

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ESTUDO SOBRE O PAPEL DA HSP27 NA TOLERÂNCIA À
ISQUEMIA CEREBRAL EM UM MODELO *IN VIVO* E EM
CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE HIPOCAMPO DE RATOS.

LAUREN MARTINS VALENTIM

Orientadora

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO

Co-orientador

CARLOS ALEXANDRE NETTO

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

Porto Alegre

2002

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

Ainda que eu tivesse o dom de profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que eu tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes e não tivesse amor, nada seria."

I Coríntios 13: 1

Dedico esta tese a algumas pessoas que estiveram sempre do meu lado: meu pai, minhas duas mães, Iara e Chris, e meus anjos-da-guarda, Augusto e Aninha.

AGRADECIMENTOS

À Chris, minha eterna mãe, por tudo que passamos juntas;

Ao Alex, co-co-chefinho, pelas orientações, idéias e carinho;

Aos meus "escravos" amados, Augusto e Ana Paula: sem vocês, eu
não sei o que seria de mim;

Ao Rod, por todo o apoio durante o trabalho;

Ao Guido, pelas "brain storms";

A todos os colegas do lab., que acabam sempre ajudando: Beti,
Sirlene, Carol, Otemar, Helena, Alexandre e todos os ICs;

Ao pessoal do "Grande Grupo", que acompanhou tudo desde o
começo;

Ao Paulo e a toda a turma da isquemia;

À Dani O., minha companheira do lab.;

À Carmem, pelo apoio na montagem das culturas organotípicas;

À Verlaine e Cecília, por todo o suporte durante a tese;

Aos meus amigos, que souberam entender a minha ausência nas
horas difíceis da tese;

Aos meus pais e minha família, pela vida.

ÍNDICE

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
APRESENTAÇÃO	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
INTRODUÇÃO	1
1..AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	2
1.1. Neurônios.....	2
1.2. Células Gliais	3
1.2.1. Astrócitos	4
1.3. Inter-relações Neurônio-Glia e Glia-Glia	5
1.4. Gliose Reativa.....	7
1.4.1. Características da Astroglíose Reativa	7
1.4.2. Funções da Astroglíose Reativa	9
2. ISQUEMIA CEREBRAL	10
2.1. Eventos que Causam a Morte Celular na Isquemia	11
2.2. Morte Celular Isquêmica	12
2.3. A Vulnerabilidade Seletiva do Hipocampo	13
2.4. Modelos Experimentais <i>in vivo</i>	15
2.5. Modelos Experimentais <i>in vitro</i>	15
3. PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO OU TOLERÂNCIA INDUZIDA	16
4. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs).....	17
4.1. HSP27.....	18
4.1.1. Fosforilação da HSP27	19
4.1.2. Funções da HSP27	19
5. CULTURA ORGANOTÍPICA.....	21
OBJETIVOS.....	24
ARTIGOS PUBLICADOS (Artigo 1)	26
ARTIGOS PUBLICADOS (Artigo 2)	34
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES.....	73
PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

A HSP27 é um membro da família das proteínas de choque térmico que protege as células contra diversos tipos de estresse, sendo expressa principalmente em astrócitos depois da isquemia. Neste trabalho, nós estudamos o papel da HSP27 na tolerância à isquemia cerebral, usando um modelo *in vivo* e culturas organotípicas. Foram estudados diferentes tempos de reperfusão *in vivo* (1, 4, 7, 14, 21, 30 dias) usando 2 min, 10 min ou 2+10 min de isquemia global transitória pela oclusão dos 4 vasos (4VO). Foi observado um aumento no imunoconteúdo no DG depois de todos os tratamentos, com uma diminuição na porcentagem de HSP27 fosforilada. Em CA1, região vulnerável, observou-se um aumento no imunoconteúdo depois de 10 ou 2+10 min de isquemia; em 10 min o aumento de fosforilação foi paralelo ao imunoconteúdo, enquanto com 2+10min de isquemia, quando a região CA1 se tornou resistente, houve uma diminuição na porcentagem de HSP27 fosforilada. Os resultados sugerem que a HSP27 pode estar atuando como chaperona, protegendo outras proteínas da desnaturação nos astrócitos, os quais podem auxiliar os neurônios a sobreviverem por manter a homeostase do tecido. Em culturas organotípicas, foram usados 5 ou 10 min de privação de glicose e oxigênio (OGD) ou 1 μ M de NMDA para induzir tolerância ao tempo letal, 40 min, de privação de glicose e oxigênio (OGD). Nesse caso, foi observado um aumento no imunoconteúdo de HSP27 depois de todos os tratamentos, mas a porcentagem de HSP27 fosforilada se manteve constante ou aumentou quando o pré-condicionamento ocorreu. A HSP27 pode estar modulando os filamentos de actina ou bloqueando o processo apoptótico, facilitando a sobrevivência das células. Em conjunto, os resultados sugerem que o mecanismo que leva à morte de células pode ser diferente nos dois modelos, exigindo atuações distintas da proteína.

ABSTRACT

HSP27 is a member of the small HSPs that protects the cells against many types of injuries and is expressed mainly in astrocytes after ischemia. In this work, we studied the role of HSP27 in the induction of tolerance to cerebral ischemia, using an *in vivo* model and organotypic hippocampal cultures. We studied different times of reperfusion *in vivo* (1, 4, 7, 14, 21 and 30 days) using 2 min, 10 min or 2+10 min of transient global ischemia using the 4 vessel occlusion model (4VO). We observed an increase in HSP27 immunocontent in DG, a resistant area, after all treatments, associated with a reduction in the percentage of phosphorylated protein. In CA1, a vulnerable area, we observed an increase in HSP27 immunocontent after 10 or 2+10 min of ischemia; after 10 min of ischemia the increase in HSP27 phosphorylation was parallel with immunocontent, while after preconditioned ischemia, when CA1 neurons became tolerant, the percentage of phosphorylated HSP27 decreased. These results suggest that HSP27 could be acting as a chaperone in DG and in tolerant CA1, protecting other proteins from denaturation in astrocytes, which could be helping neurons to survive, maintaining tissue homeostasis. In organotypic cultures, we performed 5 and 10 min of oxygen and glucose deprivation (OGD) or 1 μ M NMDA to induce tolerance to a lethal period of oxygen and glucose deprivation (OGD). In this case, we observed an increase in HSP27 immunocontent after all treatments, but the protein maintained or increased its phosphorylation state when preconditioning was achieved. HSP27 could be modulating actin filaments or blocking apoptotic processes, thus helping cells to survive. Taken together, these results suggest that the mechanisms involved in degeneration after ischemia could be different in these two models, requiring a different action for the protein.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por Introdução, Artigos Científicos publicados

e/ou submetidos, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** mostra o embasamento teórico do trabalho. Os Resultados, Material e Métodos, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios trabalhos, apresentados na seção **Artigos Publicados**. O primeiro trabalho foi publicado na Revista Neuroscience em 2001 e o segundo foi submetido à revista Journal of Neurochemistry em Janeiro de 2002.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral, englobando os dois trabalhos.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais da tese e as **Perspectivas** discutem as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir desta tese.

A seção **Referências Bibliográficas** lista apenas as referências usadas na introdução e na discussão da tese.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: As células do SNC e suas interrelações.....04

Figura 2: Cascata neurotóxica na isquemia e reperfusão.....13

Figura 3: Esquema representativo do papel da HSP27 nas células.....20

ARTIGO 1

Figura 1: Representative results of HSP27 phosphorylation level and immunoccontent after 7 days of reperfusion.....28

Figura 2: Autorradiograph of ³²P labelled hippocampal slice showing the position of HSP27 in the gel.....28

Figura 3: Immunoccontent and % of phosphorylated HSP27 after preconditioning (2 min of ischemia).....28

Figura 4: Alterations in HSP27 after ischemia for 10 min29

Figura 5: Alterations in immunoccontent % of phosphorylated HSP27 in response to ischemic preconditioning.....29

Figura 6: % of phosphorylated HSP27 after different periods of ischemia.....29

ARTIGO 2

Figura 1: Quantification of CA1 damage after 40 min of OGD and preconditioning.....	59
Figura 2: Immunocontent and % of phosphorylated HSP27 after 40 min of OGD and preconditioning using 5 min of OGD	60
Figura 3: Alterations in HSP27 after 40 min of OGD and preconditioning with 10 min of OGD.....	61
Figura 4: Alterations in HSP27 immunocontent and phosphorylation after OGD and preconditioning with 1 μ M NMDA.....	62

DISCUSSÃO

Figura 4: Esquema representativo dos possíveis mecanismos de ação da HSP27 na tolerância à isquemia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	70
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1: Alterations in HSP27 phosphorylation and immunocontent in organotypic hippocampal cultures after sublethal periods of OGD.....	58
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP: adenosina tri-fosfato
CA: corno de Ammon (*cornus ammonis*)
DG: giro denteado (*Dentate Gyrus*)
GABA: ácido gama-amino butírico
GFAP : Proteína Glial Fibrilar Ácida (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)
HBSS: solução salina balanceada de Hanks
HO-1: heme-oxigenase-1
HSP: proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
IRP/APG2: proteína responsiva à isquemia
MAPKAP quinase 2: proteína quinase ativada pela proteína quinase ativada por mitógenos
MEM: meio essencial mínimo
NMDA: N-Metil-D-Aspartato
OGD: privação de glicose e oxigênio (*Oxygen and glucose deprivation*)
OSP/APG1: proteína de estresse osmótico
PI: iodeto de propídio
PRAK: proteína quinase ativada/regulada pela p38
SNC – sistema nervoso central
4VO – oclusão dos 4 vasos (*4-Vessel Occlusion*)

INTRODUÇÃO

1. AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Diversos tipos celulares estão organizados no sistema nervoso central (SNC), cada um com funções específicas, mas relacionando-se de maneira peculiar e extremamente complexa. Entre os tipos celulares presentes no SNC, encontram-se dois grandes grupos: os neurônios e as células gliais (Kandel *et al.*, 1995).

1.1. NEURÔNIOS

Os neurônios são células que diferem de todas as outras por serem excitáveis, isto é, eles apresentam potenciais elétricos causados pelo fluxo de íons através dos canais da membrana plasmática. A excitabilidade resulta de proteínas especializadas na membrana dos neurônios (os canais de íons e bombas de íons que utilizam ATP). Um neurônio típico tem quatro regiões morfológicas definidas: corpo celular, axônio, dendritos e terminais pré-sinápticos. O corpo celular é o centro metabólico da célula. Dele emergem usualmente dois tipos de processos: os dendritos, que podem estar em número bastante grande, e o axônio, usualmente único. O axônio é a principal unidade condutora do neurônio; como ele pode apresentar ramificações, leva a informação a diferentes alvos (KANDEL *et al.*, 1995).

Transmissão Sináptica: Axônios e dendritos provenientes de diferentes neurônios se intercomunicam por junções complexas conhecidas como sinapses, as quais transmitem o potencial de ação de um neurônio para outro (PETERS E PALAY, 1996). As sinapses acontecem, principalmente, através da liberação de neurotransmissores pelo terminal pré-sináptico, que se ligam a receptores e abrem, direta ou indiretamente, canais iônicos. As sinapses podem ser excitatórias ou inibitórias, quando despolarizam ou hiperpolarizam a membrana, respectivamente (KANDEL *et al.*, 1995). Uma célula nervosa central pode receber conexões de centenas de neurônios, algumas excitatórias, outras inibitórias. No SNC os impulsos para uma única célula são mediados por uma variedade de neurotransmissores, cada um

controlando diferentes canais iônicos. Os neurônios podem, portanto, integrar diferentes impulsos em uma resposta coordenada (RAINE, 1994).

1.2. CÉLULAS GLIAIS

Em 1846, Virchow reconheceu a existência no SNC de células não-neuronais com aspecto estrelado ou alongado, às quais ele deu o nome de neuroglia (“nerve glue”). Somente no início do século XX estes elementos intersticiais foram classificados como tipos celulares distintos. Os dois grupos mais conhecidos de células gliais são a macroglia, que inclui astrócitos e oligodendrócitos, e a microglia (RAINE, 1994).

Embora seu nome seja originado da palavra grega para “cola”, as células gliais não exatamente prendem as células umas às outras. Na verdade, elas desempenham um papel essencial no processamento das informações e têm inúmeros papéis vitais, como: servir como elementos de suporte, promovendo firmeza e estrutura ao cérebro; produzir mielina; remover detritos depois de injúria ou morte neuronal; tamponar a concentração de íons potássio no espaço extracelular; recaptar neurotransmissores; orientar a migração de neurônios durante o desenvolvimento; formar, junto com as células ependimais, a barreira hemato-encefálica que evita que substâncias tóxicas do sangue entrem no cérebro, fornecer suporte energético para o metabolismo neuronal entre outras funções (KANDEL *et al.*, 1995; KEISER E PELLMAR, 1994; BARRES, 1991; FORSYTH *et al.*, 1996). Além disso, muitos estudos têm demonstrado que há uma íntima comunicação entre neurônios e células gliais, estabelecendo uma importante relação entre os dois principais elementos do SNC (FIGURA 1) (CHIU E KRIEGLER, 1994; GLOWINSKI *et al.*, 1994; ATTWELL, 1994; CARMIGNOTO, 2000; LAMING *et al.*, 2000).

FIGURA 1: As células do SNC e

suas inter-relações:

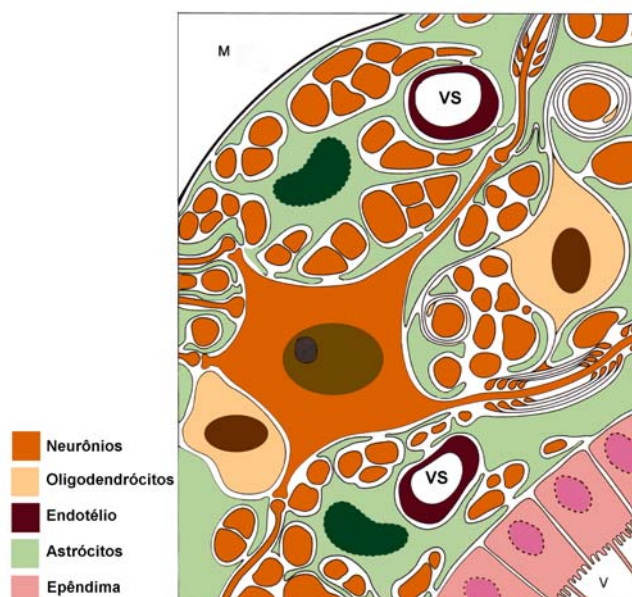
astrócitos, neurônios,

oligodendrócitos, células

ependimais e células endoteliais.

VS: vaso sanguíneo; **M:** superfície da meninge; **V:** espaço ventricular.

Baseado em Raine, 1994.

**1.2.1. ASTRÓCITOS**

Os astrócitos constituem o tipo de células gliais presentes em maior número no SNC. Seus corpos celulares têm forma estrelada e freqüentemente apresentam processos relativamente longos, cujas extremidades envolvem os capilares sanguíneos deixando somente pequenas regiões para a difusão de substâncias dos capilares para os espaços extracelulares do cérebro (BRADFORD, 1985). Esse tipo celular desempenha funções fisiológicas e é um elemento essencial na homeostase do cérebro normal, fazendo parte de uma importante interação neurônio-glia (NORENBERG, 1994; NORENBERG, 1998; RIDET *et al.*, 1997).

Dentre as funções dos astrócitos, destacam-se:

- **Metabolismo de neurotransmissores:** Os astrócitos são responsáveis por remover neurotransmissores como o glutamato e o GABA, que são liberados na fenda sináptica (KIMELBERG E NORENBERG, 1989). Foram encontrados altos níveis da enzima glutamina sintetase nos astrócitos que, em conjunto com um transportador de glutamato, removem o glutamato extracelular fornecendo glutamina, um substrato para o metabolismo neuronal (SONNEWALD, *ET AL.*, 1996; TANSEY *ET AL.*, 1991).

- **Metabolismo energético:** Os astrócitos captam a glicose, e metabolizam até lactato ou alanina e só depois distribuem os nutrientes para os neurônios (TSACOPOULOS E MAGISTRETTI, 1996). Além disso, há estoques de glicogênio quase exclusivos dos astrócitos, servindo como fonte de combustível para as células vizinhas (DRINGEN *et al.*, 1993; FORSYTH *et al.*, 1996; SCHURR *et al.*, 1997).

- **Barreira hemato-encefálica:** Os processos astrocíticos sofrem um pequeno inchamento próximo aos capilares sangüíneos formando uma espécie de barreira ao redor dos vasos que, em conjunto com as células endoteliais, impedem que diversas substâncias grandes ou moléculas carregadas do sangue entrem no SNC (BRADFORD, 1985).

- **Tamponamento de K⁺:** Os astrócitos captam os íons liberados na fenda sináptica e os carregam para outras regiões, onde a concentração de K⁺ no meio extracelular é menor. Desta forma os astrócitos mantêm o balanço de potássio, conseqüentemente o meio adequado para os neurônios (BARRES, 1991; WALZ, 1997).

- **Presença de receptores:** Apesar do fato de as células gliais não serem capazes de sofrer excitação como os neurônios, sabe-se que os astrócitos apresentam vários receptores em sua superfície e podem responder a neurotransmissores liberados na fenda sináptica, através de receptores ionotrópicos ou da produção de segundos mensageiros (KEISER E PELLMAR, 1994; STEINHAUSER E GALLO, 1996).

- **Reparar danos ao SNC:** Esta função será descrita abaixo, na sessão astrogliose reativa item 1.4

1.3. INTER-RELAÇÕES NEURÔNIO-GLIA E GLIA-GLIA

Nos últimos anos, muitas evidências têm surgido sobre a existência de uma íntima comunicação bidirecional entre neurônios e células gliais (CARMIGNOTO, 2000). A idéia de que os neurônios enviam mensagens para as células gliais sugere que a glia também se comunica com os neurônios e com outras células gliais. De fato, a glia, especialmente os astrócitos, pode

sintetizar e liberar substâncias neuroativas e fatores tróficos, fazendo com que estes dois tipos de células formem uma rede integrada dentro do cérebro (LAMING *et al.*, 2000; CARMIGNOTO, 2000).

As células gliais podem comunicar-se através das junções *gap*, que são regiões de aposição e aparente fusão entre as membranas das células. Os astrócitos formam junções *gap* uns com os outros e com os oligodendrócitos, unindo a macroglia num sincício funcional, capaz de redistribuir íons extracelulares, especialmente o potássio e o cálcio, mantendo constantes o pH extracelular e a composição iônica (ROSENBLUTH, 1995; BRADFORD, 1985).

Entre as células gliais e as neuronais, a comunicação se dá através de diferentes agentes, os quais podem auxiliar os neurônios de diferentes maneiras:

Glutamato: Como os astrócitos apresentam diversos receptores glutamatérgicos em sua membrana plasmática, eles podem responder ao glutamato liberado dos terminais sinápticos neuronais, aumentando a concentração interna de cálcio (PORTER E MCCARTHY, 1996; GALLO E GHIANI, 2000; CORNELL-BELL *et al.*, 1990); os astrócitos têm a responsabilidade de recaptar o glutamato liberado pelos neurônios no meio extracelular (SCHNEIDER E BAETHMANN, 1992; HANSSON E RÖNNBÄCK, 1995). Por outro lado, as células gliais também podem liberar glutamato, que causa um aumento na concentração neuronal de cálcio através de um mecanismo mediado por receptores NMDA (PARPURA *et al.*, 1994).

