

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Estudo do efeito neuroprotetor da oxcarbazepina
em culturas organotípicas de hipocampo à
privação de oxigênio e glicose**

FABRÍCIO SIMÃO

Orientadora:

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO

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

Porto Alegre

2006

*Aos meus pais Marco e Marta,
pelo exemplo de amor,
dedicação, honestidade e educação
que sempre foram e serão os
pilares de minha vida
e do futuro de nossas famílias.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

A professora Christianne Salbego, pela oportunidade da orientação, amizade, paciência, dedicação e incentivo durante estes dois anos de trabalho, através de uma convivência amigável, profissional e produtiva;

Aos colegas de laboratório Rudimar, Daniéli, Ricardo, Patrícia D., Katiane, Juliana, Michele, Patrícia, Caroline, Helena, Ana Paula, Lauren, Melissa e Alessandra, pelo incentivo, ajuda com reagentes e experimentos, discussões e troca de informações para uma convivência pacífica e formadora de opiniões e pelas risadas;

Aos funcionários do departamento: Cléia, Verlaine, Valdemar e pessoal do ratário;

A minha querida e amada família, minhas avós Célia e Lourdes (*in memorian*), todos os meus tios e primos pelo apoio e carinho;

A minha querida irmã, pela atenção, carinho e paciência;

A CAPES pela bolsa concedida;

Aos meus amigos (LOS AMIGOS), que souberam entender a minha ausência nas horas difíceis da dissertação;

Aos ensinamentos da vida.

ÍNDICE

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
APRESENTAÇÃO.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Doenças Neurodegenerativas.....	2
1.1. Isquemia Cerebral.....	2
1.1.2. Eventos Envolvidos na Morte Celular Após a Isquemia.....	3
1.1.3. Vulnerabilidade Seletiva do Hipocampo.....	5
1.1.4. Modelos Experimentais de Isquemia.....	7
1.1.4.1. Modelos <i>in vivo</i>	7
1.1.4.2. Modelos <i>in vitro</i>	8
1.2. Neuroproteção.....	9
1.2.1 Drogas Antiepilépticas.....	9
1.2.1.1 Oxcarbazepina.....	11
1.3. Proteínas de Interesse.....	13
1.3.1. Proteína Akt.....	13
1.3.1.1 Via da PI3-K e Fosforilação da Akt.....	14
1.3.1.2. Funções da Akt no bloqueio da apoptose.....	15
1.3.1.3. Alterações na Akt após Isquemia.....	16
1.3.2. Proteína GSK-3 β	17
OBJETIVOS.....	20
ARTIGO.....	23
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	65
PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

RESUMO

Muitas similaridades existem entre isquemia cerebral e epilepsia a respeito de dano cerebral e mecanismos de autoproteção que são ativados próximos à lesão. Oxcarbazepina (OXC), droga anticonvulsivante, atua bloqueando os canais de sódio voltagem-dependentes, aumentando a condutância de potássio e modulando os canais de cálcio voltagem-dependentes. Nosso objetivo nesse trabalho foi analisar o perfil de neuroproteção da OXC e investigar o possível envolvimento da via de sinalização celular PI3-K (fosfatidil inositol 3-cinase), uma via conhecida por seus efeitos proliferativos e antiapoptótico. Para mimetizar uma isquemia, culturas organotípicas de fatias hipocâmpais de ratos Wistar de 6-8 dias foram expostas à privação de oxigênio e glicose (POG). A adição da OXC (30 μ M) antes da indução da lesão aumentou a sobrevivência neuronal no hipocampo de culturas organotípicas expostas a POG por 60 minutos, observado pela diminuição da incorporação de IP. Este efeito neuroprotetor foi prevenido por LY294002 (inibidor de PI3-K). Este resultado indica um possível envolvimento da via Akt na neuroproteção. Para investigar se a proteína Akt, uma cinase ativada pela PI3-K, estava envolvida na neuroproteção das células as condições de POG, analisamos a fosforilação e o imunoconteúdo dessa cinase em 1, 6 e 24 horas depois da reperfusão. Nenhuma alteração foi observada nesses parâmetros, sugerindo que, nesse caso, a fosforilação da Akt não está envolvida na neuroproteção mediada pela OXC. Da mesma maneira não foi observada alteração em 1, 6 e 24 horas na GSK-3 β , uma cinase logo abaixo na via Akt, e pró-apoptótica, sugerindo que, nesse caso, a fosforilação da GSK-3 β não está envolvida na neuroproteção mediada pela OXC. Juntos, os resultados deste trabalho mostram um claro efeito neuroprotetor da OXC contra a lesão isquêmica, que entretanto, não envolve a via de sinalização da Akt/GSK-3 β . Embora a reversão da proteção ao tratamento, com o inibidor da PI3-K, seja um indício de que uma via possa ser ativada pela PI3-K e estar envolvida na neuroproteção. Os dados suportam a idéia que a OXC poderia ser utilizada na profilaxia e/ou tratamento da isquemia cerebral.

ABSTRACT

Many similarities exist between cerebral ischemia and epilepsy regarding brain-damaging and auto-protective mechanisms that are activated following the injurious insult. Oxcarbazepine (OXC), an anticonvulsant drug, acts blocking voltage-gated sodium channels, enhanced potassium current and modulating voltage-dependent calcium channels. Our goal in this study was to analyze the profile of neuroprotection presented by oxcarbazepine (OXC) and investigate a possible involvement of PI3-K (phosphatidylinositol 3-Kinase) pathway, a pathway known by its proliferative and pro-survival effects. To mimic the ischemia, organotypic hippocampal slice cultures from 6-8 days old Wistar rats were exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD). The addition of oxcarbazepine (30 μ M) before the lesion induction, increased the cellular survival in organotypic culture of hippocampus exposed to OGD for 60 minutes, as observed by the decreased of PI incorporation. This effect was prevented by LY294002 (PI3-K inhibitor), suggesting that the PI3-K is involved in the neuroprotection by OXC observed in our model of cell death. To investigate whether Akt protein, a downstream kinase in PI3-K pathway, was involved in the neuroprotection after OGD conditions, we measured the phosphorylation and immunocontent of this protein after 1, 6 and 24 hours of reperfusion. No alterations were observed in these parameters, suggesting that, in this case, phosphorylation of Akt is not involved in the neuroprotection promoted by OXC. In the same way, GSK-3 β , a downstream Kinase in the Akt pathway, and pro-apoptotic enzyme, was analyzed in the neuroprotection of cells after OGD conditions. We measured the phosphorylation and immunocontent of this protein after 1, 6 and 24 hours of reperfusion. No alterations were observed in these parameters, suggesting that, in this case, phosphorylation of GSK-3 β is not involved in the neuroprotection promoted by OXC. Taken together, the results of the present work show the ability of OXC to reduce cellular damage induced by OGD. Probably the PI3-K pathway is not a major player in the neuroprotection, but we can not discard the involvement of modulation of their activity on other proteins. This support to the idea that the OXC may be useful in the prophylaxis and/or treatment of brain ischemia.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada na forma de artigo científico da seguinte maneira:

Capítulo I: apresenta uma breve introdução sobre o tema a ser investigado, abordando aspectos que foram essenciais para a formulação da proposta de trabalho.

Capítulo II: apresenta os métodos e resultados, assim como as referências bibliográficas específicas, na forma de artigo científico submetido à revista Neuroscience Research em janeiro de 2005.

Capítulo III: nesta seção é feita uma discussão dos resultados obtidos bem como as conclusões gerais do trabalho.

Capítulo IV: perspectivas sobre as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir dos resultados obtidos.

Referências Bibliográficas: lista as referências citadas na introdução e discussão da dissertação.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Cascata neurotóxica na isquemia e na recirculação.....6
- Figura 2:** Funções do Na⁺ e canais de Na⁺ na isquemia.....11
- Figura 3:** Estrutura química da Oxcarbazepina e seu metabólito MHD.....12
- Figura 4:** Modelo do mecanismo de ativação de Akt/PKB por fatores de crescimento.....15
- Figura 5:** Vias de sinalização da proteína Akt.....16
- Figura 6:** Vias de sinalização de regulação da GSK-3 β e fatores de transcrição regulados pela GSK-3 β18
- Figura 7:** Envolvimento da via PI3-K/Akt na inibição da GSK-3 β19

ARTIGO

- Figura 1:** Effect of OXC on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures.....49
- Figura 2:** Effect of LY294009 on neuroprotective effect of OXC on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures...50
- Figura 3:** Effect of treatment with oxcarbazepine and LY294002 on the percentage of phosphorylated Akt in organotypic hippocampal cultures 24 h after OGD.....51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABLE 1: Immunoblot analysis of ratio pAkt/Akt and pGSK-3 β /GSK-3 β in hippocampus of organotypic culture at 1, 6 and 24 h after OGD induction.....	48
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- Akt:** Homóloga celular ao oncogene viral v-Akt
- ATP:** Adenosina Tri-Fosfato
- Bcl:** Oncogene da célula B (*B cell leukemia oncogene*)
- CA:** Corno de Ammon (*Cornus Ammonis*)
- Caspase:** Protease com cisteína no sítio ativo e capaz de clivar outras proteínas após resíduos de aspartato (*Cysteine-dependent aspartate-specific protease*)
- C/EBP:** (CCAAT/Enhancer-Binding Protein)
- CREB:** Proteína responsiva ao AMPc (cAMP response element-binding protein)
- DG:** Giro Denteado (*Dentate Gyrus*)
- EPD:** Dia pós-natal equivalente (Equivalent Postnatal Day)
- ERK:** Cinase regulada por sinais extracelulares
- FKHR:** (Forkhead in Rhabdomyosarcoma)
- GSK-3 β :** Glicogênio Sintase Cinase 3 beta (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta)
- HSF-1:** (Heat Shock Factor-1)
- IKK:** Cinase do inibidor de NF- κ B
- LY:** LY294002, inibidor da PI3-K
- MHD:** 10-monohidróxi derivado
- Myc:** oncogene viral v-myc
- NFATc:** (Nuclear Factor of Activated T-cells)
- NF- κ B:** Fator de crescimento neuronal
- PDK:** Proteína Cinase Dependente de Fosfoinositóis-3
- POG:** Privação de Oxigênio e Glicose
- PI3-K:** Fosfoinositol 3-cinase (Phosphoinositide 3-Kinase)
- PKA:** Proteína Cinase A
- PKB:** Proteína Cinase B
- PKC:** Proteína Cinase C
- PTEN:** Fosfatase da PI3-K
- SNC:** Sistema Nervoso Central
- TTX:** Tetrodotoxina

CAPÍTULO I

Introdução e Objetivos

1. Doenças Neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas afetam um amplo espectro da população e, na maioria dos casos, elas levam à incapacidade física e/ou mental, envolvendo memória, cognição, linguagem e personalidade (Price, 1999). Dentre essas doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), podemos destacar as desordens cerebrovasculares, a epilepsia, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a esclerose múltipla. Para cada uma dessas doenças, na maioria das vezes, apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis.

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

1.1. Isquemia cerebral

A isquemia cerebral, popularmente conhecida como acidente vascular cerebral (AVC) ou derrame, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Ela está intimamente ligada a uma variedade de fatores de risco como hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes (Price, 1999). Contudo, muitos pacientes que sofrem a isquemia sobrevivem e experimentam as conseqüências do dano por anos, muitas vezes em nível emocional, motor e/ou intelectual. Apesar dos constantes esforços, ainda não se conhece um tratamento que conduza à prevenção da ocorrência ou redução das conseqüências clínicas da isquemia (Juurlink & Sweeney, 1997).

O metabolismo energético no cérebro apresenta algumas características especiais, como a alta taxa metabólica, reservas energéticas limitadas e uma alta dependência do metabolismo aeróbico da glicose. Por essa razão, o cérebro é mais vulnerável ao dano isquêmico do que os outros tecidos. A

isquemia é caracterizada por uma forte redução ou por um bloqueio completo do fluxo sangüíneo ao cérebro (Siesjo, 1978). Devido à própria natureza desta lesão, o dano resultante é produto da combinação de vários fatores patofisiológicos que interagem de forma complexa. O tipo mais freqüente de isquemia em humanos é a **isquemia focal**, que é definida como a interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do cérebro. Outro tipo é a **isquemia global**, que resulta da interrupção transitória do fluxo sangüíneo para todo o cérebro, como ocorre durante uma parada cardíaca. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, a volta da circulação sangüínea pode aumentar ainda mais a morte neuronal, em especial nas áreas mais vulneráveis do cérebro (Siegel *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1996; White *et al.*, 2000).

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

1.1.2. Eventos envolvidos na morte celular após isquemia

A morte celular depois de uma isquemia pode ser imediata ou tardia. Ainda não há um consenso entre o tipo de morte que ocorre após a lesão isquêmica. Utilizando modelos *in vivo*, alguns pesquisadores observaram apenas necrose (Colbourne *et al.*, 1999; Yamashima, 2000), enquanto outros observaram necrose combinada com apoptose ou apenas apoptose (Zeng & Xu, 2000; Cao *et al.*, 2001; Niwa *et al.*, 2001; Zhan *et al.*, 2001).

Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, sozinhos ou combinados, levam ao dano neuronal pós-isquêmico: falta de energia (ATP), aumento de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos e formação de radicais livres (Taylor *et al.*, 1996; Juurlink & Sweeney, 1997; Dirnagl *et al.*, 1999; Frantseva *et al.*, 2001).

Quando os estoques de energia esgotam-se (sendo o ATP depletado pelo uso e pela não formação devido à falta de oxigênio na cadeia respiratória)

ocorre diminuição da função das bombas iônicas, como a Na⁺-K⁺-ATPase, o mais importante transportador responsável pela manutenção das altas concentrações intracelulares de K⁺ (~155 mM) e pelas baixas concentrações intracelulares de Na⁺ (~12 mM). A perda funcional desta bomba iônica ocasiona a redução dos gradientes iônicos transmembrana, com isso, o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização (Dugan & Choi, 1994). Conseqüentemente, os canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem são ativados e estimulam a liberação dos estoques vesiculares de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, particularmente o glutamato (Choi, 1995; De Keyser *et al.*, 1999). Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptção pré-sináptica de neurotransmissores, são bloqueados, aumentando ainda mais o acúmulo de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular. A ativação de receptores glutamatérgicos leva ao aumento do cálcio intracelular pela abertura direta de canais de cálcio (receptores ionotrópicos), pela ligação aos receptores ligados a proteínas G (receptores metabotrópicos) e favorecendo a saída do Ca²⁺ do retículo endoplasmático. Como resultado da ativação glutamatérgica, íons Na⁺ e Cl⁻ entram nos neurônios através de canais iônicos, juntamente com a água, levando a um inchamento das células – o edema (Dirnagl *et al.*, 1999).

O aumento no Ca²⁺ intracelular, um dos principais segundos mensageiros das células, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, causando danos no tecido através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases e outras enzimas que causam danos em vários locais da célula, levando-a a morte (Mitani *et al.*, 1993). Alguns exemplos que podem ser citados aqui são: a ativação da fosfolipase A₂ e da ciclooxygenase geram radicais livres esgotando os estoques de antioxidantes, aumentando o dano através de peroxidação lipídica e danos na membrana; o aumento do óxido nítrico gerado pela enzima óxido nítrico sintase, que nessas condições, também promove danos ao tecido e pode levar à apoptose e a ativação de calpaínas, proteínas ativadas por cálcio que podem ativar as catepsinas lisossomais responsáveis pela ruptura da organela e proteólise do material citoplasmático (Sweeney *et al.*, 1995; Phillis *et al.*, 1996; Iadecola, 1997; Yamashima, 2000).

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

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

1.1.3. Vulnerabilidade seletiva do hipocampo

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

No hipocampo, as células piramidais da região CA1 são sensíveis, enquanto as células piramidais da região vizinha CA3 são resistentes. No giro denteado (DG) as células granulares são resistentes, enquanto no hilo somente uma sub-população de células parece ser vulnerável (Hsu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Depois de 20-30 minutos de isquemia *in vivo* no rato, as áreas CA1, CA2 e o hilo são afetadas, enquanto as células das regiões CA3 e DG permanecem aparentemente normais. Os neurônios da região CA1 e do hilo são, talvez, os mais vulneráveis de todo o cérebro. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue a seqüência: CA1>hilo>CA2>CA3>DG. É importante ressaltar que, apesar de os neurônios morrerem depois da lesão, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do cérebro (Schmidt-Kastner & Freund, 1991). Essa morte diferencial já foi demonstrada tanto *in vivo* (Ordy *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 1994;

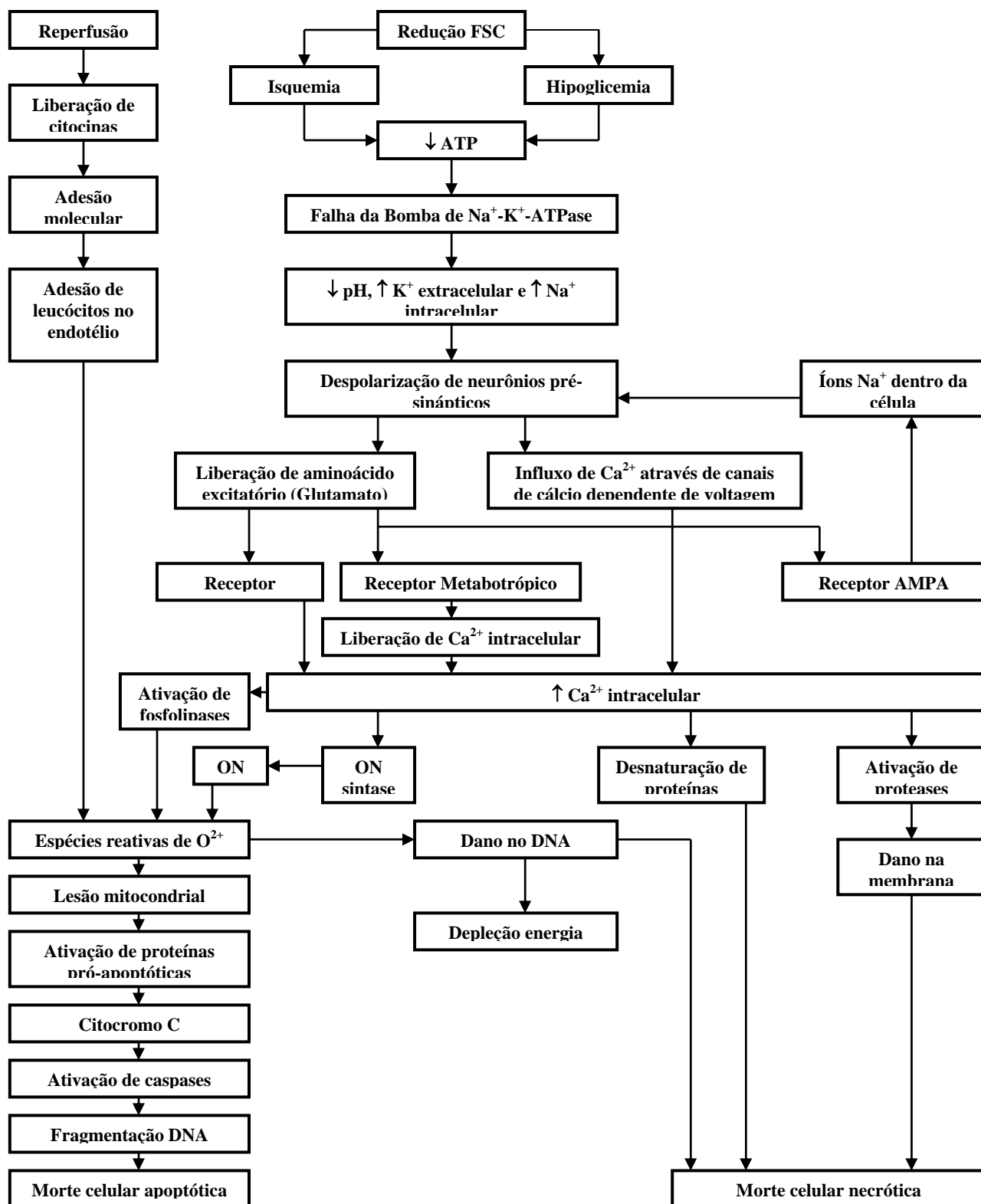


Figura 1: Cascata neurotóxica na isquemia e na recirculação. Alguns eventos principais são: despolarização descontrolada, excitação por glutamato, aumento de cálcio intracelular, geração de radicais livres e ativação da inflamação. FSC: fluxo sanguíneo cerebral; ATP: adenosina trifosfato; AMPA: *D*-amino-3-hidroxi-5-etil-4-isoxazol propionato; NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato; ON: óxido nítrico. Adaptada de Wahlgren & Ahmed, 2004.

