreactivity in the brain *in vivo* has been shown by others (8), as well as

an increase of prothrombin mRNA after global ischemia (10). In our experiments, the presence of thrombin after growth for 24 hours in serum free medium suggests an endogenous neural synthesis, although traces of horse prothrombin from the culture medium cannot be completely ruled out.

Our work provides further support of the role of thrombin signaling leading to cell death. Excitingly, thrombin appears to play an important role in the central nervous system, as is the case for tissue plasminogen activator (15). Thrombin inhibition was shown to be beneficial in animal models of cerebral ischemia (7,8,16-18). Anticoagulation with heparin turned out not to be beneficial in the acute phase in human stroke patients, because the trend to a reduction of the incidence of ischemic strokes was accompanied by an increase in hemorrhagic strokes and extra cranial bleedings (19). The direct thrombin antagonist argatroban is currently under investigation in acute stroke. A phase I safety study has recently shown that it does not significantly increase intracerebral hemorrhages (20). In a Japanese double-blinded randomized trial of argatroban in acute stroke, argatroban was shown to improve the outcome in acute ischemic stroke without an increased number of intracerebral hemorrhages (21).

Further investigation is required to determine how prothrombin is activated into thrombin, and which intracellular signaling cascades are involved. It seems likely at present that cell death is mediated by the activation of the thrombin receptor PAR-1, as PAR-1 deficient mice have 3.1 fold smaller lesions after MCAo and the intracerebro-ventricular administration of the PAR-1 antagonist BMS-200261 also significantly reduces the infarct volume (6). Our in vitro model should provide a useful tool to analyze the mechanisms involved in



thrombin activation and in signaling cascades. After clarifying these mechanisms, it will be an exciting challenge in stroke therapy research to try to dissociate the effects of thrombin in coagulation and in cell death signaling, with the aim to target the cell death-signaling pathway of thrombin to achieve neuroprotection without an increased risk of symptomatic bleeding.

#### Acknowledgements

*This work was funded by a Swiss Science Foundation grant FN3200-68306.02.*

*MdCR was supported by a fellowship from the Swiss Confederation (CFBE).*

*We thank Pr. François Vingerhoets for helpful discussion.*

#### Conflict of interest

None

## Figure legends

Figure 1

### **Hirudin reduces ischemic cell death after OGD, in the presence of 15% horse serum.**

Organotypic hippocampal slice cultures were subjected to combined oxygen and glucose deprivation (OGD) for 30 minutes. Neuronal death was quantitated after 48 hours by the uptake of propidium iodide in CA1. Hirudin was applied after OGD and left for 24 hours (A) or washed off already after one hour (B), in the presence of 15 % horse serum. Hirudin concentrations of 0.1 U/ml (24 hour incubation  $p < 0.01$ , 1 hour incubation  $p < 0.05$ ) and 1 U/ml (24 hour incubation  $p < 0.001$ , 1 hour incubation  $p < 0.01$ ) attenuated neuronal death compared to OGD (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

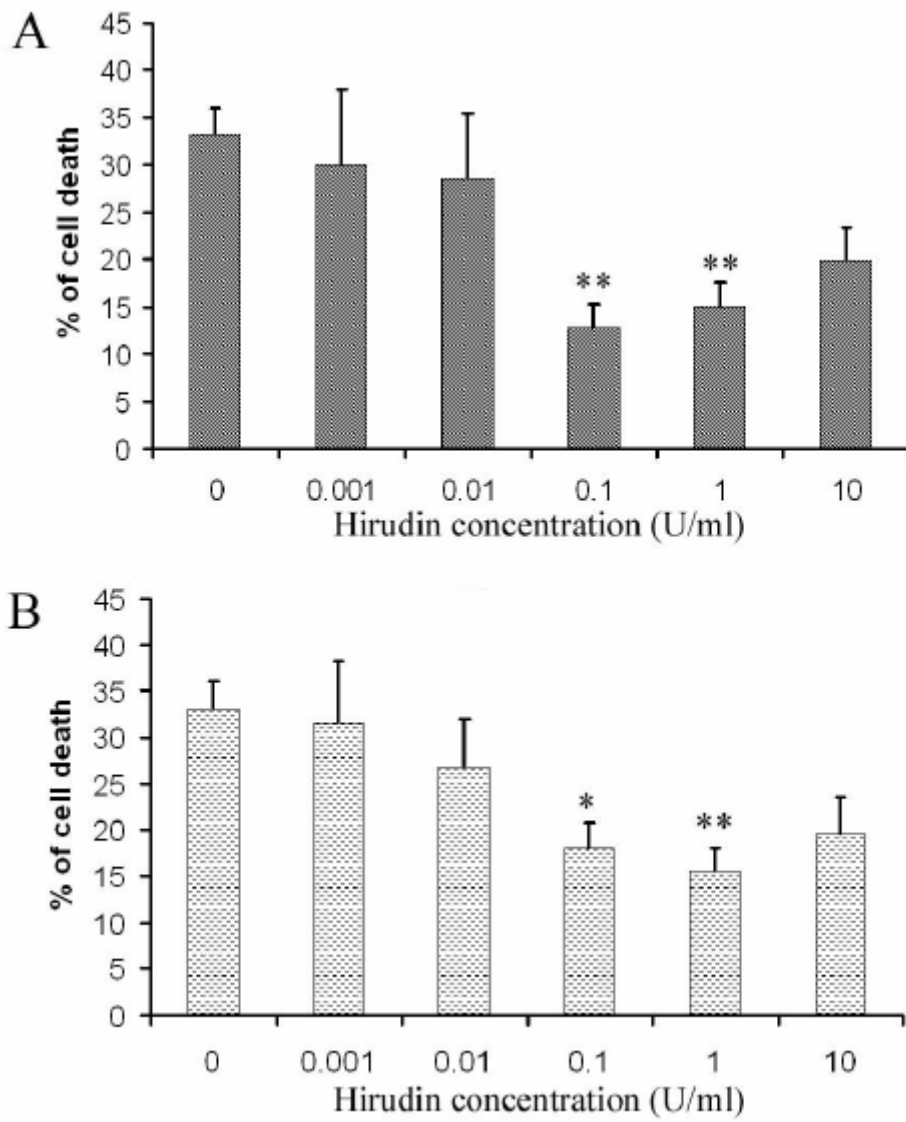


Figure 2

### Hirudin reduces ischemic cell death after OGD, in the absence of horse serum

Hippocampal slice cultures were subjected to OGD, and treated with hirudin in the absence of horse serum. Neuronal death was quantitated by propidium iodide uptake in CA1 (A, B, C) after 24 hours. Hirudin concentrations of 0.01 U/ml ( $p < 0.05$ ) and 0.1 U/ml ( $P < 0.01$ ) significantly reduced neuronal death (A-D; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). Cell death appeared to be enhanced at 1 U/ml, possibly due to a toxic effect.

FIGURE 2

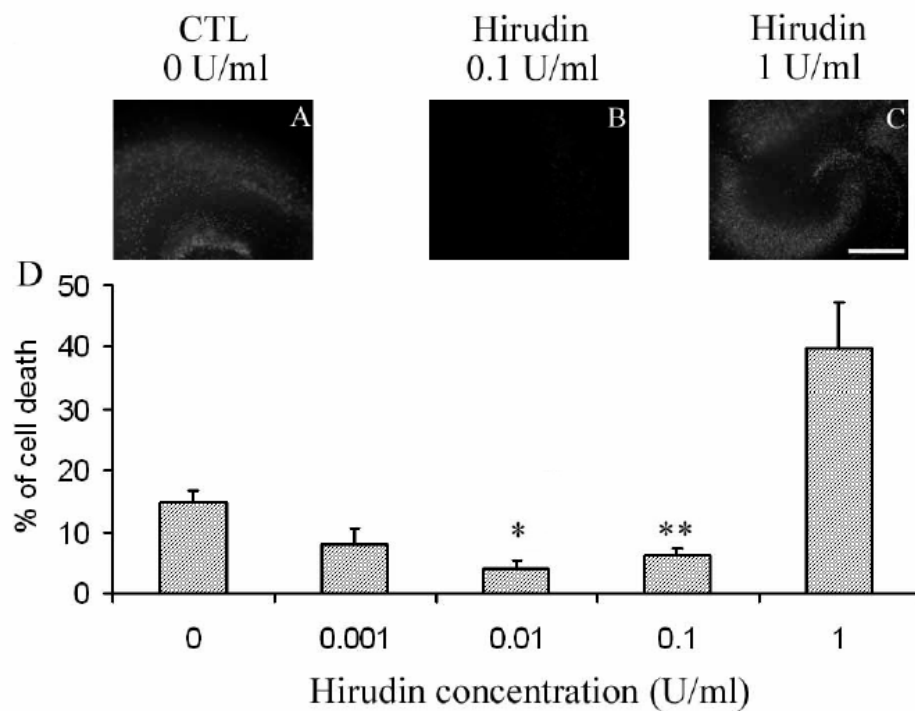


Figure 3

**Protease Nexin-1 reduces ischemic cell death after OGD.**

Hippocampal slice cultures were subjected to OGD, and treated with recombinant PN-1 in the absence of horse serum. Neuronal death was quantitated by propidium iodide uptake in CA1 (A, B, C) after 24 hours. The PN-1 concentration of 0.31 mg/ml significantly ( $p < 0.05$ ) reduced neuronal death (A-D; \*  $p < 0.05$ ).

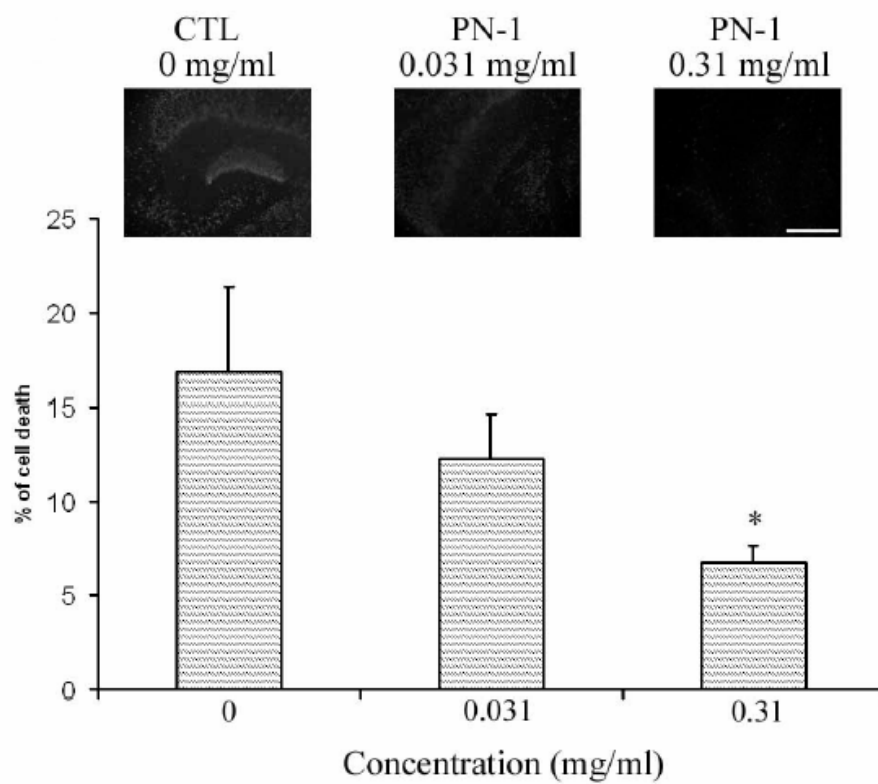
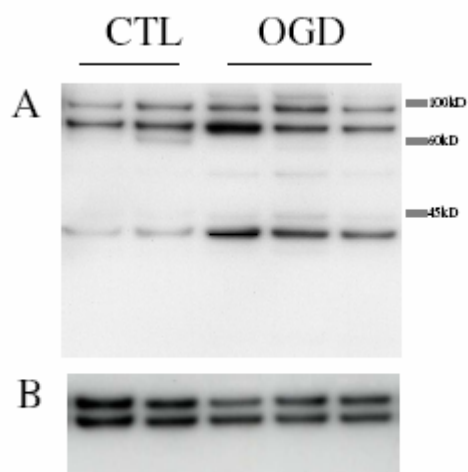
**FIGURE 3**

Figure 4

**Thrombin immunoreactivity in hippocampal slices is enhanced 24hours after OGD.**

Hippocampal slice cultures were subjected to OGD, and cultured in the absence of horse serum for 24 hours. Protein extracts from hippocampal slice cultures were analyzed by Western blotting using an antibody against thrombin (A). The lower band corresponds in size to thrombin (approximately 37 kD). The antibody also recognizes rat prothrombin<sup>8</sup> and the upper doublet corresponds in size to prothrombin, or possibly to an inhibitor-thrombin complex (approximately 70 kD). There is a 3.8 fold increase in thrombin immunoreactivity (n=3) levels 24 hours after OGD compared to controls (cultured in the absence of horse serum for 24 hours, n=2). Coomassie blue staining was also used (not shown).

**FIGURE 4**

## References

- (1) Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci*;17 (1997):5316-26.
- (2) Donovan FM, Cunningham DD. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem*; 273 (1998):12746-52.
- (3) Gloor S, Odink K, Guenther J, Nick H, Monard D. A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell*;47 (1986):687-93.
- (4) Striggow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, Krug M, Reymann KG, Reiser G. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci*;14 (2001):595-608.
- (5) Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg*;84 (1996):91-6.
- (6) Junge CE, Sugawara T, Mannaioni G, Alagarsamy S, Conn PJ, Brat DJ, Chan PH, Traynelis SF. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100 (2003): 13019-24.
- (7) Kawai H, Yuki S, Sugimoto J, Tamao Y. Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J Pharmacol Exp Ther*, 278 (1996):780-5.