Cálcio: Quando um potencial elétrico focal é aplicado em astrócitos, em culturas mistas, ocorre um aumento no cálcio intracelular da célula alvo, provocando ondas de cálcio que se propagam de astrócito a astrócito. Os neurônios próximos desses astrócitos também respondem aumentando sua concentração citosólica de cálcio (PASTI *et al.*, 1997; ZANOTTI E CHARLES, 1997).

Outros neurotransmissores: Os astrócitos também possuem receptores adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos e purinérgicos, entre outros. As funções dessas estruturas ainda merecem

muito estudo, mas certamente estão também envolvidas com a intercomunicação neurônio-glia (KIMELBERG, 1995).

Fatores tróficos: As células gliais também liberam fatores tróficos que interferem no crescimento dos neurônios, podendo auxiliar na recuperação depois de uma lesão (GIULIAN, 1993; MATSUSHIMA *et al.*, 1998; SEMKOVA E KRIEGLSTEIN, 1999).

1.4. GLIOSE REATIVA

Também conhecida como astrogliose reativa ou astrocitose reativa, a gliose é um evento universal no SNC depois de um dano de qualquer tipo. É caracterizada pela presença de um grande número de astrócitos reativos ou ativados, que se distinguem dos normais pelo seu maior tamanho, processos mais longos e largos e aumento da expressão da proteína específica de astrócitos, a GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Os núcleos são freqüentemente grandes, irregulares e muitas vezes apresentam numerosos nucléolos. Diferentes tipos de danos ao SNC induzem uma variedade de respostas astrocíticas, indicando que a gliose pode variar de acordo com a lesão (NORTON *et al.*, 1992).

1.4.1. CARACTERÍSTICAS DA ASTROGLIOSE REATIVA

a) Hipertrofia dos astrócitos e alterações morfológicas: O edema dos astrócitos representa um fenômeno comum e, talvez, a primeira resposta glial à injúria no SNC. O edema é causado por um aumento da concentração intracelular de solutos, com um influxo secundário de água causado por inúmeros agentes, tais como o glutamato (HANSSON, 1994). A glia hipertrofiada perde sua habilidade de manter os gradientes iônicos necessários para regular o glutamato e os íons. Além disso, esses astrócitos também podem liberar glutamato, o que contribui para a excitotoxicidade

(STAUB *et al.*, 1993).

A redução do espaço extracelular, em função do edema das células, pode alterar as concentrações iônicas extracelulares (especialmente de cálcio) que pode afetar a excitabilidade neuronal. Quando a hipertrofia é severa, a membrana celular pode se romper e causar a morte da célula (NORENBERG, 1994).

b) Hiperplasia dos astrócitos: Um aspecto amplamente estudado é se a proliferação dos astrócitos contribui para a gliose. Enquanto há um “*pool*” de astrócitos capazes de entrar no ciclo mitótico, sua capacidade proliferativa é limitada no cérebro adulto. Embora o número de astrócitos GFAP-positivos aumente (o que nos leva a imaginar um aumento no número de astrócitos), em muitos casos isto é devido ao fato de células GFAP-negativas terem se tornado positivas (NORTON *et al.*, 1992).

Embora seja comumente considerado que os astrócitos proliferam em resposta à injúria cerebral, isto é evidente somente em certos tipos de lesões, especialmente quando há rompimento do tecido. Nestes casos, a proliferação acontece nas proximidades da lesão. Estudos de injúrias não invasoras, como a anóxia, não confirmam a idéia de que astrócitos proliferam em resposta ao dano. São necessários estudos mais detalhados para confirmar em quais situações, e em quais regiões, a glia sofre proliferação em resposta à injúria (HATTEN *et al.*, 1991; NORENBERG, 1994).

c) Aumento de GFAP e expressão de vimentina: Normalmente são encontrados níveis aumentados da proteína GFAP, e de seu mRNA em regiões lesionadas (NORTON *et al.*, 1992; VALENTIM *et al.*, 1999). A vimentina é uma proteína de filamentos intermediários que é substituída pela GFAP quando o cérebro atinge a maturidade. Entretanto, pode haver indução de sua expressão em astrócitos reativos proliferativos no sítio da lesão, sendo co-expressa com a GFAP (JANECZKO, 1993). Também tem sido observado o aumento da expressão da proteína S-100 depois de trauma e isquemia (NORENBERG, 1994).

d) Cicatriz glial: A cicatriz glial é formada pelos longos e espessos processos citoplasmáticos da glia reativa. Trata-se de uma mistura

complexa de astroglia, microglia, oligodendrócitos, neutrófilos, macrófagos e outras células, que varia de acordo com o tipo de lesão e a idade do animal (HATTEN *et al.*, 1991; FAWCETT E ASHER, 1999).

e) Fatores de crescimento: Alguns fatores de crescimento produzidos pela glia podem recuperar neurônios danificados e favorecer a sobrevivência neuronal, auxiliando na restauração dos processos (COTMAN *et al.*, 1994; MATSUSHIMA *et al.*, 1998; SEMKOVA E KRIEGLSTEIN, 1999).

f) Expressão de proteínas de choque térmico: Os astrócitos ativados aumentam a expressão de proteínas de choque térmico, especialmente da HSP27 (heat shock protein of 27 KDa) . Dentre as funções descritas para essa proteína destaca-se a função de proteger as células do estresse (CURRIE *et al.*, 2000). As propriedades da HSP27 serão melhor descritas adiante (sessão 4 desta introdução).

1.4.2. FUNÇÕES DA ASTROGLOSE REATIVA

Para que os neurônios possam sobreviver depois de uma injúria, é fundamental que o SNC mantenha a homeostase cerebral, isto envolve uma ativa interação neurônio-glia. Depois da lesão, os astrócitos são responsáveis pela remoção de neurotransmissores excitotóxicos e íons, incluindo glutamato, lactato, hidrogênio e potássio (LIU *et al.*, 1999; AMEDEE *et al.*, 1997). Em 1999, Liu e colaboradores demonstraram que uma disfunção astrogliar pode aumentar o dano neuronal, especialmente por comprometer as interações neurônio-glia e dificultar a manutenção do equilíbrio osmótico. Os astrócitos também produzem uma variedade de fatores de crescimento e tem altos níveis de glutathiona, um importante antioxidante no SNC (JUURLINK, 1997; CULMSEE *et al.*, 1999; GOTTLIEB E MATUTE, 1999). Portanto, um distúrbio nessas atividades astrogliais pode induzir ou aumentar a disfunção neuronal e a doença neurológica (ASCHNER, 1998; RAPS *et al.*, 1989).

Outra característica da gliose reativa é sua capacidade de responder a pequenos insultos, mesmo na ausência de lesão detectável indicando que os astrócitos podem responder a sinais patológicos na ausência de

mudanças morfológicas significativas. Isto pode acontecer devido à difusão de sinais ao longo do meio extracelular ou através das junções *gap* (NORENBERG, 1994). Louwe e colaboradores (1998) sugerem que uma ativação prévia dos astrócitos, induzida por uma injúria não letal, pode diminuir a lesão neuronal causada pela oclusão do fluxo sanguíneo (isquemia) e demonstraram que a desativação dos astrócitos (causada pelo agente brometo de etídio) pode diminuir a recuperação dos neurônios expostos a um estímulo letal. Este e outros trabalhos vêm mostrando a importância dos astrócitos na recuperação do sistema nervoso depois de uma lesão e que, quando ativadas, essas células podem aumentar sua capacidade de manter o equilíbrio do sistema.

2. ISQUEMIA CEREBRAL

A isquemia e a hipóxia constituem importantes condições patofisiológicas de lesão cerebral e são alvos de intensa investigação. A isquemia é definida como uma redução severa ou um completo bloqueio do fluxo sanguíneo. A hipóxia denota a redução no conteúdo de oxigênio no sangue, que ainda circula e pode remover metabólitos (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991). Até hoje a isquemia cerebral afeta um número assustador de vítimas e o índice de mortalidade permanece em torno de 30% (DIRNAGL *et al.*, 1999).

O metabolismo energético normal no cérebro tem algumas características especiais, que incluem uma taxa metabólica alta, estoques de energia limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Por essa razão, o cérebro é mais vulnerável ao dano isquêmico do que outros tecidos. O tipo mais comum de isquemia em humanos é a **isquemia focal**, que é a interrupção do fluxo de sangue de uma parte do cérebro. Outro tipo é a **isquemia global**, que resulta de uma interrupção transitória do fluxo sanguíneo para todo o cérebro, como ocorre durante uma parada cardíaca. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, muitos fatores durante a volta da circulação

sangüínea (reperfusão) podem aumentar ainda mais o dano neuronal, especificamente em áreas vulneráveis do cérebro (TAYLOR *et al.*, 1996).

2.1. EVENTOS QUE CAUSAM A MORTE CELULAR NA ISQUEMIA

A interrupção na circulação de sangue desencadeia uma cascata de eventos que leva à morte celular (FIGURA 2) (DIRNAGL *et al.*, 1999; JUURLINK E SWEENEY, 1997). Quando os estoques de energia se esgotam, o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização. Conseqüentemente, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem se tornam ativados e são liberados aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, particularmente o glutamato (CHOI, 1995; DE KEYSER, 1999). Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores, são bloqueados, o que aumenta o acúmulo de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular. A ativação de receptores glutamatérgicos leva ao aumento de cálcio intracelular, por abertura direta de um canal de cálcio (receptores ionotrópicos) ou através de proteínas G (receptores metabotrópicos). Como resultado da ativação glutamatérgica, íons Na^+ e Cl^- entram nos neurônios através de canais iônicos, juntamente com a água, levando a um inchamento das células (edema).

O aumento no Ca^{2+} , um dos principais segundos mensageiros das células, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, causando danos no tecido através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases e outras enzimas que causam danos em vários locais da célula, levando à morte por necrose (MITANI *et al.*, 1993). A ativação da fosfolipase A_2 e da ciclooxigenase gera radicais livres esgotando os estoques de antioxidantes, aumentando o dano através de peroxidação lipídica e danos na membrana, assim como o óxido nítrico gerado pela óxido nítrico sintase que também promove danos ao tecido e pode levar a apoptose (IADECOLA, 1997; SWEENEY *et al.*, 1995; PHILLIS, 1996).

A mitocôndria, que é uma importante geradora de radicais livres, fica

debilitada pela ação de radicais livres na membrana interna e pela oxidação de proteínas que mediam o transporte elétrico (DUGAN E CHOI, 1994). Forma-se uma espécie de poro na membrana da mitocôndria que causa um inchamento e a liberação de citocromo C; esta seqüência de eventos pode desencadear a apoptose.

Quando o fluxo sangüíneo é restaurado (reperfusão), a disponibilidade de oxigênio aumenta, bem como as reações bioquímicas que geram radicais livres. Outro componente do dano celular é a inflamação, que causa liberação de citocinas que contribuem para o aumento do dano (ASHENER *et al.*, 1998a).

A isquemia e a reperfusão podem induzir a síntese de proteínas específicas, por exemplo as Proteínas de Choque Térmico (HSPs) (LI *et al.*, 1995), vimentina, e GFAP. A indução dessas proteínas pode estar relacionada com o aumento da resistência à injúria (HSP) e resposta glial à lesão (GFAP e vimentina) (KINDY *et al.*, 1992).

2.2. MORTE CELULAR ISQUÊMICA

A morte de neurônios depois de um insulto isquêmico pode ser imediata ou tardia. A morte imediata é causada pelo mecanismo necrótico, enquanto a tardia pode ocorrer por necrose ou apoptose (GRAHAM E CHEN, 2001; ZHAN *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2001; WHITFIELD *et al.*, 1999). A apoptose é a morte celular programada, em que a célula morre em resposta à ativação de um programa genético específico, enquanto a necrose parece ser a resposta das células à perda de ATP, acompanhada pelo influxo massivo de Ca^{2+} (SWEENEY *et al.*, 1995). A inibição da síntese de proteínas parece estar relacionada com a morte neuronal, pois a morte nas áreas vulneráveis é precedida por uma severa inibição na síntese protéica, e a restauração da síntese previne a injúria neuronal (HOSSMANN, 1993).

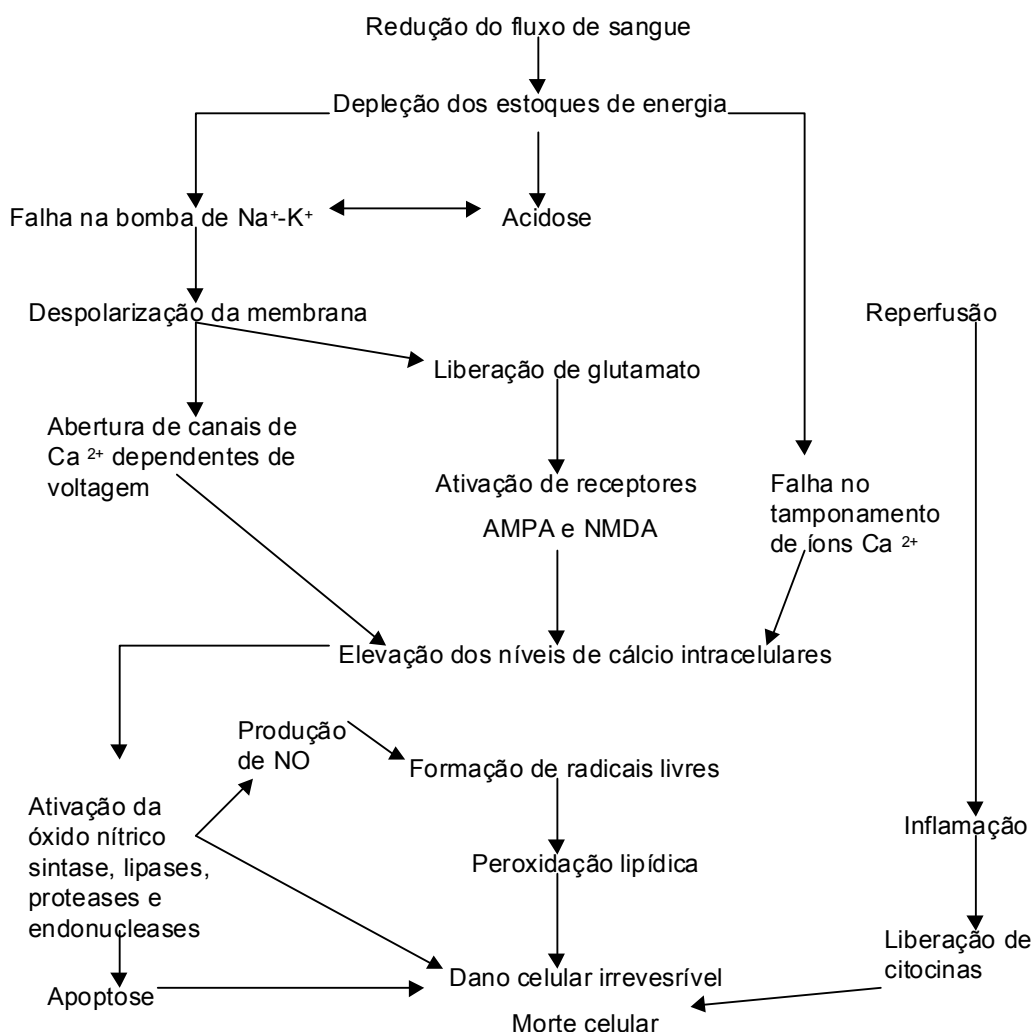


FIGURA 2: Cascata neurotóxica na isquemia e reperfusão. Alguns eventos principais são a despolarização descontrolada, excitação por glutamato, aumento de cálcio intracelular, geração de radicais livres, ativação de enzimas e inflamação. Baseado em De Keyser *et al.*, 1999.

2.3. A VULNERABILIDADE SELETIVA DO HIPOCAMPO

Populações de células que se encontram próximas no cérebro podem

apresentar uma vulnerabilidade diferente a equivalentes intensidades de isquemia. Apesar de, atualmente, se saber muito sobre a anatomia, a fisiologia e a bioquímica do SNC, ainda resta muito a descobrir sobre as causas dessa vulnerabilidade diferenciada de populações específicas em resposta à isquemia. O dano depois da isquemia global limita-se à região CA1 do hipocampo e, em menor extensão, a certas sub-regiões do neocórtex, tálamo e estriato (SCHREIBER E BAUDRY, 1995).

No hipocampo, as células piramidais da região CA1 são sensíveis enquanto as células piramidais da região vizinha CA₃ são resistentes. No giro denteado (DG) as células granulares são resistentes, enquanto no hilo somente uma sub-população de células parece ser vulnerável (HSU *et al.*, 1994; PULSINELLI *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 2000). Depois de 20-30 min de isquemia no rato, as áreas CA1, CA2 e o hilo são afetados, enquanto as células das regiões CA3 e DG permanecem intactas. Os neurônios da região CA1 e do hilo são, talvez, os mais vulneráveis de todo o cérebro. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue a seqüência: CA1, hilo > CA2 > CA3 > DG. É importante ressaltar que, apesar de os neurônios morrerem depois do insulto, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do cérebro (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991).

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

Os fatores que determinam essa seletividade ainda são um mistério. Uma das hipóteses para explicar a vulnerabilidade das células CA1 refere-se ao aumento na liberação de glutamato durante a isquemia, superativando os receptores, levando a um excesso de cálcio livre na célula, ativando proteases, endonucleases e a síntese de radicais livres, além da ativação de “genes de morte celular”. Alguns estudos bioquímicos e morfológicos indicam que morte neuronal tardia pode acontecer por morte celular programada, ou apoptose (HSU *et al.*, 1994; SCHREIBER E BAUDRY, 1995; WHITE *et al.*, 2000).

2.4. MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

Os modelos de isquemia podem ser globais quando afetam todo o cérebro ou focais quando afetam uma pequena região; permanentes quando sem reperfusão ou transitórios quando seguidos de reperfusão.

Isquemia cerebral global: Há muitas causas da isquemia cerebral em humanos, incluindo trauma e ataque cardíaco. Nos modelos experimentais para a isquemia cerebral global são interrompidos os grandes vasos extracranianos, simulando distúrbios circulatórios globais que acontecem durante um ataque cardíaco ou hipotensão severa (SCHMIDT-KASTNER E FREUND, 1991). O modelo experimental mais usado nesse caso é o da oclusão dos 4 vasos (4VO), que inclui a cauterização das artérias vertebrais seguida de oclusão temporária das artérias carótidas comuns. (FAROOQUI, 1994; VALENTIM *et al.*, 1999; NETTO *et al.*, 1993).

Isquemia cerebral focal: Neste modelo são interrompidas artérias cerebrais específicas, afetando somente uma pequena parte do cérebro. A isquemia focal prolongada leva a um infarto cerebral, que é caracterizado pela perda de elementos do tecido (FAROOQUI, 1994).

2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*

Como modelo para o estudo de lesões no SNC, uma alternativa para a experimentação animal *in vivo* pode ser o uso de sistemas de cultivo de células ou de tecido, como culturas organotípicas. No caso de lesões isquêmicas, estas são mimetizadas expondo-se as culturas a privação de glicose e oxigênio. Esta metodologia será melhor detalhada na sessão 5 desta introdução.