Valentim *et al.*, 2001) quanto *in vitro* (Bernaudin *et al.*, 1998; Cimarosti *et al.*, 2001; Valentim *et al.*, 2003, Horn *et al.*, 2005).

Morte celular tardia

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

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

1.1.4. Modelos experimentais de isquemia

1.1.4.1. Modelos *in vivo*

Os modelos experimentais de isquemia *in vivo* podem ser globais, quando afetam todo o cérebro, ou focais, quando afetam uma pequena região; permanentes quando sem recirculação sanguínea ou transitórios quando seguidos da recirculação.

Isquemia cerebral global: Nestes modelos são interrompidos os grandes vasos extracranianos, simulando distúrbios circulatórios globais que acontecem durante um ataque cardíaco ou forte hipotensão (Schmidt-Kastner & 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 (Pulsinelli *et al.*, 1982; Farooqui *et al.*, 1994; Valentim *et al.*, 1999).

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

1.1.4.2. Modelos *in vitro*

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

Esse modelo de culturas foi desenvolvido em 1981 por Gähwiler e foi modificado por Stoppini e colaboradores em 1991. Basicamente, trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo, sobre uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo assim permanecer por diversas semanas. Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter a organização do tecido *in vivo* como, por exemplo, a organização existente no hipocampo (Stoppini *et al.*, 1991; Gähwiler *et al.*, 1997). A idade dessas culturas é denotada em EPD, dia pós-natal equivalente (*equivalent postnatal day*), o qual corresponde à idade que o animal tinha quando as fatias foram preparadas e colocadas em cultivo somado ao número de dias de permanência *in vitro* (Bruce *et al.*, 1995).

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

As culturas organotípicas de hipocampo são uma excelente alternativa para o estudo da isquemia cerebral, pois essas culturas mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva no hipocampo (Strasser & Fischer, 1995; Laake *et al.*, 1999; Noraberg *et al.*, 1999; Cimarosti *et al.*, 2001).

1.2. Neuroproteção

Os mecanismos neuroprotetores contra a isquemia têm focalizado principalmente o bloqueio da excitotoxicidade, que leva à morte neuronal disparada pelo transmissor excitatório glutamato e mediada pelo influxo de cálcio em níveis citotóxicos (Meldrum, 1985; Rothman & Olney, 1986; Choi *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1999).

Além da excitotoxicidade e da morte celular por necrose participarem da patogênese da lesão cerebral isquêmica, surgem evidências crescentes indicando que várias células cerebrais sofrem apoptose após a lesão isquêmica (Johnson & Deckwerth, 1993; Hengartner & Horvitz, 1994). Então, com relação à neuroproteção, as pesquisas em torno de estratégias terapêuticas buscam não apenas a inibição da necrose excitotóxica, mas também a inibição de processos apoptóticos disparados pela condição isquêmica.

1.2.1 Drogas Antiepilépticas

Muitas similaridades existem entre isquemia cerebral e epilepsia a respeito de dano cerebral e mecanismos de autoproteção que são ativados próximos à lesão (Calabresi *et al.*, 2003; Leker & Neufeld, 2003). Então, drogas que são efetivas em minimizar crises convulsivas que induzem dano cerebral podem também ter efeito na minimização da lesão isquêmica. A investigação dessa classe de drogas iniciou-se a partir da melhor compreensão dos fenômenos bioquímicos envolvidos nas lesões do SNC. Muitos anticonvulsivantes têm efeito neuroprotetor em animal (Bannan *et al.*, 1994; Shuaib *et al.*, 1995; Wiard *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Hanon & Klitgaard, 2001; Edmonds *et al.*, 2001), e em modelo *in vitro* (Calabresi *et al.*, 1996, 1999; Rekling, 2003) de isquemia cerebral e em lesão cerebral traumática (Taylor & Meldrum, 1995; Obrenovitch, 1997), podendo ser

considerado seu uso como drogas alternativas para neuroproteção em humanos. Dentre as drogas testadas, as bloqueadoras dos canais de sódio têm fornecido um forte mecanismo neuroprotetor, principalmente em modelos animais de isquemia cerebral global (Wiard *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1998; Edmonds *et al.*, 2001) e focal (Rataud *et al.*, 1994; Smith & Meldrum, 1995; Minato *et al.*, 1997). As correntes persistentes de Na^+ amplificam a despolarização e os potenciais sinápticos abaixo do patamar e servem como um marca passo para o disparo do potencial de ação; também podem manter um influxo prejudicial de Na^+ nos neurônios durante crises convulsivas ou isquemia (Taylor & Meldrum, 1995; Obrenovitch, 1997). Durante a isquemia o bloqueio dos canais de Na^+ reduziria a entrada de Na^+ e a despolarização celular, que reduziria por sua vez o influxo de Ca^{2+} através do mecanismo de troca de Na^+ - Ca^{2+} , atenuando a entrada de cálcio mediada pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (figura 2) (Taylor & Meldrum, 1995). Foi descrito que as ações neuroprotetoras de diversos moduladores dos canais de Na^+ (lamotrigina, carbamazepina, topiramato e fenitonina) foram atribuídos à redução da liberação de glutamato pelo bloqueio dos canais de Na^+ (Rataud *et al.*, 1994; Edmonds *et al.*, 2001). A liberação de glutamato durante a isquemia pode ser diferente da liberação vesicular fisiológica de glutamato, e vários estudos indicam que a liberação de glutamato decorrentes de uma isquemia em alguns modelos tem pouca ou nenhuma dependência de Ca^{2+} , e são mediados pelo transporte reverso de glutamato dependente de Na^+ (Taylor & Meldrum, 1995). Em fatias hipocámpais privadas de oxigênio e glicose, a aplicação de tetrodotoxina (TTX, bloqueador dos canais de Na^+) (Weber & Taylor, 1994; Breder *et al.*, 2000) reduziu o excesso do fluxo de glutamato. Reduzir a liberação de glutamato pode ser uma forma principal da ação neuroprotetora de bloqueadores dos canais de Na^+ dependentes de voltagem.

É notável que muitos destes agentes sejam cerebroprotetores nas doses que são relativamente livres de efeitos adversos, em contraste aos antagonistas de aminoácido ou aos bloqueadores dos canais de Ca^{2+} . Compostos como a fenitoína, carbamazepina, topiramato ou a lamotrigina podem agir nos canais de sódio impedindo a despolarização, inibindo a liberação de neurotransmissores tal como o glutamato e proteger assim o

cérebro contra o dano celular induzido pela isquemia, pela inibição pre- e pós-sináptica de neurotransmissores em excesso (Calabresi *et al.*, 1996, 2003).

1.2.1.1. Oxcarbazepina

Oxcarbazepina (OXC; 10,11-dihidro-10-óxi-5H,dibenzazepine-5-carbóxiáamida) (figura 3) é análogo do grupo ceto da carbamazepina (CBZ), com uma

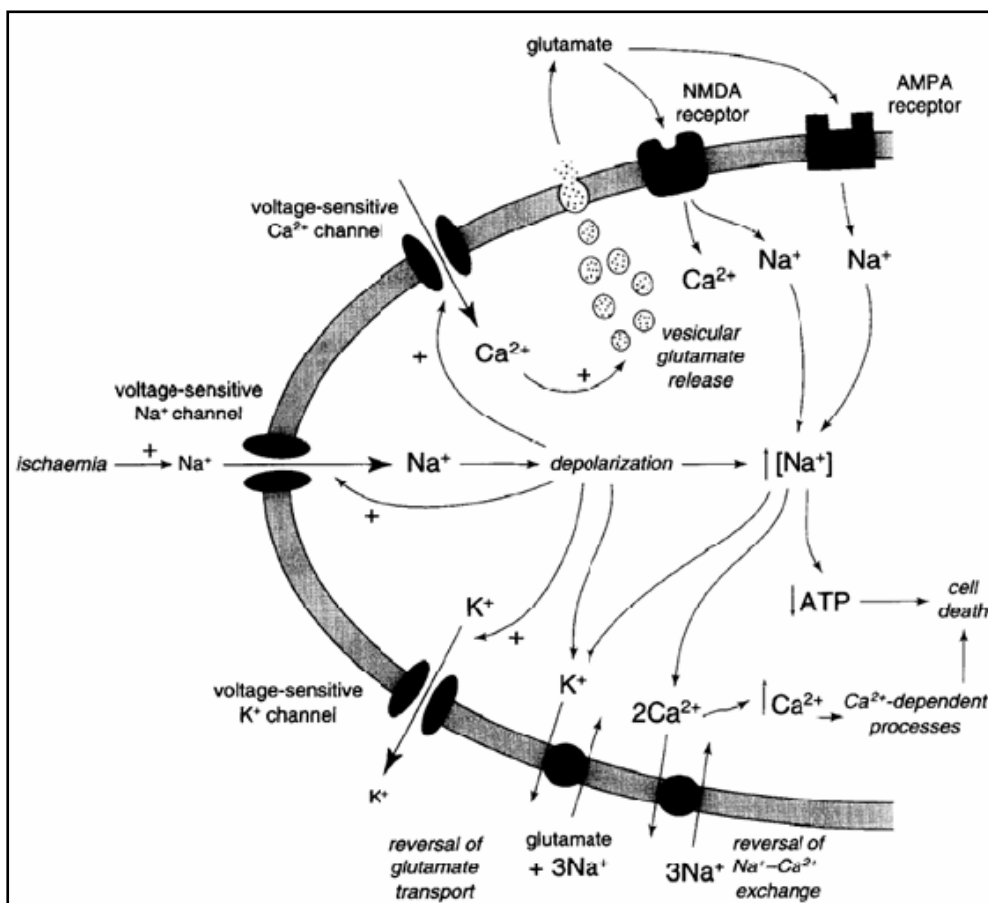


Figura 2: Funções do Na⁺ e canais de Na⁺ na isquemia. A abertura dos canais de Na⁺, despolariza o neurônio e ativa outros mecanismos dependentes de voltagem. Adaptada de Taylor & Meldrum, 1995.

eficácia anticonvulsivante comparável (Wamil *et al.*, 1994; Benes *et al.*, 1999; Tecoma, 1999; White, 1999,). Tem a vantagem de uma baixa incidência de reações alérgicas. A oxcarbazepina é indicada como uma droga antiepiléptica de primeira linha para uso como monoterapia ou terapia adjuvante para o tratamento de crises parciais (as quais envolvem os subtipos simples, complexas e crises parciais evoluindo para crises com generalização

secundária) e crises tônico-clônicas generalizadas (Shorvon, 2000; Kalis & Huff, 2001; Tecoma, 1999). A atividade farmacológica da OXC é primariamente manifestada através do metabólito MHD (10-monohidróxi derivado) da oxcarbazepina (Grant & Faulds, 1992).

Acredita-se que o mecanismo de ação da OXC e seu metabólito MHD seja baseado principalmente no bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependentes, resultando então na estabilização de membranas neurais hiperexcitadas, inibição da descarga neuronal repetitiva e diminuição da

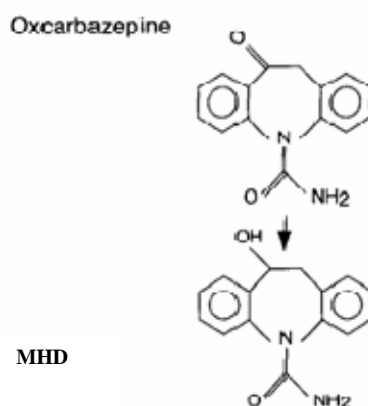


Figura 3: Estrutura química da Oxcarbazepina e seu metabólito MHD. Adaptada de Kalis & Huff, 2001.

propagação de impulsos sinápticos (McLean *et al.*, 1994; Schmutz *et al.*, 1994; Wamil *et al.*, 1994). Muitas drogas anticonvulsivantes têm múltiplos alvos moleculares, e pode-se relacionar a OXC também. Em fatias hipocâmpais, a penicilina induz descargas elétricas que podem ser inibidas pela CBZ e pela OXC (Stefani *et al.*, 1995). Propõe-se que no modelo da penicilina, o efeito da CBZ e da OXC seja devido ao aumento das correntes de potássio, que poderiam hiperpolarizar a membrana e possivelmente contribuir para o efeito anticonvulsivante. Além disso, há evidências que OXC inibe o influxo do cálcio dependente de voltagem em neurônios, que poderiam conduzir à atividade sináptica diminuída (Stefani *et al.*, 1997). Conseqüentemente, a eficácia clínica da OXC no tratamento da epilepsia pode ser o resultado de diversos mecanismos de ação.

A OXC e seu metabólito ativo (MHD) são anticonvulsivantes potentes e eficazes em animais (Schmutz *et al.*, 1994). Foram eficazes em roedores com

crises tônico-clônicas generalizadas e, em menor grau, com crises clônicas, e aboliram ou reduziram a frequência de crises parciais recorrentes cronicamente em símios com implantes de alumínio (Schmutz *et al.*, 1994). Nenhuma tolerância foi observada (por ex.: atenuação de atividade anticonvulsivante) nas crises tônico-clônicas quando camundongos e ratos foram tratados diariamente por 5 dias ou 4 semanas respectivamente, com oxcarbazepina ou MHD (Schmutz *et al.*, 1994). OXC e CBZ inibiram de uma maneira dose dependente (30-300 μ M) a liberação de glutamato, aspartato, dopamina e GABA induzida pela veratridina (Waldmeier, 1995, 1996). Foi sugerido que CBZ e OXC inibem a liberação dos neurotransmissores induzido pela veratridina através de sua capacidade em bloquear os canais de sódio voltagem dependentes (Ambrósio *et al.*, 2001)

1.3 As proteínas de interesse

1.3.1 Proteína Akt/PKB

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

A proteína PKB/Akt é ativada em resposta a tratamentos com estímulos de crescimento, incluindo PDGF (Platelet-derived growth factor), EGF (Epidermal growth factor), insulina, trombina, NGF (Nerve growth factor) e bFGF (basic fibroblast growth factor). Muitos estudos indicam que a cinase de lipídeos PI3-K (Phosphoinositide 3-OH kinase) está envolvida na regulação da PKB/Akt. Foi visto que sua ativação é dependente da sua fosforilação nos resíduos 308 e 473 (Kohn *et al.*, 1996; Belham *et al.*, 1999), como descrito abaixo.

1.3.1.1. Via da PI3-K e fosforilação da Akt

A PI3-K é formada por duas subunidades: p85 (regulatória) e p110 (catalítica). As subunidades estão dissociadas e juntam-se no momento da ativação, quando ela é capaz de fosforilar fosfoinosítídeos (PtdIns) na posição 3 do anel inositol, gerando PtdIns3P, PtdIns(3,4)P₂ e PtdIns(3,4,5)P₃. Os primeiros estudos que sugeriram que a Akt era ativada pela PI3-K basearam-se em duas observações:

1. A ativação de Akt induzida por fatores de crescimento pôde ser completamente bloqueada por wortmanina, um inibidor de PI3-K;
2. O ponto de mutação do receptor de fator de crescimento que evita a ativação de PI3-K também inibe a ativação da Akt (Coffer *et al.*, 1998).

A figura 4 mostra-nos um modelo de ativação da Akt por fatores de crescimento. Tomando como exemplo um receptor tirosina cinase, podemos observar que a fosforilação dos resíduos de tirosina é necessária para a ligação da subunidade p85 da PI3-K no receptor. Essa ligação dá-se através do domínio SH2 da proteína. Isso faz com que a subunidade p110 da PI3-K junte-se ao complexo e desencadeando a fosforilação dos fosfoinosítídeos de membrana (PtdIns3P, PtdIns(3,4)P₂ e PtdIns(3,4,5)P₃). Essa fosforilação sinaliza para as proteínas cinases dependentes de fosfoinosítíeis-3 (PDKs) 1 e 2, que são recrutadas para o local. Essas proteínas possuem ativação constitutiva e são capazes de fosforilar a Akt em dois diferentes sítios (Belham *et al.*, 1999). Estudos mostram que PDK1 fosforila Akt1 na treonina 308, sendo essa fosforilação dependente de Ca²⁺ (Yano *et al.*, 1998), enquanto que PDK2 fosforila na serina 473, parecendo que a fosforilação nos dois sítios é necessária para a completa ativação de Akt (Coffer *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1999). A fosforilação da Akt pode ser melhor compreendida baseando-se na figura 4.

A principal fosfatase capaz de inativar a cascata da PI3-K é a PTEN, já tendo sido mostrado que a sua deficiência leva a um aumento na fosforilação e na atividade da Akt (Sun *et al.*, 1999). Outra forma de inativação da Akt é sua clivagem por caspase 3, o que anula seus efeitos antiapoptóticos (François & Grimes, 1999).

Uma via alternativa que pode ser disparada pela ativação de PI3-K é a via da PDK1, que, além da Akt, possui substratos como PKC, p70S6K e ERK, capazes de aumentar a transcrição de genes que codificam proteínas de sobrevivência (Belham *et al.*, 1999; Kis *et al.*, 2003). Parece que uma vez ativada, essa via comporta-se sempre como uma via em prol da sobrevivência da célula.

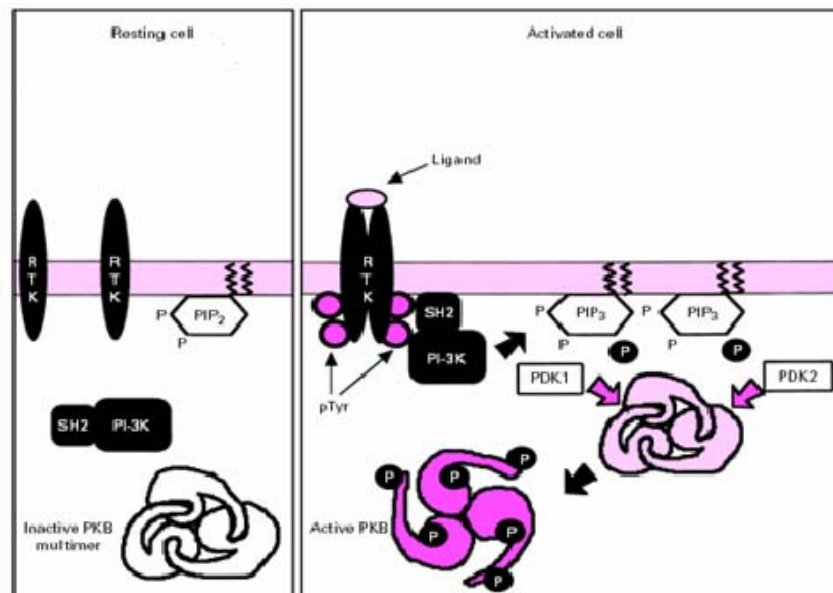


Figura 4: Modelo do mecanismo de ativação de Akt/PKB por fatores de crescimento. Adaptada de Coffey *et al.*, 1998. Akt/PKB: homóloga celular ao oncogene viral v-Akt; PDK: proteína cinase dependente de fosfoinositóis-3; PI3-K: fosfoinositol-3 cinase; RTK: receptor tirosina cinase.