- (8) Karabiyikoglu M, Hua Y, Keep RF, Ennis SR, Xi G. Intracerebral hirudin injection attenuates ischemic damage and neurologic deficits without altering local cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*; 24 (2004):159-66.
- (9) Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res*; 74 (1994):1-23.
- (10) Riek-Burchardt M, Striggow F, Henrich-Noack P, Reiser G, Reymann KG. Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. *Neurosci Lett*, 329 (2002): 181-4.
- (11) Badaut J, Pellerin L, Magistretti PJ, Regli L. Development of an in vitro model of "ischemic penumbra" on organotypic slice cultures. *J Cereb Blood Flow Metab*; 21 (2001):S 520.
- (12) Hirt L, Badaut J, Thevenet J, Granziera C, Regli L, Maurer F, Bonny C, Bogousslavsky J. D-JNK11, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia. *Stroke*; 35 (2004):1738-43.
- (13) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*;37 (1991):173-82.
- (14) Sommer J, Meyhack B, Rovelli G, Buergi R, Monard D. Synthesis of glia-derived nexin in yeast. *Gene*; 85 (1989): 453-9.
- (15) Tsirka SE. Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans*; 30 (2002): 222-5.
- (16) Ohyama H, Hosomi N, Takahashi T, Mizushige K, Kohno M. Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia. *Brain Res*; 902 (2001): 264-71.



(17) Mima T, Jin YJ, Hirayama T, Mostafa MG, Mori K. Argatroban, a thrombin inhibitor, decreased mortality after 10 min of forebrain ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett*, 279 (2000): 93-6.

(18) Kamiya T, Nito C, Ueda M, Kato K, Amemiya S, Terashi A, Katayama Y. Mild hypothermia enhances the neuroprotective effects of a selective thrombin inhibitor following transient focal ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl*; 86 (2003): 195-8.

(19) The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet*, 349 (1997): 1569-81.

(20) LaMonte MP, Nash ML, Wang DZ, Woolfenden AR, Schultz J, Hursting MJ, Brown PM. Argatroban anticoagulation in patients with acute ischemic stroke (ARGIS-1): a randomized, placebo-controlled safety study. *Stroke*;35 (2004):1677-82.

(21) Kobayashi S, Tazaki Y. Effect of the thrombin inhibitor argatroban in acute cerebral thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 23 (1996): 531-4.

## O PAPEL DA TROMBINA NA MORTE NEURONAL ISQUÊMICA

Marlise de Castro Ribeiro<sup>1</sup>, MD

Jérôme Badaut<sup>2</sup>, PhD

Melanie Price<sup>1</sup>, PhD

Marita Meins<sup>3</sup>, MS

Julien Bogousslavsky<sup>1</sup>, MD

Denis Monard<sup>3</sup>, PhD

Lorenz Hirt<sup>1</sup>, MD

1. Neurology Service, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland, phone +41 21 314 11 83

2. Neurosurgery Service, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland phone +41 21 314 21 20

3. Friedrich-Miescher Institut for Biomedical Research, Basel, Switzerland, phone +41 61 697 66 58

## RESUMO

**Introdução e Objetivo:** a trombina tem um efeito duplo na morte e na sobrevivência celular: em altas concentrações, pode intermediar a morte neuronal apoptótica em culturas de astrócitos e de neurônios, enquanto em baixas concentrações, induz neuroproteção. O papel da trombina na morte neuronal isquêmica é demonstrado pela neuroproteção após a injeção intracerebral de hirudina, um seletivo inibidor de trombina, em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média (oACM). A fim de separar o papel da trombina na morte celular e na coagulação, nós utilizamos uma técnica *in vitro* para testar os efeitos da hirudina e da protease nexina-1 (PN1), um inibidor cerebral da trombina, na isquemia cerebral. **Material e Métodos:** Culturas organotípicas de hipocampo derivados de ratos recém-nascidos foram submetidos à privação de oxigênio e glicose (OGD) durante 30 minutos, e a morte celular foi avaliada com iodo propiônico na região de CA1. Hirudina recombinante ou PN-1 foram administradas após OGD e a expressão de trombina foi observada através de Western-Blot. **Resultados:** a trombina possui um importante papel na morte neuronal isquêmica, visto que ambas, hirudina e PN-1, preveniram de forma significativa a morte neuronal nos cortes hipocámpais submetidos à OGD. Vinte e quatro horas após a OGD houve uma imunorreatividade aumentada da trombina no Western-Blot. **Conclusão:** a trombina contribui para o dano isquêmico das células neuronais em um modelo *in vitro* de isquemia.

**Palavras-chave:** culturas organotípicas de hipocampo

anticoagulantes; trombina

hirudina; protease-nexina 1

neuroproteção;

## INTRODUÇÃO

A trombina é uma protease sérica mais conhecida pelo seu papel na coagulação, porém com duplo efeito na morte e na sobrevivência da célula: promove a morte celular apoptótica a altas concentrações em culturas de astrócitos e neurônios hipocámpais e induz neuroproteção a baixas concentrações nessas mesmas células(1,2).

A trombina é derivada da ativação proteolítica de seu precursor, a protrombina. O RNA mensageiro da protrombina (mRNA protrombina), o receptor de trombina PAR-1 (receptor de protease ativada-1), e também o inibidor de trombina PN-1 (protease nexina- 1) têm sido detectados no sistema nervoso central (3,4). No tecido cerebral, a trombina é responsável por parte do edema resultante da hemorragia intracraniana(5).

Ratos transgênicos com perda de PAR-1 desenvolvem lesões menores do que ratos normais, quando submetidos à oACM (6) , sugerindo um papel da trombina como mediadora do dano isquêmico. O argatroban, um inibidor direto da trombina, foi estudado em ratos usando-se um modelo de oclusão distal trombótica da ACM e administração intraperitoneal da droga. Foram observados redução dos micro-êmbolos, melhora do fluxo sanguíneo cerebral regional, diminuição do tamanho da lesão e melhora do prognóstico funcional (7). Mais recentemente a hirudina foi estudada em um modelo animal não-trombótico de AVC (8). A hirudina é um polipeptídeo anticoagulante composto por 65 aminoácidos derivado das glândulas salivares de sanguessugas (*Hirudo medicinalis*) constituindo-se em um inibidor seletivo e direto de trombina, ligando-se à mesma e impedindo sua clivagem em seus substratos (9).

A injeção intracerebral de hirudina promove neuroproteção em um modelo animal de oACM por sutura, sem influenciar o fluxo sanguíneo cerebral, sugerindo que a trombina está envolvida nos mecanismos da morte neuronal isquêmica (8). Após isquemia, houve um marcado aumento na imunorreatividade da trombina nas lesões isquêmicas que poderiam resultar ou de sua entrada no tecido cerebral após a quebra da barreira hematoencefálica ou de síntese endógena. Níveis aumentados de mRNA protrombina têm sido detectados no cérebro após isquemia cerebral global em ratos, indicando que a protrombina é sintetizada no parênquima cerebral (10).

Submetemos culturas organotípicas hipocampais à privação combinada de oxigênio e glicose (POG) (11,12). A hirudina, mesmo em baixas concentrações promove uma forte proteção neste sistema e, a PN-1 recombinante, um inibidor central da trombina, também reduz significativamente a morte neuronal. Houve um importante aumento na imunorreatividade da trombina em Western-Blot após a POG.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos animais realizados foram conduzidos de acordo com as normas da Secretaria Suíça de Veterinária.

### **Cultura de cortes hipocampais**

As culturas organotípicas de hipocampo foram preparadas a partir de ratos de 10-12 dias de vida (OFA Sprage Dawley, IFA CREDO, France) (11,13). Cortes coronais (350 $\mu$ m) foram colocados em membranas estéreis

porosas (Millicell-CM, Milipore) e após em placas contendo 1 ml de cultura com 25% de soro de cavalo, 50% MEM adicionado a HEPES e bicarbonato de sódio, 25% de solução salina de Hank, 2 mM de L-glutamina e 35 mM de D-glicose. As culturas cresceram a 33°C, 100% umidade e 5% CO<sub>2</sub> durante 4 dias, sendo então transferidas a um meio de cultura com 15% de soro de cavalo e 5 mM de D-glicose.

#### Privação de oxigênio e glicose nas culturas organotípicas de hipocampo

A privação de oxigênio e glicose (POG) foi realizada em meio “hipoglicêmico” livre de soro, DMEM (D030, Sigma) enriquecido com 1 mM de D-glicose e 2 mM de L-glutamina, colocado na placa de cultura após o oitavo dia. Inicialmente, esse meio foi equilibrado por 1 hora a 37°C, em uma câmara hipóxica umidificada (COY, MI, USA), com uma “atmosfera” hipóxica de 5%O<sub>2</sub> e 5%CO<sub>2</sub>, completada com N<sub>2</sub>. Os cortes hipocâmpais foram então transferidos para as placas de cultura contendo esse “meio tamponado” e colocados na câmara hipóxica por 30 minutos. Culturas-controle foram colocadas em meio DMEM enriquecido com 5 mM de D-glicose e 2 mM de L-glutamina por 30 minutos a 37°C em uma atmosfera úmida e normóxica (11,12). As culturas foram transferidas para o meio de cultura, ou com soro de cavalo a 15% ou sem soro, a 33°C por 24 ou 48 horas. Hirudina, PN-1 ou volume igual de meio de cultura foram adicionados após POG. A hirudina recombinante (Lys 47) derivada da saliva de sanguessuga (concentrações finais de 0,001, 0,01, 0,1, 1 ou 10 U/ml de antitrombina, Sigma) foi adicionada após POG e removida 1 ou 24 horas depois, em culturas com e sem soro de cavalo. PN-1 recombinante (14) foi colocada após OGD (concentrações finais 0,31 mg/ml ou 0,031 mg/ml)

na ausência de soro mas com adição de albumina bovina sérica (BSA, concentração final de 0,1 mg/ml).

A morte celular foi determinada em CA1 usando-se um indicador de viabilidade por fluorescência, o iodo propiônico (PI, 50 µg/ml, 30 minutos) (12). A emissão de fluorescência do PI (excitação de tamanho de onda de 568 nm) foi medida 24 e 48 horas após a isquemia, usando um microscópio de epifluorescência (Leica) com uma lente de 5X, acoplada a câmera (Leica). As imagens foram gravadas com medidas estandardizadas e a densidade óptica foi medida através do programa de imagens Scion (Scion Corp). Após subtrair a fluorescência de fundo (medida em cada fatia), os resultados foram expressos como a porcentagem máxima de morte celular ocorrida a partir da submersão dos hipocampos-controle (não submetidos a OGD) em PBS durante 24 horas a 8 °C.

#### Western Blotting

Após coloração com PI, os cortes hipocampais foram congelados em vapor de nitrogênio líquido. As fatias congeladas foram transferidas para um tampão de homogeneização resfriado a zero grau (20 mM Trisacetato pH 7.0, 0,27 M sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM fluoreto de sódio, 10mM β-glicerofosfato, 1 mM vanadato de sódio, 1mM ditioneitol, 5mM pirofosfato de sódio, 10 mM PNPP, 1 % Triton X-100, “coquetel” inibidor de proteases, Roche), sonicadas (3 fatias em 100µL de tampão) e centrifugadas a 10000g por 15 minutos. Os extratos de proteínas (10 µg por coluna) foram separados por eletroforese, desnaturados em gel a 10% SDS-poliacrilamida (Invitrogen) e transferidos a uma membrana Hybond-P (Amersham Biosciences). As membranas foram

incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com um anticorpo antitrombina (1/2.000, IgG purificado por afinidade do soro de ovelhas, fragmento anti-humano IIa, Affinity Biologicals Inc), seguido por anticorpo secundário IgG anti-ovelha e conjugado peroxidase de cavalo (1/50.000, Upstate) por 1 hora e revelados por quimioluminescência contrastada (Amersham). Após processo de *stripping*, as membranas foram coradas com Azul de Comassie como controle para a presença de proteínas.

## **ANALISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram apresentados como média +/- desvio padrão. Comparações entre os grupos foram calculadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelas comparações múltiplas de Dunn (Instat, Graphpad, San Diego). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **RESULTADOS**

Adição de hirudina após OGD protege culturas hipocampais

A isquemia foi realizada em um modelo *in vitro* submetendo-se culturas de fatias hipocampais à privação combinada de oxigênio e glicose (POG) (11,12) por 30 minutos. Após POG, foi adicionada hirudina ao meio de cultura por 1 ou 24 horas. Concentrações de 0,1 U/ml e 1 U/ml de hirudina por 24 horas reduziram a morte neuronal medidas a 48 horas em CA1 (12,9±2,3%, n=24;  $p < 0.01$  and 15,1±2,4%; n=35;  $p < 0.001$ , respectivamente) comparados a culturas submetidas a POG, sem a adição de hirudina (33,1±2,9%; n = 51 Figura 1A). Como a hirudina é um inibidor bastante específico da trombina,



esse primeiro experimento sugere que a trombina ativa esteja presente nessas culturas organotípicas e contribua para o dano isquêmico.

Quando a hirudina esteve presente por somente 1 hora após POG, também houve uma significativa redução da morte neuronal isquêmica com concentrações de 0,1 e 1 U/ml ( $18,1 \pm 2,8\%$ ;  $n=31$ ;  $p<0,05$  and  $15,6 \pm 2,5\%$ ,  $n=19$ ;  $p<0,01$ , respectivamente) comparada à POG sem hirudina ( $33,1 \pm 2,9\%$ ; Figura 1B), demonstrando que a ação da hirudina em um tempo precoce é suficiente para se obter proteção celular.

Nos experimentos descritos acima, as culturas hipocampais, foram transferidas após POG, a um meio de cultura contendo 15% de soro de cavalo. Com o intuito de limitar a contribuição da protrombina e dos fatores ativadores, transferimos as culturas para um meio livre de soro após OGD, adicionamos hirudina e quantificamos a morte celular após 24 horas. Este tempo foi escolhido pois houve um aumento da morte celular não específica a partir de 48 horas na ausência de soro. Observamos, também nas culturas sem soro, uma significativa proteção com hirudina a concentrações de 0,01 U/ml ( $3,8 \pm 1,4\%$ ;  $n=15$ ;  $p<0,01$ ) e 0.1 U/ml ( $6,0 \pm 1,3$ ;  $n=26$ ;  $p<0,05$ ) comparadas à POG sem hirudina ( $14,6 \pm 2,0\%$ ;  $n=26$ ; Figura 2). Esses resultados, na ausência de soro, sugerem que a trombina está presente nas culturas organotípicas após POG e que contribui significativamente para o dano neuronal isquêmico. De modo notável, as concentrações de hirudina requeridas para a neuroproteção foram menores (10 vezes) na ausência de soro, possivelmente devido a concentrações reduzidas de trombina (Figura 1).