3. PRÉ-CONDICIONAMENTO ISQUÊMICO OU TOLERÂNCIA INDUZIDA

O fenômeno do pré-condicionamento isquêmico demonstra que um curto período de isquemia, não letal para as células neuronais de regiões vulneráveis do cérebro (1,5 -2 min), pode proteger as células neuronais contra uma isquemia mais severa que normalmente seria letal para os neurônios, especialmente da região CA1 do hipocampo (KATO *et al.*, 1994b; OHNO E WATANABE, 1996; CORBETT E CROOKS, 1997, BARONE *et al.*, 1998; WADA *et al.*, 1999). Os mecanismos de proteção da região CA1 pelo pré-condicionamento isquêmico ainda não estão bem compreendidos, mas estudos recentes têm mostrado que vários aspectos podem estar envolvidos no desenvolvimento do fenômeno, como redução da produção de radicais livres, mecanismos anti-apoptóticos e indução de proteínas de choque térmico, entre outros fenômenos (BAEK *et al.*, 2000; ZHAN *et al.*, 2001; AOKI *et al.*, 1993; RAVATI *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2001).

Particularmente, tem sido muito estudado o papel dos astrócitos no fenômeno de tolerância à isquemia e cada vez mais se tem demonstrado que essas células são essenciais para a sobrevivência neuronal (KITAGAWA *et al.*, 2000; LOUW *et al.*, 1998; MATSUSHIMA *et al.*, 1998). Em resposta à isquemia, com pré-condicionamento ou não, os astrócitos sofrem diversas alterações, desde morfológicas até síntese de proteínas, tornando-se reativos (ver item 2.4). O pré-condicionamento *per se* é capaz de levar a

essas modificações nos astrócitos; esta ativação prévia pode ser um dos fatores auxiliares na proteção (KATO *et al.*, 1994b). Algumas das alterações decorrentes da ativação dos astrócitos que podem contribuir na neuroproteção são: 1) síntese de fatores tróficos (CULMSEE *et al.*, 1999); 2) aumento na expressão de GFAP (VALENTIM *et al.*, 1999); 3) hiperplasia (LANDIS, 1994); 4) expressão de proteínas de choque térmico, como a HSP27 (CURRIE *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 1995b).

Apesar de o mecanismo de tolerância à isquemia não estar completamente elucidado, cada vez mais os astrócitos estão sendo considerados coadjuvantes na proteção dos neurônios contra a lesão isquêmica, merecendo importantes estudos.

4. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)

As proteínas de choque térmico, as HSPs, formam um grupo diversificado de proteínas, classificadas de acordo com o seu peso molecular. São definidas fisiologicamente por sua habilidade de serem induzidas por choque térmico e, em termos moleculares, pela presença de um "elemento de choque térmico" no gene promotor. As HSPs funcionam como "chaperonas", que auxiliam as proteínas recém sintetizadas a adquirir sua conformação nativa ou auxiliam as proteínas desnaturadas em consequência do estresse a voltarem à sua conformação funcional (DILLMANN, 1999; MCCLELLAN E FRYDMAN, 2001). As HSPs têm sua expressão induzida por diversos fatores que estressam a célula, como por exemplo choque térmico e isquemia, e são encontradas em plantas, bactérias e células de mamíferos (SHARP *et al.*, 1999). O estresse ativa os fatores de choque térmico que, por sua vez, se ligam ao elemento de choque térmico, o promotor do gene, estimulando a transcrição (ZOU *et al.*, 1998).

Entretanto, elas ainda são pouco estudadas no que diz respeito à medicina e a neurociência. Algumas das HSPs conhecidas incluem a

HSP27, HSP32 (HO-1), HSP47, HSP70; HSC70, HSP90 e HSP100/105.

A HSP32 ou heme-oxigenase-1 (HO-1) é sintetizada principalmente na microglia e é uma das proteínas relacionadas à heme oxigenase, que metaboliza o heme a monóxido de carbono, ferro e biliverdina (SNYDER *et al.*, 1998). A HSP47 também é uma chaperona de células gliais e parece ter um papel nas mudanças no citoesqueleto que acontecem quando a glia se torna ativada, por exemplo na isquemia (NIMURA *et al.*, 1996).

A família da HSP110 tem três membros encontrados em mamíferos: HSP110/015, a proteína de estresse osmótico OSP94/APG-1 e a proteína responsiva a isquemia IRP94/APG-2. A indução da HSP110/105 depois da isquemia e do pré-condicionamento está co-localizada com a indução da HSP70 na região CA1 do hipocampo, o que sugere uma colaboração entre as duas proteínas na proteção (YAGITA *et al.*, 2001).

A HSC70 é expressa constitutivamente, enquanto a HSP70 (HSP72) é uma proteína indutível, precisa de um estímulo estressante para ser expressa. Essas duas HSPs são encontradas em um grande número de células e são as HSPs mais estudadas até o momento. Elas atuam também como chaperonas, auxiliando no dobramento de novas proteínas ou evitando a desnaturação de proteínas em decorrência do estresse. Em resposta à isquemia, a HSP70 é induzida especialmente em neurônios (CURRIE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1997).

Outra proteína de choque térmico bastante estudada é a HSP27, que será descrita em maiores detalhes a seguir.

4.1. HSP27

A HSP27 é um dos membros do grupo das pequenas HSPs, que protege vários tipos de células contra o estresse, por exemplo, choque térmico, estresse oxidativo e isquemia (BRAR *et al.*, 1999; WAGSTAFF *et al.*, 1996, 1999; MEHLEN *et al.*, 1996; LOKTIONOVA *et al.*, 1998; SCHNEIDER *et al.*,

1998; ROGALLA *et al.*, 1999; GARRIDO *et al.*, 1997). No SNC de mamíferos, ela é uma proteína constitutiva, expressa basicamente em astrócitos e a expressão aumentada da proteína confere resistência ao estresse, como choque térmico por exemplo (KATO *et al.*, 1995a,b; LANDRY *et al.*, 1989; LAVOIE *et al.*, 1993; PLUMIER *et al.*, 1996; PLUMIER *et al.*, 1997). A HSP27 pode ser regulada de duas maneiras: através do aumento de expressão em condições estressantes e por fosforilação (COOPER *et al.*, 2000; CHAUFOUR *et al.*, 1996; KATO *et al.*, 1994a; LARSEN *et al.*, 1997).

4.1.1. FOSFORILAÇÃO DA HSP27

A fosforilação da HSP27 é mediada por duas proteínas quinases, a MAPKAP quinase-2 (proteína quinase ativada pela proteína quinase ativada por mitógenos) e a PRAK (proteína quinase ativada pela p38), ambas ativadas pela via de transdução de sinal responsiva a estresse, a p38 (STOKOE *et al.*, 1992; LARSEN *et al.*, 1997; NEW *et al.*, 1998; KATO *et al.*, 2001). A via das MAP quinases (proteínas quinases ativadas por mitógenos) desempenha um papel central na transdução de sinal iniciada por uma variedade de estímulos. A p38 é um dos membros dessa via, sendo estimulada basicamente por agentes estressores. Quando ativada, ela desencadeia uma cascata de fosforilação de proteínas que leva à ativação da MAPKAP quinase-2 e da PRAK; estas, por sua vez, à ativação da HSP27.

Quando desfosforilada, a HSP27 forma grandes agregados intracelulares de até 800 kDa sendo que a fosforilação altera a estrutura quaternária da proteína, formando agregados menores como dímeros e tetrâmeros (LAMBERT *et al.*, 1999; ROGALLA *et al.*, 1999). A HSP27 desempenha diferentes funções dentro da célula de acordo com seu estado de fosforilação (FIGURA 3).

4.1.2. FUNÇÕES DA HSP27

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

CHAPERONA. Vários estudos têm mostrado que os grandes oligômeros

de HSP27, ou seja, quando a proteína está desfosforilada, atuam dentro das células como chaperonas *in vitro*, evitando a desnaturação das proteínas ou auxiliando a renaturação (EHRNSPERGER *et al.*, 1997; LEE *et al.* 1997 ; JAKOB *et al.*, 1993; LEROUX *et al.*, 1997; GUO E COOPER, 2000). Rogalla e colaboradores (1999) demonstraram que a fosforilação da HSP27, com a conseqüente diminuição dos agregados intracelulares, diminui, e até mesmo bloqueia, sua capacidade de evitar a desnaturação da citrato sintase *in vitro*, demonstrando que a atuação da HSP27 como chaperona depende da presença de grandes oligômeros.

MODULAÇÃO DOS FILAMENTOS DE ACTINA: Quando desfosforilada, a HSP27 forma pequenos oligômeros, geralmente dímeros ou tetrâmetros, que parecem ser responsáveis pela modulação dos filamentos de actina. A HSP27 se liga à região terminal da actina, impedindo que outras moléculas se liguem. Quando esta HSP27 é fosforilada em resposta ao estresse, ela se desliga da actina e permite a polimerização, a modulação da estabilidade e reorganização dos filamentos (LAVOIE *et al.*, 1993; LAVOIE *et al.*, 1995; LOKTIONOVA E KABAKOV, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 1998).

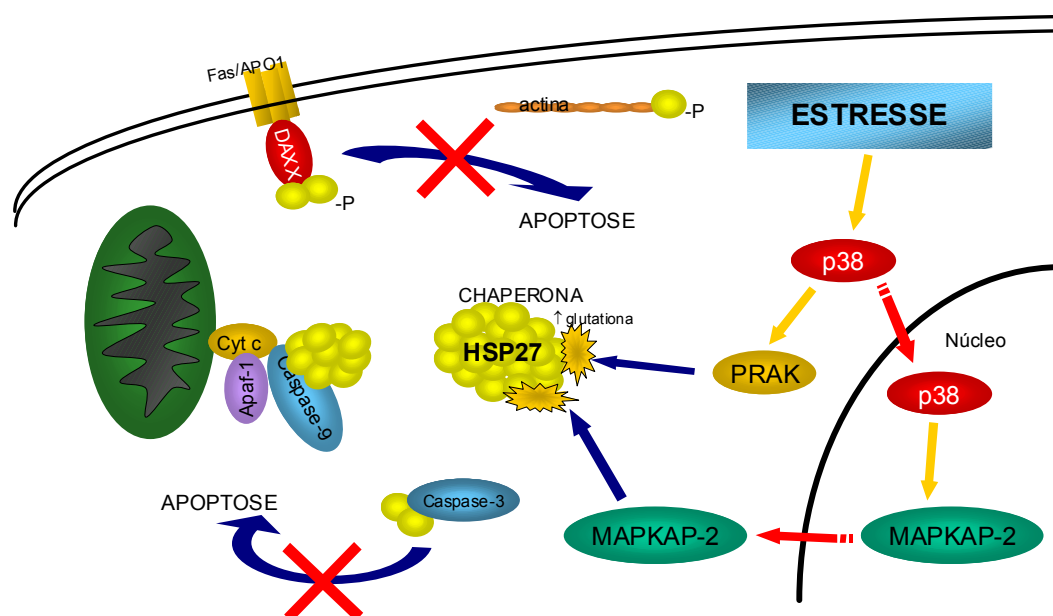


FIGURA 3: Esquema representativo do papel da HSP27 nas células de acordo com seu estado de fosforilação. Para maiores detalhes, ver o texto.

MODULAÇÃO DO PROCESSO APOPTÓTICO: Estudos recentes têm mostrado que a HSP27 pode ser um bloqueador da apoptose em diversas etapas do processo, o que poderia explicar as várias atividades protetoras exercidas pela proteína (CHARETTE *et al.*, 2000; GARRIDO *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2001; WAGSTAFF *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000). A expressão aumentada de HSP27 protege neurônios contra a falta de fatores tróficos, um conhecido indutor de apoptose (Wagstaff *et al.*, 1999) e inibe a ativação das pró-caspases 9 e 3 (GARRIDO *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000; BRUEY *et al.*, 2000). Nestes dois casos, não há informações sobre o estado de fosforilação da HSP27 no processo. Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que a HSP27 pode bloquear a apoptose induzida pelo receptor **Fas**, mas precisa estar fosforilada para que isso aconteça (CHARETTE E LANDRY, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000).

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

5. CULTURA ORGANOTÍPICA

As técnicas *in vitro* são ferramentas importantes para o estudo de diversas doenças neurodegenerativas, por serem um modelo mais simples para estudos moleculares do que o animal *in vivo* (PRINGLE *et al.*, 1997a). As culturas organotípicas têm se tornado uma importante alternativa para estudar a morte neuronal induzida por excitotoxinas (ABDEL-HAMID E TYMIANSKI, 1997), hipóxia (PRINGLE *et al.*, 1997b), hipoglicemia (TASKER *et al.*, 1992) e hipóxia/hipoglicemia para simular a isquemia (NEWELL *et al.*, 1995; BERNAUDIN *et al.*, 1998; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

Esse modelo de culturas foi desenvolvido em 1981 por Gähwiler e foi

modificado por Stoppini e colaboradores em 1991. Basicamente, trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo, numa interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo permanecer por diversas semanas. Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter a organização do tecido *in vivo*, por exemplo, a organização existente no hipocampo (STOPPINI *et al.*, 1991; BUCHS *et al.*, 1993; GÄHWILER *et al.*, 1997). A idade dessas culturas é denotada em EPD, dia pós-natal equivalente (*equivalent postnatal day*), o qual corresponde à idade que o animal tinha quando as fatias foram colocadas em cultivo somado ao número de dias de permanência *in vitro* (BRUCE *et al.*, 1995).

"ISQUEMIA" IN VITRO: A cultura organotípica de hipocampo pode ser submetida a um modelo experimental que simula as condições de isquemia *in vivo*, a privação de glicose e oxigênio (OGD). Esse método consiste em submeter as culturas a um meio sem glicose e a uma atmosfera saturada de nitrogênio. Essas condições simulam a falta de fluxo sanguíneo da isquemia (LAAKE *et al.*, 1999; PRINGLE *et al.*, 1999; BREDER *et al.*, 2000; STRIGGOW *et al.*, 2000). As culturas organotípicas de hipocampo são uma excelente alternativa para o estudo da isquemia cerebral, pois essas culturas mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (STRASSER E FISCHER, 1995; NORABERG *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001; LAAKE *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

Considerando os dados referidos na literatura sobre o papel da HSP27 em situações de estresse celular, buscamos investigar o seu envolvimento em condições de lesão induzida pelo insulto isquêmico e após a indução da tolerância, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. O presente trabalho tem como objetivos:

- ◆ verificar alterações no imunoconteúdo e no estado de fosforilação da HSP27 em resposta à isquemia cerebral global e ao pré-condicionamento em um modelo *in vivo*;
- ◆ estudar a indução de tolerância no modelo *in vitro* de lesão isquêmica, usando culturas organotípicas de fatias de hipocampo expostas à privação de glicose e oxigênio
- ◆ investigar as alterações na expressão e na fosforilação da proteína HSP27 em culturas organotípicas de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio e ao pré-condicionamento;
- ◆ identificar um possível papel da HSP27 na tolerância à isquemia cerebral global, no modelo *in vivo* e em culturas organotípicas.

ARTIGOS PUBLICADOS

- ARTIGO 1:** Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immuncontent and phophorylation in rat hippocampus.
Neuroscience **107**, 43-49, 2001.

ARTIGOS PUBLICADOS

Artigo 2: Preconditioning to oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures involves alterations in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent.

Submetido ao *Journal of Neurochemistry*
em Janeiro de 2002.

**PRECONDITIONING TO OXYGEN/GLUCOSE DEPRIVATION IN ORGANOTYPIC
HIPPOCAMPAL CULTURES INVOLVES ALTERATIONS IN HEAT SHOCK
PROTEIN 27 PHOSPHORYLATION AND IMMUNOCONTENT**

VALENTIM L. M.*, GEYER A. B.*, HORN A. P.*, TAVARES A.*, CIMAROSTI H.*,
RODNIGHT R.*, NETTO C. A.* AND SALBEGO C.G.**

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

** corresponding author

Address for correspondence: C. G. Salbego

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

Abbreviations

DG: Dentate Gyrus

HBSS: Hanks balanced salt solution

HSP: Heat shock protein

MAPKAP kinase 2: Mitogen activated protein kinase activated protein
kinase 2

MEM: Minimum Essential Medium

OGD: Oxygen and glucose deprivation

PI: Propidium iodide

PRAK: p38 regulated/activated protein kinase

SDS-PAGE: Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

ABSTRACT

Organotypic hippocampal cultures have been recently used to study ischemic neuronal death *in vitro*. *In vivo*, sub-lethal periods of ischemia confer resistance to lethal insults and many studies have demonstrated the involvement of heat shock proteins in this phenomenon. We used organotypic hippocampal cultures to investigate the role of HSP27 in preconditioning to oxygen and glucose deprivation. Neuronal damage was assessed using propidium iodide fluorescence; HSP27 phosphorylation and immunocontent were obtained using ³²Pi labeling followed by SDS-PAGE and immunoblotting. We observed that immunocontent of HSP27 was increased after lethal or not treatment, indicating it is a response to stress. Treatments with 5 or 10 min of OGD or 1 μ M NMDA using low serum medium in the recovery period induced tolerance to 40 min of OGD, with an increase in HSP27 immunocontent and phosphorylation. When cultures were maintained in standard culture medium (25% serum), preconditioning treatments were not protective and, conversely, there was a decrease in HSP27 phosphorylation in dentate gyrus. These data suggest that, *in vitro*, phosphorylated HSP27 might be involved in preconditioning, probably acting as a modulator of actin filaments or by the blockage of apoptotic processes.

Key words: preconditioning; oxygen and glucose deprivation; HSP27; organotypic hippocampal culture

Running title: Preconditioning in organotypic cultures and HSP27

INTRODUCTION

The reduction in the supply of glucose and oxygen to the brain that occurs in cerebral ischemia leads to a complex cascade of cellular events, resulting in neuronal death (White *et al.*, 2000; Lipton, 1999; Nieber, 1999). Many aspects of ischemic cell death have been demonstrated in animal models (Corbett and Crooks, 1997; Kato *et al.*, 1995a); however, these represent a complex environment in which to dissect the cellular and molecular mechanisms involved in ischemic neurodegeneration. Organotypic slice cultures have become an attractive alternative to study neuronal death induced by excitotoxins (Abdel-Hamid and Tymianski, 1997), hypoxia (Pringle *et al.*, 1997b), hypoglycemia (Tasker *et al.*, 1992) and a combination of these to simulate ischemia (Newell *et al.*, 1995; Bernaudin *et al.*, 1998; Cimarosti *et al.*, 2001). Cell culture systems, while further from the *in vivo* situation represent a more defined microenvironment where the presence of a vascular compartment and changes in temperature, for example, are not confounding variables (Pringle *et al.*, 1997a). Hippocampal organotypic cultures are a particularly valuable alternative to study cerebral ischemia *in vitro*, because these cultures retain many aspects of *in vivo* ischemia, such as delayed death of CA1 neurons and selective vulnerability in response to oxygen and glucose deprivation (Strasser and Fischer, 1995; Noraberg *et al.*, 1999; Cimarosti *et al.*, 2001; Laake *et al.*, 1999).