1.3.1.2. Funções da Akt no bloqueio da apoptose

Estando a via da PI3-K ativada, a apoptose é bloqueada de várias maneiras. A Akt é capaz de regular proteínas envolvidas no processo da apoptose (Coffey *et al.*, 1998; Downward, 1998; Datta *et al.*, 1999; Yuan & Yankner, 2000). Já foi demonstrada a interação da Akt com FKHR, (fator de transcrição do receptor Fas), BAD (atua na mitocôndria liberando citocromo c), Caspase 9 (ativa caspase 3) e GSK-3 β , fosforilando-a e inativando-a para também por essa via bloquear a indução da apoptose.

A Akt também é capaz de interagir com proteínas como a cinase do inibidor de NF- κ B (IKK), fosforilando-a e liberando o fator de transcrição NF- κ B (Ozes *et al.*, 1999) e com a proteína responsiva ao cAMP (CREB), aumentando a transcrição direcionada por esses fatores (Du & Montminy, 1998). As

interações podem ser melhor visualizadas na figura 5. Dessa forma a proteína Akt pode atuar frente à indução de lesão celular como a falta de fatores de crescimento, por exemplo, diminuindo a morte celular.

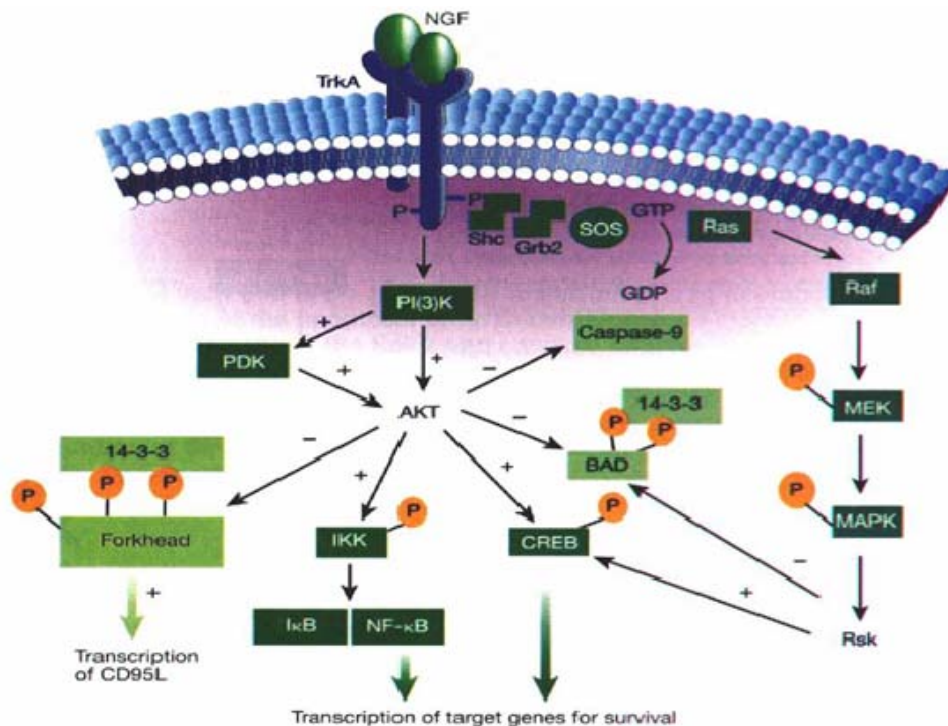


Figura 5: Vias de sinalização da proteína Akt. Adaptada de Yuan & Yankner, 2000.

Akt/PKB: homóloga celular ao oncogene viral v-Akt; PDK: proteína cinase dependente de fosfoinositol-3; PI3-K: fosfoinositol-3 cinase; NGF: fator de crescimento neuronal; IKK: cinase do inibidor de NF-κB; NF-κB: fator nuclear kappa B; CREB: proteína responsiva ao cAMP; MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos.

1.3.1.3. Alterações na Akt após isquemia

Alguns autores, utilizando modelos *in vivo* de isquemia, já demonstraram alterações na fosforilação da proteína Akt no hipocampo, utilizando tanto ratos (Ouyang *et al.*, 1999; Friguls *et al.*, 2001; Janelidze *et al.*, 2001) quanto “gerbils” (Namura *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 2001; Kawano *et al.*, 2002).

A maioria dos trabalhos que investigaram o envolvimento da proteína Akt na lesão isquêmica observaram um aumento na fosforilação da Akt em serina 473 nos mais variados tempos após a lesão. O que parece ser um consenso é que essa fosforilação volta aos níveis basais após 24 horas de recuperação e que o imunoconteúdo da proteína não é alterado nesse tempo. Quando a fosforilação em treonina 308 foi investigada, não se observou nenhuma alteração (Kitagawa *et al.*, 2002).

1.3.2. Proteína GSK-3 β

Glicogênio sintase cinase-3-beta (GSK-3 β) foi identificada em 1980 como uma das várias proteínas cinases que poderiam fosforilar a glicogênio sintase (Parker *et al.*, 1982), e rapidamente tornou-se reconhecida como um regulador central de cascatas de sinalização celular por causa da grande variedade de substratos que fosforila. Estes incluem proteínas do citoesqueleto, proteínas do ciclo celular e metabólica, e um grande número de fatores de transcrição chave. GSK-3 β é constitutivamente ativa, mas sua atividade pode ser modulada pela fosforilação. A atividade da GSK-3 β é significativamente reduzida pela fosforilação de uma serina presente na extremidade N-terminal, Ser-9 (Plyte *et al.*, 1992). Uma importante via que medeia esta modificação envolve a via PI3-K/Akt. Estimulação de PI3-K conduz a fosforilação e ativação da Akt por cinases dependentes de fosfoinosítídeos. Akt ativada, fosforila Ser-9 da GSK-3 β , que inibi sua atividade (Cross *et al.*, 1995). Várias outras cinases são capaz de fosforilar Ser-9 da GSK-3 β , incluindo p70S6 cinase, p90Rsk, PKC e PKA (Sutherland *et al.*, 1993; Goode *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 2000) (Figura 6). GSK-3 β pode também ser inibida através da fosforilação pela via de sinalização Wnt, com isso, GSK-3 β não fosforila β -catenina evitando sua degradação (Dale, 1998). GSK-3 β também modula a atividade de vários outros fatores chave, dentre eles, AP-1 (de Groot *et al.*, 1993), CREB (Shaywitz & Greenberg, 1999), NF- κ B, Myc (Grandori *et al.*, 2000), HSF-1 (Chu *et al.*, 1996), NFATc (Beals *et al.*, 1997) e C/EBP (Ross *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, GSK-3 β tornou-se reconhecida como um importante modulador da apoptose. As intrigantes ligações entre GSK-3 β e sobrevivência celular que foram identificadas são as recentes descobertas que a ativação da GSK-3 β regula a atividade de vários fatores de transcrição que são necessários para sobrevivência celular. Por outro lado, a inibição da GSK-3 β pela ativação da via PI3-K/Akt (figura 7) pode proteger neurônios de uma ampla variedade de lesões potencialmente letais. Estas observações implicam que GSK-3 β pode ser um fator inicial na morte celular. A primeira evidência que a ativação da GSK-3 β poderia estar envolvida com apoptose neuronal foi descrita por Takashima e colaboradores (1993), neste estudo, tratamento de neurônios

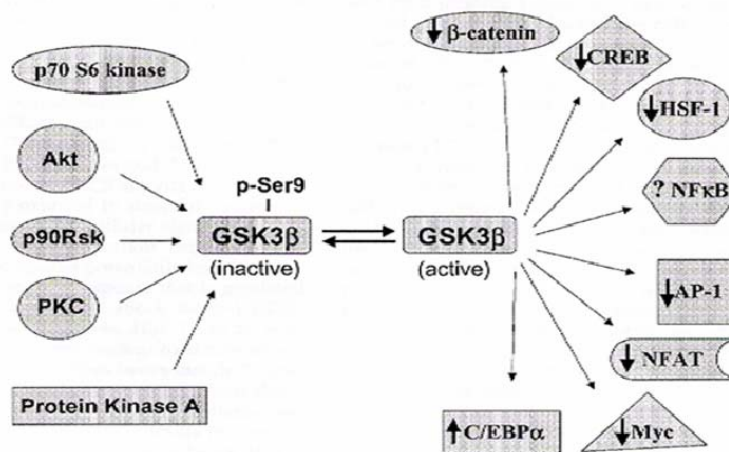


Figura 6: Vias de sinalização de regulação da GSK-3β e fatores de transcrição regulados pela GSK-3β. O esquema descreve cinco cinases que são capazes de fosforilar em Ser-9, que inibi sua atividade. Quando ativa, GSK-3β fosforila oito fatores de transcrição, modulando suas atividades indicado pelas setas. Adaptada de Jope & Bijur, 2002.

hipocampais de ratos com a proteína β-amilóide aumentou a atividade da GSK-3β e induziu a apoptose, e o tratamento com oligonucleotídeo antisense da GSK-3β preveniu a apoptose. Em outro estudo, Pap & Cooper (1998), encontraram que a super expressão da GSK-3β, ativa em células PC12 e Rat-1, foi suficiente para induzir a apoptose, sendo que a super expressão da forma cataliticamente inativa de GSK-3β reduziu a apoptose induzida por um inibidor da via da PI3-K. Estas importantes descobertas estabelecem a GSK-3β como um dos alvos da via de sinalização anti-apoptótica da PI3-k/Akt a qual causa inibição da GSK-3β, validando esta como uma enzima pró-apoptótica.

Durante os últimos anos, tem se estabelecido uma ligação direta entre a via da PI3-K/Akt e lítio (De Sarno *et al.*, 2002). Foi descrito que o lítio protegeu células contra apoptose induzida por staurosporina em células de neuroblastoma SH-SY5Y, através da inibição da GSK-3β. Além do lítio, os anticonvulsivantes, ácido valpróico e lamotrigine, mas não carbamazepina, mostraram proteger da apoptose induzida pela GSK-3β em células de neuroblastoma SH-SY5Y (Li *et al.*, 2002). Estes resultados demonstram que drogas anticonvulsivantes podem prover neuroproteção pela inibição dos efeitos pró-apoptóticos da GSK-3β.

Reduzir a apoptose neuronal é uma importante estratégia terapêutica no contexto de trauma cerebral, isquemia, epilepsia e doenças neuronais motoras.

Portanto, a função emergente da GSK-3 β como um fator pró-apoptótico em células neuronais faz desta proteína cinase um alvo terapêutico atrativo para o propósito do desenvolvimento de drogas inibitórias para tratar estas doenças.

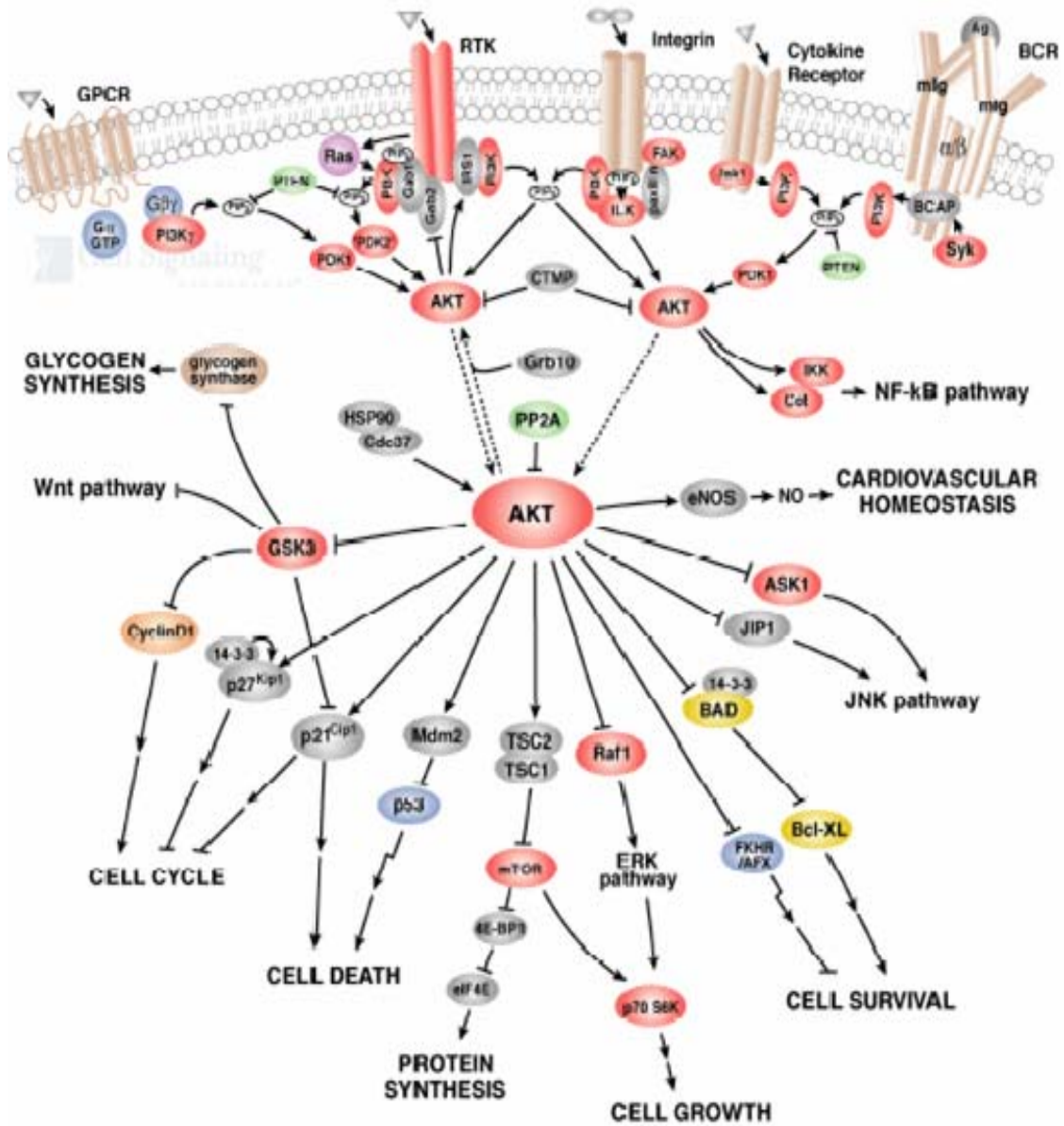


Figura 7: Envolvimento da via PI3-K/Akt na inibição da GSK-3 β . Adaptada da página <http://www.cellsignal.com>

2. Objetivos:

O objetivo geral do trabalho foi:

- Estudar a ação neuroprotetora da oxcarbazepina em um modelo *in vitro* de morte celular.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Investigar o perfil de neuroproteção da oxcarbazepina em um modelo *in vitro* de lesão isquêmica, usando culturas organotípicas de fatias hipocâmpais de ratos expostas à privação de oxigênio e glicose (POG);
- Verificar se a neuroproteção mediada pela oxcarbazepina envolve a via de sinalização celular da PI3-K através do uso de inibidor específico.
- Investigar possíveis alterações no imunoconteúdo e no estado de fosforilação da Akt e da GSK-3 β .

CAPÍTULO II

Protective Profile of Oxcarbazepine Against Oxygen-Glucose Deprivation in Organotypic Hippocampal Slice Culture Does Not Mediate Akt/GSK-3 β Pathway. Neuroscience Research, submetido

From: **Neuroscience Research** <editnsr@jnss.org>

To: **simaof@gmail.com**

Date: **Jan 20, 2006 4:02 PM**

Subject: **Submission Confirmation**

[Reply](#) | [Reply to all](#) | [Forward](#) | [Print](#) | [Add sender to Contacts list](#) | [Delete this message](#) | [Report phishing](#) | [Show original](#) | [Message text garbled?](#)

Dear Mr. Fabricio Simao,

Your submission entitled "Protective Profile of Oxcarbazepine Against Oxygen-Glucose Deprivation in Organotypic Hippocampal Slice Culture Does Not Mediate Akt/GSK-3 β Pathway" has been received by Neuroscience Research

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nsr/>.

Your username is: simaof
Your password is: simao54

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Neuroscience Research

Protective Profile of Oxcarbazepine Against Oxygen-Glucose Deprivation in
Organotypic Hippocampal Slice Culture Does Not Mediate Akt/GSK-3 β Pathway

Fabrcio Simo, Lauren L. Zamin, Rudimar Frozza, Melissa Nassif, Ana Paula
Horn, Christianne G. Salbego*

*Departamento de Bioquimica, Instituto de Ciencas Basicas da Saude, UFRGS,
Porto Alegre, RS, Brazil.*

*Corresponding author:

C. Salbego

Departamento de Bioquimica,
Instituto de Ciencas Basicas da Saude,
UFRGS, 90035-003
Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +55-51-3316-5570 (direct line)

FAX: +55-51-3316-5535

E-mail: salbego@terra.com.br

Abstract

Brain ischemia results in cellular degeneration and loss of function. Here, we investigated the neuroprotective profile of oxcarbazepine (OXC), anticonvulsant, in an *in vitro* model of ischemia. Organotypic hippocampal slice cultures were exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD). Cellular death was quantified by measuring uptake of propidium iodide (PI). OXC (30 μ M) was added to the medium before, during and after the OGD induction. A decrease of incorporation of PI was observed only when OXC was added before OGD, indicating a neuroprotective effect. To elucidate a possible mechanism by which OXC exerts its neuroprotective effect we used LY294002, a specific inhibitor of PI3-K pathway. The OXC neuroprotection was prevented by LY294002. Immunoblotting revealed that OXC 30 μ M had no effect in the phosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). These results show that OXC has a neuroprotective effect and suggest that its use in the treatment of some neurodegenerative diseases could be investigated.

Keywords: Neuroprotection, Akt, GSK-3 β , LY294002, Oxcarbazepine, oxygen and glucose deprivation, organotypic.

INTRODUCTION

Neurodegeneration is a prominent feature of cerebrovascular disorders, particularly stroke syndromes that are a major cause of morbidity and mortality in middle and later life for which no efficient therapy is presently available. The brain is highly dependent on continuous blood flow for the supply of oxygen and glucose. The reduction in the supply of these molecules to the brain that occurs in cerebral ischemia leads to a complex cascade of cellular events, resulting in severe neuronal degeneration and, consequently, in loss of brain functions (Nieber, 1999; Lipton, 1999; White et al., 2000).

Diverse *in vitro* and *in vivo* systems have been utilized to study the mechanisms underlying neuronal degeneration and to evaluate potential neuroprotective effects of pharmacological treatments. Among the *in vitro* systems used to study ischemia-induced injuries, organotypic hippocampal slice cultures, combined with oxygen–glucose deprivation (OGD), offer great advantages in that they mimic closely the situation *in vivo*. Cultured slices maintain their cellular architectures and interneuronal connections, and neurons survive during the long-term culture and physiologically mature over this period, allowing an extended survival study (Muller et al., 1993; Stoppini et al., 1991; Xiang et al., 2000; Cho et al., 2004).