### Protease Nexina-1 após OGD protege culturas hipocampais

A protease nexina-1 recombinante (PN-1) foi adicionada após POG em meio de cultura sem soro contendo 0,1 mg/mL de BSA. A PN-1 (0,31 mg/ml) reduziu significativamente a morte neuronal a 24 horas ( $6,7 \pm 2,4\%$ ;  $n=7$ ;  $p<0,05$ ) comparada à POG sem PN-1 ( $16,8 \pm 4,5$ ;  $n=11$ ; Figura 3). A PN-1 é um inibidor endógeno de trombina e confirma os resultados obtidos com a hirudina.

### Trombina pode ser detectada em culturas organotípicas hipocampais

Extratos de proteínas foram preparados a partir de fatias de hipocampus submetidos à POG, colocados em meios de cultura sem soro por 24 horas. O Western-Blot demonstrou uma banda correspondente em tamanho (aproximadamente 37 kD) ao anticorpo anti-trombina recombinante de rato (Sigma, não demonstrado). Uma banda dupla superior, correspondente em tamanho à protrombina ou ao complexo trombina-inibidor (aproximadamente 70 kD e 90 kD) (8) também esteve presente. O sinal de trombina foi aumentado após a POG (3,8 vezes), sugerindo que houve uma conversão de protrombina em trombina em resposta à POG nesse sistema *in vitro*. Demonstramos um aumento da imunoreatividade da trombina após POG em homogeneizados de culturas organotípicas hipocampais mantidos por 24 horas sem soro, corroborando nossa hipótese da atuação da trombina como mediadora de morte celular isquêmica em nosso sistema.

## DISCUSSÃO

A trombina é uma molécula complexa, mais conhecida por seu papel na cascata da coagulação, embora também desempenhe um papel relevante na sobrevivência e na morte celular. A inovação deste trabalho reside no uso de um método *in vitro* para estudar o efeito da sinalização da trombina após isquemia cerebral. Previamente, foi demonstrado, *in vivo*, que a hirudina, um potente inibidor de trombina, induziu proteção quando injetada intra-cerebralmente após oclusão de artéria cerebral média (oACM) de ratos, demonstrando participação da trombina na isquemia(8). No nosso sistema *in vitro*, o efeito da trombina no tecido neuronal pode ser separado do seu papel na coagulação. Nós observamos uma significativa neuroproteção exercida por dois diferentes inibidores de trombina, a PN-1, um inibidor de proteases séricas encontrado no SNC, e a hirudina, quando administrados após POG. A demonstração de que dois inibidores de trombina promovam proteção após POG, é um forte argumento de que sua ação neuroprotetora seja mediada pela inibição da trombina. A hirudina foi neuroprotetora em culturas com e sem soro de cavalo, enquanto a PN-1, que é um inibidor inativado pelo soro, foi testada somente sem soro.

A proteção conferida pelos dois inibidores de trombina sugere que ela está presente em nossas culturas e está envolvida na intermediação da morte neuronal isquêmica. A fim de demonstrar a presença de trombina nas culturas, analisamos algumas amostras protéicas das mesmas em meio sem soro por 24 horas através de Western-Blot. Em ambos os grupos, submetidos e não submetidos à POG (culturas-controle), houve uma banda correspondente em

tamanho à trombina. Entretanto, após a POG, houve um aumento da intensidade do sinal de trombina, resultante provavelmente da conversão de protrombina em trombina. Outros autores(8) demonstraram uma imunorreatividade aumentada para protrombina e trombina, bem como um aumento de protrombina RNAm em cérebros *in vivo* após isquemia global. Em nosso experimento, a presença de trombina em culturas mantidas durante 24 horas em meio sem soro sugere uma síntese neuronal endógena, embora traços de protrombina presente no soro de cavalo, mantida nos primeiros dias de cultura, não possam ser completamente descartados.

Nosso trabalho fortalece o papel da trombina como um sinalizador da morte celular. Paralelamente, a trombina parece ter um importante papel no SNC, semelhante ao ativador de plasminogênio tecidual(15). A inibição de trombina demonstrou-se benéfica em modelos animais de isquemia cerebral (7,8,16-18). Entretanto a anticoagulação com heparina não foi eficaz em humanos com AVC em fase aguda, porque a tendência à redução da incidência de AVCs isquêmicos foi acompanhada por um aumento de AVCs hemorrágicos e hemorragias extracranianas(19). O argatroban, um antagonista direto da trombina, está atualmente em investigação para uso em AVC isquêmico agudo. Um estudo de segurança de fase I observou que não houve aumento de hemorragias intracerebrais (20). Em um estudo randomizado duplo-cego japonês, o uso do argatroban na fase aguda do AVC isquêmico melhorou a sobrevida dos pacientes tratados sem aumentar o número de hemorragias intracranianas(21).

Maiores investigações são necessárias para determinar a quantidade de protrombina que é ativada em trombina e quais as cascatas sinalizadoras

intracelulares estão envolvidas. É provável, até o presente momento, que a morte celular seja mediada pela ativação dos receptores de trombina PAR-1. Camundongos deficientes para PAR-1 têm lesões 3,1 vezes menores após oACM e, a administração intraventricular de antagonista PAR-1 (BMS-200261) também reduz significativamente o volume do infarto (6). Nosso modelo *in vitro* tenta fornecer ferramentas úteis para analisar os mecanismos envolvidos na ativação da trombina na sinalização de cascatas. A elucidação desses mecanismos será um excitante desafio na pesquisa do tratamento do AVC e na tentativa de dissociar os efeitos da trombina na coagulação e na sinalização da morte celular, concentrando os esforços terapêuticos nesta última via, buscando-se a neuroproteção sem aumentar os riscos de sangramentos sintomáticos.

**FIGURAS- LEGENDAS**

Figura 1

**Hirudina reduz morte celular isquêmica após POG, na presença de soro de cavalo 15%.**

Culturas organotípicas de fatias hipocâmpais foram submetidas à privação combinada de oxigênio e glicose (POG) por 30 minutos. A morte neuronal foi quantificada após 48 horas pela captação de iodo propiônico em CA1. A hirudina foi adicionada após POG e deixada por 24 horas (A) ou retirada após uma hora (B), na presença de soro de cavalo 15%. Concentrações de hirudina de 0,1 U/ml (24 horas de incubação  $p < 0,01$ , 1 hora incubação  $p < 0,05$ ) e 1 U/ml (24 horas de incubação  $p < 0,001$ , 1 hora incubação  $p < 0,01$ ) diminuíram a morte neuronal comparadas a OGD (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

FIGURA 1

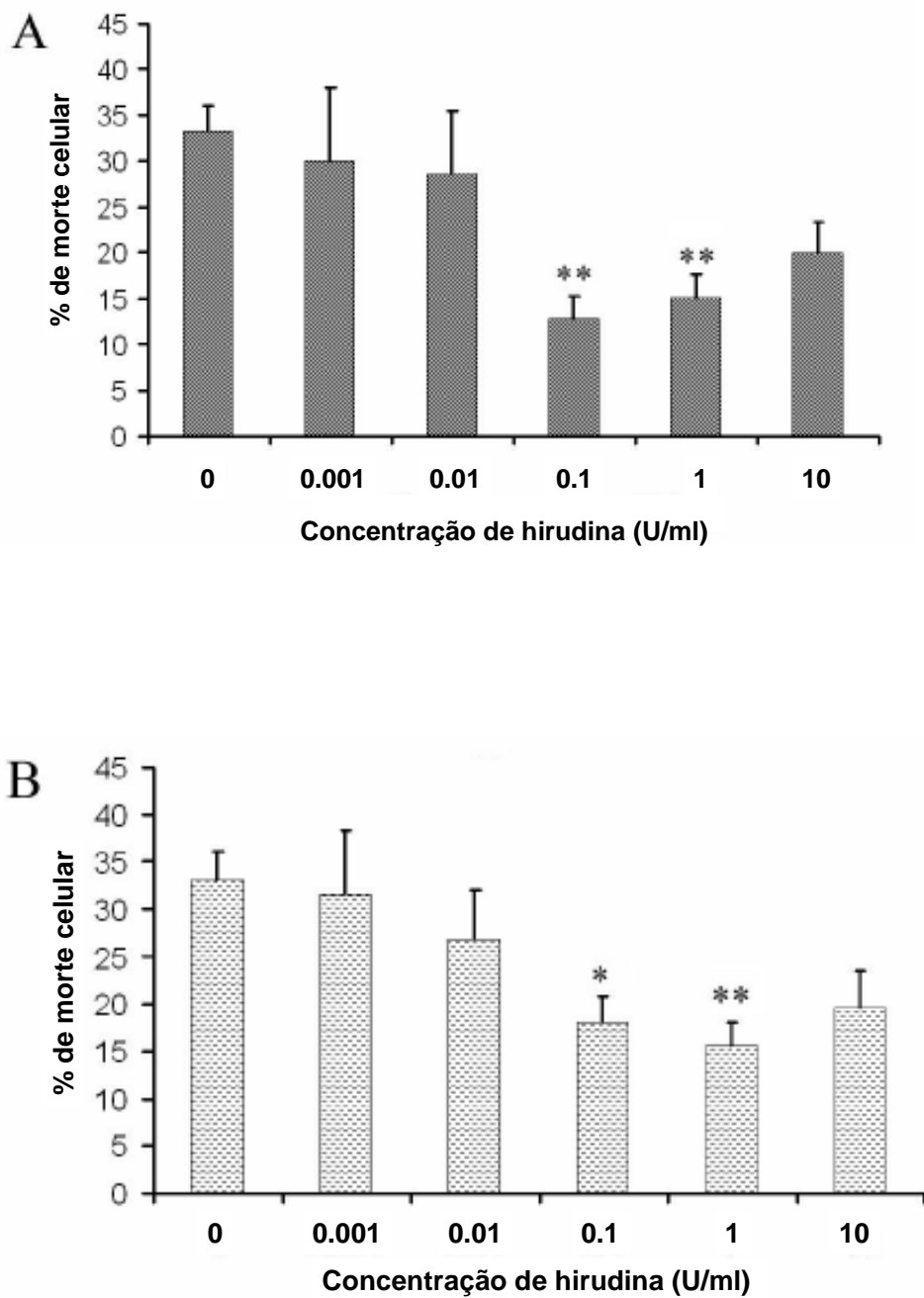


Figura 2

**Hirudina reduz morte celular isquêmica após POG, na ausência de soro.**

Culturas organotípicas de fatias hipocâmpais foram submetidas a POG e tratadas com hirudina na ausência de soro de cavalo. A morte neuronal foi quantificada pela captação de iodo propiônico em CA1 (A, B, C) após 24 horas. Concentrações de hirudina de 0,01 U/ml ( $p < 0,05$ ) e 0,1 U/ml ( $p < 0,01$ ) reduziram significativamente a morte neuronal (A-D; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ). A morte celular parece ser aumentada a 1 U/ml, possivelmente devido a efeitos tóxicos.

FIGURA 2

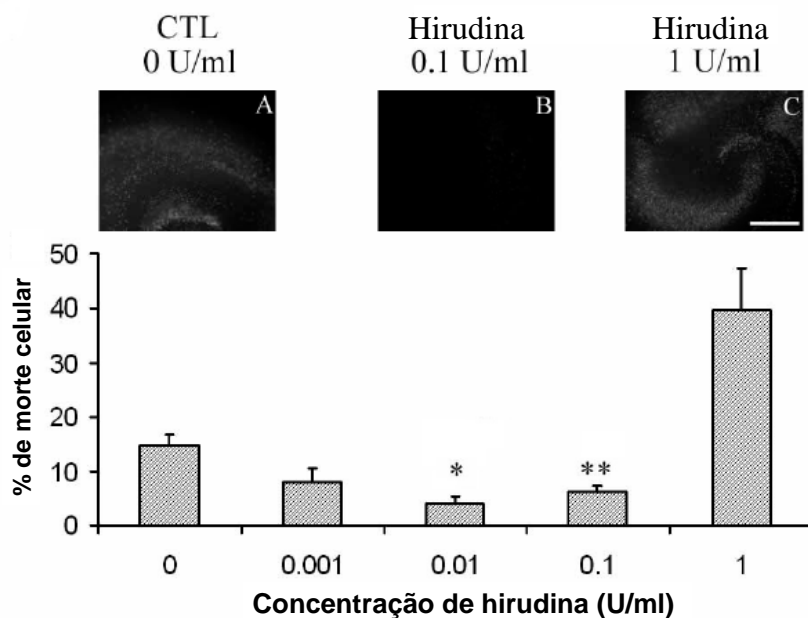




Figura 3

**Protease Nexina-1 reduz morte celular isquêmica após POG.**

Culturas organotípicas hipocâmpais foram submetidas à POG, e tratadas com PN-1 recombinante na ausência de soro de cavalo. A morte neuronal foi quantificada pela captação de iodo propiônico em CA1 (A, B, C) após 24 horas. A concentração de PN-1 de 0,31 mg/ml reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a morte neuronal (A-D; \*  $p < 0,05$ ).