Heat shock proteins (HSPs) have homeostatic functions that help cells to overcome stressful conditions (Welsh and Gaestel, 1998; Dillmann, 1999). Mammalian HSP27 is a member of a group of small HSPs that protect many types of cells against ischemia, heat shock, chemotherapeutic agents and oxidative stress (Brar *et al.*, 1999; Wagstaff *et al.*, 1999; Mehlen *et al.*, 1996; Loktionova *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1998; Rogalla *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 1997). It is now known that HSP27 is expressed constitutively in mammalian brain, particularly in astrocytes, (Kato *et al.*, 1995a, b; Plumier *et al.*, 1996) and overexpression of human HSP27 in rodent cells confers resistance to heat shock (Landry *et al.*, 1989; Lavoie *et al.*, 1993; Plumier *et al.*, 1996, 1997). HSP27 is regulated at both transcriptional and posttranslational levels: its concentration increases under specific stressful conditions and its functional features can be altered by phosphorylation (Cooper *et al.*, 2000; Chaufour *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1994a; Larsen *et al.*, 1997). When dephosphorylated, HSP27 forms large intracellular

aggregates (up to 800 kDa or sometimes even larger) and phosphorylation changes the quaternary structure of HSP27, which shifts from large oligomers to dimers or tetramers (Lambert *et al.*, 1999; Rogalla *et al.*, 1999). The stress-induced phosphorylation of HSP27 is the result of activation of the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade, which subsequently activates MAP kinase-activated protein kinase 2 and PRAK, which in turn directly phosphorylates HSP27 (Stokoe *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1997; New *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2001).

Distinct biochemical activities have been reported for small and large molecular complexes of HSP27. The large oligomers can act as a chaperone *in vitro*, preventing unfolded proteins from irreversible aggregation and facilitating the refolding of unfolded proteins (Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997; Jakob *et al.*, 1993; Leroux *et al.*, 1997; Guo and Cooper, 2000). The small oligomers are responsible for the stabilization of actin microfilaments by acting as an actin cap-binding protein and thus inhibiting actin polymerization. When phosphorylated in response to stress, HSP27 releases actin allowing its polymerization and modulating filament stability or reorganization (Lavoie *et al.*, 1993; Loktionova and Kabakov, 1998; Schneider *et al.*, 1998). Recently, it has been reported that HSP27 can block apoptotic processes at several levels, what could explain many of the protective activities of HSP27 (Charette *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2001; Wagstaff *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000).

In vivo studies have demonstrated that brief, non-lethal periods of ischemia (1.5-2 min) prior to a subsequent severe insult, protect CA1 neurons in a process known as ischemic preconditioning (Doodley and Corbett, 1998, Corbett and Crooks, 1997, Ohno and Watanabe, 1996, Barone *et al.*, 1998, Yano *et al.*, 2001, Bond, *et al.*, 1999). This form of neuroprotection has been shown in gerbil (Bond *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1994b; Corbett and Crooks, 1997) and rat (Currie *et al.*, 2000; Dave *et al.*, 2001; Wyse *et al.*, 2000) models of global ischemia as well as in focal ischemia in the rat (Simon *et al.*, 1993; Glazier *et al.*, 1994). The mechanisms underlying the protection of CA1 neurons by ischemic preconditioning are not fully understood, but seem to involve the induction of Heat Shock Proteins (Currie *et al.*, 2000, Kato *et al.*, 1994a, Kato *et al.*, 1995a). In a recent study (Valentim *et al.*, 2001) we demonstrated specific alterations in HSP27 in CA1 and DG areas of hippocampus after global ischemia and preconditioning, supporting a possible role for this protein in the phenomenon of tolerance. The mechanisms of ischemic preconditioning have been studied in models using *in vivo* conditions, while the

understanding of the *in vitro* situation remains unclear. In a recent work, Pringle *et al.* (1999) demonstrated that HSP72 is not involved in preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures, but there are no studies concerning the involvement of HSP27 in this model.

In the present work, we investigate the correlation between the phosphorylation state and immunoccontent of HSP27 and preconditioning in a model of oxygen/glucose deprivation in organotypic cultures of rat hippocampus.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to the method of Stoppini *et al.* (1991). Hippocampal slices were prepared from 6 to 8 day old Wistar rats by removing the brain, dissecting hippocampi and making transverse slices (400 μm) using a McIlwain tissue chopper. Slices were placed in a Hanks Balanced Salt Solution (HBSS mg/mL): 6.5 glucose, 0.14 CaCl_2 , 0.4 KCl, 8 NaCl, 0.06 KH_2PO_4 , 0.048 Na_2HPO_4 , 0.1 MgCl_2 , 0.1 MgSO_4 , 25 mM Hepes, 1% fungizone and 36 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ garamicine, pH 7.2) to be separated. The slices were cultured on Millicell culture inserts (Millipore); six slices were transferred onto each insert. The insert membranes were placed in 6 well plates (Cell Culture Cluster, Costar) with 1 mL of culture medium consisting of 50% Minimum Essential Medium (MEM, Gibco), 25% Heat Inactivated Horse Serum (Gibco) and 25% HBSS (Gibco), supplemented with (final concentration): 6.5 mg/mL glucose; 1 mM glutamine; 25 mM Hepes; and 4 mM NaHCO_3 , Fungizone (1%) and garamicine (36 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$), pH 7.3. Cultures were grown at 37°C in an atmosphere with a 5% CO_2 . Culture medium was changed twice a week and experiments were carried out after 14 days *in vitro*.

Oxygen and Glucose Deprivation (OGD)

The induction of oxygen and glucose deprivation was based on the method described by Strasser and Fischer (1995), with some modifications. After double rinsing, cultures were placed in 1 mL of HBSS lacking glucose for 15 min to deplete glucose from the extracellular space. For OGD conditions, buffer was replaced to HBSS lacking glucose previously bubbled with N_2 for 30 min and then transferred to

an anaerobic chamber, with N₂-enriched atmosphere and 37°C. Cultures were incubated for 5, 10, 20 or 40 min. After the deprivation period, slices were maintained in standard culture medium or in a reduced serum medium (2.5%) for 24h.

Quantification of neuronal death

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake. After a 22 h recovery period, 7.5 μM PI was added to the cultures and incubated for 2 h. PI is excluded from healthy cells, but following loss of membrane integrity it enters cells, binds to DNA and becomes highly fluorescent. Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter set. Images were captured and then analyzed using “Scion Image” software (www.scioncorp.com). The area where PI fluorescence was detectable above background was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the total CA1 area to obtain the percentage of damage. The comparison of each experimental group with its matched control was made by the use of a paired *t*-test. Comparisons between experimental groups were by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan’s multiple range test when indicated. All data are presented as mean ± S.E.M.

Preconditioning protocols

- 1) To determine the duration of OGD required to produce a sublethal insult with maximal expression of HSP27, cultures were deprived of oxygen and glucose for 5, 10, and 20 min. After a 24 h recovery period, damage was observed using propidium iodide; CA1 and DG areas were separated for the labelling procedure (see below).
- 2) Cultures were exposed to 5 or 10 min of OGD and allowed to recover for 24 h before being exposed to 40 min of OGD followed by a further 24 h recovery. Cultures were separated in two groups: one of them was maintained in standard culture medium during the recovery periods and in the other group, 12 h prior to exposure to 5 or 10 min OGD, cultures were rinsed three times and maintained in a culture medium in which serum was reduced to 2.5%. This low serum medium was maintained during the recovery periods.
- 3) Cultures were pre-treated with 1 μM NMDA for 3 h. After 48 h of recovery,

cultures were exposed to 40 min of OGD, followed by a 24 h recovery period. Cultures were separated in two groups: one group was maintained in standard culture medium during the recovery periods and in the other group, 12 h prior to exposure to NMDA, cultures were rinsed three times and maintained in a culture medium in which serum was reduced to 2.5%. This low serum medium was maintained during the recovery periods.

Labelling procedure

The inserts were rinsed x 3 with the incubation medium (124 mM NaCl; 4 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 25 mM Na-Hepes; 12 mM glucose and 1mM CaCl₂, pH 7.4). Slices were gently removed from the membrane with a brush and microslices with a 0.7 mm diameter were punched out from the CA1 and DG within the same slice. Two microslices obtained from the same animal were preincubated for 30 min at room temperature in 30 µL of the same medium. Then, 20 µL of medium containing 30 µCi of [³²P]orthophosphate were added and incubated for 1 h at 30°C. The reaction was stopped with 1 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and the microslices maintained in ice for 10 min. After that, microslices were washed with 4% TCA to remove the excess of radioactivity, and washed twice with water to remove the acid. The microslices were immediately dissolved in stopping solution. An aliquot was taken for determination of protein, and beta-mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%.

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Samples were analyzed by SDS-PAGE in 12% gels. Protein (15 µg) from each sample was applied to the gels. After electrophoresis, the area of the gel containing HSP27 was excised and reserved for immunoblotting. The remainder of the gel was then dried and exposed to X-ray films (Kodak X-Omat) in order to obtain an estimate of total phosphorylation.

Phosphorylation level and immunocontent of HSP27

The pieces of gel containing HSP27 were blotted to nitrocellulose membranes using a semi-dry blotting system (Bio-Rad Trans-Blot SD). The membranes were first exposed for autoradiography and subsequently blocked overnight with 5% powdered milk in Tris-buffered saline. HSP27 protein was

detected using the anti-HSP25 antibody (1:1000, overnight incubation, Stressgen Biotechnologies), followed by anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated (1:1000, Amersham). The chemiluminescence (ECL, Pharmacia) was detected using X-ray films.

Quantitation and statistical analysis

The autoradiographs of the nitrocellulose membranes and the ECL films were scanned and the percentage of phosphorylated HSP27 and the immunocontent were analyzed using "OptiQuant" software (Packard Instrument). The test groups were compared with control non-treated cultures, which were considered 100%. The percentage of phosphorylated protein was obtained comparing the phosphorylated HSP27 with the total amount of HSP27 obtained by the immunodetection assay. The comparison of each experimental group with its matched control was made by the use of paired *t*-test. Comparisons between experimental groups were by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's multiple range test when indicated. All data are presented as mean \pm S.E.M.

RESULTS

1) Damage to CA1 area and changes in HSP27 in response to short periods of OGD

Short periods of OGD (5, 10, or 20 min) did not cause significant neuronal death in CA1 area of hippocampal organotypic cultures after 24 h recovery in standard culture medium, as indicated by PI fluorescence (data not shown). Control cultures maintained in low serum concentration (2.5%) were similar to those maintained in standard culture medium. Despite the absence of neuronal death, significant changes in HSP27 parameters were detected (Table 1). We observed a decrease in HSP27 phosphorylation in the CA1 area after 5, 10 and 20 min of OGD, with a significant increase in its immunocontent after all periods of OGD. In dentate gyrus, an increase in immunocontent was also observed, but in this area, there was a significant increase in the percentage of phosphorylated HSP27 at 5, 10 and 20 min of OGD. From these data we determined the parameters of sub-lethal insults to be used in preconditioning protocols. The sub-lethal insults that produced significant, sustained alterations in HSP were 5 and 10 min of OGD and consequently we chose these as periods of preconditioning insults.

2) Longer periods of OGD lead to CA1 death and significant changes in HSP27

When cultures were exposed to 40 min OGD and a recovery period of 24 h in standard culture medium or in the medium with 2.5% serum we observed a marked fluorescence in the CA1 area, indicating a high incorporation of propidium iodide, as shown in the photomicrographs in Figure 1. Quantification of PI fluorescence showed that 40 min of OGD, with standard or low serum concentration medium, caused about 90% of damage in CA1 cells (Figure 1). In the dentate gyrus area, no damage to neuronal cells was observed and, sometimes, a small number of CA3 cells were affected by this insult. After this lethal insult, we observed that 40 min of OGD, both with standard or low serum medium in the recovery period, resulted in an increase in HSP27 immunocontent in both hippocampal areas (Figure 2). The phosphorylation state of HSP27 showed a decrease in the CA1 area after 40 min of OGD and a recovery period with standard serum medium, while in the DG area a decrease in the percentage of phosphorylated HSP27 was observed with low serum medium.

3) Preconditioning with OGD in standard or low serum concentration medium

After we established sub-lethal conditions, we investigated whether ischemic tolerance could be induced in organotypic cultures with these conditions. Preconditioning cultures for 5 or 10 min followed by 24 h recovery and after this 40 min of OGD did not induce ischemic tolerance in hippocampal cultures when they were maintained in standard medium during the recovery period (Figure 1A and B). To determine whether the serum concentration in the medium was one of the factors that could be blocking induced tolerance, we performed the same protocol as above, but cultures were maintained in a medium with 2.5% serum 12 h before preconditioning, and during the recovery period. We observed that, when serum was low in the medium, preconditioning with 5 or 10 min of OGD reduced the damage from 90% without preconditioning to 75% in CA1 area (Figure 1A and B).

We also observed significant alterations in HSP27 phosphorylation and immunocontent after preconditioning. Figure 2A represents alterations in HSP27 after 40 min of OGD and 5 min of OGD preconditioning. We observed an increase in HSP immunocontent after all treatments in CA1 area, with no significant alterations in the percentage of phosphorylated HSP27 after preconditioning (Figure 2A). The dentate gyrus area showed an increase in HSP immunocontent after all treatments and when the preconditioning (5+40min OGD) was performed with

standard serum medium the increase observed was different from all the other groups (Figure 2B). The phosphorylation of HSP27 was decreased in the dentate gyrus area after 5+40 min of OGD with standard medium, differently from the other treatments.

Preconditioning with 10 min of OGD led to similar changes in HSP27 phosphorylation and immunocontent as we observed with 5 min preconditioning (Figure 3A and B). HSP27 immunocontent was increased in both areas, with a higher increase in DG after 10+40 min of OGD (standard medium). The percentage of phosphorylated HSP27 showed a significant decrease in DG after 10+40 min of OGD with standard medium (Figure 3B).

4) Preconditioning with NMDA

According to Pringle *et al.* (1999), 1 μ M NMDA for 3 h can induce tolerance to OGD in hippocampal organotypic cultures. We decided to investigate whether this preconditioning protocol could induce alterations in HSP27. First, we used a standard culture medium (25%serum) in the recovery period and observed that, in this condition, NMDA does not induce tolerance to OGD (Figure 1C). Then we decided to reduce serum concentration, as we did in the procedure using 5 or 10 min of OGD preconditioning. Using low serum concentration in the recovery medium, we observed that NMDA reduced the damage in CA1 area to 6%, as shown in Figure 1C.

Figure 4 shows changes in HSP27 immunocontent and phosphorylation after NMDA preconditioning. We observed an increase in HSP immunocontent after all treatments, both in CA1 and DG areas of the hippocampus. When cultures were maintained in standard medium, the percentage of phosphorylated HSP27 decreased in both areas, after preconditioning with NMDA (NMDA+OGD). When serum was reduced, we observed an increase in HSP phosphorylation in CA1 area, and this result was different from those observed with preconditioning with 5 min of OGD (5+40) and 10 min of OGD (10+40) (Figure 4A).

DISCUSSION

Models using *in vivo* conditions have demonstrated the basic mechanisms of ischemic preconditioning, while the understanding of the *in vitro* situation remains unclear. Recent studies showed ischemic preconditioning using dissociated neuronal cultures, but these models are not very close to the brain *in vivo* (Bruer *et*

al., 1997; Khaspekov *et al.*, 1998). Recently, organotypic cultures have been used to demonstrate ischemic conditions *in vitro*, with similar responses to the brain *in vivo*, such as delayed neuronal death and hippocampal selective vulnerability (Laake *et al.*, 1999; Newell *et al.*, 1995; Bernaudin *et al.*, 1998; Breder *et al.*, 2000, Tavares *et al.*, 2001).

One of the main characteristics of the ischemic stress response is the induction of heat shock proteins, including HSP27. Many studies *in vivo* have demonstrated that HSP27 may be involved in the phenomenon of ischemic tolerance (Valentim *et al.*, 2001; Wagstaff *et al.*, 1996; Currie *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 1994a, Kato *et al.*, 1995b). Pringle *et al.* (1999) demonstrated that HSP72 is not involved in tolerance to deprivation of oxygen and glucose (OGD) in organotypic hippocampal cultures and we showed in this work that HSP27 is overexpressed even in short, non-lethal periods of OGD suggesting that this protein is probably involved in preconditioning. As demonstrated in Figures 1A and B, 5 or 10 min of OGD induces a small, but significant tolerance to 40 min of OGD, with an increase in HSP27 immunocontent in CA1 and DG, maintaining the percentage of phosphorylated HSP27 (Figures 2 and 3). When cultures were maintained in standard serum medium, 5 or 10 min of OGD did not induce tolerance, and HSP27 shows a decrease in the percentage of phosphorylated protein in DG. Recent studies have shown that some signal transduction pathways are involved in tolerance *in vivo*, some of them regulated by trophic factors. In the presence of 25% serum, these pathways may be maximally activated, and preconditioning would not be possible (Xi *et al.*, 2001; Yano *et al.*, 2001). In a previous study (Valentim *et al.*, 2001), we demonstrated that preconditioning *in vivo* requires induction of HSP27 with a decrease in the percentage of phosphorylated protein in CA1 and DG areas. This situation probably leads to an oligomerization of the protein, which could act as a chaperone, protecting other proteins from denaturation (Guo and Cooper, 2000; Cuesta *et al.*, 2001; Rogalla *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 1999; Prévile *et al.*, 1998). According to the results of the present work, dephosphorylation of HSP27 in organotypic hippocampal cultures is not one of the facts involved in tolerance, as demonstrated by the fact that the decrease in the percentage of phosphorylated HSP27 (5 or 10+40min of OGD in standard serum medium) does not correspond to preconditioning. We also demonstrated that, in these conditions, dentate gyrus, a resistant area, seems to be more responsive than CA1 area, according to our *in vivo* work. As described in other studies, HSP27 is widely induced in brain after

many types of stress, even without a detectable damage (Akbar *et al.*, 2001; Currie *et al.*, 2000), probably helping these cells to resist to stress.

Pringle *et al.* (1999) have demonstrated that 1 μ M NMDA for 3 h can induce tolerance to OGD, without induction of HSP72. Figure 1C shows that this protocol reduces damage to CA1 from 90% to 6%, with induction of the expression of HSP27, differently from HSP72 (Figure 4). When cultures were maintained in standard serum medium in the recovery period, preconditioning did not work and HSP27 showed a decrease in phosphorylation, according to our results using 5 or 10 min of OGD preconditioning and standard serum medium. These two protocols were not able to induce tolerance, and dephosphorylation of HSP27 appears to be not involved in preconditioning, differently from *in vivo* study (Valentim *et al.*, 2001). When serum was reduced, we observed an increase in HSP27 phosphorylation particularly in CA1. This result suggests that preconditioning require an increase in HSP27 phosphorylation, as demonstrated by our results using NMDA or OGD as preconditioning insults. We also observed that the increase in the percentage of phosphorylated HSP27 using NMDA was higher than using 5 or 10 min of OGD and, with NMDA, the protection was much higher. These results suggest that, in hippocampal organotypic cultures, HSP27 has to maintain or increase phosphorylation to allow preconditioning. It is clearly demonstrated that many types of stress can induce HSP27 phosphorylation through the activation of p38 signalling via and, consequently, MAPKAP kinase 2 and PRAK, the major kinases responsible for HSP27 phosphorylation (New *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1992). Induction of phosphorylation can dissociate the intracellular aggregates, leading to a decrease in HSP oligomeric size (Préville *et al.*, 1998, Rogalla *et al.*, 1999). When phosphorylated, HSP27 shows the ability to stabilise actin filaments, accelerating recovery of filaments after stress (Welsh and Gaestel, 1998; Schneider *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 1995; Guay *et al.*, 1997). In our work, phosphorylated HSP27 may be decreasing a disorganisation of cytoskeleton caused by stress. According to the literature, stability of the actin filaments is considered an important factor in the survival of cells exposed to stress and may contribute to tolerance of OGD (Gabai and Kabakov, 1993; Loktionova and Kabakov, 1998; Landry and Huot, 1999).