Given the similarities in the death-promoting mechanism between ischemia and seizures, anticonvulsants may also have potential neuroprotective capabilities. The actions of anticonvulsants usually target the initiation and spread of seizure activity. In doing so, they may also abort some of the toxic mechanisms leading to neuronal damage associated with ischemia (Leker and Neufeld, 2003). Some anticonvulsants have neuroprotective effects

in animal and *in vitro* models of cerebral ischemia and traumatic brain injury (Taylor and Meldrum, 1995; Obrenovitch, 1997; Calabresi et al., 2003), and consequently deserve consideration as putative neuroprotectants in humans.

Oxcarbazepine (10,11-dihydro-10-oxo-carbazepine; OXC) is an anticonvulsant compound that is metabolized rapidly and completely in humans to the 10-monohydroxy compound (10-11-dihydro-10-hydroxy carbazepine; HCBZ) (Grant and Faulds, 1992; Kalis and Huff, 2001). It has been proposed that the antiepileptic activity of oxcarbazepine and HCBZ occurs as a result of blockade of voltage-gated sodium channels (Mclean et al., 1994; White, 1999) and suppress the frequency of sustained repetitive firing of action potentials *in vitro* (Wamil et al., 1994; Mclean et al., 1994). Neurochemical studies also showed that OXC binds to sodium channels and modulates sodium entry in cortical synaptosomes (Benes et al., 1999). Blockade of voltage-sensitive channels is believed to result in stabilization of neuronal membranes, inhibition of repetitive neuronal firing, decreased synaptic neurotransmission, and decreased seizure spread (Mclean et al., 1994; White, 1999; Tecoma, 1999). Thus, drugs that block sodium channels such as oxcarbazepine may prevent the release of excitotoxic amino acids and may also alter recurrent depolarizations.

Molecular and cellular targets involved in brain damage after ischemic insults have been intensively studied and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/Akt (also called protein kinase B) signaling pathway has been identified as a major mechanism supporting cellular proliferation and survival (Datta et al., 1999; Brazil and Hemmings, 2001; Brunet et al., 2001). Akt activation depends upon its phosphorylation on Ser-473, located in the C-terminal domain of the

kinase, and on Thr-308, which is in the kinase activation loop (Alessi et al., 1996; Chan et al., 1999). Activated Akt is then able to directly phosphorylate and modulate the activity of downstream target proteins, which influences multiple cellular functions such as glycogen synthesis, protein synthesis, gene expression, and the proliferation and survival of cells (Datta et al., 1999; Brazil and Hemmings, 2001; Brunet et al., 2001). One of the downstream targets of Akt is glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), which is inactivated by phosphorylation on Ser-9 by Akt (Cross et al., 1995). The importance of this regulatory action of Akt has gained recognition as widespread effects of GSK-3 β have been identified on multiple transcription factors, metabolic enzymes, cytoskeletal proteins (Grimes and Jope, 2001) and which is able to induce cellular death (Pap and Cooper, 1998). De Sarno and colleagues (2002) reported that treatment with sodium valproate caused a gradual but relatively large increase in the activation-associated phosphorylation of Akt, and a similarly gradual but more modest increase in the inhibition-associated phosphorylation of GSK-3 β . In addition, lamotrigine, but not carbamazepine, provided protection from GSK-3 β -facilitated apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells (Li et al., 2000).

The potential importance of these actions in the therapeutic led us to investigate the profile of neuroprotection of the oxcarbazepine in organotypic cultures of rat hippocampus exposed to an *in vitro* model of neuronal death using OGD and on two key components of this signaling pathway, Akt and GSK-3 β . Since several anticonvulsants recently have been shown to be effective neuroprotective, this was addressed by testing whether this agent altered the phosphorylation of Akt, which is associated with activation of Akt, or

the phosphorylation of Ser-9 of GSK-3 β , which is associated with inhibition of its activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Organotypic Hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal cultures were prepared according to the method of Stoppini et al. (1991). The local Animal Care Committee approved all animal procedures used. Hippocampal slices were obtained from 6–8-day-old Wistar rats by removing the brain, dissecting hippocampi and making transverse slices (400 μ m), using a McIlwain tissue chopper. Slices were separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (mM): glucose 36, CaCl₂ 1.26, KCl 5.36, NaCl 136.89, KH₂PO₄ 0.44, Na₂HPO₄ 0.34, MgCl₂ 0.49, MgSO₄ 0.44, HEPES 25; fungizone 1% (Gibco, Grand Island, NY, USA) and gentamicine 36 μ L/100mL (Schering[®]); pH 7.2. Six slices were placed on one Millicell culture insert (Millicell[®]-CM, 0.4 μ m, Millipore[®], Bedford, MA, USA) and the inserts were transferred to a six-well culture plate (Cell Culture Cluster, Costar[®]) with 1 ml of culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM) (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) and 25% HBSS (Gibco), supplemented with (mM, final concentration): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; fungizone 1% (Gibco) and gentamicine 36 μ L/100mL (Schering[®]); pH 7.2. The plates were then placed in an incubator at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The medium was changed every 3 days and experiments were carried out after 14 days *in vitro*.

OGD

OGD was achieved by combining hypoxia with aglycemia, according to the method described by Strasser and Fisher (1995), with some modifications (Cimarosti et al., 2001). After 14 days *in vitro*, the inserts were transferred to a sterilized 6-well plate, and incubated with 1mL of OGD medium consisting of HBSS lacking glucose for 15 min to deplete glucose from intracellular stores and extracellular space. After that, medium was replaced by one with the same composition but previously bubbled with N₂ for 30 min and the plate immediately transferred to an anaerobic chamber at 37°C with N₂-enriched atmosphere for 60 min. During this process control slices were maintained in an incubator with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. After the deprivation period, slice cultures were incubated in culture medium under normoxic conditions for 24 h, corresponding to the recovery period.

Drug exposition

Oxcarbazepine was obtained from Novartis (Basel, Switzerland), LY294002 was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). All drugs were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA). Oxcarbazepine (30 µM), DMSO (0.01%) and LY294002 (5 µM) were added to the culture medium and/or OGD medium.

The experimental treatments were: (1) drug group in which OXC (30 µM) was added to the culture medium 1h before OGD period (BEFORE) or during the OGD period (INSULT) or in the recovery period (RECOVERY); (2) vehicle group in which DMSO 0.01% was added to the culture medium 1h before OGD period, during OGD period and in the recovery period; (3) LY group in which

LY294002 (5 μ M) was added to the culture medium 2h before OGD period, and maintained during the OGD and the recovery period; (5) OXC+LY group in which LY294002 (5 μ M) was added to the culture medium 2h before OGD and maintained during the OGD and the recovery period and OXC (30 μ M) was added 1h before OGD;

Quantification of neuronal cell death

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Noraberg et al., 1999). After a recovery period of 22 h, 7.5 μ M PI (Sigma Chemical) was added to the cultures and incubated for 2 h. PI uptake is indicative of significant membrane injury (Macklis and Madison, 1990). Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 300) using a standard rhodamine filter set. Images were captured and then analysed 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 hippocampus area to obtain the percentage of damage (Valentim et al., 2003).

Western blotting assay

After obtaining the fluorescent images, cultured slices were homogenized in lysis buffer (4% sodium dodecylsulfate (SDS), 2.1mM EDTA, 50 mM Tris) 1, 6 and 24 h after OGD. Aliquots were taken for protein determination and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Proteins (Peterson, 1983) were separated (40 μ g per lane) on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to

nitrocellulose membranes using a semi-dry apparatus (Bio-Rad Trans-Blot SD, CA, USA).

Membranes were incubated for 60 min at 4°C in blocking solution (Tris-buffered saline containing 5% powdered milk and 0.1% Tween-20), and further incubated with the appropriate primary antibody dissolved in blocking solution overnight at 4°C. The primary antibody used were anti-phospho Akt (Ser-473) (pAkt, 1:1000; Cell Signaling Technology), anti-Akt (1:1000; Cell Signaling Technology), anti-phospho GSK-3 β (ser-9) (pGSK-3 β , 1:1000; Cell Signaling Technology), anti-GSK-3 β (1:1000; Cell Signaling Technology). The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:1000; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Immunoreactive bands were revealed by an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Pharmacia), and detected using X-ray films. The immunoblot films were scanned and the digitalized images analyzed with Optiquant software (Packard Instrument) (Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2005).

For each experiment, the test groups were referred to vehicle treated control cultures not exposed to OGD, which were considered 100%, thus assuring the same signal intensity for control and test groups. Data are expressed as percentage of phosphorylated protein, which was obtained by the ratio of the immunocontent of phospho-protein (Akt or GSK-3 β) with the whole amount of the protein (Akt or GSK-3 β) provide by the immunodetection assay with the total (Akt or GSK-3 β) antibody.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed for statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA) using a post-hoc Tukey's test for multiple comparisons. Differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Oxcarbazepine protects against cell death induced by OGD

The exposure of the cultures to 60 min of OGD and 24 h of recovery caused a marked fluorescence in the hippocampus, indicating a high incorporation of PI, as presented in the photomicrograph in figure 1A (OGD DMSO group). Quantification of PI fluorescence showed that OGD caused about 59% of damage in hippocampus, a significant increase compared to control cultures with a basal hippocampus damage of 3% (Fig. 1A). Propidium iodide uptake was used as a marker of cell death since studies have shown that, in organotypic cultures, this endpoint correlates well with the extent of cell death detected by other methods.

Pretreatment with 30 μ M OXC before OGD exposure significantly reduced damage in the hippocampus from 59%, without treatment, to 37%, with treatment (Fig. 1B). When 30 μ M OXC was present only during the lesion induction and maintained during the recovery period (OGD INSULT+RECOVERY), no significant difference was observed. Also, no significant difference in the neuroprotective effects with 30 μ M OXC was present only during the recovery period (OGD RECOVERY). Any difference among treatments in control slices has not been detectable, indicating that OXC

had no toxic effect in basal conditions (Fig. 1B). We have previously demonstrated (Horn et al., 2005) that cell death was not observed after a recovery period of 1 and 6 h as we have found in our results (data not show).

Neuroprotective effect of OXC involves PI3-K

In order to investigate whether the PI3-K signaling pathway was involved in the neuroprotective effect of OXC, we carried out experiments using LY294002, a specific inhibitor of PI3-K (Vlahos et al., 1994). LY294002 (5 μ M) prevented the neuroprotective effect of OXC (30 μ M), increasing the PI incorporation from 37% (OGD OXC) to 52% (OGD OXC+LY) (Fig. 2B). No neurotoxic effects were observed with inhibitors only in control culture (Fig. 2A).

OXC does not change the Akt and GSK3- β phosphorylation after OGD treatment

Considering that LY294002 abolished the neuroprotective effect of OXC, we hypothesized that OXC would induce Akt activation, a PI3-K-activated protein kinase. The status of Akt phosphorylation was examined after 1, 6 and 24 h of recovery by Western blotting with antibodies against the active form of Akt, phosphorylated at Ser-473, as well as its total immunocontent. OXC 30 μ M not changed the percentage of pAkt after OGD cultures in all recovery periods (Table 1). There were no differences in the pAkt intensity neither among controls slices nor in OGD DMSO treated group. No alteration in the total amount of Akt was observed (representative Western blotting in Fig. 3A). To confirm that LY294002 was effective in the blockage of the PI3-K pathway we measured the phosphorylation state of Akt in the presence of LY294002 after

24 h of recovery. Treatment with LY294002 reduced the ratio of pAkt/Akt (Fig. 3B) in OGD exposed, confirming the efficacy of this inhibitor.

As GSK-3 β is a substrate of PI3-K pathway and since GSK-3 β when phosphorylated has its proapoptotic activity inhibited, we investigated, by the same way to that performed to Akt/PKB, its phosphorylation state in our model after 1, 6 and 24 h after OGD and OXC treatment. We found that OXC not changed the GSK-3 β phosphorylation in OGD cultures in all recovery periods tested (Table 1). No differences were detected in the percentage of pGSK-3 β neither among controls slices nor OGD DMSO treated group. It was not detectable alteration in the total amount of GSK-3 β . LY294002 does not change the ratio of pGSK-3 β /GSK-3 β mediated by OXC (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we tested the neuroprotective effect of OXC in ischemic injury and proposed an underlying mechanism by which this neuroprotection occurs. For this purpose, we have used organotypic hippocampal slice cultures to examine its profile in an *in vitro* model of 'ischemic-like insult' using OGD, extensively employed in our research group (Tavares et al., 2001; Valentim et al., 2003; Cimarosti et al., 2005; Horn et al., 2005). Models of oxygen–glucose deprivation based on organotypic cultures demonstrate that many of the elements of the *in vivo* situation are retained, including selective vulnerability of CA1 pyramidal cells, delayed neuronal cell death, and protection by glutamate receptor antagonists (Strasser and Fischer, 1995; Pringle et al., 1997). Using this model, we have shown here that OXC at dose of 30 μ M protects organotypic hippocampal slice cultures against OGD

only when used before OGD induction. The protective effect of OXC is in accordance with the findings of Reckling (2003), showing that direct pharmacological blockade of the OXC (30 μ M) protected the hippocampus from ischemic damage. Oxcarbazepine fail to protect when used only during OGD exposition and maintained in the recovery period and/or after OGD induction.

The mechanisms by which OXC exert their anticonvulsant effect are not completely understood but may be partly due to effects on sodium and calcium ion flow across neuronal membranes. Such compounds as phenytoin, carbamazepine or lamotrigine may act at sodium channels to prevent depolarization, inhibit release of neurotransmitters such as glutamate and thus protects the cortex against cellular damage induced by focal ischaemia by both pre- and post-synaptic inhibition of abnormal neurotransmission (Rataud et al., 1994). Therefore, these drugs would have little effect on normal neuronal signalling but would block Na^+ channels under pathological conditions such as seizures or ischaemia. During ischaemia, blockade of Na^+ channels would reduce Na^+ loading and cellular depolarization, which would in turn reduce Ca^{2+} influx via the Na^+ - Ca^{2+} exchange mechanism and consequently reduce glutamate release (Taylor and Meldrum, 1995). Tetrodotoxin (TTX) significantly reduces Na^+ influx in rat hippocampal slices depolarized by hypoxia (Kass et al., 1992), suggesting that voltage- dependent channel blockers might also reduce Na^+ loading of neurones during ischaemia. The activation of voltage gated Na^+ channels thus appears to contribute to neuronal damage during the ischemic insult, but not during the recovery period (Breder et al., 2000). In the same way, OXC protect only when used before OGD period, but not during the recovery period.

The mechanisms of the neuroprotective effects of OXC are not fully understood, although some mechanisms have been proposed. In this study we proposed that OXC could mediate its neuroprotective effect by activating of signaling pathway implicated in supporting neuronal survive: PI3-K (Pettmann and Hendersen, 1998). We investigated whether OXC could activate the PI3-K pathway, therefore, we used LY294002, a specific inhibitor of PI3-K, to block its activity. The results presented here show that the neuroprotective effect of OXC was prevented by this inhibitor. These results suggest that the PI3-K is involved in the neuroprotection by OXC observed in our model of cell death.

It has been shown that the protective effects of PI3-K are mediated primarily by one of its downstream targets – Akt (Franke et al., 1997). Akt has direct effects on the apoptosis pathway, by inhibiting the pro-apoptotic proteins as, among others, Bad, caspase 9, forkhead factors and GSK-3 β (Song et al., 1995). Several reports have suggested that apoptosis is underlying the delayed neuronal death in ischemic brain injuries (MacManus et al., 1993; Nitatori et al., 1995). Studies have shown that blocking increased Akt phosphorylation by treatment with LY294002, increases subsequent DNA fragmentation (Noshita et al., 2001). Likewise, reverting the decrease in Akt phosphorylation seen immediately after brain ischemia by treatment with intraventricular administration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), rescued cells from neuronal cell death (Wang et al., 2000). Taken together, decreased Akt activity accounts for neuronal damage following brain ischemia, and increased Akt activity observed a few hours later could participate in endogenous neuroprotective responses to ischemia.

Therefore, we hypothesized that oxcarbazepine could protect neurons against cell death induced by OGD by activating PI3-k/Akt proteins. The authors observed that OXC did not change Akt phosphorylation levels after OGD, but it was abolished by LY294002, which is reported to be an irreversible inhibitor of PI3-K, suggesting that the PI3-K pathway is involved in Akt activation. No change in the amount of pAkt or Akt was observed in control slices treated with OXC. Furthermore, there was no increase in pAkt or Akt in OGD DMSO group. The current results indicate that Akt does not play a major role in inducing neuroprotection by OXC. Horn et al. (2005) did not observe any significant changes in Akt phosphorylation and immunocontent in CA1 or *Dentate Gyrus* areas of organotypic cultures exposed to OGD after 30 min, 6 and 24 h of reperfusion. However, another group reported a dramatically decrease in Akt phosphorylation at Ser-473 immediately following global brain ischemia in the hippocampus of *Wistar* rats. After this transient decrease in Akt phosphorylation, phosphorylation greatly increased within the next 24 h and declined to basal levels within 48 h (Ouyang et al. 1999). Transient upregulation of Akt phosphorylation was also observed in the global ischemic model using 4-vessel occlusion in the rat (Jin et al., 2001). One possible explanation for these apparent controversies results is that the latter used an *in vivo* model of global brain ischemia and the former used an *in vitro* model of organotypic hippocampal slice cultures exposed to OGD.

Following the PI3-K pathway, we investigated whether oxcarbazepine had effect on GSK-3 β phosphoregulation and whether this effect could involve PI3-K using LY294002. Our results indicated that OXC did not change GSK-3 β phosphorylation after OGD in any time studied (Table 1) and did not alter

inhibition by LY294002 (data not shown). No change in the amount of pGSK-3 β or GSK-3 β was observed in control slices treated with OXC. Furthermore, there was no increase in pGSK-3 β or GSK-3 β in OGD DMSO group. These results suggest that the neuroprotection mediated by OXC couldn't involve change of GSK-3 β phosphorylation after the insult. Despite the fact that organotypic cultures respond similarly to *in vivo* ischaemia, the mechanisms that result in cell death could be different and require an alternative response for this protein. There is growing evidence that GSK-3 β is involved in the pathogenesis of central nervous system diseases. There are only a handful of research reports on the expression of GSK-3 β in cerebral ischemia. GSK-3 β is present in neurons following MCAO (Sasaki et al., 2001). De Sarno and colleagues (2002) reported that treatment with sodium valproate caused a gradual but relatively large increase in the activation-associated phosphorylation of Akt on Ser-473, and a similarly gradual but more modest increase in the inhibition-associated phosphorylation of GSK-3 β on Ser-9. In addition, lamotrigine, but not carbamazepine, provided protection from GSK-3 β -facilitated apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells (Li et al., 2000).

Altogether, the authors suggest that probably the Akt/GSK-3 β pathway is not a major player in the neuroprotection by oxcarbazepine in hippocampus, however, these results suggest that the PI3-K is involved in the neuroprotection by OXC observed in our model of cell death. This is the first report investigating the possible involvement of Akt/GSK-3 β activation by OXC. It is important to point out that although Akt and GSK-3 β did not have their ratio altered in the hippocampus by OXC, we cannot discard the involvement of modulation of their activity in response to another model and/or determined brain regions. Despite

presenting data, suggesting that although our knowledge of the molecular mechanisms involved in the neuroprotective action of oxcarbazepine in ischemic damage is incomplete, its ability to reduce cellular damage induced by OGD lends support to the idea that the drug could be used in the prophylaxis and/or treatment of neurodegenerative diseases. In fact, it is possible that the drug that was used show a different pharmacological efficacy when used *in vivo*. Using electrophysiology and toxin probes, OXC could have shown neuroprotective effects to interact with Na⁺ channels in an *in vitro* model of OGD.