FIGURA 3

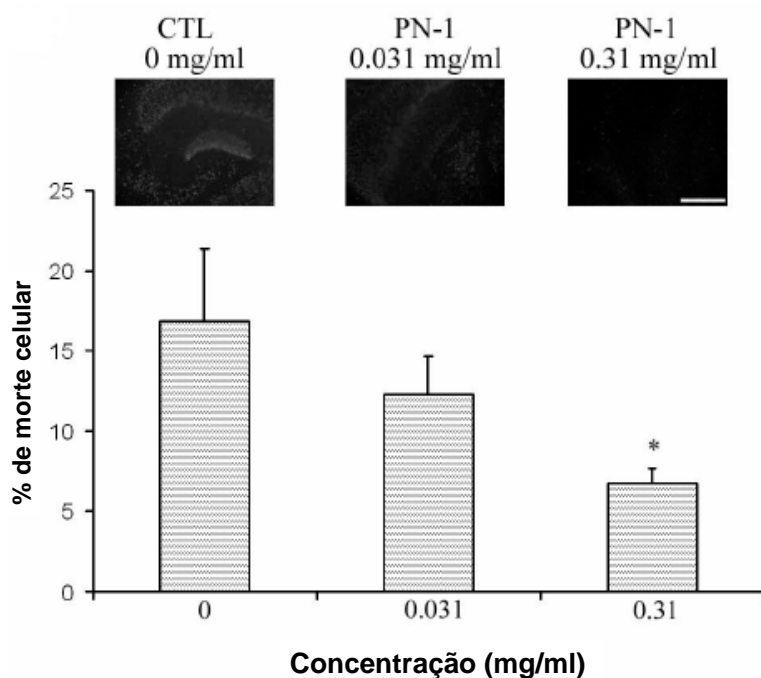
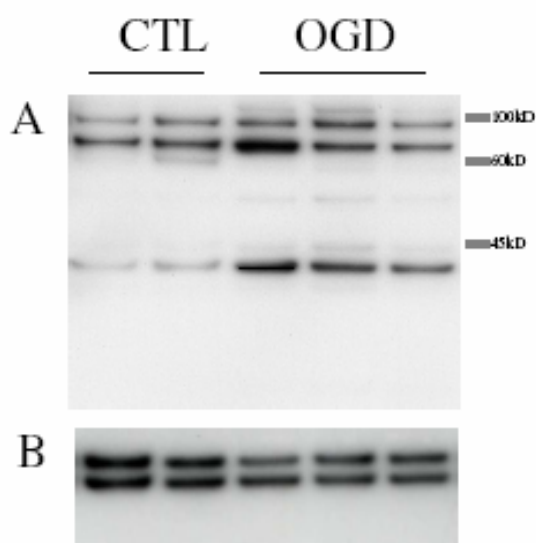


Figure 4

**Imunorreatividade para trombina em fatias hipocampais é aumentada 24 horas após POG**

Culturas organotípicas hipocampais foram submetidas à POG e mantidas em meios de cultura na ausência de soro de cavalo por 24 horas. Extratos protéicos de fatias hipocampais foram analisadas por Western-Blot usado um anticorpo anti trombina (A). A banda mais baixa corresponde em tamanho à trombina (aproximadamente 37 kD). O anticorpo também reconhece protrombina (8) e a dupla banda superior corresponde em tamanho à protrombina, ou possivelmente ao complexo trombina-inibidor (aproximadamente 70 kD). Há um aumento de 3,8 vezes na imunorreatividade da trombina (n=3) 24 horas após POG comparados aos grupos-controle (culturas não submetidas à POG e com ausência de soro por 24 horas, n= 2). Coloração azul de Coomassie (não demonstrada).

FIGURA 4



## Referências

- (1) Donovan FM, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci*;17 (1997):5316-26.
- (2) Donovan FM, Cunningham DD. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem*; 273 (1998):12746-52.
- (3) Gloor S, Odink K, Guenther J, Nick H, Monard D. A glia-derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell*; 47 (1986):687-93.
- (4) Striggow F, Riek-Burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-Noack P, Breder J, Krug M, Reymann KG, Reiser G. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci*;14 (2001):595-608.
- (5) Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg*; 84 (1996):91-6.
- (6) Junge CE, Sugawara T, Mannaioni G, Alagarsamy S, Conn PJ, Brat DJ, Chan PH, Traynelis SF. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100 (2003):13019-24.
- (7) Kawai H, Yuki S, Sugimoto J, Tamao Y. Effects of a thrombin inhibitor, argatroban, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J Pharmacol Exp Ther*, 278 (1996):780-5.

- (8) Karabiyikoglu M, Hua Y, Keep RF, Ennis SR, Xi G. Intracerebral hirudin injection attenuates ischemic damage and neurologic deficits without altering local cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*;24 (2004):159-66.
- (9) Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res*;74 (1994):1-23.
- (10) Riek-Burchardt M, Striggow F, Henrich-Noack P, Reiser G, Reymann KG. Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. *Neurosci Lett*, 329 (2002): 181-4.
- (11) Badaut J, Pellerin L, Magistretti PJ, Regli L. Development of an in vitro model of "ischemic penumbra" on organotypic slice cultures. *J Cereb Blood Flow Metab*; 21 (2001): S 520.
- (12) Hirt L, Badaut J, Thevenet J, Granziera C, Regli L, Maurer F, Bonny C, Bogousslavsky J. D-JNKI1, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia. *Stroke*; 35(2004):1738-43.
- (13) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*; 37 (1991):173-82.
- (14) Sommer J, Meyhack B, Rovelli G, Buergi R, Monard D. Synthesis of glia-derived nexin in yeast. *Gene*; 85 (1989): 453-9.
- (15) Tsirka SE. Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans*; 30 (2002): 222-5.
- (16) Ohyama H, Hosomi N, Takahashi T, Mizushige K, Kohno M. Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia. *Brain Res*; 902 (2001): 264-71.

(17) Mima T, Jin YJ, Hirayama T, Mostafa MG, Mori K. Argatroban, a thrombin inhibitor, decreased mortality after 10 min of forebrain ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett*, 279 (2000): 93-6.

(18) Kamiya T, Nito C, Ueda M, Kato K, Amemiya S, Terashi A, Katayama Y. Mild hypothermia enhances the neuroprotective effects of a selective thrombin inhibitor following transient focal ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl*; 86 (2003):195-8.

(19) The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet*, 349 (1997): 1569-81.

(20) LaMonte MP, Nash ML, Wang DZ, Woolfenden AR, Schultz J, Hursting MJ, Brown PM. Argatroban anticoagulation in patients with acute ischemic stroke (ARGIS-1): a randomized, placebo-controlled safety study. *Stroke*;35 (2004):1677-82.

(21) Kobayashi S, Tazaki Y. Effect of the thrombin inhibitor argatroban in acute cerebral thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 23 (1997):531-4.

**HYPOXIA /HYPOGLYCAEMIA PRECONDITIONING PREVENTS THE LOSS OF FUNCTIONAL ELECTRICAL ACTIVITY IN ORGANOTYPIC SLICE CULTURES.**

Jérôme Badaut<sup>1</sup>, Lorenz Hirt<sup>3</sup>, Melanie Price<sup>3</sup>, Marlise de Castro Ribeiro<sup>3</sup>, Pierre J Magistretti<sup>2, 3</sup> and Luca Regli <sup>1</sup>

1 Neurosurgery Research Group, CHUV, 1011 Lausanne, Switzerland

2 Institute of physiology, 7 rue du Bugnon, Lausanne, Switzerland

3 Department of Neurology, CHUV, 1011 Lausanne, Switzerland

Corresponding Author:

Jérôme Badaut, PhD

Neurosurgery Research Group

Centre Hospitalier universitaire Vaudois (CHUV)

Pavillon 3 - Beaumont

1011 LausanneSwitzerland

Tel + 41 21 314 21 20

**Abstract**

In Ischemic preconditioning (IPC) a first sublethal ischemia increases the resistance of the neurons to a subsequent severe ischemia. Despite numerous studies, the mechanisms have not yet been fully understood. Our goal was to develop an *in vitro* model of IPC on hippocampal organotypic slice cultures. Instead of anoxia, we chose to apply varying degrees of hypoxia. We chose to expose our cultures to combined oxygen and glucose deprivations (OGD) of varying intensity, ranging from mild to severe, assessing both the electrical activity and the cell death. IPC was obtained by an exposure to our mildest ischemia condition (10% of O<sub>2</sub> during 15 min) 24h before the severe deprivation (5% of O<sub>2</sub> during 30 min). Interestingly, IPC prevented not only the delayed ischemic cell death 6 days after insult but also the transient loss of evoked potential response. The main advantage of this system over both the acute slice preparation and normal cultures is the ability to measure at the same time the delayed neuronal damage and neuronal function.

Classification terms: Ischemia, *in vitro* model, preconditioning

Theme: Disorders of the nervous system

Topic: Ischemia

**Key words:** tissue culture; ischemia; penumbra; electrophysiology, immunohistochemistry; preconditioning

Ischemic preconditioning (IPC) is a sub-lethal ischemia that increases the resistance of nervous tissue to a subsequent lethal ischemia (3). Numerous models of IPC models have been developed *in vivo* (4,11,17) and *in vitro* (5,10,19,26). Despite numerous studies, the specific mechanisms leading to this state of tolerance still remain largely unknown. Hippocampal organotypic cultures are a particularly valuable model to study cerebral ischemia *in vitro*, because these cultures retain aspects of *in vivo* ischemia, such as selective vulnerability of CA1 neurons to oxygen and glucose deprivation (OGD) (7,13). Organotypic slice cultures offer also the advantages to preserve the intrinsic synaptic connections found *in vivo* and to study the delayed cell death. These cultures have been used in numerous studies on ischemic processes using a combined oxygen and glucose deprivation (OGD) (2,12,14-16,22,24). In these, oxygen deprivation consisted in anoxia that induces a rapid cell death (2,12,14-16,22,24). To establish an appropriate condition for a mild ischemic preconditioning stimulus, we chose to apply different levels of hypoxia instead of anoxia, combined to hypoglycemia for either a short or a long duration, thereby causing mild, moderate or severe ischemic damage. We assessed the impact of the combined hypoxia/hypoglycaemia (OGD) on the electrical activity and on cell death.

Organotypic cultures of the hippocampus were prepared from brains of 11-12 day-old rats (OFA, IFFA-CREDO, France) as previously described (6). Coronal hippocampal sections were disposed onto a membrane unit (Millicell-CM, Millipore) in wells containing 1ml of culture medium (50 % MEM, GIBCO laboratories, supplemented with HEPES and sodium bicarbonate, 25 % Hank's



salt solution, 25 % horse serum, 2 mM L-glutamine and D-glucose to a final concentration 6.5 mg/ml). Cultures were grown at 37 °C, 100% humidity, 5 % CO<sub>2</sub>. After 4 days, the medium was changed for a culture medium containing 15 % horse serum, 5mM D-glucose. Slices were maintained in an incubator at 33 °C in 5 % CO<sub>2</sub> and the medium changed every 3-4 days. 33°C is the standard condition for maintaining organotypic slices in culture over long periods of time (20).

In contrast with previous studies which used anoxia in the OGD paradigm (2,12,14-16,22,24), hippocampal organotypic slices were subjected to hypoglycaemia combined with 3 different levels of hypoxia (1%, 5% or 10% O<sub>2</sub>) for either 15 minutes or 30 minutes, at DIV 8, in DMEM (D5030, Sigma) supplemented by 1mM D-glucose and 2mM L-glutamine. 1 mM glucose was considered hypoglycaemic compared to standard culture conditions for organotypic cultures, where the concentration ranges from 5 to 25mM (2,12,20,22,24). This medium was equilibrated for 1hour at 37°C in a humidified hypoxic chamber (COY) with a "hypoxic" atmosphere of 1%, 5% or 10% O<sub>2</sub>; with 5% CO<sub>2</sub> balanced with N<sub>2</sub>. Slices were aseptically transferred into this "ischemic medium" and then placed in the hypoxic chamber during 15 or 30 minutes. Control cultures were placed in DMEM medium supplemented with 5 mmol/L D-glucose and 2 mmol/L L-glutamine for 30 minutes at 37°C, in a humid normoxic atmosphere. For recovery, cultures were placed in culture medium at 33°C for 24, 48, 72 hours or 6 days.

Extracellular-evoked field potentials were recorded in the hippocampal CA1 region using a multi-electrode array system (Physiocard, Biocell, Geneva) and measured with the Physiocard software (Biocell, Geneva)(6,21), after

stimulating in the CA3 region at a frequency of 1 stimulation every 2-minutes, before and after OGD on 5 to 9 slices for different conditions. The EP amplitudes recorded before OGD ( $\approx 1.2$  Mv) were used to determine the baseline 100%. After OGD, the recovery of population spikes was monitored for 1h. The values of population spike amplitudes were expressed as percents of the control value. Values obtained from independent experiments ( $n=5$  to  $9$ ) were given as mean  $\pm$  s.e.m. The Mann-Whitney U-test was used to compare population spike recovery of organotypic slices after OGD during 15 min vs OGD during 30 min and OGD 5% during 30 min versus preconditioning and MK801. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

Cell death was determined in CA1 using the fluorescent viability indicator propidium iodide (PI) on 5-different cultures containing 4 slices each. PI was applied at  $5 \mu\text{g/ml}$ , 30 min before the measurements in each dish. PI-fluorescence emission (Excitation wavelength 568 nm) was measured 24h, 48h, 72h and 6days after OGD using an epifluorescence microscope (Leica) with a 5 X lens, coupled to a camera (Leica, Inc). The PI results were expressed as percentage of maximal cell death obtained by submerging slices in PBS for 24h (6). The normalized values of neuronal cell death obtained from independent experiments were given as mean  $\pm$  s.e.m. ANOVA and post-hoc test, Scheffe, were used to compare neuronal damage in the different conditions. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

Exposure to 10 % O<sub>2</sub> (mild hypoxia) during both 15 min and 30 min induced a decrease of the electrical activity five minutes after OGD, to respectively  $34.6 \% \pm 5.7$  and  $34.0 \% \pm 9.12$  of the control value. A rapid and a complete recovery was observed 40 min after OGD for both durations (15 and

30 min, Fig.1A). Exposure to 5 % O<sub>2</sub> (moderate hypoxia) during 15 or 30 min induced a significant decrease of evoked field potential amplitudes at 5min after insult, with respectively 19.8%±5.1 and 6.7 %±0.9 of control value (Fig.1B). A significant recovery of the electrical signal was observed for the slices exposed during 15 min at the OGD (50.3 % ±9.2, 20 min after OGD, P<0.05, Fig. 1B). Electrical recovery is considered non significant in the condition 5 % O<sub>2</sub> during 30 min (Fig. 1B). In contrast, 60 min after 15 min of OGD, the electrical activity was 60.8 % ± 6.1 of the control value. Under the condition of 1% O<sub>2</sub> (severe hypoxia) a difference was observed between the times of exposure, 15 and 30 min. For both durations a significant decrease of the electrical activity was noted respectively 5.3 % ± 1.5 and 11.9 ± 3.9. For the 15 min exposure time, a recovery of 53.2 % ±11.5 was observed 60 min after insult. As for the previous hypoxia level (5%), there was no recovery of the electrical activity in the case of 30 min exposure.