Another feature of HSP27 is its ability to block apoptotic processes. Recent studies have demonstrated that overexpression of HSP27 protects neuronal cells from withdrawal of trophic factors (Wagstaff *et al.*, 1999), inhibits activation of

procaspases 9 and 3 (Garrido *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000; Bruey *et al.*, 2000), and, most interestingly, phosphorylated HSP27 blocks Fas-induced apoptosis (Charette and Landry, 2000; Charette *et al.*, 2000). A recent study demonstrated that apoptotic processes are one of the factors leading to cell death in CA1 area of organotypic cultures after OGD (Ray *et al.*, 2000). Our results suggest that HSP27 may also be blocking apoptotic processes after oxygen and glucose deprivation, thus helping CA1 cells to survive.

In conclusion, our data suggest that HSP27 is involved in tolerance to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures, with different characteristics to those observed in *in vivo* ischemia. Other studies have demonstrated that, even *in vivo* or in cultured cells, HSP27 is mainly expressed in astrocytes, but there are no studies determining the cellular localisation of HSP27 in organotypic hippocampal cultures (Sato and Kim, 1995; Kato *et al.*, 1995 a, b; Plumier *et al.*, 1996). Despite the fact that organotypic cultures respond very similar to *in vivo* ischemia, the mechanisms that result in cell death could be different and require an alternative response for the protein. These two facts need to be elucidated in order to arrive at a better understanding of the mechanism of cell death after OGD and the role of HSP27 in preconditioning.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian Funding Agencies CNPq, FAPERGS and PRONEX.

REFERENCES

Abdel-Hamid K. M. and Tymianski M. (1997) Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. *J. Neurosci.* **17**, 3538-3553.

Akbar M. T., Wells D. J., Latchman D. S. and Belleruche J. (2001) Heat shock protein 27 shows a distinctive widespread spatial and temporal pattern of induction in CNS glial and neuronal cells compared to heat shock protein 70 and caspase 3 following kainate administration. *Mol. Brain Res.* **93**, 148-163.

Barone F. C., White R. F., Spera P. A., Ellison J., Currie W., Wang X. and Feuerstein G. Z. (1998) Ischemic preconditioning and brain tolerance temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-

1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* **29**, 1937-1951.

Bernaudin M., Nouvelot A., MacKenzie E. T. and Petit E. (1998) Selective Neuronal Vulnerability and Specific Glial Reactions in Hippocampal and Neocortical Organotypic Cultures Submitted to Ischemia. *Exp. Neurol.* **150**, 30-39.

Bond A., Lodge D., Hicks C. A., Ward M. A. and O'Neill, M. J. (1999) NMDA receptor antagonism, but not AMPA receptor antagonism attenuates induced ischaemic tolerance in the gerbil hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **380**, 91-99.

Brar B. K., Stephanou A., Wagstaff M. J. D., Coffin R. S., Marber M. S., Engelmann G. and Latchman D. S. (1999) Heat Shock Proteins Delivered With a Virus Vector Can Protect Cardiac Cells Against Apoptosis As Well As Against Thermal or Hypoxic Stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 135-146.

Breder J., Sabelhaus C. F., Opitz T., Reymann K. G. and Schröder U. H. (2000) Inhibition of different pathways influencing Na⁺ homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. *Neuropharmacology.* **39**, 1779-1787.

Bruer U., Weih M. K., Isaev N. K., Meisel A., Ruscher K., Bergk A., Trendelenburg G., Wiegand F., Victorov I. V. and Dirnagl U. (1998) Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* **414**, 117-121.

Bruey J. M., Ducasse C., Bonniaud P., Ravagnan L., Susin S. A., Diaz-Latoud C., Gurbuxani S., Arrigo A. P., Kroemer G., Solary, E. and Garrido C. (2000) Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat. Cell Biol.* **2**, 645-652.

Charette S. and Landry J. (2000) The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **926**, 126-131.

Charette S. J., Lavoie J., Lambert H. and Landry J. (2000) Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7602-7612.

Chaufour S., Mehlen P. and Arrigo A. P. (1996). Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell Stress Chap.* **1**, 225-235.

Cimarosti H., Rodnight R., Tavares A., Paiva R., Valentim L., Rocha E. and Salbego C. G. (2001) An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett.* **23**; 33-36.

Cooper L. F., Uoshima K. and Guo Z. (2000) Transcriptional regulation involving the intronic heat shock element of the rat hsp27 gene. *Biochim. Biophys. Acta* . **1490**, 348-354.

Corbett D. and Crooks P. (1997) Ischemic preconditioning: a long term survival study using behavioural and histological endpoints. *Brain Res.* **760**, 129-136.

Cuesta R., Laroia G. and Schneider R. J. (2000) Chaperone Hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & Development.* **14**, 1460-1470.

Currie W., Ellison J.A., White R. F., Feuerstein G. Z., Wang X. and Barone F. C. (2000) Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of hsp27. *Brain Res.* **863**, 169-181.

Dave K. R., Saul I., Busto R., Ginsberg M. D., Sick T.J. and Perez-Pinzon M. A. (2001) Ischemic preconditioning preserves mitochondrial function after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1401-1410.

Dillmann W .H. (1999) Small heat shock proteins and protection against injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **874**, 66-68.

Doodley P. and Corbett D. (1998) Competing processes of cell death and recovery of function following ischemic preconditioning. *Brain Res.* **794**, 119-126.

Ehrnsperger M., Graber S., Gaestel M. and Buchner J. (1997) Binding of non-native protein to HSP25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**, 221-229.

Gabai V. L. and Kabakov A. E. (1993) Tumor cell resistance to energy deprivation and hyperthermia can be determined by the actin cytoskeleton stability. *Cancer Lett.* **70**, 25-31.

Garrido C., Ottavi P., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A. P., Chauffert B and Mehlen P. (1997) HSP-27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res.* **57**, 2661-2667.

Garrido C., Bruey J.-M., Fromentin A., Hammann A., Arrigo A. P. and Solary E. (1999) HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* **13**, 2061-2070.

Glazier S. S., O'Rourke D. M., Graham D. I. and Welsh F. A. (1994) Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**, 545-553.

Guay J., Lambert H., Gingras-Breton G., Lavoie J. N., Huot J. and Landry J. (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* **110**, 357-368.

Guo Z. and Cooper F. L. (2000) An N-Terminal 33-Amino-Acid-Deletion Variant of hsp25 Retains Oligomerization and Functional Properties. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **270**, 183-189.

Jakob U., Gaestel M., Engel K. and Buchner J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**, 1517-1520.

Kato H., Liu Y., Kogure K. and Kato K. (1994a) Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. *Brain Res.* **634**, 235-244.

Kato H., Kogure K., Araki T. and Itoyama Y. (1994b) Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. *Brain Res.* **664**, 69-76.

Kato H., Kogure K., Liu X.H., Araki T., Kato K. and Itoyama Y. (1995a) Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* **679**, 1-7.

Kato H., Araki T., Kogure K. and Kato K. (1995b) An immunohistochemical study of heat shock protein-27 in the hippocampus in a gerbil model of cerebral ischemia and ischemic tolerance. *Neuroscience* **68**, 65-71.

Kato K., Ito H., Iwamoto I., Iida K. and Inaguma Y. (2001) Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. *Cell Stress Chap.* **6**, 16-20.

Khaspekov L., Shamloo M., Victorov I. and Wieloch T. (1998) Sublethal in vitro glucose-oxygen deprivation protects cultured hippocampal neurons against a subsequent severe insult. *Neuroreport* **9**, 1273-1276.

Laake J. H., Haug F. M., Wieloch T. and Ottersen O. P. (1999) A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res. Prot.* **4**, 173-184.

Lambert H., Charette S. J., Bernier A. F., Guimond A. and Landry J. (1999) HSP27 Multimerization Mediated by Phosphorylation-sensitive Intermolecular Interactions at the Amino Terminus. *J. Biol. Chem.* **274**, 9378-9385.

Landry J., Chrétien P., Lambert L., Hickey E. and Weber L. A. (1989) Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* **109**, 7-15.

Landry J. and Huot J. (1999) Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (HSP27). *Biochem. Soc. Symp.* **64**, 79-89.

Larsen J. K., Yamboliev I. A., Weber L. A. and Gerthojer W. T. (1997) Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **273**, L930-L940.

Lavoie J. N., Hickey E., Weber L. A. and Landry J. (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Biol. Chem.* **268**, 24210-24214.

Lavoie J. N., Lambert H., Hickey E., Weber L. A. and Landry J. (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 505-516.

Lee G. J., Roseman A. M., Saibil H. R. and Vierling E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *EMBO J.* **16**, 659-671.

Leroux M. R., Melki R., Gordon B., Batelier G. and Candido E. P. M. (1997) Structure-Function Studies on Small Heat Shock Protein Oligomeric Assembly and Interaction with Unfolded Polypeptides. *J. Biol. Chem.* **272**, 24646-24656.

Lipton P. (1999) Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Rev.* **79**, 1431-1568.

Loktionova S. A. and Kabakov A. E. (1998) Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells. *FEBS Lett.* **433**, 294-300.

Loktionova S. A., Ilyinskaya O. P. and Kabakov A. E. (1998) Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27. *Am. J. Physiol.* **275**, 2147-2158.

Mehlen P., Schulze-Osthoff K. and Arrigo A. P. (1996) Small Stress Proteins as Novel Regulators Of Apoptosis Heat Shock Protein 27 Blocks Fas/Apo-1- And

Staurosporine-Induced Cell Death. *J. Biol. Chem.* **271**, 16510-16514.

New L., Jiang Y., Zhao M., Liu K., Zhu W., Flood L. J., Kato Y., Parry G. C.N. and Han J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38MAP kinase. *EMBO J.* **17**, 3372-3384.

Newell D. W., Barth A. and Malouf A. T. (1995) Glycine site NMDA receptor antagonists provide protection against ischemic-induced neuronal damage in hippocampal slice cultures. *Brain Res.* **675**, 38-44.

Nieber K. (1999) Hypoxia and Neuronal Function under *in Vitro* Conditions. *Pharmacol. Ther.* **82**, 71-86.

Noraberg J., Kristensen B. W., and Zimmer J. (1999) Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res. Prot.* **3**, 278-290.

Ohno M. and Watanabe S. (1996) Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats. *Brain Res. Bull.* **40**, 229-236.

Pandey P., Farber R., Nakazawa A., Kumar S., Bharti A., Nalin C., Weichselbaum R., Kufe D. and Kharbanda S. (2000) HSP27 functions as negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* **19**, 1975-1981.

Plumier J. C. L., Armstrong J. N., Landry J., Babity J. M., Robertson H. A. and Currie R. W. (1996) Expression of the 27,000 mol. wt heat shock protein following kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Neuroscience* **75**, 849-856.

Plumier J. C., Hopkins D. A., Robertson H. A. and Currie W. (1997) Constitutive expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in sensory and motor neurons of the rat nervous system. *J. Comp. Neurol.* **384**, 409-428.

Préville X., Schultz H., Knauf U., Gaestel M. and Arrigo A. P. (1998) Analysis of the role of HSP25 phosphorylation reveals the importance of the oligomerization state of this small heat shock protein in its protective function against TNFK- and hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Cell. Biochem.* **69**, 436-452.

Pringle A. K., Iannotti F., Wilde G. J. C., Chad J. E., Seeley P. J. and Sundstrom L. E. (1997a) Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. *Brain Res.* **755**, 36-46.

Pringle A. K., Angunawela R., Wilde G. J., Mephan J. A., Sundstrom L. E. and Iannotti F. (1997b) Induction of 72-kDa heat-shock pretein following sub-lethal oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **23**, 289-298.

Pringle A. K., Thomas S. J., Signorelli F. and Iannotti F. (1999) Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res.* **845**, 152-164.

Ray A. M., Owen D. E., Evans M. L., Davis J. B. and Benham C. D. (2000) Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. *Brain Res.* **867**, 62-69.

Rogalla T., Ehrnsperger M., Preville X., Kotlyarovi A., Lutsch G., Ducasse C., Paul C., Wieske M., Arrigo A. P., Buchner, J. and Gaestel M. (1999) Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor α by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 18947-18956.

Satoh J. and Kim S.U. (1995) Differential expression of heat shock protein HSP27 in human neurons and glial cells in culture. *J. Neurosci. Res.* **41**, 805-818.

Schneider G. B., Hamano H. and Cooper L. F. (1998) In vivo evaluation of HSP27 as an inhibitor of actin polymerization: HSP27 limits actin stress fibers and focal adhesion formation after heat shock. *J. Cell. Physiol.* **177**, 575-584.

Simon R. P., Niirio M. and Gwinn R. (1993) Prior ischemic stress protects against experimental stroke. *Neurosci. Lett.* **163**, 135-137.

Stokoe D., Engel K., Campbell D. G., Cohen P. and Gaestel M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the

small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **131**, 307-313.

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

Strasser U. and Fischer G. (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods* **57**, 177-186.

Tasker R. C., Coyle J. T. and Vornov J. J. (1992) The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. *J. Neurosci.* **12**, 4298–4308.

Tavares A., Cimarosti H., Valentim L. and Salbego C. (2001) Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport* **12**, 2705-2709.

Valentim L. M., Geyer A. B., Tavares A., Cimarosti H., Worm P.V., Rodnight R., Netto C. A. and Salbego C.G. (2001) Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immuncontent and phosphorylation in rat hippocampus. *Neuroscience* **107**, 43-49.

Wagstaff M. J. D., Collaço-Moraes Y., Aspey B. S., Vohn R. S., Harrison M. J. G., Latchman D. S. and Bellerocche J. S. (1996) Focal cerebral ischemia increases the levels of several classes of heat shock proteins and their corresponding mRNAs. *Mol. Brain Res.* **42**, 236-244.

Wagstaff M. J. D., Collaço-Moraes Y. C., Smith J., Bellerocche J. S., Coffin R. S. and Latchman D. S. (1999) Protection of Neuronal Cells from Apoptosis by Hsp27 Delivered with a Herpes Simplex Virus-based Vector. *J. Biol. Chem.* **274**, 5061-5069.

Welsh M. J. and Gaestel M. (1998) Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **851**, 28-35.

White B. C., Sullivan J. M., DeGracia D. J., Brian J. and O'Neil B. J. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* **179**, 1-33.

Wyse A. T., Streck E. L., Worm P., Wajner A., Ritter F. and Netto C. A. (2000) Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem Res.* **25**, 971-975.

Xi G., Hua Y., Keep R. F., Duong H. K. and Hoff J. T. (2001) Activation of p44/ 42 mitogen activated protein kinases in thrombin-induced brain tolerance. *Brain Res.* **895**, 153-159.

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

Legends to figures

Table1: Alterations in HSP27 phosphorylation and immunocontent in organotypic hippocampal cultures after sublethal periods of OGD. Data are described as means of percentage of control \pm S.E.M.

* different from control (paired t-test, $p < 0.05$)

Figure 1: Quantification of CA1 damage after 40 min of OGD and preconditioning. Photomicrographs represent PI fluorescence after the treatments. *** different from control (paired t-test, $p < 0.001$); # different the other groups (one-way ANOVA, Duncan's test)

Figure 2: Immunocontent and % of phosphorylated HSP27 after 40 min of OGD and preconditioning using 5 min of OGD. A) CA1 area; B) dentate gyrus. * different from control (paired t-test, $p < 0.05$); ** different from control (paired t-test $p < 0.01$); *** different from control (paired t-test $p < 0.001$); # different from the other groups (one-way ANOVA, Duncan's test)

Figure 3: Alterations in HSP27 after 40 min of OGD and preconditioning with 10 min of OGD. A) CA1; B) DG. * different from control (paired t-test, $p < 0.05$); ** different from control (paired t-test $p < 0.01$); *** different from control (paired t-test $p < 0.001$); # different from the other groups (one-way ANOVA, Duncan's test)

Figure 4: Alterations in HSP27 immunocontent and phosphorylation after OGD and preconditioning with 1 μ M NMDA. A) CA1; B) DG. * different from control (paired t-test, $p < 0.05$); ** different from control (paired t-test $p < 0.01$); *** different from control (paired t-test ($p < 0.001$); # different from control and NMDA+OGD with 2.5% serum (one-way ANOVA, Duncan's test); Δ different from the other types of preconditioning, 5 min of OGD and 10 min OGD (one-way ANOVA, Duncan's test).

Duration of OGD	Phosphorylation		Immunocontent	
	CA1	DG	CA1	DG
5 min	89.87 ± 12.02	177.78 ± 20.72*	152.45 ± 18.13*	188.72 ± 33.89*
10 min	61.39 ± 8.88*	195.79 ± 50.00*	228.96 ± 41.48*	189.10 ± 27.71*
20 min	68.11 ± 11.37*	131.19 ± 43.38	181.12 ± 45.00*	148.15 ± 15.82*