Acknowledgements: This work was supported by the Brazilian funding agencies CAPES, CNPq, PROPESQ/UFRGS and FAPERGS. We thank Novartis Pharmaceuticals, for the generous gift of oxcarbazepine.

REFERENCES

- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO Journal* 15, 6541–6551.
- Benes, J., Parada, A., Figueiredo, A.A., Alves, P.C., Freitas, A.P., Learmonth, D.A., Cunha, R.A., Garrett, J., Soares-da-Silva, P., 1999. Anticonvulsant and sodium channel-blocking properties of novel 10, 11 dihydro-5H-dibenz[b]fazole-5-carboxamide derivatives. *J. Med. Chem.* 42, 2582-2587.
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 657–664.

- Breder, J., Sabelhaus, C., Opitz, T., Reymann, K., Schröder, U., 2000. Inhibition of different pathways influencing Na⁺ homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. *Neuropharmacol.* 39, 1779-1787.
- Brunet, A., Datta, S.R., Greenberg, M.E., 2001. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 297–305.
- Calabresi, P., Cupini, L.M., Centonze, D., Pisani, F., Bernardi, G., 2003. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. *Neurol. Prog.* 53, 693-702.
- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., Tschlis, P.N., 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual Review in Biochemistry* 68, 965–1014.
- Cho, S., Liu, D., Fairman, D., Li, P., Jenkins, L., McGonigle, P., Wood, A., 2004. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Int.* 45, 117-127.
- Cimarosti, H., Rodnight, R., Tavares, A., Paiva, R., Valentim, L., Rocha, E., Salbego, C., 2001. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice culture of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 315, 33-36.
- Cimarosti, H., Zamin, L.L., Frozza, R., Nassif, M., Horn, A.P., Tavares, A., Netto, C.A., Salbego, C., 2005. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . *Neurochem. Res.* 30, 191-199.

- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 13, 2905–2927.
- De Sarno, P., Li, X., Jope, R.S., 2002. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharm.* 43, 1158-64.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., 1997. PI3K: downstream AKTion on blocks apoptosis. *Cell* 88, 435–437.
- Grant, S.M., Faulds, D., 1992. Oxcarbazepine. A review of its pharmacology and therapeutic potential in epilepsy, trigeminal neuralgia and affective disorders. *Drugs* 43, 873-888.
- Grimes, C.A., Jope, R.S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Progress in Neurobiology* 65, 391–426.
- Horn, A.P., Gerhardt, D., Geyer, A.B., Valetim, L., Cimarosti, H., Tavares, A., Horn, F., Lenz, G., Salbego, C., 2005. Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and Oxygen and Glucose deprivation. *Neurochem. Res.* 30, 355-361.
- Jin, K., Mao, X.O., Batteur, S.P., McEachron, E., Leahy, A., Greenberg, D.A., 2001. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience* 108, 351-358.
- Kalis, M.M., Huff, N.A., 2001. Oxcarbazepine, an antiepileptic agent. *Clin. Theraph.* 23, 680-700.

- Kass, I.S., Abramowicz, A.E., Cottrell, J.E., Chambers, G., 1992. The barbiturate thiopental reduces ATP levels during anoxia but improves electrophysiological recovery and ionic homeostasis in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* 49, 537-43.
- Leker, R.R., Neufeld, M.Y., 2003. Anti-epileptic drugs as possible neuroprotectants in cerebral ischemia. *Brain Res. Rev.* 42, 187-203.
- Li, X., Bijur, G.N., Jope, R.S., 2002. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord.* 4, 137-44.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 79, 1431-1568.
- Macklis, J.D., Madison, R.D., 1990. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J. Neurosci. Meth.* 31, 43-46.
- MacManus, J.P., Buchan, A.M., Hill, I.E., Rasquinha, I., Preston, E., 1993. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci. Lett.* 164, 89-92.
- McLean, M.J., Schmutz, M., Wamil, A.W., 1994. Oxcarbazepine: Mechanisms of action. *Epilepsia* 35, S5-S9.
- Muller, D., Buchs, P.A., Stoppini, L., 1993. Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Dev. Brain Res.* 71, 93-100.
- Nieber, K., 1999. Hypoxia and neuronal function under *in vitro* conditions. *Pharmacol. Ther.* 82, 71-86.

- Nitatori, T., Sato, N., Waguri, S., Karasawa, Y., Araki, H., Shibana, K., Kominami, E., Uchiyama, Y., 1995. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 15, 1001-1011.
- Norberg, J., Kristensen, B.W., Zimmer, J., 1999. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res. Prot.* 3, 278-290.
- Noshita, N., Lewen, A., Sugawara, T., Chan, P.H., 2001. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1442-1450.
- Obrenovitch, T.P., 1997. Sodium and potassium channels modulators: their role in neuroprotection. *Int. Rev. Neurobiol.* 40, 109-135.
- Ouyang, Y., Tan, Y., Comb, M., Liu, C., Martone, M.E., Siesjo, B.K., Hu, B., 1999. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome c, and activation of caspase-like proteases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1126-1135.
- Pap, M., Cooper, G.M., 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 19929-19932.
- Peterson, G.L., 1983. Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91, 95-119.
- Pettmann, B., Henderson, C.E., 1998. Neuronal cell death. *Neuron* 20, 633-647.
- Pringle, A.K., Angunawela, R., Wilde, G.J., Mephram, J.A., Sundstrom, L.E., Lannotti, F., 1997. Induction of 72 KDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 23, 289-298.

- Rataud, J., Debarnot, F., Mary, V., Pratt, J., Stutzmann, J.M., 1994. Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. *Neurosci. Lett.* 172, 19–23.
- Rekling, J.C., 2003. Neuroprotective effects of anticonvulsivants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 335, 167-170.
- Sasaki, C., Hayashi, T., Zhang, W.R., Warita, H., Manabe, Y., Sakai, K., Abe, K., 2001. Different expression of glycogen synthase kinase-3beta between young and old rat brains after transient middle cerebral artery occlusion. *Neurol. Res.* 23, 588-592.
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S., 1995. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell Mol. Med.* 9, 59-71.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Meth.* 37, 173-182.
- Strasser, U., Fischer, G., 1995. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J. Neurosci. Meth.* 57, 177-186.
- Tavares, A., Cimarosti, H., Valentim, L., Salbego, C., 2001. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice culture of rat hippocampus. *Neuroreport* 12, 2705-2709.
- Taylor, C.P., Meldrum, B.S., 1995. Na⁺ channels as target for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 309-316.
- Tecoma, E.S., 1999. Oxcarbazepine. *Epilepsia* 40, S37–S46.
- Valentim, L.M., Rodnight, R., Geyer, A.B., Horn, A.P., Tavares, A., Cimarosti, H., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2003. Changes in heat shock protein 27

- phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 118, 379-386.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F., 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241-5248.
- Wamil, A.W., Schmutz, M., Portet, C., Feldmann, K.F., McClean, M.J., 1994. Effects of oxcarbazepine and 10-hydroxycarbamazepine on action potential firing and generalized seizures. *Eur. J. Pharmacol.* 27, 301-308.
- Wang, J.M., Hayashi, T., Zhang, W.R., Sakai, K., Shiro, Y., Abe, K., 2000. Reduction of ischemic brain injury by topical application of insulin-like growth factor-I after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 859, 381-385.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., Brian, J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanism of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179, 1-33.
- White, H.S., 1999. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia* 40, S2-S10.
- Xiang, Z., Hrabetova, S., Moskowitz, S.I., Casaccia-Bonnel, P., Young, S.R., Nimmrich, V.C., Tiedge, H., Einheber, S., Karnup, S., Bianchi, R., Bergold, P.J., 2000. Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro. *J. Neurosci. Meth.* 98, 145-154.

Legend to Figures

Figure 1: Effect of OXC on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures. (A): Representative photomicrographs of slices stained with PI after 24 h after exposure to OGD. (B): Quantitative analysis of hippocampus damage 24 h after exposure to OGD. OGD, oxygen and glucose deprivation exposed cultures; DMSO, vehicle-treated cultures; BEFORE, Oxcarbazepine (30 μ M) was added 1h before OGD induction; INSULT+RECOVERY, OXC (30 μ M) was added during OGD induction and maintained during the recovery period; RECOVERY, OXC (30 μ M) was added after OGD period and maintained during the recovery period. Bars represent the mean \pm S.E.M., n=12. # significantly different from control and DMSO-treated OGD cultures (one-way ANOVA followed by Tukey's, $P<0.001$).

Figure 2: Effect of LY294009 on neuroprotective effect of OXC on cell damage induced by OGD for 60 min in organotypic hippocampal cultures. A: Representative photomicrographs of cultures showing PI fluorescence 24 h after exposure to OGD. B: Quantitative analysis of hippocampus damage 24 h after exposure to OGD. OXC: Oxcarbazepine (30 μ M) was added 1h before of OGD induction. LY: LY294009 (5 μ M) was added 2 h before OGD, during OGD and maintained in the recovery period. OXC+LY: Oxcarbazepine (30 μ M) was added 1h before OGD medium and LY294009 (5 μ M) was added 2h before OGD medium and maintained during the recovery. Bars represent the mean \pm S.E.M., n=9. * significantly different from control cultures (indicated by traced line). # significantly different from control cultures and OGD cultures treated with

DMSO, LY and OXC+LY (one-way ANOVA followed by Tukey's test, * $P < 0.05$; # $P < 0.001$).

Figure 3. Effect of treatment with oxcarbazepine and LY294002 on the percentage of phosphorylated Akt in organotypic hippocampal cultures 24 h after OGD. A: Representative Western blottings of pAkt and Akt revealed using specific antibodies. B: Histograms represent the quantitative Western blotting analysis of Akt phosphorylation state. The densitometric values obtained to phospho- and total-Akt from all treatments were first normalized to their respective vehicle-treated control non-exposed to OGD condition (DMSO bar) (100%). OXC: Oxcarbazepine (30 μ M) was added 1h before OGD induction. LY: LY294009 (5 μ M) was added to 2 h before OGD, during OGD and maintained in the recovery period. OXC+LY: Oxcarbazepine (30 μ M) was added 1h before OGD induction and LY294009 (5 μ M) was added to 2 h before OGD, during OGD and maintained in the recovery period. Data are expressed as a ratio of the normalized percentages of pAkt and Akt. Bars represent the mean \pm S.E.M., n=6. * significantly different from controls cultures and OGD cultures treated with DMSO, OXC and OXC+LY (one-way ANOVA followed by Tukey's test, $P < 0.01$).

Table 1

Immunoblot analysis of ratio pAkt/Akt and pGSK-3 β /GSK-3 β in hippocampus of organotypic culture at 1, 6 and 24 h after OGD induction

	pAkt/Akt				pGSK3 β /GSK3 β			
	Control		OGD		Control		OGD	
	DMSO	OXC	DMSO	OXC	DMSO	OXC	DMSO	OXC
1h	100	100 \pm 3	99 \pm 2	104 \pm 4	100	98 \pm 2	101 \pm 5	105 \pm 8
6h	100	93 \pm 8	125 \pm 6	139 \pm 9	100	92 \pm 9	85 \pm 4	85 \pm 6
24h	100	102 \pm 5	93 \pm 5	97 \pm 4	100	99 \pm 3	92 \pm 7	105 \pm 4

Data represent mean \pm S.E.M. of percentage of control for six samples per group.

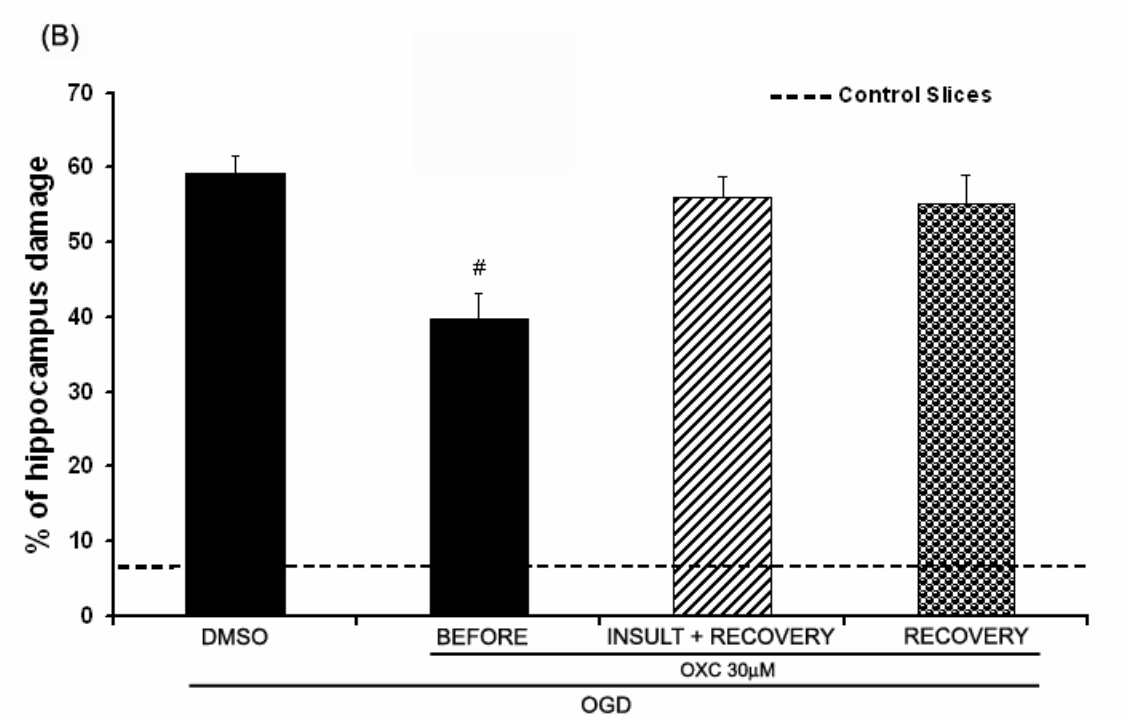
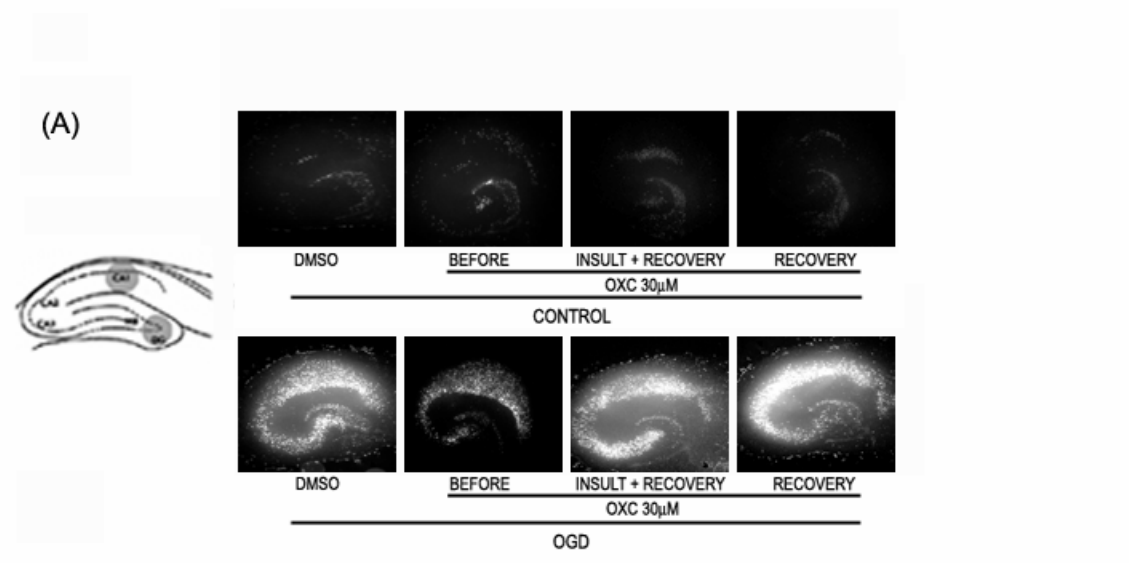


Figure 1

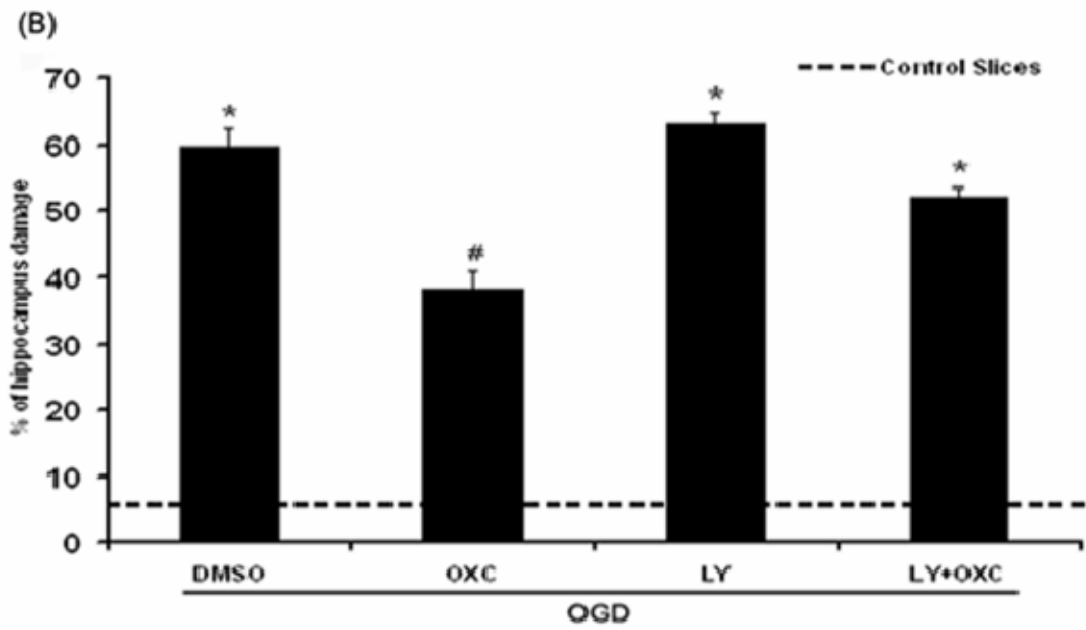
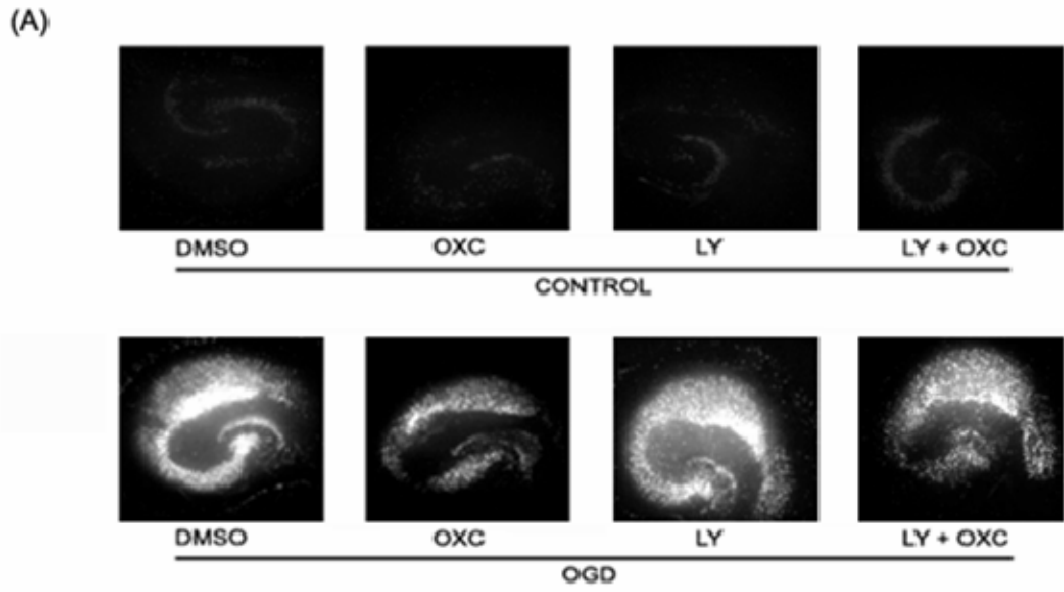