Assessment of cell viability was studied by the propidium iodide staining. 24 hours after OGD, a low level of cell death (10 %) was observed in three hypoxic conditions with a short exposure time (15 min), and in the case of mild ischemia with long exposure (10%, 30min), correlating with an electrophysiological recovery at 60 min after the insult. In the case of moderate or severe hypoxia (1% and 5% O<sub>2</sub>), the level of cell death was significantly increased in the long exposure group (30 min) at 24h and at 48h (Fig. 2A, B). In these conditions, a significant amount of cell death was induced in CA1, CA2, and CA3, correlating with an absence of electrical recovery. A low level of cell death was seen only in the condition mild hypoxia (10%) with short exposure (15 min) 72h after OGD, (Fig. 2C), in all other conditions there was an important cell death. At the late

time-point, 6 days after the insult, level of cell death, around 50%, was similar for all conditions (Fig. 2D). This time-course of cell death illustrates that in the conditions with a short time of exposure, the cell death is delayed at 72h to 6 days after insult. In the moderate OGD conditions, the cell death appeared first in the dentate gyrus (DG, data not shown). Our results were obtained with hippocampal slice cultures from P10-P12 animals. Neurons in such cultures are more resistant to OGD than in cultures from older animals (P20-30; (5)). In our most severe OGD condition, the duration of the experimental ischemia was longer than *in vivo* models of global ischemia in the rat or in the gerbil (9), suggesting that neurons in hippocampal cultures are more resistant.

For our ischemic preconditioning, we chose our mildest OGD condition (10%O<sub>2</sub>, 15 min; lowest cell death at 72h, (Fig.2C), transiently reduced electrical activity (Fig. 1A)) as the preconditioning stimulus followed 24 hours later by a severe second OGD (5%O<sub>2</sub>, 30 min, highest cell death at 72h (Fig 2C), no electrical recovery within 60min (Fig 1B)). As expected, the preconditioning induced a significant neuroprotection, with a significantly lower cell death 24 hours after the severe OGD (9.8% ± 3.7 versus 19.5% ± 4.7. p<0.05). This protection was observed at 24h, 48h and as late as 6 days after moderate OGD (Fig. 3A), similar to the effect of MK801 (Fig. 3C), chosen as a positive control. MK801, a NMDA antagonist known as a neuroprotectant, which was applied (10 μM) (18) starting from 5min before, and during OGD. The protection induced by preconditioning however differed from the one resulting from MK801 treatment, in that it protected neuronal cells from the decrease of the evoked potential amplitude. Indeed, 5 min after OGD, the value in preconditioned slices was 79.7% ± 5.8 of baseline versus 14.1% ± 4.0 (p<0.05). This significant difference

was maintained during the 60 min of recording (Fig. 3B). In the experiments with MK801, we observed a decrease of evoked potential to  $20.5 \% \pm 10.1$ . A recovery of the evoked potential was observed beginning at 20 min after reperfusion (Fig. 3D). The neuroprotection was significant at 24h, 48h and 72h after the insult. With MK801, however, cell death increased 6 days after OGD and there was no significant difference with controls (Fig. 3C).

We report of an *in vitro* approach allowing us to model ischemia and define conditions of ischemia ranging from mild to severe, with complete, partial or absent electrical recovery, combined with delayed neuronal death. We observed a good correlation between the neuronal electrical activity and the degree of cell death. Some functional characteristics of the penumbra *in vivo* were thereby reproduced in the moderate and mild OGD with neuronal electrical silence and preserved trans-membrane ionic gradients (1)

The level of delayed cell death, 6 days after insult (50% of cell death), was similar in all conditions (Fig. 2D) excepted in after IPC (Fig. 3A). In this new model, we have shown that the loss of evoked responses following OGD corresponds to neuronal loss in first days after insult for severe conditions or after 6 days. Our *in vitro* approach is suitable to study mechanisms of ischemic neuronal death and test neuroprotectants, such as MK801 (Fig. 3), or, as we showed recently, the inhibitor of the c-Jun-N-terminal kinase D-JNKI1 [6]. With MK801 treatment, there was a reduced neuronal death in PI staining and a functional recovery by electrophysiology, as we have also shown with the D-JNKI1 (6). Interestingly, the decrease of the electrical activity was prevented in the IPC. This result indicates that the preconditioning protects the functional electrical activity in the neuron. The adaptation of the electrical activity was

previously observed in a model acute hippocampal slices pre-exposed to a short anoxia (5 min) (19). This adaptation was time dependent and rapid (19). The maintaining of the electrical activity permits a good neuroprotection at 6 days after the insult (Fig. 3A). In MK801 treatment, there is no neuroprotection (Fig. 3C) and this correlates with a transient decrease of the electrical activity (Fig. 3D). To date, the mechanisms of preconditioning are still studied. Initial experiments suggested a role of the adenosine (25). More recent reports seem to indicate a role of the PKC pathways and the heat shock proteins (8,15,23). The model described in this study is a powerful tool to further characterizes the mechanisms of IPC and especially the molecular modifications that permit the protection of the electrical activity after mild OGD.

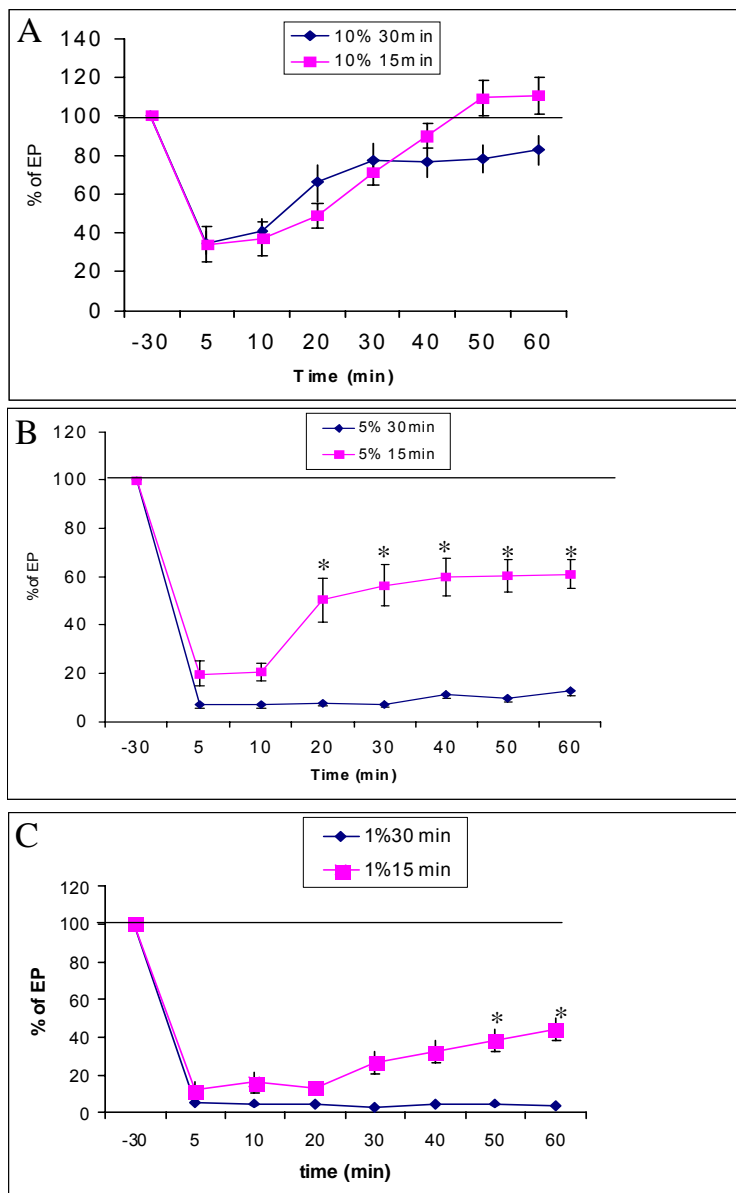
#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondazione per lo studio delle malattie neurodegenerative delle persone adulte e dell'anziano, Lugano, Switzerland; 3200-68306.02 and 3100A0-108001 from the Swiss National Science Foundation; Novartis Foundation for Medicine and Biology, Basel, Switzerland; and Leenaards Foundation, Switzerland. The Hypoxic chamber was bought with generous donation from REM, Athens GA, USA.

**Figure 1:** Effects of different insult paradigms on the recovery of extracellular field EP following 15 and 30 min OGD at 10 % of O<sub>2</sub> (A), at 5 % of O<sub>2</sub> (B), and at 1 % of O<sub>2</sub> (C).

(A) Hippocampal slices in condition 10 % of O<sub>2</sub> during 15 and 30 min demonstrated recovery of synaptic activity similar to baseline levels, with no significant differences between both time periods. (B) Hippocampal slices in condition 5 % of O<sub>2</sub> during 15 min demonstrated a recovery of EP back to 50 % to 60% of baseline levels. In contrast, slices treated during 30 min did not exhibit a recovery. A significant difference between the two time periods was observed at 20 min (\*,  $p < 0.05$ , non parametric test, Mann-Whitney U-test). (C) Hippocampal slices in condition 1% of O<sub>2</sub> showed a recovery for the 15 min with a value of 50 % of the baseline. A significant difference between the two groups was observed after 50 and 60 min of recovery (\*,  $p < 0.05$ , non parametric test, Mann-Whitney U-test). Slices treated with 1% of O<sub>2</sub> during 30 min did not present a recovery. The Mann-Whitney U-test was used to compare population spike recovery of organotypic slices. Each point represents mean  $\pm$  SEM.

FIGURE 1





**Figure 2:** Effects of insults (1% of O<sub>2</sub>, 5% of O<sub>2</sub>, 10% of O<sub>2</sub>, during 15 or 30 min) on cell death in hippocampal slice cultures at 24 (A), 48 (B), 72 hours(C), and 6 days (D) after insult evaluated by propidium iodide staining.

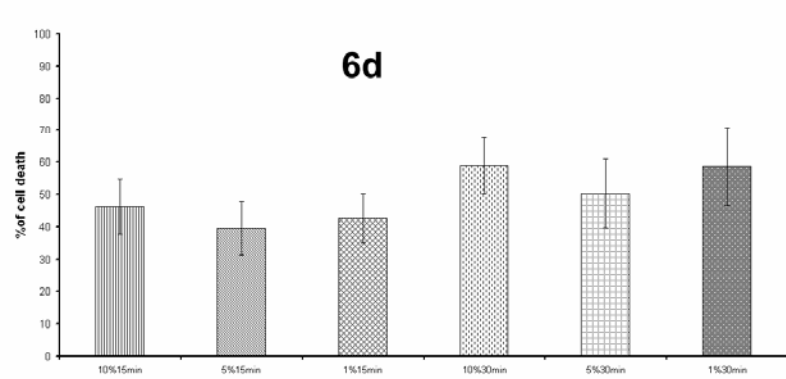
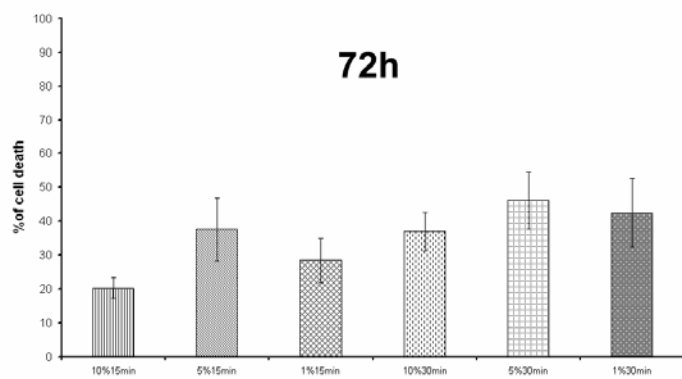
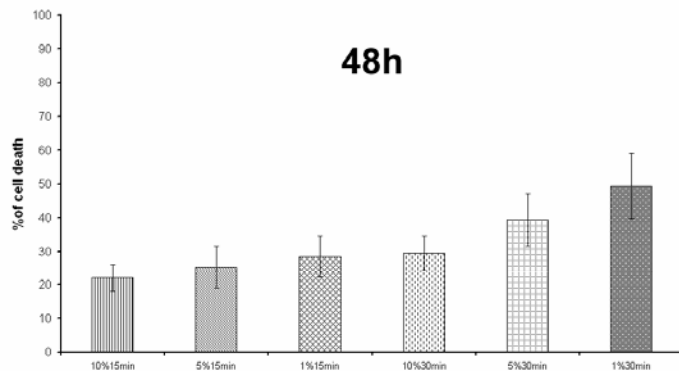
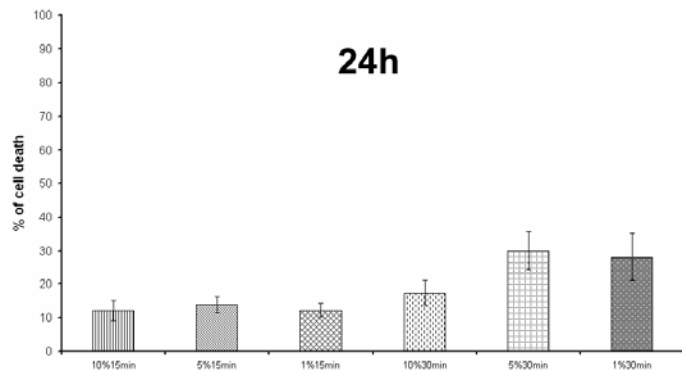
(A) At 24 hours after insult, in the group of moderate and severe hypoxia (1% and 5 % O<sub>2</sub>), the level of cell viability was significantly different between 15 min and 30 min of exposure (\*,  $p < 0.05$ , ANOVA, Scheffe test). A significant difference of cell death was observed between the condition of 10% of O<sub>2</sub> during 15 min and the conditions 5% and 1% of O<sub>2</sub> during 30 min (\*,  $p < 0.05$ , ANOVA, Scheffe test).

(B) At 48h after insult, the conditions 1, 5 and 10% of O<sub>2</sub> showed a lower level of cell death significantly different of the cell death in the conditions 1 and 5% (\*,  $p < 0.05$ , ANOVA, Scheffe test).

(C) At 72h, only the condition 10 % of O<sub>2</sub> during 15 min showed a significant lower cell death with the rest of the group (\*,  $p < 0.05$ , ANOVA, Scheffe test).

(D) At 6 days, the cell death showed no significant difference among the groups. Data represents mean  $\pm$  s.e.m.