Table1

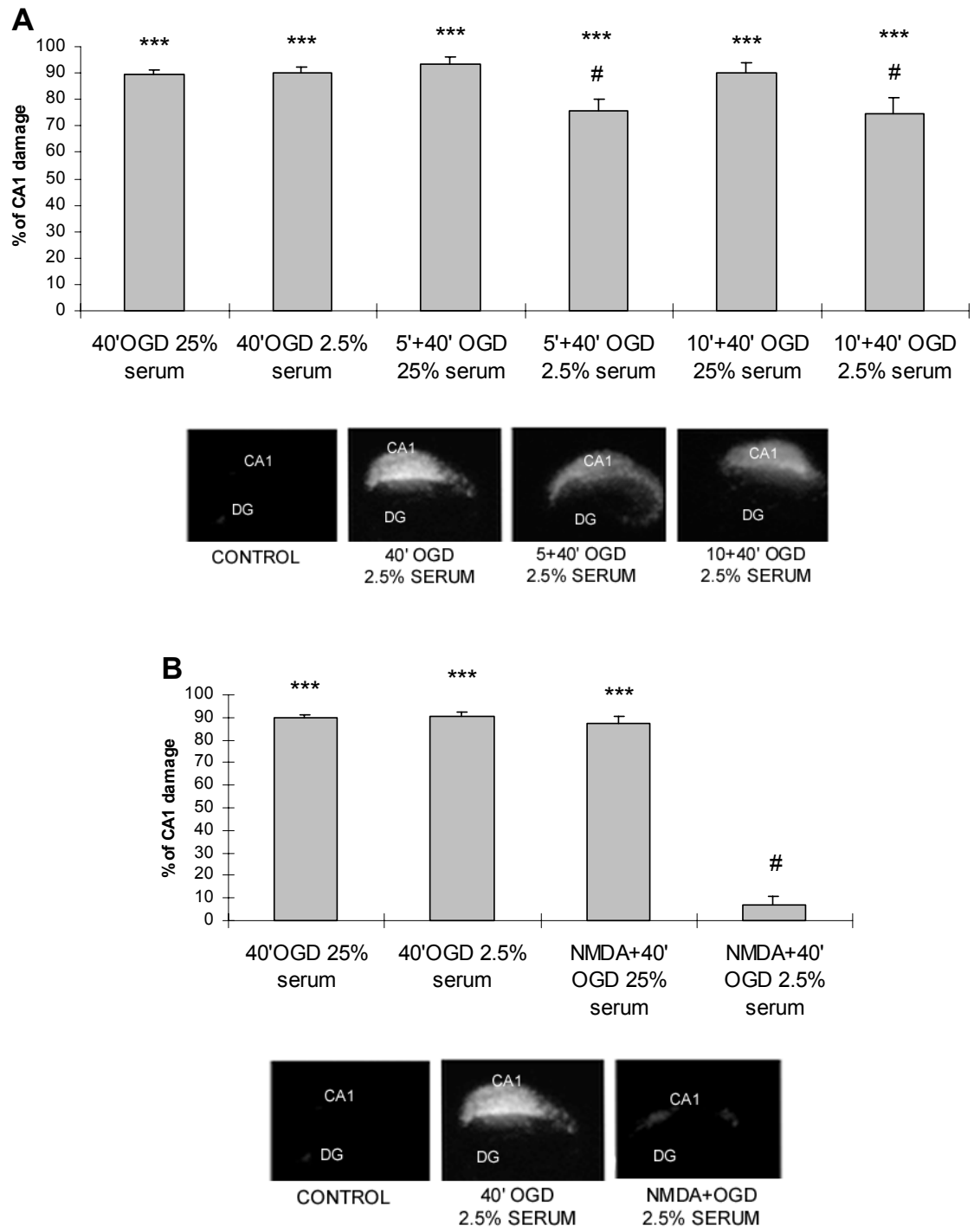


Figure 1

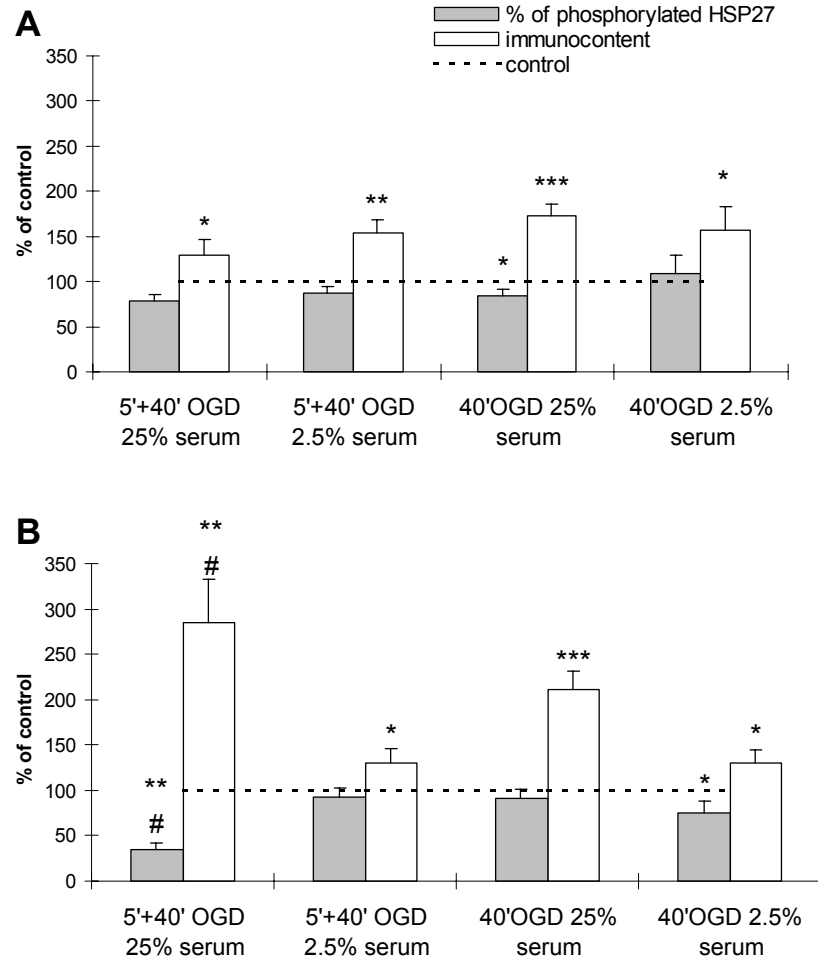


Figure 2

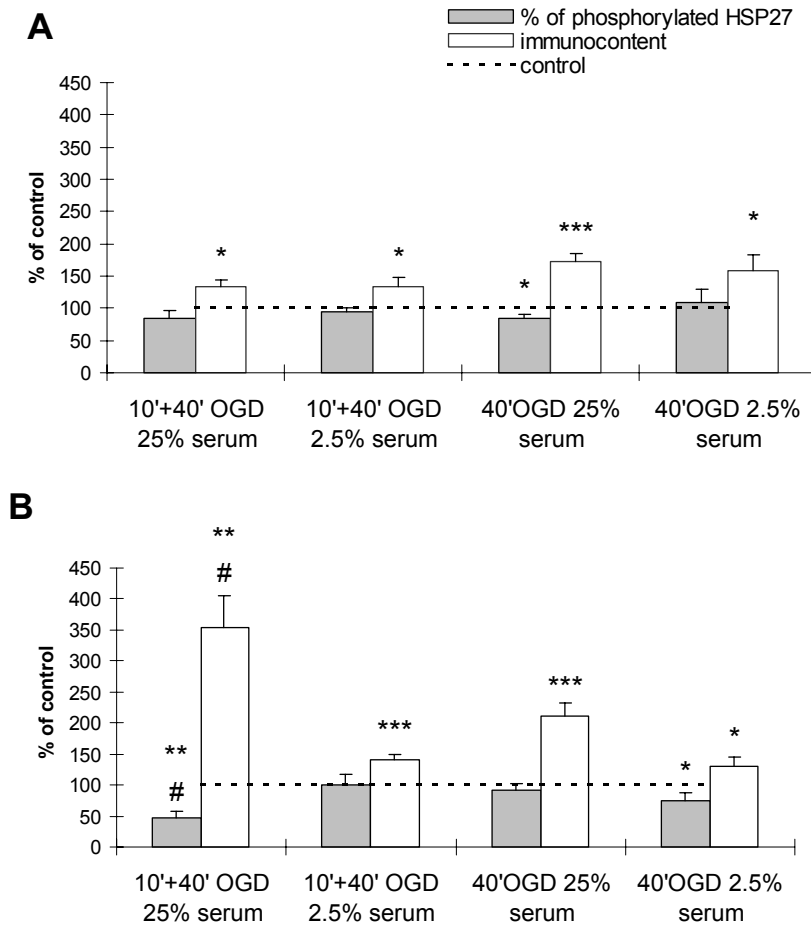


Figure 3

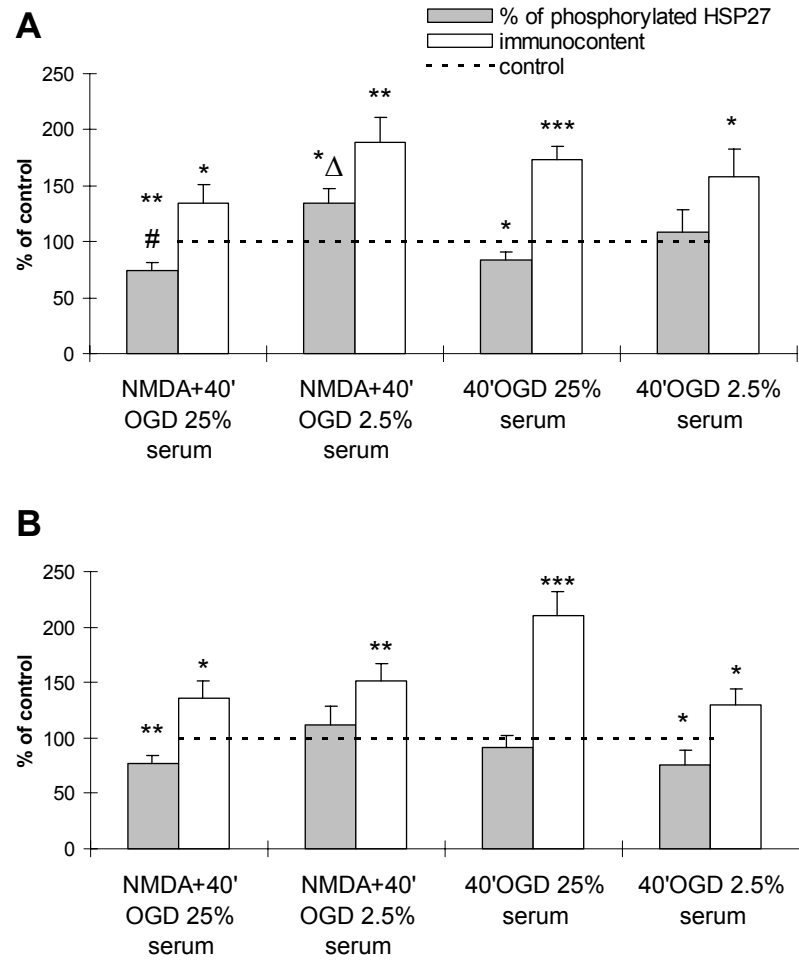


Figure 4

DISCUSSÃO

As lesões no SNC são uma das condições médicas mais catastróficas e devastadoras. Até hoje, a degeneração neuronal associada a desordens no SNC, como Alzheimer, Parkinson e isquemia é irreversível (MAIESE, 1999). A morte neuronal causada pela isquemia é desencadeada, basicamente, por um aumento excessivo nos níveis de cálcio intracelulares, causado pela liberação de glutamato durante o insulto isquêmico *in vivo*. Em culturas organotípicas de hipocampo, não está bem definida a cascata de eventos que leva à morte celular, mas alguns trabalhos mostraram alterações no cálcio e no glutamato em resposta à privação de glicose e oxigênio (BREder *et al.*, 2000; PEREZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 1997; NEWELL *et al.*, 1995). Quando a cascata de eventos que leva à morte celular na isquemia é desencadeada, as células da região CA1 do hipocampo, a região vulnerável, desenvolvem um processo de morte tardio, onde as células morrem em torno de 72h depois da isquemia *in vivo* ou 24h depois da OGD *in vitro* (BARTUS *et al.*, 1998; KIRINO *et al.*, 2000; BARTH *et al.*, 1996; LAAKE *et al.*, 1999).

In vivo, uma isquemia não tóxica para os neurônios pode reduzir a morte neuronal causada por um segundo episódio isquêmico, que normalmente seria letal para os neurônios. Os mecanismos do pré-condicionamento isquêmico não estão esclarecidos, embora já tenham sido investigados alguns possíveis mecanismos (BAEK *et al.*, 2000; ZHAN *et al.*, 2001; AOKI *et al.*, 1993; RAVATI *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2001). Em muitos tipos de células, a tolerância obtida com o pré-condicionamento está relacionada com a indução de de proteínas de estresse, particularmente a HSP70 e a HSP27 (CURRIE *et al.*, 2000). Em resposta à isquemia e ao pré-condicionamento, a HSP27 tem sua expressão aumentada especialmente em células gliais, astrócitos em particular, e tem sido sugerido em diversos trabalhos na literatura que esta proteína pode estar envolvida com a resistência das células a diversos tipos de estresse (KATO *et al.*, 1994a; KATO *et al.*, 1995b; BRAR *et al.*, 1999; GARRIDO *et al.*, 1997; WAGSTAFF *et al.*, 1999).

Nossos estudos no modelo *in vivo* mostraram alterações na

fosforilação e no imunoconteúdo da HSP27 em resposta à isquemia e ao pré-condicionamento *in vivo*. Sabe-se que a HSP27 pode ser induzida por diversos fatores estressantes ou agentes neurotóxicos, incluindo a isquemia cerebral (PLUMIER *et al.*, 1997; KRUGER-NAUG *et al.*, 2000; TSUJI *et al.*, 2000; CURRIE *et al.*, 2000). Os resultados revelaram que a isquemia, com ou sem pré-condicionamento, induz a expressão e a fosforilação da HSP27 diferentemente na área CA1 (vulnerável ao insulto isquêmico) e no giro denteado (área resistente ao insulto isquêmico) do hipocampo. O giro denteado apresentou um aumento no imunoconteúdo da HSP27 nas 3 condições estudadas, ou seja, no insulto isquêmico não letal para as células neuronais das regiões vulneráveis (2 min); no insulto isquêmico letal (10 min) e na situação de pré-condicionamento (2+10 min), enquanto a porcentagem de HSP27 fosforilada manteve-se inferior ao controle na maioria dos tratamentos. Somente observou-se um aumento na fosforilação 4 dias depois da isquemia letal.

Conforme descrito na literatura, a isquemia não letal pode induzir gliose no hipocampo e essa ativação dos astrócitos envolve a síntese de proteínas de choque térmico, particularmente HSP27 (KATO *et al.*, 1994b; KATO *et al.*, 1995a; CURRIE *et al.*, 2000). Possivelmente o giro denteado, através da ativação dos astrócitos, foi mais responsivo ao insulto não letal do que a região vulnerável CA1, protegendo os astrócitos que, ativados, podem desempenhar funções relacionadas à proteção das células neuronais tais como, recaptação de neurotransmissores e mantendo a homeostase iônica.

A desfosforilação da HSP27 leva à formação de grandes oligômeros, que podem atuar como chaperonas e proteger outras proteínas da desnaturação (LEROUX *et al.*, 1997; PRÉVILLE *et al.*, 1998; LAMBERT *et al.*, 1999; ROGALLA *et al.*, 1999; GUO E COOPER, 2000). A diminuição na fosforilação da HSP27 em resposta aos diferentes tratamentos observada no giro denteado pode contribuir para a manutenção das funções normais dos astrócitos, e desta forma participar do mecanismo molecular responsável pela resistência à isquemia observada nesta área. Além disso,

o fato de o giro denteado ter 30% mais HSP27 do que a região CA1 nos animais controle também pode ser um dos fatores que favorecem a resistência neuronal.

A região CA1 apresenta características diferentes daquelas observadas no giro denteado. Observamos um aumento no imunoconteúdo de HSP27 somente nos tratamentos em que foi feita a isquemia letal, precedida ou não pelo pré-condicionamento, ou seja, 10 min ou 2+10 min de isquemia. A porcentagem de HSP27 fosforilada na região CA1 não apresentou alterações importantes em resposta ao pré-condicionamento e permaneceu em torno de 100% depois da isquemia letal.

Uma alteração interessante foi observada na região CA1 depois de 10min de isquemia: um aumento na fosforilação 14 dias depois do insulto. Em um trabalho anterior no nosso laboratório (VALENTIM *et al.*, 1999), foi observada uma alteração na proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no mesmo período, o que pode indicar uma alteração no citoesqueleto para reorganização depois da lesão. O resultado com HSP27 pode ser interpretado da mesma maneira, já que, quando fosforilada, ela pode modular os filamentos de actina, alterando o citoesqueleto (LAVOIE *et al.*, 1995; GUAY *et al.*, 1997; LANDRY E HUOT, 1999). Depois da isquemia pré-condicionada, quando os neurônios da região CA1 se tornaram resistentes à isquemia, observamos um aumento no imunoconteúdo de HSP27, com uma diminuição significativa na porcentagem de HSP27 fosforilada, semelhante ao giro denteado, que é resistente. Este resultado sugere que, nestas condições, a HSP27 pode estar protegendo os astrócitos da região CA1, atuando como chaperona. Outro papel demonstrado atualmente pela literatura para a HSP27 é o bloqueio do mecanismo apoptótico. Em células tumorais, os grandes oligômeros de HSP27 podem bloquear a ativação de caspases pelo citocromo C (BRUEY *et al.*, 2000). Outros trabalhos também mostram a ação anti-apoptótica da HSP27, porém não demonstram o estado de oligomerização da proteína (GARRIDO *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000). De acordo com a literatura, o mecanismo de morte celular isquêmica pode envolver a apoptose, portanto, a HSP27 pode também estar atuando como

bloqueadora do processo apoptótico, auxiliando a sobrevivência dos astrócitos (ZHAN *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2001).

Os astrócitos são ativados por uma grande variedade de lesões, e há evidências de que a ativação dessas células está relacionada com a tolerância à isquemia (KATO *et al.*, 1994b; CURRIE *et al.*, 2000). A ativação dos astrócitos leva a um aumento na capacidade destas células de recaptar neurotransmissores, manter o equilíbrio iônico e secretar fatores tróficos, o que auxilia na sobrevivência neuronal (MATSUSHIMA *et al.*, 1998; LOUW *et al.*, 1998; CULMSEE *et al.*, 1999; GOTTLIEB e MATUTE, 1999; LIU *et al.*, 1999). Se a ativação dos astrócitos pode melhorar sua capacidade de realizar suas funções, e considerando que as alterações observadas na HSP27 estão relacionadas com sua função de chaperona, podemos sugerir que estas células podem indiretamente contribuir para a sobrevivência dos neurônios.

O segundo artigo deste trabalho mostrou alterações na HSP27 em resposta à OGD e ao pré-condicionamento em culturas organotípicas de hipocampo. Apesar do grande número de trabalhos a respeito do pré-condicionamento isquêmico *in vivo*, o mecanismo *in vitro* ainda permanece obscuro. Alguns trabalhos têm mostrado a resposta de culturas organotípicas de hipocampo à privação de glicose e oxigênio, que simula a isquemia *in vivo*, mas poucos estudam o pré-condicionamento (LAAKE *et al.*, 1999; NEWELL *et al.*, 1995; BERNAUDIN *et al.*, 1998; BREDER *et al.*, 2000; TAVARES *et al.*, 2001).

Pringle e colaboradores (1999) demonstraram que o pré-condicionamento em culturas organotípicas usando tempos não letais de privação de glicose e oxigênio não está envolvido com a expressão de HSP70. Os resultados aqui descritos mostram que a HSP27 responde aumentando o imunoconteúdo tanto depois de um insulto não letal quanto depois de um insulto letal. Usando 5 ou 10 min de OGD como indutores de tolerância, observou-se uma pequena, mas significativa proteção contra 40 min de OGD (tempo letal). Este resultado foi obtido quando as culturas foram mantidas em um meio com quantidade reduzida de soro (2,5%), diferente do meio de cultivo padrão, que tem 25% de soro. Quando os

experimentos foram realizados mantendo-se as culturas no meio padrão durante a recuperação, o pré-condicionamento não ocorreu.

Observamos um resultado semelhante quando o NMDA foi usado como indutor de tolerância. O pré-condicionamento diminuiu para 6% a morte observada na região CA1 (usando o meio com soro reduzido na recuperação) em contraste com a isquemia sozinha, que causou um dano de 90%. Sabe-se que algumas vias de transdução de sinal precisam ser ativadas para que o pré-condicionamento ocorra *in vivo*, sendo algumas dessas vias ativadas por fatores tróficos (GUOHUA *et al.*, 2001; YANO *et al.*, 2001). Possivelmente a alta quantidade de soro do meio padrão possa estar mantendo essas vias em um nível máximo de ativação, impedindo que o pré-condicionamento ocorra.

Em relação a HSP27, foram observadas alterações distintas de acordo com os tratamentos. Tanto o pré-condicionamento usando 5 ou 10 min de OGD quanto NMDA, causaram um aumento no imunoconteúdo da HSP27 em CA1 e DG, usando o meio padrão ou o meio com soro reduzido. Entretanto, algumas alterações interessantes foram observadas na porcentagem de HS-27 fosforilada. Nos tratamentos em que foi usado o meio padrão no período de recuperação, observou-se uma diminuição na porcentagem de HSP27 fosforilada no giro denteado. Quando utilizamos o meio com baixa concentração de soro, observamos uma manutenção no estado de fosforilação da HSP27 em ambas as regiões, sendo que quando o NMDA foi usado como pré-condicionante, houve um aumento na porcentagem de HSP27 fosforilada na região CA1.

No artigo anterior, foi mostrado que a indução de tolerância à isquemia *in vivo* está relacionada com aumento na expressão e diminuição na fosforilação da HSP27. Em culturas organotípicas, a desfosforilação da HSP27 parece não estar relacionada com a indução da tolerância. Ao contrário, parece ser necessário que a porcentagem de HSP27 fosforilada seja mantida ou até mesmo aumentada para que o pré-condicionamento ocorra.