Figure 2

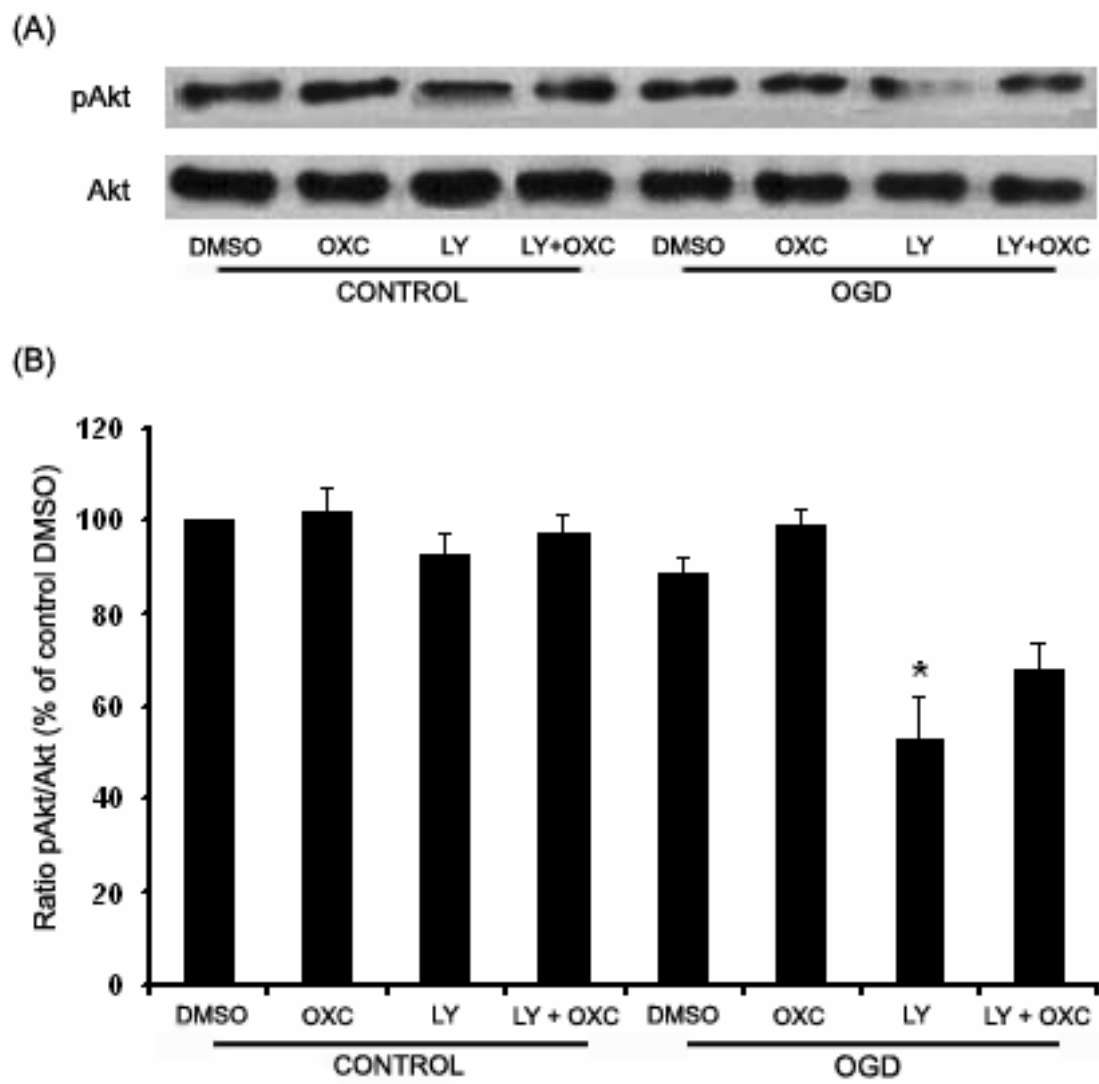


Figure 3



Guide for Authors

1. General

Neuroscience Research publishes experimental studies of nerve cells or nervous systems, including a broad range of approaches from the molecular to the behavioral. Theoretical studies are acceptable if they are relevant for interpretation of experimental data or elucidate principles of general interest. Papers dealing with studies on humans with relevance to neurological and psychiatric disorders are welcome, but case reports are not included in the scope of this journal. Papers should present new, important observations or interpretations that can be of general interest to various areas of neuroscientists.

All manuscripts should be accompanied by a clear statement that the work has not been published elsewhere and is not under review with another journal. When there is more than one author, a clear statement should be made in the cover letter that all co-authors have agreed to the submission of the final manuscript. In the cover letter authors must indicate one of the Receiving Editors (listed below) whose subject area most closely relates to the work submitted.

If illustrations or other small parts of articles or books published elsewhere are used in papers submitted to *Neuroscience Research*, the written permission of the author(s) and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Authors should keep copies of all material submitted. To help ensure that papers are reviewed by the most suitable referees, authors must provide a list of up to five candidate referees (including names, addresses, fax and e-mail) who do not have conflict of interest in the research being submitted. The Editors reserve the right to choose different referees from the ones suggested.

Receiving Editors will pre-review manuscripts and, in consultation with the Editor-in-Chief, reserve the right to return a manuscript to the author(s) without further review.

2. Submission of manuscripts

It is possible to submit electronic or hardcopy manuscripts. Electronic submission is the preferred route, since submission and peer-review can now be handled entirely over the web.

(A) Electronic Submission

Before submitting, it is essential for authors to refer to the Elsevier Artwork Guidelines: <http://authors.elsevier.com/artwork>. Once electronic manuscripts are ready to submit:

1. Go to <http://authors.elsevier.com/JournalDetail.html?PubID=506082:Precis=DESC> 2. Select 'Submit online to this journal' option from the 'Journal Services' sidebar.

3. Follow prompts online.

(B) Hardcopy submission requirements

Four copies of manuscripts and illustrations must be submitted.

Three copies are to be sent to the Editor-in-Chief, Neuroscience Research, one copy is to be sent to one of the following Receiving Editors whose subject area most closely relates to the work submitted.

Molecular Neuroscience

1. **Heinrich Betz**, Department of Neurochemistry, Max-Planck-Institute for Brain Research, Deutschordenstrasse 46, 60528 Frankfurt, Germany, tel: +49-69-96769-220, fax: +49-69-96769-441, e-mail: neurochemie@mpih-frankfurt.mpg.de
2. **Nobutaka Hirokawa**, Department of Cell Biology and Anatomy, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan, tel: +81-3-5841-3326, fax: +81-3-5802-8646, e-mail: hirokawa@m.u-tokyo.ac.jp
3. **Katsuhiko Mikoshiba**, Department of Molecular Neurobiology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639 Japan, tel: +81-3-5449-5316, fax: +81-3-5449-5420, e-mail: mikosiba@ims.u-tokyo.ac.jp

Developmental Neuroscience

1. **Lawrence Katz**, HHMI and Department of Neurobiology, Box 3209, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710 USA, tel: +1-919-681-6225, fax: +1-919-681-6783, e-mail: larry@neuro.duke.edu
2. **Fujio Murakami**, Neuroscience Lab, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, 565-0871 Japan, tel: +81-6-6879-4655, fax: +81-6-6879-4659, e-mail: murakami@fbs.osaka-u.ac.jp
3. **Hideyuki Okano**, Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582 Japan, tel: +81-3-5363-3746, fax: +81-3-3357-5445, e-mail: hidokano@med.keio.ac.jp

Cellular Neuroscience

1. **Toshio Kosaka**, Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582 Japan. Tel: +81 92 642 6047, Fax: +81 92 642 6059, e-mail kosaka@a3rd.med.kyushu-u.ac.jp
 2. **Arthur Konnerth**, Institut fuer Physiologie, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, ettenkoferstr 12, 80336 Muenchen, Germany, tel: +49-89 5996 510 (511), fax: +49-89-5996 512, e-mail: konnerth@lrz.uni-muenchen.de
 3. **Seiji Ozawa**, Department of Physiology, Gunma University School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma, 371-8511 Japan, tel: +81-27-220-7930, fax: +81-27-220-7936, e-mail: ozawas@med.gunma-u.ac.jp
- #### **System/Behavioral Neuroscience**
1. **Ulf Eysel**, Department of Neurophysiology, MA 4/149, Ruhr University Bochum, D-44780, Bochum, Germany, Tel: +49 234 32 23849, Fax: +49 234 32 14192, e-mail eyssel@neurop.rub.de
 2. **Takeshi Kaneko**, Department of Morphological Brain Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501 Japan, Tel: +81 75 753 4331, Fax: +81 75 753 4340, e-mail kaneko@mbs.med.kyoto-u.ac.jp
 3. **Jun Tanji**, Brain Science Research Center, Research Institute Tamagawa University, 1-1-6, Tamagawagakuen, Machida, Tokyo, 194-8610 Japan, tel: +81-42-739-8667, fax: +81-42-739-8663, e-mail: tanji@lab.tamagawa.ac.jp
 4. **David Van Essen**, Department of Anatomy and Neurobiology, Washington University School of Medicine, 660 S Euclid Avenue, St Louis, MO 63110 USA, tel: +1-314-362-7043, fax: +1-314-747-3436, e-mail: vanessen@v1.wustl.edu

Cognitive/Computational Neuroscience

1. **Okhide Hikosaka**, Lab. of Sensorimotor Research, National Eye Institute, NIH, 49 Convent Drive, Bidg 49, Room 2A50, Bethesda, MD20892-4435, USA, tel: +1 301 402 7959, fax: +1 301 402 0511, e-mail oh@lsr.nei.nih.gov
2. **Yasushi Miyashita**, Department of Physiology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033 Japan, tel: +81-3-5841-3457 fax: +81-3-5800-6847, e-mail: physiol@m.u-tokyo.ac.jp
3. **Keiji Tanaka**, Laboratory for Cognitive Brain Mapping, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198 Japan, tel: +81-48-467-9342, fax: +81-48-462-4651, e-mail: keiji@postman.riken.jp

Neurochemistry

1. **Kunihiko Obata**, Neural Network Research Group, RIKEN Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, 351-0198, Japan, tel: +81-48 467 9623, fax: +81-48 462 4697, e-mail: obata@brain.riken.jp
2. **Thomas Soderling**, Vollum Institute, Oregon Health Science University, L-474, 3181 SW Sam Jackson Pk Rd, Portland, OR 97201-3098 USA, tel: +1-503-494-6931, fax: +1-503-494-4534, e-mail: soderlit@ohsu.edu

3. **Naomasa Miki**, Department of Pharmacology (A6), Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, 565 0871, Japan, tel: +81 6 6879 3520, fax: +81 6 6879 3529, e-mail n-miki@pharma.med.osaka-u.ac.jp
- #### **Clinical Neuroscience**

1. **Ichiro Kanazawa**, National Institute of Neuroscience, National Center of neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8502 Japan, tel: +81-42-346-1711, fax: +81-42-346-1741, e-mail: ichiro@ncnp.go.jp
2. **Nobumasa Kato**, Department of Neuropsychiatry, Graduate School of Medicine, The University

of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655 Japan, tel: +81-3-5800-8919, fax: +81-3-5800-6894, e-mail: katon-ky@umin.ac.jp
3. **John Rothwell**, MRC HMBU, Institute of Neurology, Queen Square, London, WC1N 3BG, UK, tel: +44-171-829-8725, fax: +44-171-278-9836, e-mail: j.rothwell@ion.ucl.ac.uk

3. Types of articles

(a) **Research Reports** reporting original results of research within the field of neuroscience, usually 3000-5000 words.

(b) **Rapid Communications** reporting on research which has progressed to the stage when it is considered necessary that the results be rapidly made known to other workers in the field. Priority for rapid publication will be given to this category of paper at all stages. The maximum length is 2000 words, with a summary of maximum 100 words. Rapid Communications should contain no section headings, a maximum of 4 figures and a maximum of 30 references.

(c) **Review Articles** should give a survey, evaluation and critical interpretation of recent research, data and concepts in the fields covered by the journal.

(d) **Update Articles** are brief personal commentaries, hypotheses, viewpoints and spotlight reviews. Their aim is to give an update on rapid progress in the field of neuroscience. (e)

Technical notes are technical reports of, as a guideline, a maximum of 2000 words.

(f) **Letters to the Editors** should be comments and clarifications on articles that have been published in Neuroscience Research, and should be limited to a maximum of 1000 words.

4. The form of the manuscript Manuscripts should be written in English. Manuscripts must be in double-spaced typing on pages of uniform size (preferably A4 or 8.5 × 11"). As a rule, papers should be divided into sections headed by a caption (e.g., Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References).

(a). **Disks in case of hardcopy submission**

The storage medium for text should be a 3.5 inch floppy disk in MS-DOS or Macintosh format. The word-processing format should be Microsoft Word, WordPerfect, WordStar, or TeX. Files in ASCII can also be used, although not preferred. Please specify the type of computer and word-processing package. It is recommended that the authors send the cover letter and the title and abstract pages to the Editor-in-Chief by e-mail simultaneously with submission by post. This part in the e-mail will be used in the process for choosing appropriate reviewers by e-mail, if the authors agree. The submission of electronic files for illustration is welcome, but do not import the illustrations into the file for text. Further information on text and electronic graphic files is obtained from the web-site

(b). **Title Page.**

This must include a title, the author's name(s), the address(es) from which the work originated, the name and address of the person who will deal with correspondence, including proofs. The total number of pages, figures and tables being submitted should also be indicated on this page. At the top right-hand corner of the page should be the name of the Receiving Editor who deals with the manuscript.

(c). **Abstract**

An abstract of not more than 200 words (100 words in case of Rapid Communications and Technical Notes) should be given in the second page of the manuscript.

(d). **Key words**

Normally 6-8 items should be included in the Abstract page after the Abstract. They may be words or phrases that appear in the title.

(e). **Illustrations**

There is no limit set on the number of illustrations, but authors should use them sparingly, making sure that each figure is relevant to the text and that the figures are presented in the order in which they are mentioned in the text. Legends for figures must be typed, also with double spacing, on separate pages. Each figure submitted should be clearly labeled with the name of the author(s), the title of the paper and the figure number on the back. Wherever possible, figures should be submitted in their desired final size, to fit the width of a single column of text, i.e. 84 mm wide, or where it is necessary they should be 176 mm in maximum width. The final size of the printed figure cannot exceed 250 × 200 mm including legends, and where a reduction is required this should be indicated on the back of figures.

All signs and letters should be large enough for the final reduction and should be shown clearly against the background. Where several figures are mounted together, they should be squared accurately and separated by about 5 mm. All of the figures in such a group should have approximately the same contrast values. Photographs should be of sufficient quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of detail inherent in the printing process and should not require a reduction of more than 80%. Please indicate magnification by a bar on the photograph.

Free colour reproduction: If, together with an accepted article, author(s) submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, the author(s) will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of the accepted article. Generally, one colour illustration for each article will be published free of charge in the hardcopy, at the discretion of the Editorial Board. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>. *Please note:* Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should the author(s) not opt for colour in print) in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations should be submitted. For manuscripts submitted online, a file of a black and white version of each colour figure should be uploaded, in addition to the colour figure file.

Cover illustration: The authors may suggest the Editor-in-Chief to use a color figure for the cover of the journal, although there is no guarantee that it will be selected. The figure should have a short legend to the Editor-in-Chief, indicating to which paper the photograph belongs. It need not necessarily appear in the paper but can be related to it.

(f). **Tables** must be typed (with double spacing) on separate pages, and should be provided with a short descriptive heading and, if applicable, a legend.

(g). **References**

Citations in the text should be by author(s) and year in chronological not alphabetical order. When papers written by three or more authors are cited in the text, the abbreviation 'et al.' should be used following the name of the leading author. Citations of two or more articles by the same author(s) in the same year should be distinguished by 'a,b,c' etc. after the year. All references cited in the text must be listed at the end of the paper in double spaced typing and arranged in alphabetical order of first author's name (Harvard system). References must be complete, including initial(s) of author(s) cited, year of publication, title of paper referred to, journal, volume, and page numbers. Journal titles should be abbreviated according to Index Medicus, List of Journals Indexed, Latest edition. For citations of books the following uniform sequence should be maintained: author(s), year of publication, editor(s), complete title of book, publisher, place of publication, and page numbers (see examples given below). All references cited in the text must be in the reference list and vice versa. Manuscripts in preparation and submitted but not accepted as well as 'personal communications' should not appear in the reference list, but can be cited at the appropriate place in the text. This journal should be abbreviated as **Neurosci. Res.**

Examples:

Starr, A., Kristeva, R., Cheyne, D., Lindinger, G., Deecke, L., 1991. Localization of brain activity during auditory verbal short-term memory derived from magnetic recordings. *Brain Res.* 558, 181-190.

Kowler, E., 1990. Reviews in *Oculomotor Research*, vol. 4, Eye Movements and Their Role in Visual and Cognitive Processes. Elsevier, Amsterdam, pp. 486.

Kolb, B., 1990. Animal models for human PFC-related disorders. In: Uylings, H.B.M., van Eden, C.G., de Bruin, J.P.C., Corner, M.A., Feenstra, M.G.P. (Eds.), *The Prefrontal Cortex: Its Structure, Function and Pathology*, Progress in Brain Research, vol. 85. Elsevier, Amsterdam, pp. 501-519.

5. Experimental subjects

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject. Authors should be aware of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki), which has been printed in the *British Medical Journal* (18 July 1964). Also the authors should follow the Guidelines Regarding Ethical Issues of "Non-invasive Studies of Human Brain Function", the summary of which has been printed in *Neuroscience Research* (Vol. 42, No. 3, page IV-VI, 2002) and appears in the web site of Neuroscience Research editorial office <http://www.jnss.org/NSRoffice/>.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt whether appropriate procedures have been used.

6. Page proofs will be sent to the corresponding author of an article unless an alternative is requested in the title page of the manuscript. Proofs should be checked carefully and returned to the publisher within 2 days of receipt. Only typesetting errors may be corrected; no change in or additions to the edited original manuscript will be allowed at this stage.

7. Reprints may be ordered by completing and returning to the Publisher the order form which will be sent by the Publisher shortly after receipt of the accepted manuscript. Twenty Five reprints per contribution will be made available free of charge. There will be no page charges.

8. Copyright: It is a condition of publication in the Journal that authors assign copyright to the Japanese Neuroscience Society and the Publisher. Requests from third parties to reproduce articles are handled by the Publisher on behalf of itself and the Japan Neuroscience Society to make the procedures simpler. In assigning copyright, authors may use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication, and Elsevier is notified in writing and in advance.