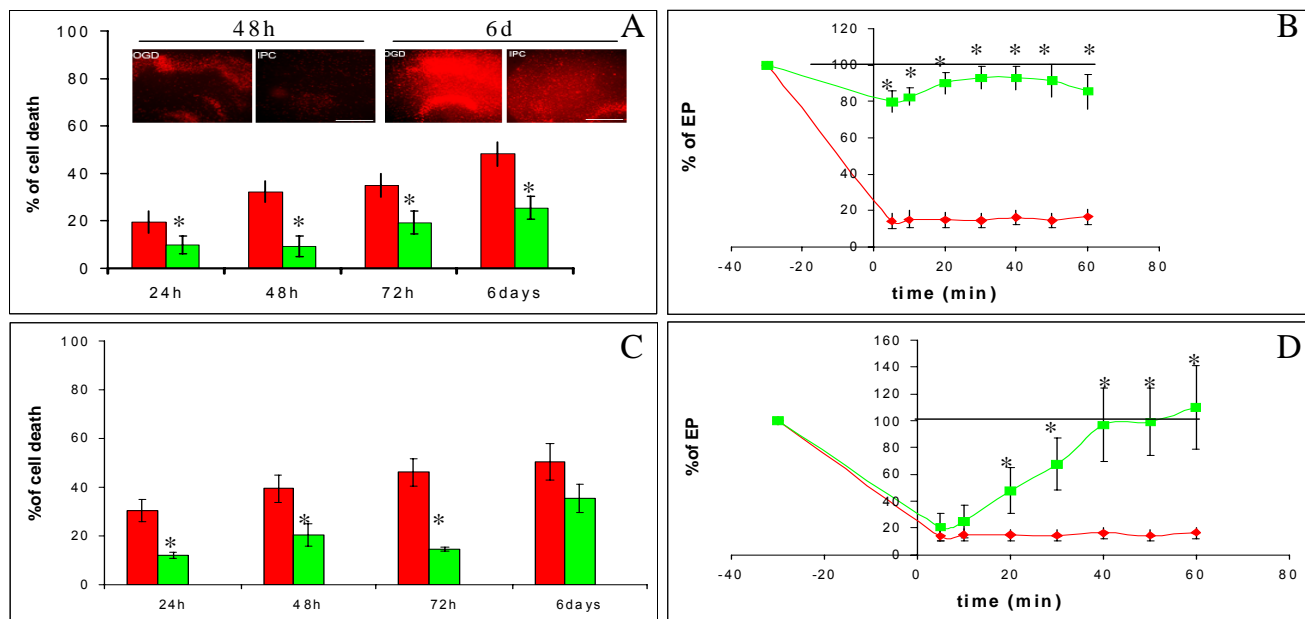
FIGURE 2



**Figure 3:** Neuroprotective effects of preconditioning (A, B) and MK801 (C,D) on cell death (A,C) and on the recovery of extracellular field EP (B, D) following 30 min OGD at 5 % of O<sub>2</sub>.

- (A) Preconditioning by a OGD 10% during 15min 24 hours before the insult induced neuroprotection reflected by a significant decrease of the cell death at 24h ( $9.8\% \pm 3.7$  versus  $19.5\% \pm 4.7$ , ANOVA, Scheffe-test), at 48 h ( $9.3 \pm 4.3$  versus  $32.2\% \pm 4.4$ , ANOVA, Scheffe-test) and at 6 days ( $25.5 \pm 5.2$  versus  $48.8\% \pm 4.7$ , ANOVA, T-test). An example of PI-staining in OGD without (OGD) and with preconditioning (IPC) was presented at 48h and at 6 days after insult. The PI-staining was more extended in the OGD slices compared to IPC slices at 48h. This difference was still observed at 6 days. The scale bar is 500  $\mu$ m.
- (B) In preconditioned slices, the EP was only slightly affected after a moderate OGD ( $79.7\% \pm 5.7$  at 5 min versus  $14.1 \pm 4.0$ ,  $p < 0.05$ , non parametric test, Mann-Whitney U-test) and total recovery was rapidly observed.
- (C) MK801 used as pre-treatment and during OGD induced a significant neuroprotection from 24h to 72 h after moderate OGD.
- (D) In contrast with the preconditioning, the electrical activity decreased after moderate OGD in slices treated with MK801 ( $20.5\% \pm 5$ ). Recovery started 20 min after OGD (\*,  $p < 0.05$ , non parametric test, Mann-Whitney U-test).

FIGURE 3



## **References**

- (1) Astrup, J., Siesjo, B.K. and Symon, L., Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra, *Stroke*, 12 (1981) 723-5.
- (2) Bernaudin, M., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T. and Petit, E., Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia, *Exp Neurol*, 150 (1998) 30-9.
- (3) Dirnagl, U., Simon, R.P. and Hallenbeck, J.M., Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection, *Trends Neurosci*, 26 (2003) 248-54.
- (4) Dowden, J. and Corbett, D., Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures, *Stroke*, 30 (1999) 1240-6.
- (5) Hassen, G.W., Tian, D., Ding, D. and Bergold, P.J., A new model of ischemic preconditioning using young adult hippocampal slice cultures, *Brain Res Brain Res Protoc*, 13 (2004) 135-43.
- (6) Hirt, L., Badaut, J., Thevenet, J., Granziera, C., Regli, L., Maurer, F., Bonny, C. and Bogousslavsky, J., D-JNK11, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia, *Stroke*, 35 (2004) 1738-43.
- (7) Laake, J.H., Haug, F.M., Wieloch, T. and Ottersen, O.P., A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence, *Brain Res Brain Res Protoc*, 4 (1999) 173-84.

- (8) Lange-Asschenfeldt, C., Raval, A.P., Dave, K.R., Mochly-Rosen, D., Sick, T.J. and Perez-Pinzon, M.A., Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice, *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (2004) 636-45.
- (9) Lipton, P., Ischemic Cell Death in Brain Neurons, *Physiol. Rev.*, 79 (1999) 1431-1568.
- (10) Martinez-Sanchez, M., Striggow, F., Schroder, U.H., Kahlert, S., Reymann, K.G. and Reiser, G., Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures, *Neuroscience*, 128 (2004) 729-740.
- (11) Moncayo, J., de Freitas, G.R., Bogousslavsky, J., Altieri, M. and van Melle, G., Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect?, *Neurology*, 54 (2000) 2089-94.
- (12) Newell, D.W., Malouf, A.T. and Franck, J.E., Glutamate-mediated selective vulnerability to ischemia is present in organotypic cultures of hippocampus, *Neurosci Lett*, 116 (1990) 325-30.
- (13) Noraberg, J., Kristensen, B.W. and Zimmer, J., Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures, *Brain Res Brain Res Protoc*, 3 (1999) 278-90.
- (14) Perez Velazquez, J.L., Frantseva, M.V. and Carlen, P.L., In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons, *J Neurosci*, 17 (1997) 9085-94.
- (15) Pringle, A.K., Angunawela, R., Wilde, G.J., Mephram, J.A., Sundstrom, L.E. and Iannotti, F., Induction of 72 kDa heat-shock protein following sub-lethal

oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23 (1997) 289-98.

(16) Pringle, A.K., Thomas, S.J., Signorelli, F. and Iannotti, F., Ischaemic preconditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72), *Brain Res*, 845 (1999) 152-64.

(17) Schaller, B. and Graf, R., Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention?, *J Neurol*, 249 (2002) 1503-11.

(18) Schurr, A., Payne, R.S. and Rigor, B.M., Protection by MK-801 against hypoxia-, excitotoxin-, and depolarization-induced neuronal damage in vitro, *Neurochem Int*, 26 (1995) 519-25.

(19) Schurr, A., Reid, K.H., Tseng, M.T., West, C. and Rigor, B.M., Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro, *Brain Res*, 374 (1986) 244-8.

(20) Stoppini, L., Buchs, P.A. and Muller, D., A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, *J Neurosci Methods*, 37 (1991) 173-82.

(21) Stoppini, L., Duport, S. and Correges, P., A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures, *J Neurosci Methods*, 72 (1997) 23-33.

(22) Striggow, F., Riek, M., Breder, J., Henrich-Noack, P., Reymann, K.G. and Reiser, G., The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 2264-9.

(23)Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, 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) 379-86.

(24)Vornov, J.J., Park, J. and Thomas, A.G., Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture, *Exp Neurol*, 149 (1998) 109-22.

(25)Welsh, F.A., Mechanisms of induced tolerance to cerebral ischemia, *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 65 (1998) 447-9.

(26)Xu, G.P., Dave, K.R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T.J. and Perez-Pinzon, M.A., Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures, *Brain Res*, 952 (2002) 153-8.



**PRÉ-CONDICIONAMENTO HIPÓXICO/HIPOGLICÊMICO PREVINE A PERDA DA ATIVIDADE ELÉTRICA FUNCIONAL EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS**

Autores: Jérôme Badaut<sup>a</sup>, Lorenz Hirt<sup>c</sup>, Melanie Price<sup>c</sup>, Marlise de Castro Ribeiro<sup>c</sup>, Pierre J. Magistretti<sup>b,c</sup>, Luca Regli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Pesquisa em Neurocirurgia do Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Pavillon 3 – Beaumont, 1011 Lausanne, Suíça

<sup>b</sup> Instituto de Fisiologia da Universidade de Lausanne, Rue de Bugnon 7, 1005 Lausanne, Suíça

<sup>c</sup> Departamento de Neurologia do CHUV, Rue de Bugnon 21, 1011 Lausanne, Suíça

## Resumo

No pré-condicionamento isquêmico cerebral (PCI), uma isquemia inicial subletal aumenta a resistência neuronal a uma subsequente isquemia mais severa. Apesar de diversos estudos, os mecanismos ainda não são completamente entendidos. Nosso objetivo é desenvolver um modelo *in vitro* de PCI em culturas organotípicas de hipocampo. Em vez de anoxia, escolhemos aplicar variados graus de hipoxia, o que nos permite diversos níveis de insulto graduados de leve a severo. As culturas foram expostas a uma privação combinada de oxigênio e glicose (POG) de várias intensidades, avaliando-se a atividade elétrica e a morte celular. O PCI foi obtido pela exposição a uma condição isquêmica leve (10% de O<sub>2</sub> por 15 minutos) 24 horas antes de uma severa privação (5% de O<sub>2</sub> por 30 minutos). Surpreendentemente, o PCI produziu não apenas uma diminuição na morte celular isquêmica até 6 dias após o insulto, como também uma perda transitória da resposta potencial evocada. O grande interesse e a vantagem desse sistema sobre a preparação rápida de cortes a cultura primária de células é a habilidade de mensurar simultaneamente o atraso da morte celular e a função celular.

## Introdução

O pré-condicionamento isquêmico (PCI) é uma isquemia subletal que aumenta a resistência do tecido à subsequente isquemia letal (4). Vários modelos de PCI têm sido desenvolvidos *in vivo* (5,12,18) e *in vitro* (6,11,19,26). Entretanto, os mecanismos específicos desse estado de tolerância isquêmica permanecem desconhecidos. A cultura organotípica de hipocampo é um modelo particularmente válido para estudar a isquemia cerebral *in vitro* devido à semelhança em alguns aspectos com a isquemia *in vivo*, como a seletiva vulnerabilidade dos neurônios de CA1 à privação de oxigênio e glicose (POG) (9,14). As culturas organotípicas também oferecem a vantagem de preservar as conexões sinápticas intrínsecas encontradas *in vivo* e a possibilidade de estudar o retardo da morte celular. Essas culturas têm sido amplamente utilizadas para investigar processos isquêmicos utilizando-se a POG combinada (3,13,15-17,23,24). Nessas culturas, a privação de oxigênio foi seguida pela anoxia que induz rapidamente a morte neuronal (3,13,15-17,23,24). A fim de estabelecer uma condição apropriada para o PCI leve, decidiu-se aplicar diferentes níveis de hipoxia combinada com hipoglicemia de curta ou longa duração, causando, assim, um dano isquêmico leve, moderado ou severo. Avaliou-se o impacto da POG através da atividade elétrica e da morte celular.

## Material e Métodos

Culturas organotípicas de hipocampo foram preparadas a partir de cérebros de ratos de 10 a 12 dias de vida (OFA, IFFA-CREDO, França), tal como previamente descrito (7). Cortes coronais de hipocampo foram colocados em uma membrana (Millicell-CM, Millipore) com paredes contendo 1,5 ml de cultura (50% MEM, GIBCO Laboratories, enriquecido com HEPES e bicarbonato de sódio, 25% de solução salina de Hank, 25% de soro de cavalo, 2 mM de L-glutamina e D-glicose a uma concentração final de 6,5 mg/ml). As culturas desenvolveram-se a 37°C, 100% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 dias e meio, foram transferidas para outro meio de cultura, contendo 15% de soro de cavalo e 5 mM de D-glicose. Os cortes de hipocampo foram mantidos a 33°C em 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. A temperatura de 33°C é a condição preconizada para manter culturas organotípicas por longos períodos de tempo (21).

Em contraste com estudos prévios que usaram anoxia na POG (3,13,15-17,23,24), os cortes organotípicos de hipocampo foram submetidos a hipoglicemia combinada com três diferentes níveis de hipoxia (1%, 5% ou 10%) por 15 ou 30 minutos, no oitavo dia de cultura, em DMEM (D5030, Sigma) enriquecido com 1 mM de D-glicose e 2 mM de L-glutamina. A concentração de 1 mM de D-glicose foi considerada hipoglicêmica comparada àquela

normalmente utilizada em culturas organotípicas (5 a 25 mM) (3,13,21,23,24). O meio foi equilibrado por 1 hora a 37°C em uma câmara hipóxica umidificada (COY-Laboratory, USA) com uma atmosfera hipóxica de 1%, 5% ou 10% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> balanceado com N<sub>2</sub>. Os cortes foram transferidos para uma placa de cultura contendo o “meio isquêmico” e, então, colocadas na câmara de hipoxia por 15 ou 30 minutos. Culturas-controle foram colocadas em meio DMEM combinado com 5 mmol/L de D-glicose e 2 mmol/L de L-glutamina por 30 minutos a 37°C em uma atmosfera normóxica e umidificada. Após serem submetidas a hipoxia, todos os cortes de hipocampo foram colocados em meio de cultura contendo 15% de soro de cavalo e 5 mM de D-glicose a 33°C por 24, 48, 72 horas ou 6 dias.