Vários tipos de estresse podem aumentar a fosforilação da HSP27

através da ativação da via de sinalização p38, responsiva ao estresse, e a conseqüente ativação da MAPKAP quinase-2 e da PRAK, as enzimas que fosforilam a HSP27 (NEW *et al.*, 1998; LARSEN *et al.*, 1997; STOKOE *et al.*, 1992), podendo causar uma diminuição no tamanho dos oligômeros da HSP27 (PRÉVILLE *et al.*, 1998, ROGALLA *et al.*, 1999). Quando fosforilada, a HSP27 pode estabilizar os filamentos de actina, acelerando a recuperação dos filamentos depois do estresse (WELSH E GAESTEL, 1998; SCHNEIDER *et al.*, 1998; LAVOIE *et al.*, 1995; GUAY *et al.*, 1997). Nas culturas organotípicas, a HSP27 pode estar diminuindo a desorganização do citoesqueleto causada pelo estresse. A estabilidade dos filamentos de actina é considerada um fator importante na sobrevivência das células e pode contribuir para o fenômeno da tolerância (GABAI E KHABAKOV, 1993; LOKTIONOVA E KHABAKOV, 1998; LANDRY E HUOT, 1999).

Outra característica da HSP27 a ser considerada é sua capacidade de bloquear a apoptose. A expressão aumentada de HSP27 protege as células neurais da falta de fatores tróficos (WAGSTAFF *et al.*, 1999), inibe a ativação de caspases (GARRIDO *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000; BRUEY *et al.*, 2000) e, quando fosforilada, a HSP27 pode bloquear a apoptose induzida pelo receptor Fas (CHARETTE E LANDRY, 2000; CHARETTE *et al.*, 2000). Sabe-se que a apoptose é um dos processos que leva à morte de neurônios na região CA1 em conseqüência da privação de glicose e oxigênio, portanto, os resultados deste trabalho podem sugerir que a HSP27 esteja diminuindo a apoptose, auxiliando a sobrevivência celular (RAY *et al.*, 2000).

Analizando os resultados dos dois grupos de experimentos em conjunto, podemos sugerir que a HSP27 está envolvida no fenômeno de tolerância à isquemia nos dois modelos experimentais estudados, porém com características diferentes. A Figura 4 mostra os possíveis mecanismos sugeridos neste trabalho para o envolvimento da HSP27 na tolerância à isquemia *in vivo* e *in vitro*. No modelo *in vivo*, a tolerância está associada à desfosforilação da HSP27, enquanto *in vitro* parece ser a forma fosforilada da HSP27 que está relacionada com a proteção. Alguns estudos têm demonstrado que *in vivo*, a HSP27 é expressa principalmente em astrócitos,

porém não há estudos mostrando a localização celular da proteína em culturas organotípicas (SATO e KIM, 1995; KATO *et al.*, 1995a, KATO *et al.*, 1995b; PLUMIER *et al.*, 1996). Apesar do fato de as culturas organotípicas responderem à isquemia de modo semelhante ao modelo *in vivo* (morte de células na região vulnerável CA1), os mecanismos que levam à morte podem ser diferentes, necessitando ações distintas da proteína. Estes fatos precisam ser elucidados para que se possa entender melhor o papel da HSP27 na tolerância à isquemia.

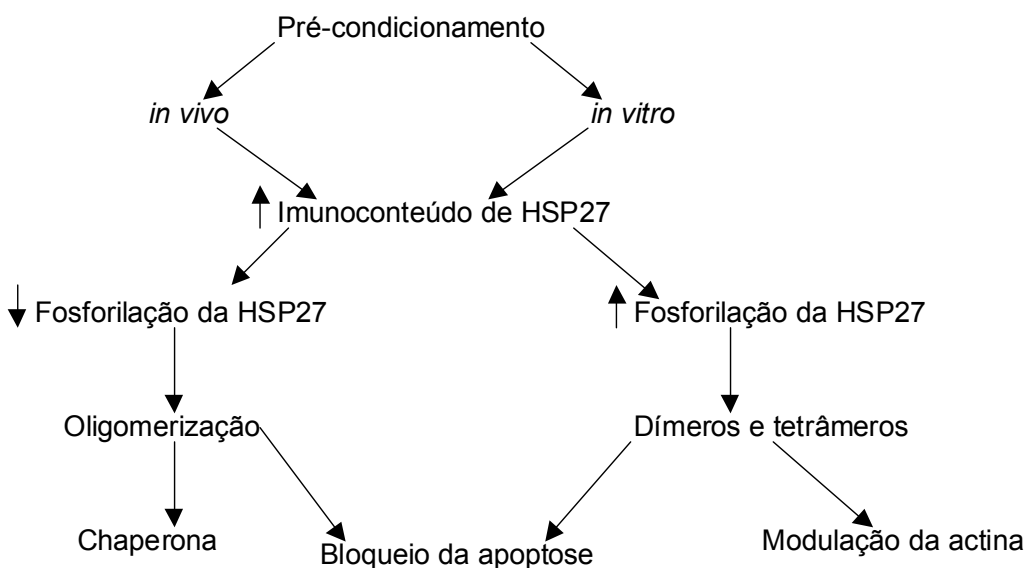


FIGURA 4: Esquema representativo dos possíveis mecanismos de ação da HSP27 na tolerância à isquemia *in vivo* e *in vitro*.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

◆ No modelo *in vivo* de isquemia cerebral e pré-condicionamento:

-na região resistente, o giro denteado, houve um aumento no imunoconteúdo da HSP27 em resposta à isquemia letal (10 min) e ao pré-condicionamento (2+10 min), porém a fosforilação não aumentou paralelamente;

-no CA1, região vulnerável, houve aumento de imunoconteúdo da HSP27, em resposta à isquemia letal (10 min) e ao pré-condicionamento (2+10 min) e este foi acompanhado de um aumento no estado de fosforilação da proteína aos 10 min de isquemia;

-quando o CA1 se tornou resistente (situação de pré-condicionamento), a porcentagem de HSP27 fosforilada diminuiu, de forma semelhante ao observado no giro denteado.

Pode-se concluir que a HSP27 possivelmente desempenha um papel na tolerância induzida à isquemia, aumentando o imunoconteúdo e diminuindo a fosforilação, podendo atuar como chaperona e proteger outras proteínas celulares da desnaturação.

◆ No modelo *in vitro* de "isquemia" e pré-condicionamento:

-no caso das culturas organotípicas, observamos um aumento no imunoconteúdo, nas duas regiões do hipocampo, mas as alterações na fosforilação da proteína foram diferentes nas duas áreas. Quando não houve pré-condicionamento, observamos uma diminuição na fosforilação da proteína no giro denteado e, quando o pré-condicionamento foi obtido, a fosforilação aumentou em paralelo ou mais do que o imunoconteúdo, nas duas regiões;

-quando o pré-condicionamento à privação de glicose e oxigênio ocorreu, em culturas organotípicas de hipocampo, a HSP27 manteve-se no estado fosforilado, podendo atuar na

modulação dos filamentos de actina ou bloquear o processo apoptótico.

- ▶ Observando os resultados dos dois trabalhos em conjunto, podemos sugerir que:
 - ▶ a HSP27 possivelmente desempenha um papel na tolerância à isquemia tanto *in vivo* quanto *in vitro*;
 - ▶ possivelmente a obtenção da tolerância tenha vias diferentes *in vivo* e *in vitro*, exigindo diferentes ações da HSP27.

PERSPECTIVAS

Como continuação deste trabalho, serão realizados experimentos envolvendo a modulação da vulnerabilidade seletiva do hipocampo à privação de glicose e oxigênio em culturas organotípicas. Será analisada a via de transdução de sinal que envolve a proteína fosfo-inositol 3 quinase (PI3K), uma via conhecidamente anti-apoptótica, que pode envolver a proteína HSP27 através de uma interação com a proteína quinase B (AKT/PKB). Essa via pode ter regulações diferentes em CA1 e DG, contribuindo para a vulnerabilidade seletiva.

Também como sequência deste trabalho, serão realizados experimentos em animais geneticamente modificados, com expressão aumentada de HSP27, com o objetivo de elucidar o papel da proteína na resposta celular às lesões cerebrais. Este projeto será realizado no laboratório do Professor David Latchman, Institute of Child Health, University College London, no Reino Unido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID K. M. e TYMIANSKI M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. **J. Neurosci.** v. 17, p. 3538-3553, 1997.
- AMEDEE T., ROBERT A., e COLES J. A. Potassium homeostasis and glial energy metabolism. **Glia** v. 21, n. 1, p. 46-55, 1997.
- AOKI M., ABE K., KAWAGOE J., NAKAMURA S. e KOGURE K. The preconditioned hippocampus accelerates HSP70 heat shock gene expression following transient ischemia in the gerbil. **Neurosci. Lett.** v.155, p.7-10, 1993.
- ASCHNER M. Astrocytic functions and physiological reactions to injury: the potential to induce and/or exacerbate neuronal dysfunction-a forum position paper. **Neurotoxicology** v. 19, p. 7-18, 1998.
- ASCHNER M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. **Toxicol. Lett.** v. 102-103, p. 283-287, 1998a.
- ATTWELL D. Glia and neurons in dialogue. **Nature** v. 369, p. 707-708, 1994.
- BAEK S.H., KIM J. Y., CHOI J. H., PARK E. M., HAN M. Y., KIM C. H., AHN Y. S., e PARK Y. M. Reduced glutathione oxidation ratio and 8 ohdG accumulation by mild ischemic pretreatment. **Brain Res.** v. 856, p. 28-36, 2000.
- BARONE F. C., WHITE R. F., SPERA P., ELLISON J., CURRIE R. W., WANG X., e FAUERSTEIN G. Z., Ischemic preconditioning and brain tolerance. **Stroke** v. 29, p. 1937-1951, 1998.

- BARRES B. New roles for glia. **J. Neurosci.** v. 11, p. 3685-3694, 1991.
- BARTH A., BARTH L. E NEWELL D.W. Combination therapy with MK-801 and α -Phenyl-tert-butyl-nitrone enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. **Exp. Neurol.** v. 141, p. 330-336, 1996.
- BARTUS R. T., DEAN R. L., MENNERICK S., EVELETH D., e LYNCH G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Res.** v. 790, n. 1-2, p. 1-13, 1998.
- BERNAUDIN M., NOUVELOT A., MACKENZIE E. T. e PETIT E. Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. **Exp. Neurol.** v. 150, p. 30-39, 1998.
- BRADFORD H. F. Glial Cells: mechanical and functional supporting cells of the nervous system. **Chem. Neurobiol.** W.H. Freeman and Company, New York, 1985.
- BRAR B. K., STEPHANOU A., WAGSTAFF M. J. D., COFFIN R. S., MARBER M. S., ENGELMANN G. e LATCHMAN D. S. Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress. **J. Mol. Cell. Cardiol.** v. 31, p. 135-146, 1999.
- BREDER J., SABELHAUS C. F., OPITZ T., REYMANN K. G. e SCHRÖDER U. H. Inhibition of different pathways influencing Na⁺ homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. **Neuropharmacology** v. 39, p. 1779-1787, 2000.

- BRUCE A.J., SAKHI S., SCHREIBER S.S. e BAUDRY M. Development of kainic acid and N-methyl-D-aspartic acid toxicity in organotypic hippocampal cultures. **Exp Neurol.** v.132, 9. 209-219, 1995.
- BRUEY J. M., DUCASSE C., BONNIAUD P., RAVAGNAN L., SUSIN S. A., DIAZ-LATOUD C., GURBUXANI S., ARRIGO A. P, KROEMER G., SOLARY, E. e GARRIDO C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat. Cell Biol.** v. 2, p. 645-652, 2000.
- BUCHS P. A., STOPPINI L., e MULLER D. Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures. **Dev. Brain Res.** v. 71, n.1, p. 81-91, 1993.
- CAO G., MINAMI M., PEI W., YAN C., CHEN D., O'HORO C., GRAHAM S.H. e CHEN J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**v.21, p. 321-333, 2001.
- CARMIGNOTO G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. **Prog. Neurobiol.** v. 62, n. 6, p. 561-581, 2000.
- CHARETTE S. e LANDRY J. The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 926, p. 126-131, 2000.
- CHARETTE S. J., LAVOIE J., LAMBERT H. e LANDRY J. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. **Mol. Cell Biol.** v. 20, p. 7602-7612, 2000.

- CHAUFOUR S., MEHLEN P., e ARRIGO A. P. Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of Hsp27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells: possible role in the control of cellular growth and differentiation. **Cell Stress Chaperones** v. 1, p. 225–235, 1996.
- CHIU S. Y., e KRIEGLER S. Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. **Glia** v. 11, p. 191-200, 1994.
- CHOI D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic/ischemic neuronal death. **Trends Neurosci.** v. 18, p. 58-60, 1995.
- CIMAROSTI H., RODNIGHT R., TAVARES A., PAIVA R., VALENTIM L., ROCHA E. e SALBEGO C. G. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci Lett.** v. 23, p. 33-36, 2001.
- COOPER L. F., UOSHIMA K. e GUO Z. Transcriptional regulation involving the intronic heat shock element of the rat hsp27 gene. **Biochim. Biophys. Acta** . v. 1490, p. 348-354, 2000.
- CORBETT D. e CROOKS P. Ischemic preconditioning: a long term survival study using behavioural and histological endpoints. **Brain Res.** v. 760, p. 129-136, 1997.
- CORNELL-BELL A. H., FINKBEINER S. M., COOPER M. S., e SMITH S. J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. **Science** v. 247, n. 4941, p. 470-473, 1990.

- COTMAN C. W., PINILLA F. G., e KAHLE J. S. Neural plasticity and regeneration, p. 607-626. **Basic Neurochemistry**. 5. ed., New York, Raven Press, 1994.
- CULMSEE C., STUMM R. K., SCHAFER M. K., WEIHE E., e KRIEGLSTEIN J. Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. **Eur. J. Pharmacol.** v. 379, n. 1, p. 33-45, 1999.
- CURRIE W., ELLISON J. A., WHITE R. F., FAUERSTEIN G. J., e WANG X., BARONE F. C. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal HSP70 and prolonged astrogliosis with expression of HSP27. **Brain Res.** v. 863, p. 169-181, 2000.
- DE KEYSER J., SULTER G., e LUITEN P. G. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? **Trends Neurosci.** v. 22, p. 535-540, 1999.
- DILLMANN W .H. Small heat shock proteins and protection against injury. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 874, p. 66-68, 1999.
- DIRNAGL U., IADECOLA C., MOSKOWITZ M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.** v. 22, n. 9, p. 391-397, 1999.
- DRINGEN R., GEBHART R. e HAMPRECHT B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. **Brain Res.** v. 623, p. 208-214, 1993.
- DUGAN L.L. e CHOI D.W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Ann Neurol.**v.35 p.S17-2, 1994.

- EHRNSPERGER M., GRABER S., GAESTEL M. e BUCHNER J. Binding of non-native protein to HSP25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. **EMBO J.** v. 16, p. 221-229, 1997.
- FAROOQUI A. A., HAUN S. E., e HORROCKS L. A. Ischemia and hypoxia, p. 867-883. **Basic Neurochemistry.** 5. ed., New York, Raven Press, 1994.
- FAWCETT J. W., e ASHER R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res. Bull.** v. 49, n. 6, p. 377-391, 1999.
- FORSYTH R., FRAY A., BOUTELLE M., FILLENZ M., MIDDLEDITCH C. e BURCHELL A. A role for astrocytes in glucose delivery to neurons? **Dev. Neurosci.** v. 18, p. 360-370, 1996.
- GABAI V. L. e KHABAKOV A. E. Tumor cell resistance to energy deprivation and hyperthermia can be determined by the actin cytoskeleton stability. **Cancer Lett.** v. 70, p. 25-31, 1993.
- GÄHWILER B.H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. **J. Neurosci. Methods** v. 4, p. 329-342, 1981.
- GÄHWILER B.H., CAPOGNA M., DEBANNE D., MCKINNEY R.A. e THOMPSON S.M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **Trends Neurosci.** v. 20, p. 471-477, 1997.
- GALLO V., GHIANI C. A. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 21, n. 7, p. 252-258, 2000.

- GARRIDO C., OTTAVI P., FROMENTIN A., HAMMANN A., ARRIGO A. P., CHAUFFERT B. e MEHLEN PHSP-27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. **Cancer Res.** v. 57, p. 2661-2667, 1997.
- GARRIDO C., BRUEY J.-M., FROMENTIN A., HAMMANN A., ARRIGO A. P. e SOLARY E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **FASEB J.** v. 13, p. 2061-2070, 1999.
- GIULIAN D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. **Glia** v. 7, p. 102-110, 1993.
- GLOWINSKI J., MARIN P., TENCE M., STELLA N., GIAUME C., e PREMONT J. Glial receptors and their intervention in astrocyto-astocytic and astrocyto-neuronal interactions. **Glia** v. 11, p. 201-208, 1994.
- GOTTLIEB M., e MATUTE C. Expression of nerve growth factor in astrocytes of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. **Neuroscience** v. 91, n. 3, p. 1027-1034, 1999.
- GRAHAM S. H., e CHEN J. Programmed cell death in cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 21, n. 2, p. 99-109, 2001.
- GUAY J., LAMBERT H., GINGRAS-BRETON G., LAVOIE J., HUOT J., e LANDRY J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. **J. Cell. Sci.** v. 110, p. 357-368, 1997.
- GUO Z. e COOPER F. L. An N-terminal 33-amino-acid-deletion variant of HSP25 retains oligomerization and functional properties. **Bioch. Biophys. Res. Comm.** v. 270, p. 183-189, 2000.

- HANSSON E. Metabotropic glutamate receptor activation induces astroglial swelling. **J. Biol. Chem.** v. 35, p. 21955-21961, 1994.
- HANSSON E. e RÖNNBÄCK L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. **FASEB J.** v. 9, p. 343-350, 1995.
- HATTEN M. E., LIEM R. K. H., SHELANSKI M. L. e MASON C. A. Astroglia in CNS injury. **Glia** v. 4, p. 233-243, 1991.
- HOSSMANN K. A. Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. **Prog. Brain Res.** v. 96, p. 161-177, 1993.
- HSU M., SIK A., GALLYAS F., HORVÁTH Z., e BUSKÁKI G. Short-term and long term changes in the postischemic hippocampus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 743, p. 121-139, 1994.
- IADECOLA C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci.** v. 20, p. 132-139, 1997.
- JAKOB U., GAESTEL M., ENGEL K., e BUCHNER J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 1517-1520, 1993.
- JANECZKO, K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. **Int. J. Devl. Neurosci.** v. 11, p. 139-147, 1993.
- JUURLINK B. Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 21, n. 2, p. 151-156, 1997.

- JUURLINK B., e SWEENEY M. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 21, n.2, p.121-128, 1997.
- KANDEL E. R., SHWARTZ J. H., e JESSEL T. J. Essentials of neural science and behavior, New Jersey, Prentice Hall International, 1995.
- KATO H., LIU Y., KOGURE K. e KATO K. Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance. **Brain Res.** v. 634, p. 235-244, 1994a.
- KATO H, KOGURE K, ARAKI T., e ITOYAMA Y. Astroglial and microglial reactions in the gerbil hippocampus with induced ischemic tolerance. **Brain Res.** v. 664, p. 69-76, 1994b.
- KATO H., KOGURE K., LIU X.H., ARAKI T., KATO K. e ITOYAMA Y. Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Res.** v. 679, p. 1-7, 1995a.
- KATO H., ARAKI T., KOGURE K. e KATO K. An immunohistochemical study of heat shock protein-27 in the hippocampus in a gerbil model of cerebral ischemia and ischemic tolerance. **Neuroscience** v. 68, p. 65-71, 1995b.
- KATO K., ITO H., IWAMOTO I., IIDA K. e INAGUMA Y. Protein kinase inhibitors can suppress stress-induced dissociation of Hsp27. **Cell Stress Chap.** v. 6, p. 16-20, 2001.
- KEISER D. O. e PELLMAR T. C. Synaptic transmission in the hippocampus: critical role for glial cells. **Glia** v. 10, p. 237-243, 1994.