9. Enquiries concerning manuscripts and proofs: Questions arising before acceptance of the manuscript should be directed to the Editor-in-Chief. Questions after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland; tel. (+353-61) 709688; fax (+353-61) 709107, specifying the reference/manuscript number, authors and title of the paper.

Acknowledgement: Publication of *Neuroscience Research* is supported by Grant-in-Aid for Publication of Scientific Results from the Japan Society for the Promotion of Science.

CAPÍTULO III

Discussão e Conclusões

3. Discussão

Durante os últimos anos, diversas evidências têm mostrado similaridade na cascata de eventos sinápticos e intracelulares exibidos pela epilepsia e doenças cerebrais vasculares que conduzem à morte neuronal (Lee *et al.*, 1999; Moshe, 2000). Um grande número de estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm sugerido que as drogas antiepilépticas desempenham um papel neuroprotetor, sendo que, estas evidências têm impulsionado o interesse em determinar a sua eficácia na prevenção de doenças neurodegenerativas e cérebro vasculares em humanos. Estas drogas vêm sendo usadas na tentativa de regularizar o micro-ambiente ou de aumentar a resistência neuronal ao mesmo, “neuroproteção” (Calabresi *et al.*, 2003).

O primeiro passo deste trabalho foi investigar o possível potencial neuroprotetor da oxcarbazepina, uma vez que, já foi demonstrado que algumas drogas antiepilépticas falharam em proteger quando administradas ou durante e/ou na reperfusão. Foi utilizada cultura organotípica de fatias hipocampais expostas à privação de oxigênio e glicose (POG) como modelo *in vitro* de “lesão isquêmica”. A escolha deste método de cultivo deve-se ao fato da manutenção da organização do tecido e da integridade das células, permitindo a comunicação entre neurônios e entre neurônios e glia, podendo ser importante para melhor entender os mecanismos envolvidos no efeito protetor da oxcarbazepina. Isto é sugerido pelos dados mostrando que a oxcarbazepina altera alguns parâmetros em células gliais em diversas doses (1-100 µg/mL) (Pavone & Cardile, 2003) e em neurônios (10-300 µM) (Ambrósio *et al.*, 2001), com isso, algumas ações da oxcarbazepina pode ser diferente dependendo da presença ou ausência destas células gliais e sua interação com neurônios.

Neste modelo, a captação de iodeto de propídeo foi escolhida como um marcador de células mortas uma vez que este método correlaciona-se bem como extensão da morte celular detectada por outros métodos (Noraberg *et al.*, 1999; Cimarosti *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados demonstraram que a oxcarbazepina (30 μM) foi neuroprotetora, prevenindo a morte neuronal quando usada apenas antes da exposição à POG. Os tratamentos com oxcarbazepina (30 μM) durante a exposição e mantendo-a na recuperação ou somente na recuperação, não mostraram proteção significativa, não prevenindo a morte neuronal. A ativação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem parece contribuir para dano neuronal antes e durante a lesão isquêmica, mas não durante o período de recuperação (Breder *et al.*, 2000). Neste estudo foi utilizada uma dose semelhante à concentração terapêutica de oxcarbazepina no cérebro (10 - 50 μM) (Gram & Philbert, 1986).

Apesar da existência de várias especulações, os mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores das drogas antiepiléticas contra a lesão cerebral isquêmica ainda não foram completamente esclarecidos.

Conforme dados da literatura, as drogas antiepiléticas apresentam vários mecanismos de ação, sendo a ação de bloqueadora dos canais de sódio a que melhor tem sido caracterizada (Rataud *et al.*, 1994; Taylor & Meldrum, 1995). Durante a isquemia o bloqueio dos canais de Na^+ reduziria a entrada de Na^+ e a despolarização celular, que reduziria por sua vez o influxo de Ca^{2+} através do mecanismo de troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, atenuando a entrada de cálcio mediada pelos canais de cálcio dependentes de voltagem e diminuindo a liberação do principal neurotransmissor excitatório, glutamato (Taylor &

Meldrum, 1995). Reduzir a liberação de glutamato pode ser uma forma principal da ação neuroprotetora de bloqueadores dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem. Muitas destas drogas têm outras ações além do bloqueio dos canais de Na⁺, e pode-se discutir que a neuroproteção pode ser causada por outros mecanismos. Entretanto, as evidências de que tetrodotoxina (TTX) foi significativamente neuroprotetora em diversos modelos sugerem que o bloqueio dos canais de Na⁺ sozinhos podem esclarecer a neuroproteção com alguns destes agentes (Kass *et al.*, 1992; Breder *et al.*, 2000). Compostos como a fenitoína, carbamazepina, topiramato, zonisamida ou a lamotrigina podem agir nos canais de sódio impedindo a despolarização, inibindo a liberação de neurotransmissores tal como o glutamato e proteger assim o cérebro contra o dano celular induzido pelo isquemia focal por ambas inibições pre- e pós-sinápticas de neurotransmissores em excesso (Calabresi *et al.*, 1996, 2003).

A oxcarbazepina, droga antiepiléptica de terceira geração, foi proposta para que sua atividade ocorresse como resultado do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem. Desse modo, OXC e seu metabólito MHD ocasionam inibição da descarga neuronal repetitiva e dessa forma, diminuição da propagação de impulsos sinápticos resultando na estabilização de membranas neuronais hiperexcitadas (McLean *et al.*, 1994; Schmutz *et al.*, 1994; Wamil *et al.*, 1994). OXC e MHD também se ligam aos canais de sódio e inibem a captação de sódio dentro de sinaptossomas (Benes *et al.*, 1999). Ambrósio *et al.* (2001), demonstraram que a OXC inibiu a liberação de glutamato evocada pela 4-aminopiridina ou veratridina de uma maneira dose dependente. Além disso, usando condições de estimulação com KCl (30 mM),

onde canais de Na⁺ são inativados, a OXC não inibiu a liberação de glutamato nem cálcio-dependente ou independente. Os resultados apresentados sugerem que a OXC está prevenindo a morte neuronal induzida pela POG através do bloqueio dos canais de Na⁺ (Ambrósio *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que o bloqueador específico dos canais de Na⁺, Tetrodotoxina, reduziu o dano neuronal em cultura de fatias hipocâmpais expostas a POG (Breder *et al.*, 2000). Desse modo, a OXC poderia estar diminuindo a liberação de glutamato prevenindo a morte neuronal.

Algumas drogas antiepilépticas recentemente demonstraram atuar em vias de sinalização celular regulando a morte neuronal através da ativação da Akt e/ou inibição da GSK-3 (Li *et al.*, 2002; De Sarno *et al.*, 2002; Ryves *et al.*, 2005). Com o objetivo de esclarecer o mecanismo pelo qual a OXC atuou como agente neuroprotetor em nosso estudo, investigamos o envolvimento desta via de sinalização celular. Para tal, utilizando o modelo *in vitro*, investigamos a via da PI3-K, a qual medeia vias de sinalização disparadas por diversos fatores tróficos numa variedade de tipos celulares incluindo células neuronais (Wymann & Pirola, 1998). Utilizou-se LY294002, um inibidor direto da enzima PI3-K, e este suprimiu o efeito neuroprotetor da OXC. Estes resultados sugerem fortemente que a via de sinalização da PI3-K esteja envolvida na neuroproteção pela OXC no modelo *in vitro* de morte celular.

Na tentativa de elucidar um mecanismo molecular possivelmente envolvido com a via de sinalização da PI3-K, investigou-se a ativação da enzima Akt/PKB. Nesta cascata de transdução de sinal, a Akt/PKB é o efetor direto logo abaixo da PI3-K (Songyang *et al.*, 1997) e estudos sugerem que esta via de sinalização de PI3-K para Akt/PKB esteja envolvida com o sinal de

sobrevivência celular em neurônios por inibição da apoptose (Crowder & Freeman, 1998). Nossos resultados mostraram que a OXC não induziu a fosforilação da Akt em nenhum dos tempos testados (1, 6 e 24h). Nenhuma alteração foi encontrada no imunoconteúdo e na fosforilação da Akt, mostrando-nos o não envolvimento da proteína Akt na prevenção da morte neuronal induzida pela OXC. Horn *et al.* (2005) não observaram nenhuma mudança significativa no imunoconteúdo e na fosforilação da Akt em CA1 e giro denteado de culturas organotípicas expostas a POG depois de 30min, 6 e 24 h de reperfusão. Entretanto, muitos pesquisadores já mostraram alterações na proteína Akt após isquemia *in vivo* utilizando ratos (Ouyang *et al.*, 1999; Friguls *et al.*, 2001; Janelidze *et al.*, 2001) ou “gerbils” (Namura *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 2001; Kawano *et al.*, 2002). Horn *et al.* (2005) sugerem que a resposta para essa discrepância seja o fato das condições de cultura serem por si só um ambiente que ativa essas vias, deixando-as com um nível basal bastante alto. A quantidade de soro utilizada (25%) pode estar superativando essas vias, entretanto, a redução do soro durante a recuperação, adotada por alguns autores, pode induzir um estresse ainda maior. Já vimos em nosso laboratório que 2,5% de soro nessas culturas por 24 horas aumentam a fosforilação da Akt em serina 473 (Horn *et al.*, 2005).

Apesar de nossos resultados não mostrarem alteração na Akt, resolvemos testar o substrato GSK-3 β , uma vez que drogas como o lítio mostraram serem neuroprotetoras por inibir a GSK-3 β sem alterar os níveis de fosforilação da Akt (De Sarno *et al.*, 2002). Além disso, a GSK-3 β pode ser ativada por outras cinases como mostrado na figura 6. O principal mecanismo regulatório destas enzimas é por fosforilação. A Akt/PKB é ativada enquanto que a GSK-3 β é

inibida pela fosforilação (Li *et al.*, 2000). A ativação da GSK-3 β promove a sinalização pró-apoptótica (Li *et al.*, 2000). De Sarno e colaboradores (2002) demonstraram que o tratamento com Ácido Valpróico causou um aumento na ativação associado à fosforilação da Akt, e um aumento similar na inibição associado à fosforilação da GSK-3 β . Além disso, lamotrigina, mas não carbamazepina, apresentou proteção pela inibição da apoptose mediada pela GSK-3 β em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Li *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram que a OXC não induziu a fosforilação da GSK-3 β em nenhum dos tempos testados (1, 6 e 24h). Ryves e colaboradores (2005) demonstraram que a CBZ não apresenta efeitos na atividade da GSK-3 β *in vivo* ou *in vitro* em células neocorticais de ratos. Além disso, ácido valpróico não afetou a atividade da GSK-3 β nestas células, em contraste com outros estudos (Li *et al.*, 2000; De Sarno *et al.*, 2002). Nenhuma alteração foi encontrada no imunoconteúdo e na fosforilação da GSK-3 β , sugerindo o não envolvimento da proteína GSK-3 β na prevenção da morte neuronal induzida pela OXC. Apesar do fato que culturas organotípicas respondem similarmente à isquemia *in vivo*, os mecanismos que resultam em morte celular poderiam ser diferentes e requererem uma resposta alternativa para esta proteína.

Nossos resultados sugerem que a via Akt/GSK-3 β pode não estar envolvida na neuroproteção induzida pela OXC, embora a reversão da proteção, tratamento com o inibidor da PI3-K, seja um indício de que uma via possa ser ativada pela PI3-K e estar envolvida na neuroproteção. Outras proteínas podem estar envolvidas na neuroproteção regulada por PI3-K, entre as quais encontra-se a proteína PDK-1, capaz de interagir com vias como PKC, Erk e com a proteína p70S6K, que podem proteger a célula principalmente

ativando a transcrição de genes capazes de codificar proteínas que atenuam a morte, como, por exemplo, MnSOD (Mäntymaa *et al.*, 2000; Kis *et al.*, 2003). Potencialmente essas outras vias ativadas por PI3-K, que não a da Akt, podem estar envolvidas na neuroproteção, protegendo o hipocampo da morte celular induzida por POG. Possivelmente essas vias envolvem PKC, Erk e p70S6K, justamente pela sua capacidade de responder aos estresses protegendo a célula.

No geral, nossos dados sugerem que a via de PI3-K, apesar de sua inibição prevenir o efeito protetor da OXC, não seja a única via envolvida neste efeito e sua ação parece não envolver as proteínas Akt e GSK-3 β . Não podemos descartar o envolvimento da modulação de sua atividade em resposta a um outro modelo e/ou determinadas regiões do cérebro. O conhecimento das proteínas envolvidas na atenuação da morte celular, assim como a modulação dessas proteínas, é essencial para que se chegue a um tratamento que reduza o dano celular nos pacientes que sofreram isquemia cerebral. Com os resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que, embora nosso conhecimento dos mecanismos molecular envolvidos na ação neuroprotetora da oxcarbazepina no dano isquêmico seja incompleto, sua habilidade de reduzir os danos celulares induzidos por POG foram claros e poderão guiar novas pesquisas para o esclarecimento do seu mecanismo de ação que poderão levar o uso da droga na profilaxia e/ou no tratamento de doenças neurodegenerativa. O uso de tais drogas em vítimas de um derrame pode ter importantes vantagens clínicas e financeiras.

4. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- ✓ No modelo de culturas organotípicas de fatias hipocâmpais a presença de oxcarbazepina (30 μ M) 1h antes da indução por POG exerceu efeito neuroprotetor, prevenindo a morte neuronal em torno de 21%;
- ✓ LY294002, um inibidor da via de sinalização celular da PI3-K, preveniu o efeito neuroprotetor da oxcarbazepina;
- ✓ A OXC não teve efeito sobre o imunoconteúdo nem sobre a fosforilação da proteína cinase Akt em nenhum dos tempos testados, 1, 6 e 24h após a lesão;
- ✓ A OXC não teve efeito sobre o imunoconteúdo nem sobre a fosforilação da proteína cinase GSK-3 β em nenhum dos tempos testados, 1, 6 e 24h após a lesão;

Conclusão Geral

Nossos resultados sugerem que oxcarbazepine mostrou efeito neuroprotetor contra o dano celular induzido pela privação de oxigênio e glicose. Este efeito em células de hipocampo parece envolver, pelo menos em parte, a via de sinalização da PI3-K, porém as proteínas Akt e GSK-3 β não estão envolvidas.

CAPÍTULO IV

Perspectivas

1.5 PERSPECTIVAS

Com base no conhecimento adquirido com o presente trabalho, temos como perspectivas o estudo dos mecanismos de ação envolvidos no efeito neuroprotetor da oxcarbazepina. Para isso, seguiremos os seguintes passos:

- Investigar um possível envolvimento da PDK-1, também substrato de PI3-K, na neuroproteção da oxcarbazepina no hipocampo, utilizando anticorpos específicos para essa proteína, bem como seus substratos p70S6K e ERK;
- Determinar se a neuroproteção pela oxcarbazepina envolve a modulação da função dos transportadores de glutamato gliais, GLAST e GLT-1, uma vez que são modulados pelo aumento na concentração intracelular de Na⁺. Também investigar o imunoconteúdo da GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), na tentativa de analisar se a oxcarbazepina está diminuindo a gliose reativa induzida pela POG.
- Investigar o efeito neuroprotetor da oxcarbazepina em um modelo *in vivo* de isquemia cerebral global.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.6 Referências Bibliográficas

- ABDEL-HAMID, K. M., TYMIANSKI, M. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglicemia or to excitotoxins. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 3538-3553, 1997.
- AMBRÓSIO, A. F., SILVA, A. P., MALVA, J. O., SOARES-DA-SILVA, P., CARVALHO, A. P., CARVALHO, C. M. Inhibition of glutamate release by BIA 2-093 and BIA 2-024, two novel derivatives of carbamazepine, due to blockade of sodium but not calcium channels. **Biochem. Pharm.**, v. 61, p. 1271-1275, 2001.
- ASCHNER, M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. **Toxicol. Lett.**, v. 102-103, p. 283-287, 1998.
- BANNAN, P. E., GRAHAM, D. I., LEES, K. R., McCULLOCH, J. Neuroprotective effect of remacemide hydrochloride in focal cerebral ischemia in the cat. **Brain Res.**, v. 664, p. 271-275, 1994.
- BARTUS, R. T., DEAN, R. L., MENNERICK, S., EVELETH, D., LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Res.**, v. 790, p. 1-13, 1998.
- BEALS, C. R., SHERIDAN, C. M., TURCK, C. W., GARDNER, P., CRABTREE, G. R. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. **Science**, v. 275, p. 1930-4, 1997.
- BELHAM, C., WU, S., AVRUCH, J. Intracellular Signalling: PDK1 – A kinase at the hub of things. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 93-96, 1999.
- BENES, J., PARADA, A., FIGUEIREDO, A. A., ALVES, P. C., FREITAS, A. P., LEARMONTH, D. A., CUNHA, R. A., GARRETT, J., SOARES-DA-SILVA, P. Anticonvulsant and sodium channel-blocking properties of novel 10,11 dihydro-5H-dibenz[*b*]fazole-5-carboxamide derivatives. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 2582-2587, 1999.
- BERNAUDIN, M., NOUVELOT, A., MACKENZIE, E. T., PETIT, E. Selective Neuronal Vulnerability and Specific Glial Reactions in Hippocampal and Neocortical Organotypic Cultures Submitted to Ischemia. **Exp. Neurol.**, v. 150, p. 30-39, 1998.
- BREDER, J., SABELHAUS, C., OPITZ, T., REYMANN, K., SCHRÖDER, U. Inhibition of different pathways influencing Na⁺ homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. **Neuropharmacol.**, v. 39, p. 1779-1787, 2000.

- BRUCE, A. J., SAKHI, S., SCHREIBER, S. S., BAUDRY, M. Development of kainic acid and N-methyl-D-aspartic acid toxicity in organotypic hippocampal cultures. **Exp. Neurol.**, v. 132, p. 209-219, 1995.
- CALABRESI, P., SINISCALCHI, A., PISANI, A., STEFANI, A., MERCURI, N. B., BERNARDI, G. A field potential analysis on the effects of lamotrigine, GP 47779, and felbamate in neocortical slices. **Neurology**, v. 47, p. 557-562, 1996.
- CALABRESI, P., PICCONI, B., SAULLE, E., CENTONZE, D., HAINSWORTH, A. H., BERNARDI, G. Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release. **Stroke**, v. 31, p. 766-773, 1999.
- CALABRESI, P., CUPINI, L. M., CENTONZE, D., PISANI, F., BERNARDI, G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. **Neurol. Prog.**, v. 53, p. 693-702, 2003.
- CAO, G., MINAMI, M., PEI, W., YAN, C., CHEN, D., O'HORO, C., GRAHAM, S. H., CHEN, J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 321-333, 2001.
- CHAN, S. A., REID, K. H., SCHURR, A., MILLER, J. J., IYER, V., TSENG, M. T. Fosphenytoin reduces hippocampal neuronal damage in rat following transient global ischemia. **Acta Neurochir.**, v. 140, p. 175-180, 1998.
- CHEN, X. W., YI, Y., QIU, L., SHUAIB, A. Neuroprotective activity of tiagabine in a focal embolic model of cerebral ischemia. **Brain Res.**, v. 874, p. 75-77, 2000.
- CHOI, D., KOH, J., PETERS, S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 185-196, 1988.
- CHOI, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic/ischemic neuronal death. **Trends Neurosci.**, v. 18, p. 58-60, 1995.
- CHU, B., SONCIN, F., PRICE, B. D., STEVENSON, M. A., CALDERWOOD, S. K. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 30847-57, 1996.
- CIMAROSTI, H., RODNIGHT, R., TAVARES, A., PAIVA, R., VALENTIM, L., ROCHA, E., SALBEGO, C. An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neurosci. Lett.**, v. 315, p. 33-36, 2001.