Potenciais evocados de campo extracelular (PE) foram registrados na região CA1 do hipocampo, usando-se um sistema de disposição de multieletródos (Physiocard, Biocell, Geneva), e medidos com o software Physiocard (Biocell, Geneva) (7,22). Registrou-se também a região CA3 a uma frequência de 1 estimulação a cada 2 minutos antes e depois da POG em 5 a 9 cortes para cada diferente condição. As amplitudes dos PE registrados antes da POG (~ 1,2 Mv) foram consideradas as medidas basais (100% da voltagem). Após a POG, a recuperação das descargas elétricas foi monitorada por 1 hora. Os valores obtidos de experimentos independentes (n=5 a 9) foram demonstrados através de média ± DP. Teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a população de descargas surgidas após 15 minutos de POG *versus* 30 minutos de POG e 30 minutos de POG a 5% O<sub>2</sub> *versus* o pré-condicionamento com MK-801. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

A morte celular foi determinada em CA1 por meio de um indicador fluorescente de viabilidade celular denominado iodo propiônico (PI) em cinco experimentos diferentes contendo quatro cortes hipocâmpais por membrana. O PI foi adicionado ao meio a uma concentração de 5 µg/ml, 30 minutos antes de quantificar a morte neuronal de cada placa. A emissão da fluorescência do PI (excitação de tamanho de onda de 568 nm) foi medida 24, 48, 72 horas e 6 dias após POG, usando-se um microscópio de epifluorescência (Leica) com aumento da lente de 5X, acoplado a uma câmera (Leica, Inc.). Os resultados do PI foram expressos em porcentagens da morte celular máxima, obtida pela submersão de cortes em PBS por 24 horas (1,7). Os valores da morte neuronal obtidas a partir de experimentos independentes foram demonstrados através de média  $\pm$  DP. ANOVA e teste Scheffe Post Hoc foram empregados para comparar o dano neuronal em diferentes condições. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **Resultados**

Exposição a 10% de O<sub>2</sub> (hipoxia leve) para ambos os tempos, 15 e 30 minutos, ocasionou uma diminuição da atividade elétrica 5 minutos após a OGD a 34,6%  $\pm$  5,7 e 34,0%  $\pm$  9,12, respectivamente, em relação ao valor-controle. Uma rápida e completa recuperação foi observada em 40 minutos após POG para ambos os tempos (15 e 30 minutos, Figura 1A). Exposição a 5% de O<sub>2</sub> (hipoxia moderada) por 15 ou 30 minutos induziu um significativo decréscimo da amplitude do PE a 5 minutos após o insulto hipóxico, com respectivamente 19,8%  $\pm$  5,1 e 6,7%  $\pm$  0,9% do valor-controle (Figura 1B). A

recuperação elétrica não foi significativa na condição 5% de O<sub>2</sub> por 30 minutos (Figura 1B). Da mesma maneira, foi observada uma diferença entre os tempos de exposição de 15 e 30 minutos a 1% de O<sub>2</sub> (hipoxia severa). Para ambas as durações, houve uma diminuição significativa da atividade elétrica: 5,3% ± 1,5 e 11,9% ± 3,9. Para o tempo de exposição de 15 minutos, a recuperação de 53,2% ± 11,5 foi observada 60 minutos após o insulto. Assim como no nível de hipoxia moderada (5% de O<sub>2</sub>), não houve recuperação da atividade elétrica nos casos expostos a 30 minutos de POG.

A avaliação da viabilidade celular foi estudada através da coloração pelo PI. Vinte e quatro horas após a POG, observou-se um baixo nível de morte celular nas três condições hipóxicas com um curto período de exposição (15 minutos) e em uma condição hipóxica de longa exposição (10% a 30 minutos, hipoxia leve), correlacionando-se com uma boa recuperação eletrofisiológica 60 minutos após o insulto. Nos casos de hipoxia moderada ou severa (5% e 1% de O<sub>2</sub>), o nível de morte celular foi significativamente aumentado nos grupos de longa exposição (30 minutos) a 24 e 48 horas (Figura 2A, B). Nessas condições, uma quantidade significativa de morte celular foi induzida em CA1, CA2 e CA3, correlacionando-se com uma ausência de resposta eletrofisiológica. Setenta e duas horas após a POG, um menor índice de morte celular foi visto na hipoxia leve (10%) com curta exposição (15 minutos) (Figura 2C) e, em todas as outras condições, houve uma significativa morte celular. Seis dias após o insulto, o índice de morte celular ( $\approx$  50%) foi similar para todas as condições (Figura 2D). Esse espaço de tempo de morte celular demonstra que, após um curto período de POG (15 minutos), a morte celular é retardada de 72 horas a 6 dias do insulto. Em condições de POG moderada, a morte

celular aparece primeiro no giro denteado (dados não-demonstrados). Em nossa condição mais severa de POG, a duração de isquemia experimental foi maior que para modelos *in vivo* de isquemia global em ratos ou gerbos (10), sugerindo que neurônios em culturas de hipocampo são mais resistentes. Além disso, nossos resultados foram obtidos com culturas hipocampais provenientes de animais com 10 a 12 dias de vida, e sabe-se que neurônios dessas culturas são mais resistentes que aqueles de animais mais velhos (20 ou 30 dias de vida) (6).

Para os experimentos de PCI, escolhemos os valores de hipoxia leve e de curta duração (10% de O<sub>2</sub>, 15 minutos), que demonstravam os menores níveis de morte celular a 72 horas (Figura 2C) e somente uma redução transitória da atividade elétrica (Figura 1A). Esse pré-condicionamento foi seguido, 24 horas depois, por um segundo, porém mais severo, episódio de POG (5% de O<sub>2</sub>, 30 minutos) com alto índice de morte celular a 72 horas (Figura 2C), sem recuperação da atividade elétrica em 60 minutos (Figura 1B). Como esperado, o PCI induziu uma considerável neuroproteção, com significativa redução da morte celular 24 horas após severa POG ( $9,8\% \pm 3,7$  versus  $19,5\% \pm 4,7$ ,  $p < 0,05$ ). Essa proteção foi observada em 24, 48 horas e até 6 dias após a POG (Figura 3A).

A proteção induzida pelo pré-condicionamento foi diferente daquela resultante do tratamento com o MK-801, escolhido como controle positivo. O MK-801 é um antagonista NMDA e um potente neuroprotetor. Ele foi aplicado 5 minutos antes (10  $\mu$ M) (19) e mantido durante a POG. A diferença entre os dois tratamentos foi observada 5 minutos após a segunda POG, quando o valor da amplitude do potencial evocado nos hipocampus pré-condicionados foi



79,7%  $\pm$  5,8 em relação ao valor basal *versus* 14,1%  $\pm$  4,0 nos hipocampus não pré-condicionados ( $p < 0,05$ ). Essa diferença significativa foi mantida durante os 60 minutos de recuperação (Figura 3B). Nos experimentos com MK-801, observamos uma diminuição precoce do potencial evocado a 20,5%  $\pm$  10,1 com uma recuperação iniciando 20 minutos após o término da POG (Figura 3D). Uma neuroproteção, com menor índice de morte celular, foi encontrada às 24, 48 e 72 horas após o insulto hipóxico em ambos os tratamentos. Entretanto, no grupo MK-801, a morte celular aumentou consideravelmente aos 6 dias após POG, porém sem significância estatística (Figura 3C).

## Discussão

Relatamos um modelo *in vitro* original que se aproxima de um modelo de isquemia e definimos condições isquêmicas graduadas de leve a severa, com completa, parcial ou ausente recuperação da atividade elétrica, combinadas com um retardo da morte celular. A habilidade em mensurar a morte neuronal e, ao mesmo tempo, avaliar a função neuronal é uma das vantagens desse modelo. Observamos uma boa relação entre atividade elétrica neuronal e grau de morte celular. Algumas características funcionais da penumbra *in vivo* foram, desse modo, reproduzidas em situações de leve a moderada POG com silêncio elétrico neuronal e gradientes iônicos transmembrana preservados (2). O nível de morte celular, 6 dias após POG, foi similar em todas as condições (Figura 2D), exceto após PCI (Figura 3A).

Nesse modelo, demonstramos que a perda de respostas evocadas seguindo a POG corresponde à perda neuronal nos primeiros dias após insulto

severo ou após 6 dias para condições leves. Nosso modelo *in vitro* é apropriado para estudar mecanismos de morte neuronal isquêmica e testar candidatos neuroprotetores (Figura 3). Com o grupo MK-801, houve uma redução da morte neuronal observada na coloração com PI e uma recuperação funcional vista através da eletrofisiologia, como já havíamos demonstrado com D-JNKI1 (7).

O PCI também foi capaz de prevenir a queda da atividade elétrica, indicando que o pré-condicionamento protege a atividade elétrica funcional do neurônio. A adaptação da atividade elétrica foi previamente observada em um modelo instantâneo de cortes hipocâmpais pré-expostos a um curto período de anóxia (5 minutos) (20). A manutenção da atividade elétrica correlaciona-se com uma significativa neuroproteção até 6 dias após o insulto (Figura 3A). Esse resultado contrasta com o tratamento com MK-801, em que o efeito neuroprotetor não é mantido após o sexto dia do insulto (Figura 3C). Essa ausência de neuroproteção a longo prazo corresponde a uma diminuição transitória da atividade elétrica (Figura 3D).

Os mecanismos neuroprotetores do PCI não são totalmente conhecidos. Experimentos iniciais em coração e cérebro sugerem um papel da adenosina (25). Relatos mais recentes indicam a implicação de vários mecanismos que podem ser divididos em pelo menos duas categorias: 1) de defesa celular contra a isquemia e 2) de incremento da capacidade das funções vitais dentro da célula (8). Esses mecanismos podem apresentar-se através da inibição da apoptose via produção de óxido nítrico, redução do p53, por resposta ao estresse ou estabilização de membrana (8). O modelo *in vitro* descrito neste estudo pode servir como uma importante ferramenta para caracterizar os

mecanismos do PCI e, especialmente, as modificações moleculares que se seguem à preservação da atividade elétrica após uma POG leve.

## FIGURAS- LEGENDAS

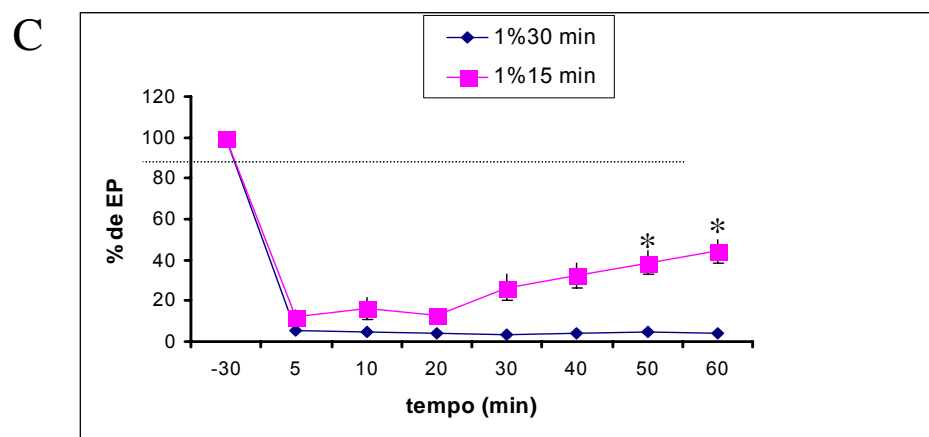
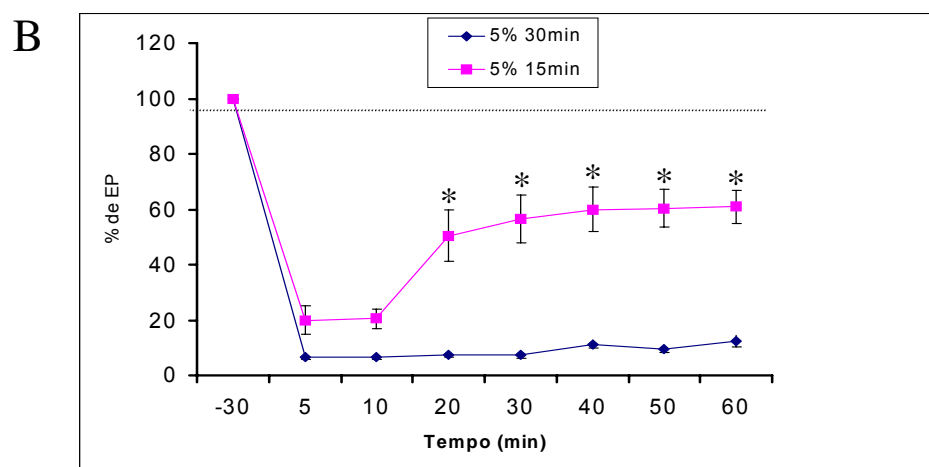
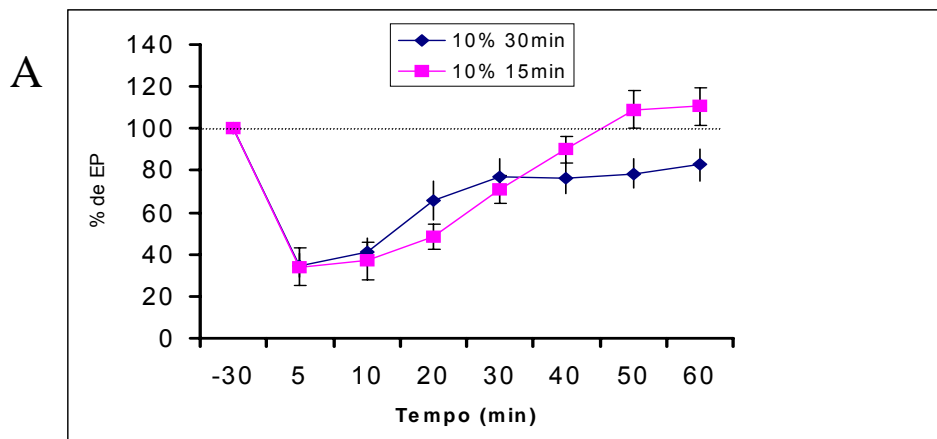
### Figura 1

Efeitos de diferentes paradigmas de insultos na recuperação do PE do campo extracelular após 15 e 30 minutos OGD a 10% de O<sub>2</sub> (A), a 5% de O<sub>2</sub> (B) e a 1% de O<sub>2</sub> (C).

- (A) Fatias hipocampais na condição 10% de O<sub>2</sub>, durante 15 e 30 minutos, demonstrou recuperação de atividade sináptica similar aos níveis de base, sem diferenças significativas entre ambos os períodos de tempo.
- (B) Fatias hipocampais na condição 5% de O<sub>2</sub>, durante 15 minutos, demonstrou uma recuperação do PE de 50 a 60% dos níveis de base. Em contraste, hipocampos tratados durante 30 minutos não demonstraram recuperação. Uma diferença significativa entre os dois tempos foi observada a 20 minutos (\*,  $p < 0,05$ , teste não-paramétrico, Teste U de Mann-Whitney).
- (C) Fatias hipocampais na condição 1% de O<sub>2</sub> demonstraram uma recuperação, para 15 minutos, de 50% dos níveis de base. Uma diferença significativa entre os dois grupos foi observada a 50 e 60 minutos da recuperação (\*,  $p < 0,05$ , teste não-paramétrico, Teste U de Mann-Whitney). Hipocampos tratados com 1% de O<sub>2</sub>, durante 30 minutos, não apresentaram recuperação. Teste U de Mann-Whitney foi usado para

comparar a recuperação da população de pontas das fatias organotípicas.