- KIMELBERG H. K. e NOREMBERG M. D. Astrocytes, **Scientific Am.** v. 66, 1989.
- KIMELBERG H. Receptors on astrocytes - What possible functions? **Neurochem. Int.** v. 26, n. 1, p. 27-40, 1995.
- KINDY M., BHAT A. N. e BHAT N. R. Transient ischemia stimulates GFAP and vimentin gene expression in the gerbil neocortex, striatum and hippocampus. **Mol Brain Res.** v. 13, p. 199-206, 1992.
- KIRINO T. Delayed neuronal death. **Neuropathology** v. 20, p. S95-97, 2000.
- KITAGAWA K., MATSUMOTO M., OHTSUKI T., KUWABARA K., MABUCHI T., YAGITA Y., HORI M., e YANAGIHARA T. Extended neuronal protection induced after sublethal ischemia adjacent to the area with delayed neuronal death. **Neuroscience** v. 96, n. 1, p. 141-146, 2000.
- KRUGER-NAUG A. M., HOPKINS D. A., ARMSTRONG J. N., PLUMIER J. C. e CURRIE R. W. Hyperthermic induction of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in neuroglia and neurons of the rat Central Nervous System. **J. Comp. Neurol.** v. 428, p. 495-510, 2000.
- LAAKE J. H., HAUG F. M., WIELOCH T. e OTTERSEN O. P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Res. Prot.** v. 4, p. 173-184, 1999.
- LAMBERT H., CHARETTE S. J., BERNIER A. F., GUIMOND A. e LANDRY J. HSP27 Multimerization Mediated by Phosphorylation-sensitive Intermolecular Interactions at the Amino Terminus. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 9378-9385, 1999.

- LAMING P. R., KIMELBERG H., ROBINSON S., SALM A., HAWRYLAK N., MÜLLER C. e ROOTS B., NG K. Neuronal–glial interactions and behaviour. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 24, n. 3, p. 295-340, 2000.
- LANDRY, J., CHRÉTIEN, P., LAMBERT, L., HICKEY, E., e WEBER, L. A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. **J. Cell Biol.** v. 109, p. 7-15, 1989.
- LANDRY J. e HUOT J. Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (HSP27). *Biochem. Soc. Symp.* 64, 79-89, 1999.
- LARSEN J. K., YAMBOLIEV I. A., WEBER L. A., e GERTHOFFER W. T. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. **Am. J. Physiol.** v. 273, p. L930-L940, 1997.
- LAVOIE J. N., GINGRAS-BRETON G., TANGUAY R. M., e LANDRY J. Induction of chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock: HSP27 stabilization of microfilament organization. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 3420-3429, 1993.
- LAVOIE J. N., LAMBERT H., HICKEY E., WEBER L. A. e LANDRY J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein27. **Mol. Cell. Biol.** v. 15, p. 505-516, 1995.

- LEE G. J., ROSEMAN A. M., SAIBIL H. R. e VIERLING E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. **EMBO J.** v. 16, p. 659-671, 1997.
- LEROUX M. R., MELKI R., GORDON B., BATELIER G., e CANDIDO P.M. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 24646-24656, 1997.
- LI Y., CHOP M., ZHANG Z. e ZHANG R. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72 kDa heat shock protein. **J. Neurol. Sci.** v. 128, p. 134-142, 1995.
- LIU D., SMITH C. L., BARONE F. C., ELLISON J. Á., LYSKO P. G., LI K., e SIMPSON I. A. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. **Mol. Brain Res.** v. 68, p. 29-41, 1999.
- LOKTIONOVA S. A. e KABAKOV A. E. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells. **FEBS Lett.** v. 433, p. 294-300, 1998.
- LOKTIONOVA S. A., ILYINSKAYA O. P. e KABAKOV A. E. Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27. **Am. J. Physiol.** v. 275, p. 2147-2158, 1998.

- LOUW D. F., MASADA T. e SUTHERLAND G. R. Ischemic injury is ameliorated by astrocyte activation. **Can. J. Neurol. Sci.** v. 25, p. 102-107, 1998.
- MAIESE K. Neuronal survival: Cellular and molecular pathways for protection. **Ann N. Y. Acad. Sci.** v. 835, p.255-273, 1997.
- MATSUSHIMA K., SCHMIDT-KASTNER R., HOGAN M. J. e HAKIM A. M. Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia. **Brain Res.** v. 807, n. 1-2, p. 47-60, 1998.
- MCCLELLAN A. J. e FRYDMAN J. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. **Nat. Cell Biol.** v. 3, n. 2, p. E51-E53, 2001.
- MEHLEN P., SCHULZE-OSTHOFF K. e ARRIGO A. P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis heat shock protein 27 blocks Fas/Apo-1- and staurosporine-induced cell death. **J. Biol. Chem.** v. 271, n. 28, p.16510-16514, 1996.
- MITANI A., YANASE H., SAKAI K., WAKE Y., e KATAOKA K. Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Res.** v. 601, p. 103-110, 1993.
- NETTO, C.A., HODGES, H., SINDEN, J.D., PEILLET, E., KERSHAW, T., SOWINSKI, P., MELDRUM, B.S., GRAY, J.A.. Effects of fetal hippocampal fieldgrafts on ischemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. **Neuroscience** v. 54, p. 69-92, 1993.

- NEW L., JIANG Y., ZHAO M., LIU K., ZHU W., FLOOD L. J., KATO Y., PARRY G. C.N. e HAN J. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38MAP kinase. **EMBO J.** v. 17, p. 3372-3384, 1998.
- NEWELL D. W., BARTH A. e MALOUF A. T. Glycine site NMDA receptor antagonists provide protection against ischemic-induced neuronal damage in hippocampal slice cultures. **Brain Res.** v. 675, p. 38-44, 1995.
- NIMURA T., WEINSTEIN P. R., MASSA S. M., PANTER S. e SHARP L. F. R. Heme-oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. **Mol. Brain Res.** v. 37, p. 201-208, 1996.
- NORABERG J., KRISTENSEN B. W., e ZIMMER J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Res. Prot.** v. 3, p. 278-290, 1999.
- NORENBERG M. D. Astrocyte responses to CNS injury. **J. Neuropathol. Exper. Neurol.** v. 53, p. 213-220, 1994.
- NORENBERG M. D. Active and passive roles of astrocytes in neurologic disease: commentary on forum position paper. **Neurotoxicology** v. 19, p. 23-26, 1998.
- NORTON W.T., AQUINO D.A., HOZUMI I., CHIU F. C. e BROSANAN C. F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochem. Res.** v. 17, p. 877-885, 1992.
- OHNO M. e WATANABE S. Ischemic tolerance to memory impairment associated with hippocampal neuronal damage after transient cerebral ischemia in rats. **Brain Res. Bull.** v. 40, n. 3 p. 229-236, 1996.

- ORDY J. M., WENGENACK T. M., BIALOBOCK P., COLEMAN P. D., RODIER P, BAGGS R. B., DUNLAP W. P. e KATEST B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Exp. Neurol.** v. 119, p. 128-139, 1993.
- PANDEY P., FARBER R., NAKAZAWA A., KUMAR S., BHARTI A., NALIN C., WEICHSELBAUM R., KUFE D. e KHARBANDA S. HSP27 functions as negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. **Oncogene** v. 19, p. 1975-1981, 2000.
- PARPURA V., BASARSKI T. A., LIU F., JEFTINIJA S. e HAYDON P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature** v. 369, p. 744-747, 1994.
- PASTI L., VOLTERRA A., POZZAN T. e CARMIGNOTO G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. **J. Neurosci.** v. 17, n. 20, p. 7817-7830, 1997.
- PEREZ VELAZQUEZ J.L., FRANTSEVA ,V. e CARLEN P.L. In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. **J. Neurosci.** v. 17, p. 9085-9094, 1997.
- PETERS A. e PALAY S. L. The morphology of synapses. **J. Neurocytol.** v. 25, n. 12, p. 687-700, 1996.

- PHILLIS J. W., O'REGAN M. H., ESTEVEZ A. Y., SONG D. e VANDERHEIDE S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **J. Neurochem.** v. 67, p. 1525-1531, 1996.
- PLUMIER J. C. L., ARMSTRONG J. N., LANDRY J., BABITY J. M., ROBERTSON H. A. e CURRIE R. W. Expression of the 27,000 mol. wt heat shock protein following kainic acid-induced status epilepticus in the rat. **Neuroscience** v. 75, p. 849-856, 1996.
- PLUMIER J. C., DAVID, J. C., ROBERTSON H. Á. e CURRIE R. W. Cortical application of potassium chloride induces the low molecular weight heat shock protein (HSP27) in astrocytes. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 17, n. 7, p. 781-790, 1997.
- PORTER J. e McCARTHY K. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. **J. Neurosci.** v. 16, n. 16, p. 5073-5081, 1996.
- PRÉVILLE X., SCHULTZ H., KNAUF U., GAESTEL M. e ARRIGO A. P. Analysis of the role of HSP25 phosphorylation reveals the importance of the oligomerization state of this small heat shock protein in its protective function against TNFK- and hydrogen peroxide-induced cell death. **J.Cell. Biochem.** v. 69, p. 436-452, 1998.
- PRINGLE A. K., IANNOTTI F., WILDE G. J. C., CHAD J. E., SEELEY P. J. e SUNDSTROM L. E. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in in vitro ischemia. **Brain Res.** v. 755, p. 36-46, 1997a.

- PRINGLE A. K., ANGUNAWELA R., WILDE G. J., MEPHAN J. A., SUNDSTROM L. E. e IANNOTTI F. Induction of 72-kDa heat-shock preotein following sub-lethal oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** v. 23, p. 289-298, 1997b.
- PRINGLE A. K., THOMAS S. J., SIGNORELLI F. e IANNOTTI F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). **Brain Res.** v. 845, p. 152-164, 1999.
- PULSINELLI W. A., JACEWICZ M., LEVY D. E., PETITO C. K. e PLUM F. Ischemic brain injury and the therapeutic window. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 835, p. 187-193, 1997.
- RAINE C. S. Neurocellular anatomy, p. 3-32. **Basic Neurochemistry.** 5.ed., New York, Raven Press, 1994.
- RAPS S. P., LAI J. C. K., HERTZ L. e COOPER J. L. glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. **Brain Res.** v. 493, p. 398-401, 1989.
- RAVATI A., AHLEMEYER B., BECKER A., e KRIEGLSTEIN J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species. **Brain Res.** v. 866, p. 23-32, 2000.
- RAY A. M., OWEN D. E., EVANS M. L., DAVIS J. B. e BENHAM C. D. Caspase inhibitors are functionally neuroprotective against oxygen glucose deprivation induced CA1 death in rat organotypic hippocampal slices. **Brain Res.** v. 867, p. 62-69, 2000.

- RIDET J. L., MALHOTRA S. K., PRIVAT A. e GAGE F. H. Reactive astrocytes: celular and molecular cues to biological fuction. **Trends Neurosci.** v. 20, p. 570-577, 1997.
- ROGALLA T., EHRNSPERGER M., PREVILLY X., KOTLYAROV I. A., LUTSCH G., DUCASSE C., PAUL C., WIESKE M., ARRIGO A.-P., BUCHNER J. e GAESTEL M. Regulation of hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. **J. Biol. Chem.** v. 274, n. 27, p. 18947-18956, 1999.
- ROSENBLUTH J. Glial membranes and axoglial junctions. Neuroglia. Oxford University Press, New York, 1995.
- SATOH J. e KIM S.U. Differential expression of heat shock protein HSP27 in human neurons and glial cells in culture. **J. Neurosci. Res.** v. 41, p. 805-818, 1995.
- SCHMIDT-KASTNER R. e FREUND T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience** v. 40, p. 599-636, 1991.
- SCHNEIDER G. B., HAMANO H. e COOPER L. F. In vivo evaluation of HSP27 as an inhibitor of actin polymerization: HSP27 limits actin stress fibers and focal adhesion formation after heat shock. **J. Cell. Physiol.** v. 177, p. 575-584, 1998.
- SCHNEIDER G. H. e BAETHMANN A. Mechanism of glial swelling induced by glutamate. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 70, p. 334S-343S, 1992.
- SCHREIBER S. S. e BAUDRY M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus - a role for gene expression. **TINS** v. 18, p. 446-451, 1995.

- SCHURR A., PAYNE R. S., MILLER J. J. e RIGOR B. M. Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. **Brain Res.** v. 774, n. 1-2, p.221-224, 1997.
- SEMKOVA I. e KRIEGLSTEIN J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. **Brain Res. Rev.** v. 30, n. 2, p. 176-188, 1999.
- SHARP F. R., MASSA S. M. e SWANSON R. A. Heat shock protein protection. **Trends Neurosci.** v. 22, n. 3, p. 97-99, 1999.
- SNYDER S.H., JAFFREY S.R. e ZAKHARY R. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. **Brain Res Rev.** v. 26, p. 167-175, 1998.
- SONNEWALD, U., WESTEGAARD N. e SCHOUSBOE A. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. **Glia** v. 21, p. 56-63, 1997.
- STAUB F., PETERS J., KEMPSKI O., SCHNEIDER G., SCHÜRER L. e BAETHMANN A. Swelling of glial cells in lactic acidosis and by glutamate: significance of Cl⁻ transport. **Brain Res.** v. 610, p. 69-74, 1993.
- STEINHAUSER C. e GALLO V. News on glutamate receptors in glial cells. **Trends Neurosci.** v. 19, n. 8, p. 339-345, 1996.
- STOKOE D., ENGEL K., CAMPBELL D. G., COHEN P. e GAESTEL M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. **FEBS Lett.** v. 131, n. 3, p. 307-313, 1992.

- STOPPINI L., BUCHS P. A. e MULLER D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **J Neurosci Methods** v. 37, p. 173-82, 1991.
- STRASSER U. e FISCHER G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **J Neurosci Methods** v. 57, p. 177-186, 1995.
- STRIGGOW F., RIEK M., BREDER J., HENRICH-NOACK P., REYMANN K. G. e 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.** v. 97, n. 5, p. 2264-2269, 2000.
- SUZUKI H., ABE K., TOJO S., MOROOKA S., KIMURA K., MIZUGAKI M. e ITOYAMA Y. Expressions of P-selectin- and HSP72-like immunoreactivities in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. **Brain Res.** v. 759, p. 321-329, 1997.
- SWEENEY M., YAGER J. Y., WALZ W. e JUURLINK B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 73, p. 1525-1535, 1995.
- TANSEY F. A., FAROOQ M. e CAMMER W. Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence. **J. Neurochem.** v. 56, n. 1, p. 266-272, 1991.
- TASKER R. C., COYLE J. T. e VORNOV J. J. The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. **J. Neurosci.** v. 12,

p. 4298–4308, 1992.

TAVARES A., CIMAROSTI H., VALENTIM L. e SALBEGO C. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. **Neuroreport** v. 12, p. 2705-2709, 2001.

TAYLOR D., OBRENOVITCH T. P. e SYMON L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochem. Res.** v. 21, p. 1013-1021, 1996.

TSACOPOULOS M. e MAGISTRETTI P. Metabolic coupling between glia and neurons. **J. Neurosci.** v. 16, p. 877-885, 1996.

TSUJI M., INANAMI O. e KUWABARA M. Neuroprotective effect of α -phenyl-N-tert-butyl-nitron in gerbil hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway and heat shock proteins. **Neurosci. Lett.** v. 282, p. 41-44, 2000.

VALENTIM L. M., MICHALOWSKI C. B., GOTTARDO S. P., PEDROSO L., GESTRICH L. G., NETTO C. A., SALBEGO C. G. e RODNIGHT R. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunoccontent in rat hippocampus. **Neuroscience** v. 91, n. 4, p. 1291-1297, 1999.

WADA T., KONDOH T. e TAMAKI N. Ischemic "cross" tolerance in hypoxic ischemia of immature rat brain. **Brain Res.** v. 847, n. 2, p. 299-307, 1999.

WAGSTAFF M. J. D., COLLAÇO-MORAES Y. C., SMITH J., BELLEROCHÉ J. S., COFFIN R. S. e LATCHMAN D. S. Protection of Neuronal Cells from Apoptosis by Hsp27 Delivered with a Herpes Simplex Virus-based

Vector. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 5061-5069, 1999.

WAGSTAFF M. J. D., COLLAÇO-MORAES Y., ASPEY B. S., VOHN R. S., HARRISON M. J. G., LATCHMAN D. S. e BELLEROCHÉ J. S. Focal cerebral ischemia increases the levels of several classes of heat shock proteins and their corresponding mRNAs. **Mol. Brain Res.** v. 42, p. 236-244, 1996.

WALZ W. Role of astrocytes in the spreading depression signal between ischemic core and penumbra. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 21, n. 2, p. 135-142, 1997.

WELSH M. J. e GAESTEL M. Small heat-shock protein family: function in health and disease. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 851, p. 28-35, 1998.

WHITE B. C., SULLIVAN J. M., DEGRACIA D. J., BRIAN J. e O'NEIL B. J. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J. Neurol. Sci.** v. 179, p. 1-33, 2000.

WHITFIELD P. C., WILLIAMS R. e PICKARD J. D. Delayed induction of JunB precedes CA1 neuronal death after global ischemia in the gerbil. **Brain Res.** v. 818, n. 2, p. 450-458, 1999.

XI G., HUA Y., KEEP R. F., DUONG H. K. e HOFF J. T. Activation of p44/42 mitogen activated protein kinases in thrombin-induced brain tolerance. **Brain Res.** v. 895, p.153-159, 2001.

YAGITA Y., KITAGAWA K., OHTSUKI T., TANAKA S., HORI M. e MATSUMOTO M. Induction of the HSP110/105 family in the rat hippocampus in cerebral ischemia and ischemic tolerance. **J. Cereb.**

Blood Flow Metab. v. 21, p. 811-819, 2001.

YANG G., KITAGAWA K., OHTSUKI T., KUWABARA K., MABUCHI T., YAGITA Y., TAKAZAWA K., TANAKA S., YANAGIHARA T., HORI M. e MATSUMOTO M. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. **Brain Res.** v. 870, n. 1-2, p. 195-198, 2000.

YANO S., MORIOKA M., FUKUNAGA K., KAWANO T., HARA T., KAI Y., HAMADA J., MIYAMOTO E. e USHIO Y. Activation of Akt/Protein Kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. **J. Cer. Blood Flow Metab.** v. 21, p. 351-360, 2001.

ZANOTTI S. e CHARLES A. Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intracellular signaling. **J. Neurochem.** v. 69, p. 594-602, 1997.

ZHAN R. Z., WU C., FUJIHARA H., TAGA K., QI S., NAITO M. e SHIMOJI K. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 21, n. 5, p. 529-540, 2001.

ZOU J., GUO Y., GUETTOUCHE T., SMITH D.F. e VOELLMY R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. **Cell** v. 94, p. 471-480, 1998.