- CIMAROSTI, H., ZAMIN, L. L., FROZZA, R., NASSIF, M., HORN, A. P., TAVARES, A., NETTO, C. A., SALBEGO, C. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3 β . **Neurochem. Res.**, v. 30, p. 191-199, 2005.
- COFFER, P. J., JIN, J., WOODGETT, J. R. Protein Kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. **Biochem. J.**, v. 335, p. 1-13, 1998.
- COLBOURNE, F., SUTHERLAND, G. R., AUER, R. N. Electron Microscopic Evidence against Apoptosis as the Mechanism of Neuronal Death in Global Ischemia. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4200-4210, 1999.
- CROSS, D. A., ALESSI, D. R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M., HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 785-9, 1995.
- CROWDER, R. J., FREEMAN, R. A. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor sympathetic neurons. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 2933-2943, 1998.
- DATTA, S. R., BRUNET, A., GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Gene Dev.**, v. 13, p. 2905-2927, 1999.
- DALE, T. C. Signal transduction by the Wnt family of ligands. **Biochem. J.**, v. 329, p. 209-23, 1998.
- DE GROOT, R. P., AUWERX, J., BOUROUIS, M., SASSONE-CORSI, P. Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the Drosophila kinase shaggy. **Oncogene**, v. 8, p. 841-7, 1993.
- DE KEYSER, J., SULTER, G., LUITEN, P. G. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 535-540, 1999.
- DE SARNO, P., LI, X., JOPE, R. S. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. **Neuropharm.**, v. 43, p. 1158-64, 2002.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 391-397, 1999.
- DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p. 262-267, 1998.
- DU, K., MONTMINY, M. CREB Is a Regulatory Target for The Protein Kinase Akt/PKB. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32377-32379, 1998.

- DUGAN, L. L., CHOI, D. W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Ann. Neurol.**, v. 35, p. S17-2, 1994.
- EDMONDS, J. R., JIANG, H. L., ZHANG, Y. D., SHANK, R. Topiramate as a neuroprotectant in a rat model of global ischemia-induced neurodegeneration. **Life Sci.**, v. 69, p. 2265–2277, 2001.
- FAROOQUI, A. A., HAUN, S. E., HORROCKS, L. A. Ischemia and hypoxia, p. 867-883. **Basic Neurochemistry**, 5. ed., New York, Raven Press, 1994.
- FANG, X., YU, S. X., LU, Y., BAST, R. C., WOODGETT, J. R., MILLS, G. B. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 97, p. 11960-5, 2000.
- FRANÇOIS, F., GRIMES, G. M. Phosphorylation-dependent Akt cleavage in neural cell in vitro reconstitution of apoptosis. **J. Neurochem.**, v. 73, p. 1773-1776, 1999.
- FRANTSEVA, M. V., CARLEN, P. I., VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. **Free Radical Bio. Med.**, v. 31, p. 1216-1227, 2001.
- FRIGULS, B., JUSTICIA, C., PALLÀS, M., PLANAS, A. M. Focal cerebral ischemia causes two temporal waves of Akt activation. **Neuroreport**, v. 12, p. 3381-3384, 2001.
- GÄHWILER, B. H., CAPOGNA, M., DEBANNE, D., MCKINNEY, R. A., THOMPSON, S. M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 471-477, 1997.
- GOODE, N., HUGHES, K., WOODGETT, J. R., PARKER, P. J. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 16878-82, 1992.
- GRAHAM, S. H., CHEN, J. Programmed cell death in cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 99-109, 2001.
- GRAM, L., PHILBERT, A. Oxcarbazepine, in: **New Anticonvulsant Drugs**, eds. B.S. Meldrum and R.J. Porter (John Libbey & Co., Ltd., England), p. 229.
- GRANDORI, C., COWLEY, S. M., JAMES, L. P., EISENMAN, R. N. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 653-99, 2000.
- GRANT, S. M., FAULDS, D. Oxcarbazepine. A review of its pharmacology and therapeutic potential in epilepsy, trigeminal neuralgia and affective disorders. **Drugs**, v. 43, p. 873-888, 1992.

- HANON, E., KLITGAARD, H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. **Seizure**, v. 10, p. 287-293, 2001.
- HENGARTNER, M. O., HORVITZ, H. R. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 4, p. 581-586, 1994.
- HSU, M., SIK, A., GALLYAS, F., HORVÁTH, Z., BUSKÁKI, G. Short-term and long term changes in the postischemic hippocampus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 743, p. 121-139, 1994.
- HORN, A. P., GERHARDT, D., GEYER, A. B., VALENTIM, L., CIMAROSTI, H., TAVARES, A., HORN, F., LENZ, G., SALBEGO, C. Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and Oxygen and Glucose deprivation. **Neurochem. Res.**, v. 30, p. 355-361, 2005.
- IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 132-139, 1997.
- JANELIDZE, S., HU, B. R., SIESJÖ, P., SIESJÖ, B. K. Alterations of Akt1 (PKB α) and p70^{S6K} in transient focal ischemia. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, p. 147-154, 2001.
- JOHNSON, E. M. J. R., DECKWERTH, T. L. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 31-46, 1993.
- JOPE, R. S., BIJUR, G. N. Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3 β and cell survival. **Molec. Psychiatry**, v. 7, p. S35-S45, 2002.
- JUURLINK, B., SWEENEY, M. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, p. 121-128, 1997.
- KALIS, M. M., HUFF, N. A. Oxcarbazepine, an antiepileptic agent. **Clin. Theraph.**, v. 23, p. 680-700, 2001.
- KASS, I. S., ABRAMOWICZ, A. E., COTTRELL, J. E., CHAMBERS, G. The barbiturate thiopental reduces ATP levels during anoxia but improves electrophysiological recovery and ionic homeostasis in the rat hippocampal slice. **Neuroscience**, v. 49, p. 537-43, 1992.
- KAWANO, T., MORIOKA, M., YANO, S., HAMADA, J., USHIO, Y., MIYAMOTO, E., FUKUNAGA, K. Decreased Akt activity is associated with activation of forkhead transcription factor after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 22, p. 926-934, 2002.
- KIRINO, T. Delayed neuronal death. **Neuropathology**, v. 20, p. S95-97, 2000.

- KIS, A., YELLON, D. M., BAXTER, G. F. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3-kinase and p70S6 Kinase. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 35, p. 1063-1071, 2003.
- KITAGAWA, K., TAKASAWA, K., KUWABARA, K., SASAKI, T., TANAKA, S., MABUCHI, T., SUGIURA, S., OMURA-MATSUOKA, E., MATSUMOTO, M., HORI, M. Differential Akt phosphorylation at Ser-473 and Thr-308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 333, p. 187-190, 2002.
- KOHN, A. D., TAKEUCHI, F., ROTH, R. A. Akt, a pleckstrin domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 21920-21926, 1996.
- LAAKE, J. H., HAUG, F. M., WIELOCH, T., OTTERSEN, O. P. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Res. Prot.**, v. 4, p. 173-184, 1999.
- LEE, J. M., ZIPFEL, G. J., CHOI, D. W. The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. **Nature**, v. 399, p. A7-14, 1999.
- LEKER, R. R., NEUFELD, M. Y. Anti-epileptic drugs as possible neuroprotectants in cerebral ischemia. **Brain Res. Rev.**, v. 42, p. 187-203, 2003.
- LI, X., BIJUR, G. N., JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. **Bipolar Disord.**, v. 4, p. 137-44, 2002.
- LOETSCHER, H., NIEDERHAUSER, O., KEMP, J., GILL, R. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? **Drug Discov. Today**, v. 6, p. 671-680, 2001.
- MÄNTYMAA, P., SHTONEN, T., GUTTORM, T., SÄILY, M., KINULLA, V., SAVOLAINEN, E., KOISTINEN, P. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. **Brit. J. Haematol.**, v. 108, p. 574-581, 2000.
- McLEAN, M. J., SCHMUTZ, M., WAMIL, A. W. Oxcarbazepine: Mechanisms of action. **Epilepsia**, v. 35, p. S5-S9, 1994.
- MELDRUM, B. S. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. **Clin. Sci.**, v. 68, p. 113-122, 1985.
- MINATO, H., KIKUTA, C., FUJITANI, B., MASUDA, Y. Protective effects of zonisamide, an antiepileptic drug, against transient focal cerebral ischemia

- with middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. **Epilepsia**, v. 38, p. 975-980, 1997.
- MITANI, A., YANASE, H., SAKAI, K., WAKE, Y., KATAOKA, K. Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 601, p. 103-110, 1993.
- MOSHE, S. L. Mechanisms of action of anticonvulsant agents. **Neurology**, v. 55, p. S32-40, 2000.
- NAMURA, S., NAGATA, I., KIKUCHI, H., ANDREUCCI, J., ALESSANDRINI, A. Serine-threonine protein kinase Akt does not mediate ischemic tolerance after global ischemia in the gerbil. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 20, p. 1301-1305, 2000.
- NIWA, M., HARA, A., IWAY, T., WANG, S., HOTTA, K., MORI, H., UEMATSU, T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transiente forebrain ischemia. **Neurosci. Lett.**, v. 300, p. 103-106, 2001.
- NORABERG, J., KRISTENSEN, B. W., ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Res. Prot.**, v. 3, p. 278-290, 1999.
- OBRENOVITCH, T. P. Sodium and potassium channels modulators: their role in neuroprotection. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 40, p. 109-135, 1997.
- ORDY, J. M., WENGENACK, T. M., BIALOBOCK, P., COLEMAN, P. D., RODIER, P., BAGGS, R. B., DUNLAP, W. P., KATEST, B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Exp. Neurol.**, p. 128-139, 1993.
- OUYANG, Y., TAN, Y., COMB, M., LIU, C., MARTONE, M. E., SIESJÖ, B. K., HU, B. Survival- and death-promoting events after transient cerebral ischemia: phosphorylation of Akt, release of cytochrome c, and activation of caspase-like proteases. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 19, p. 1126-1135, 1999.
- OZES, O. N., MAYO, L. D., GUSTIN, J. A., PFEFFER, S. R., PFEFFER, L. M., DONNER, D. B. NF κ B Activation by Tumour Necrosis Factor Requires the Akt Serine-threonine kinase. **Nature**, v. 401, p. 82-85, 1999.

- PAP, M., COOPER, G. M. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 19929-19932, 1998.
- PARKER, P. J., EMBI, N., CAUDWELL, F. B., COHEN, P. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. State of phosphorylation of the seven phosphoserine residues *in vivo* in the presence and absence of adrenaline. **Eur. J. Biochem.**, v. 124, p. 47-55, 1982.
- PAVONE, A., CARDILE, V. An *in vitro* study of new antiepileptic drugs and astrocytes. **Epilepsia**, v. 44, p. S34-9, 2003.
- PHILLIS, J. W., O'REGAN, M. H., ESTEVEZ, A. Y., SONG, D., VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **J. Neurochem.**, v. 67, p. 1525-1531, 1996.
- PLYTE, S. E., HUGHES, K., NIKOLAKAKI, E., PULVERER, B. J., WOODGETT J. R. Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1114, p. 147-62, 1992.
- PRICE, D. New order from neurological disorders. **Nature**, v. 399, p. A3-A5, 1999.
- PRINGLE, A. K., IANNOTTI, F., WILDE, G. J. C., CHAD, J. E., SEELEY, P. J., SUNDSTROM, L. E. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in *in vitro* ischemia. **Brain Res.**, v. 755, p. 36-46, 1997a.
- PRINGLE, A. K., ANGUNAWELA, R., WILDE, G. J., MEPHAN, J. A., SUNDSTROM, L. E., IANNOTTI, F. Induction of 72-kDa heat-shock protein following sub-lethal oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 23, p. 289-298, 1997b.
- PULSINELLI, W. A., BRIERLEY, J. B., PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann. Neurol.**, v. 11, p. 491-498, 1982.
- RATAUD, J., DEBARNOT, F., MARY, V., PRATT, J., STUTZMANN, J. M. Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. **Neurosci. Lett.**, v. 172, p. 19-23, 1994.

- REKLING, J. C. Neuroprotective effects of anticonvulsivants in rat hippocampal slice cultures exposed to oxygen/glucose deprivation. **Neurosci. Lett.**, v. 335, p. 167-170, 2003.
- ROSS, S. E., ERICKSON, R. L., HEMATI, N., MACDOUGALD, O. A. Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, p. 8433-41, 1999.
- ROTHMAN, S. M., OLNEY, J. M. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. **Ann. Neurol.**, v. 19, p. 105-111, 1986.
- RYVES, W. J., DALTON, E. C., HARWOOD, A. J., WILLIAMS, R. S. B. GSK-3 activity in neocortical cells is inhibited by lithium but not carbamazepine or valproic acid. **Bipolar Disord.**, v. 7, p. 260-265, 2005.
- SCHMIDT-KASTNER, R., FREUND, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 4, p. 599-636, 1991.
- SCHMUTZ, M., BRUGGER, F., GENTSCH, C., MCLEAN, M. J., OLPE, H. R. Oxcarbazepine: preclinical anticonvulsant profile and putative mechanisms of action. **Epilepsia**, v. 35, p. 47-50, 1994.
- SCHREIBER, S. S., BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus - a role for gene expression. **TINS**, v. 18, p. 446-451, 1995.
- SHAYWITZ, A. J., GREENBERG, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 821-61, 1999.
- SHORVON, S. Oxcarbazepine: Review. **Seizure**, v. 9, p. 75-79, 2000.
- SHUAIB, A., MAHMOOD, R. H., WISHART, T., KANTHAN, R., MURABIT, M. A., IJAZ, S., MIYASHITA, H., HOWLETT, W. Neuroprotective effects of lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, in vivo microdialysis and behavioural study. **Brain Res.**, v. 702, p. 199-206, 1995.
- SIEGEL, G. J., AGRANOFF, B. W., ALBERS, R. W., MOLINOFF, P. B. **Basic Neurochemistry**. New York: Raven Press, 1993.
- SIESJO, B. K. **Brain Energy Metabolism**, John Wiley ed. New York, 1978.

- SMITH, S. E., MELDRUM, B. S. Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal cerebral ischemia in the rat. **Stroke**, v. 26, p. 117-122, 1995.
- SONGYANG, Z., BALTIMORE, D., CANTLEY, L. C., KAPLAN, D. R., FRANKE, T. F. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 11345-50, 1997.
- STEFANI, A., PISANI, A., DE MURTAS, M. Action of GP47779, the active metabolite of oxcarbazepine on the corticostriatal system. II. Modulation of high-voltage-activated calcium currents. **Epilepsia**, v. 36, p. 997-1002, 1995.
- STEFANI, A., SPADONI, F., BERNARDI, G. Voltage-activated calcium channels: Targets of antiepileptic drug therapy? **Epilepsia**, v. 38, p. 959-965, 1997.
- STOPPINI, L., BUCHS, P. A., MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous system. **J. Neurosci. Meth.**, v. 37, p. 173-182, 1991.
- STRASSER, U., FISCHER, G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **J. Neurosci. Methods**, v. 57, p. 177-186, 1995.
- SUN, H., LESCHE, R., LI, D. M., LILIENTAL, J., ZHANG, H., GAO, J., GAVRILOVA, N., MUELLER, B., LIU, X., WU, H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 6199-6204, 1999.
- SUTHERLAND, C., LEIGHTON, I. A., COHEN, P. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. **Biochem. J.**, v. 296, p. 15-9, 1993.
- SWEENEY, M., YAGER, J. Y., WALZ, W., JUURLINK, B. H. J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, p. 1525-1535, 1995.
- TAKASHIMA, A., NOGUCHI, K., SATO, K., HOSHINO, T., IMAHORI, K. Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 90, p. 7789-93, 1993.

- TASKER, R. C., COYLE, J. T., VORNOV, J. J. The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 4298–4308, 1992.
- TAYLOR, C. P., MELDRUM, B. S. Na⁺ channels as target for neuroprotective drugs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, p. 309-316, 1995.
- TAYLOR, D., OBRENOVITCH, T. P., SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neuroch. Res.**, v. 21, p. 1013-1021, 1996.
- TECOMA, E. S. Oxcarbazepine. **Epilepsia**, v. 40, p. S37–S46, 1999.
- VALENTIM, L. M., MICHALOWSKI, C. B., GOTTARDO, S. P., PEDROSO, L., GESTRICH, L. G., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G., RODNIGHT, R. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunoccontent in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 91, p. 1291-1297, 1999.
- VALENTIM, L. M., GEYER, A. B., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., WORM, P. V., RODNIGHT, R., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunoccontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p. 43-49, 2001.
- VALENTIM, L. M., RODNIGHT, R., GEYER, A. B., HORN, A. P., TAVARES, A. A., CIMAROSTI, H., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p. 379-386, 2003.
- WAHLGREN N. G., AHMED N. Neuroprotection in Cerebral Ischemia: Facts and Fancies – The Need for New Approaches. **Cerebral Diseases**, v. 17, p. 153-166, 2004.
- WALDMEIER, P. C., BAUMANN, P. A., WICKI, P., FELDTRAUER, J. J., STIERLIN, C., SCHMUTZ, M. Similar potency of carbamazepine, oxcarbazepine, and lamotrigine in inhibiting the release of glutamate and other neurotransmitters. **Neurology**, v. 45, p. 1907–1913, 1995.
- WALDMEIER, P. C., MARTIN, P., STOCKLIN, K., PORTET, C., SCHMUTZ, M. Effect of carbamazepine, oxcarbazepine and lamotrigine on the increase in extracellular glutamate elicited by veratridine in rat cortex and striatum. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 354, p. 164–172, 1996.

- WAMIL, A. W., SCHMUTZ, M., PORTET, C., FELDMANN, K. F., McCLEAN, M. J. Effects of oxcarbazepine and 10-hydroxycarbamazepine on action potential firing and generalized seizures. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 27, p. 301–308, 1994.
- WEBER, M. L., TAYLOR, C. P. Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials, **Brain Res.**, v. 664, p. 167–177, 1994.
- WHITE, B. C., SULLIVAN, J. M., DEGRACIA, D. J., O'NEIL, B. J., NEUMAR, R. W., GROSSMAN L. I., RAFOLS, J. A., KRAUSE, G. S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **J. Neurol. Sci.**, v. 179, p. 1-33, 2000.
- WHITE, H. S. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 40, p. S2-S10, 1999.
- WIARD, R. P., DICKERSON, M. C., BEEK, O., NORTON, R., COOPER, B. R. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. **Stroke**, v. 26, p. 466–472, 1995.
- WYMANN, M. P., PIROLA. L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 436, p. 127-50, 1998.
- YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Prog. Neurobiol.**, v. 62, p. 273-295, 2000.
- YANG, G., KITAGAWA, K., OHTSUKI, T., KUWABARA, K., MABUCHI, T., YAGITA, Y., TAKAZAWA, K., TANAKA, S., YANAGIHARA, T., HORI, M., MATSUMOTO, M. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. **Brain Res.**, v. 870, p. 195-198, 2000.
- YANO, S., TOKUMITSU, H., SODERLING, T. R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of protein-kinase-B pathway. **Nature**, v. 396, p. 584-587, 1998.
- YANO, S., MORIOKA, M., FUKUNAGA, K., KAWANO, T., HARA, T., KAI, Y., HAMADA, J., MIYAMOTO, E., USHIO, Y. Activation of Akt/Protein Kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 351-360, 2001.
- YUAN, J., YANKNER, A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, v. 407, p. 802-809, 2000.

ZENG, Y. S., XU, Z. C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neurosci. Res.**, v. 37, p. 113-125, 2000.

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