Cada ponto representa média  $\pm$  SEM.



## Figura 2

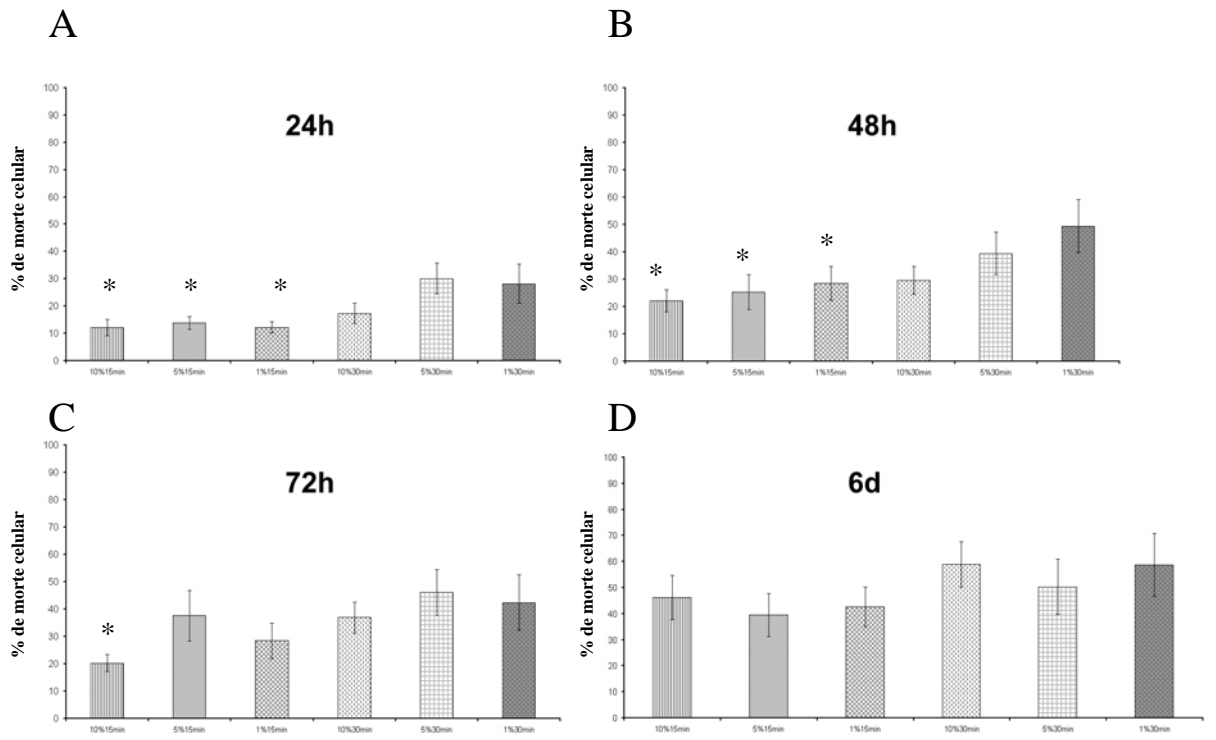
Efeitos dos insultos (1% de O<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, 10% de O<sub>2</sub>, por 15 ou 30 minutos) na morte celular de culturas organotípicas hipocâmpais a 24 (A), 48 (B), 72 horas (C) e 6 dias (D) após insulto avaliado pelo iodo propiônico.

(A) 24 horas após o insulto, no grupo de moderada e severa hipoxia (1% e 5% de O<sub>2</sub>), os níveis de viabilidade celular foram significativamente diferentes entre 15 e 30 minutos de exposição (\*, p<0,05, ANOVA, Scheffe Test). Uma diferença significativa de morte celular foi observada entre a condição 10% de O<sub>2</sub> durante 15 minutos e as condições 5 e 1% de O<sub>2</sub> durante 30 minutos (\*, p<0,05, ANOVA, Scheffe Test).

(B) 48 horas após o insulto, as condições com curto período de exposição (15 minutos) 1, 5 e 10% de O<sub>2</sub> demonstraram um menor nível de morte celular significativamente diferente das condições 1 e 5% por 30 minutos (\*, p<0,05, ANOVA, Scheffe Test).

(C) 72 horas após o insulto, somente 10% de O<sub>2</sub>, durante 15 minutos, demonstrou uma diminuição significativa da morte celular comparada ao restante do grupo (\*, p<0,05, ANOVA, Scheffe Test).

(D) Aos 6 dias, a morte celular não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Dados representados através de média ± SEM.



## Figura 3

Efeitos neuroprotetores do pré-condicionamento (A,B) e MK801 (C,D) na morte celular (A,C) e na recuperação do PE de campo extracelular (B, D) seguindo 30 minutos POG a 5% de O<sub>2</sub>.

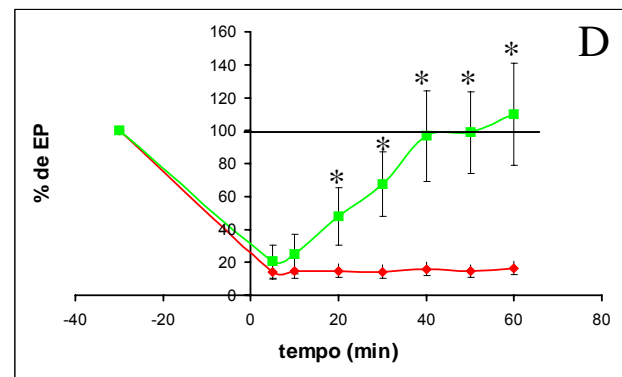
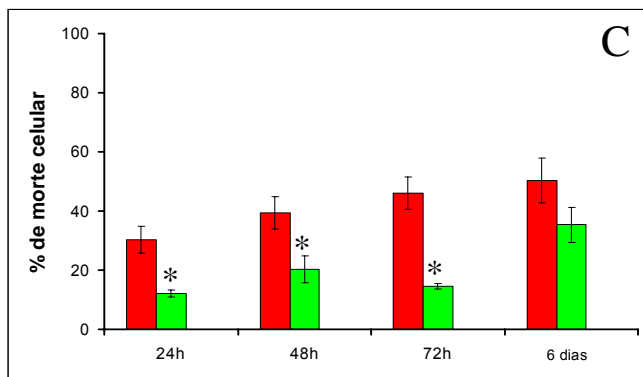
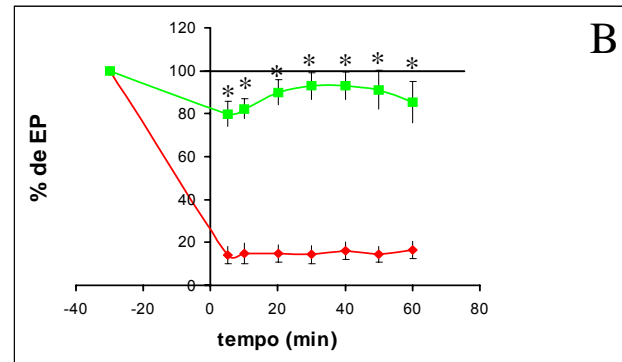
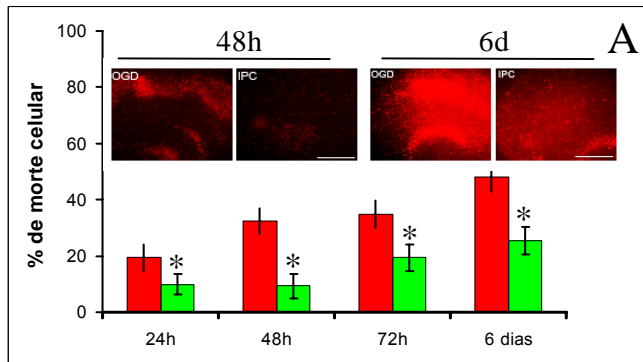
(A) Pré-condicionamento 24 horas antes do insulto induz neuroproteção, refletido por uma diminuição significativa da morte celular a 24 horas ( $9,8\% \pm 3,7$  versus  $19,5\% \pm 4,7$ , ANOVA, Scheffe Test), 48 horas ( $9,3 \pm 4,3$  versus  $32,2\% \pm 4,4$ , ANOVA, Scheffe Test) e 6 dias ( $25,5 \pm 5,2$  versus  $48,8\% \pm 4,7$ , ANOVA, Scheffe Test). Um exemplo de coloração com PI com pré-condicionamento (PCI) e sem (POG) é observado a 48 horas e 6 dias após o insulto. A coloração com PI foi mais intensa nas fatias POG quando comparadas às fatias PCI a 48 horas. Essa diferença permanece aos 6 dias. Escala de 500  $\mu$ m.

(B) Em fatias pré-condicionadas, o PE foi levemente afetado após moderada POG ( $79,7\% \pm 5,7$  a 5 minutos versus  $14,1 \pm 4,0$ ,  $p < 0,05$ , teste não-paramétrico, Teste U de Mann-Whitney) e uma recuperação total foi rapidamente observada.

(C) O MK801 usado como pré-tratamento e durante POG induziu uma significativa neuroproteção de 24 a 72 horas após moderada POG.

(D) Ao contrário das fatias pré-condicionadas, nas fatias tratadas com MK801 a atividade elétrica diminuiu após OGD moderada ( $20,5\% \pm 5$ ). A recuperação iniciou 20 minutos após POG (\*,  $p < 0,05$ , teste não-paramétrico, Teste U de Mann-Whitney).





## Referências

- (1) Astrup, J., Siesjo, B.K. and Symon, L., Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra, *Stroke*, 12 (1981) 723-5.
- (2) Bernaudin, M., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T. and Petit, E., Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia, *Exp Neurol*, 150 (1998) 30-9.
- (3) Dirnagl, U., Simon, R.P. and Hallenbeck, J.M., Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection, *Trends Neurosci*, 26 (2003) 248-54.
- (4) Dowden, J. and Corbett, D., Ischemic preconditioning in 18- to 20-month-old gerbils: long-term survival with functional outcome measures, *Stroke*, 30 (1999) 1240-6.
- (5) Hassen, G.W., Tian, D., Ding, D. and Bergold, P.J., A new model of ischemic preconditioning using young adult hippocampal slice cultures, *Brain Res Brain Res Protoc*, 13 (2004) 135-43.
- (6) Hirt, L., Badaut, J., Thevenet, J., Granziera, C., Regli, L., Maurer, F., Bonny, C. and Bogousslavsky, J., D-JNK11, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia, *Stroke*, 35 (2004) 1738-43.
- (7) Laake, J.H., Haug, F.M., Wieloch, T. and Ottersen, O.P., A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence, *Brain Res Brain Res Protoc*, 4 (1999) 173-84.
- (8) Lange-Asschenfeldt, C., Raval, A.P., Dave, K.R., Mochly-Rosen, D., Sick, T.J. and Perez-Pinzon, M.A., Epsilon protein kinase C mediated ischemic

tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice, *J Cereb Blood Flow Metab*, 24 (2004) 636-45.

(9) Lipton, P., Ischemic cell death in brain neurons, *Physiol. Rev.*, 79 (1999) 1431-1568.

(10) Martinez-Sanchez, M., Striggow, F., Schroder, U.H., Kahlert, S., Reymann, K.G. and Reiser, G., Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures, *Neuroscience*, 128 (2004) 729-740.

(11) Moncayo, J., de Freitas, G.R., Bogousslavsky, J., Altieri, M. and van Melle, G., Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*, 54 (2000) 2089-94.

(12) Newell, D.W., Malouf, A.T. and Franck, J.E., Glutamate-mediated selective vulnerability to ischemia is present in organotypic cultures of hippocampus, *Neurosci Lett*, 116 (1990) 325-30.

(13) Norberg, J., Kristensen, B.W. and Zimmer, J., Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures, *Brain Res Brain Res Protoc*, 3 (1999) 278-90.

(14) Perez Velazquez, J.L., Frantseva, M.V. and Carlen, P.L., *In vitro* ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons, *J Neurosci*, 17 (1997) 9085-94.

(15) Pringle, A.K., Angunawela, R., Wilde, G.J., Mephram, J.A., Sundstrom, L.E. and Iannotti, F., Induction of 72 kDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23 (1997) 289-98.

- (16) Pringle, A.K., Thomas, S.J., Signorelli, F. and Iannotti, F., Ischaemic preconditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72), *Brain Res*, 845 (1999) 152-64.
- (17) Schaller, B. and Graf, R., Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention?, *J Neurol*, 249 (2002) 1503-11.
- (18) Schurr, A., Payne, R.S. and Rigor, B.M., Protection by MK-801 against hypoxia-, excitotoxin-, and depolarization-induced neuronal damage in vitro, *Neurochem Int*, 26 (1995) 519-25.
- (19) Schurr, A., Reid, K.H., Tseng, M.T., West, C. and Rigor, B.M., Adaptation of adult brain tissue to anoxia and hypoxia in vitro, *Brain Res*, 374 (1986) 244-8.
- (20) Stoppini, L., Buchs, P.A. and Muller, D., A simple method for organotypic cultures of nervous tissue, *J Neurosci Methods*, 37 (1991) 173-82.
- (21) Stoppini, L., Duport, S. and Correges, P., A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures, *J Neurosci Methods*, 72 (1997) 23-33.
- (22) Striggow, F., Riek, M., Breder, J., Henrich-Noack, P., Reymann, K.G. and Reiser, G., The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2000) 2264-9.
- (23) Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A. and 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, *Neuroscience*, 118 (2003) 379-86.

(24)Vornov, J.J., Park, J. and Thomas, A.G., Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture, *Exp Neurol*, 149 (1998) 109-22.

(25)Welsh, F.A., Mechanisms of induced tolerance to cerebral ischemia, *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 65 (1998) 447-9.

(26)Xu, G.P., Dave, K.R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T.J. and Perez-Pinzon, M.A., Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures, *Brain Res*, 952 (2002) 153-8.