

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

***PERFIL DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO EM
DIFERENTES MODELOS DE ISQUEMIA CEREBRAL EM
RATOS: INJÚRIA X NEUROPROTEÇÃO***

Ana Paula Thomazi

Orientadora: Prof^ª. Dra. Susana Tchernin Wofchuk

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Christianne Salbego

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre

2009

*“Bem, se o que me dirás não é nem bom,
nem útil e muito menos sabes se é verdadeiro,
para quê dizeres-me?”*

Sócrates

AGRADECIMENTOS

À Susana, minha orientadora, pela paciência quanto às minhas incertezas.
Agradeço pelo apoio, pelo ensinamento e pela confiança.

À Christianne, pela co-orientação.

Aos colegas do laboratório 35, desde os mais antigos ao recém chegados.

Aos bolsistas de iniciação científica, aos que me acompanharam no início, no meio e no fim: Gracinha, Bruna, Tales e Cristiana. E também aos demais bolsistas do Lab. 35.

Ao pessoal dos laboratórios 33 e 37.

Ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela grande oportunidade e a todos os funcionários.

Ao CNPQ, pela bolsa cedida até a metade do curso.

Ao Hospital Fêmeina e a todo Grupo Hospitalar Conceição pela licença que me foi concedida como estímulo para o término desse curso. Agradeço aos colegas e à minha chefia pela liberação.

Aos familiares pela compreensão, incentivo e ausência em momentos importantes. Agradeço aos meus queridos e amados pais, irmãos e agregados.

Ao meu, agora marido, pelo eterno companheirismo, apoio, compreensão, principalmente nos momentos de ausência, e por dividir as eternas angústias que me perseguiram durante esses anos.

ÍNDICE

RESUMO	III
ABSTRACT	V
APRESENTAÇÃO	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
INTRODUÇÃO	1
1. Sistema Glutamatérgico	2
1.1. Receptores glutamatérgicos	4
1.2. Transportadores de glutamato	7
2. Isquemia Cerebral	11
2.1. Isquemia e transportadores de glutamato	13
2.2. Modelos experimentais de lesão isquêmica	14
2.2.1. Modelos <i>in vivo</i>	14
2.2.1.1. Hipóxia-isquemia neonatal	14
2.2.1.2. Isquemia focal	16
2.2.1.3. Isquemia global	16
2.2.2. Modelos <i>in vitro</i>	16
3. Guanosina	17
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo geral	20
4.2. Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 1	22

CAPÍTULO 2	31
CAPÍTULO 3	55
CAPÍTULO 4	87
DISCUSSÃO	97
CONCLUSÕES	113
PERSPECTIVAS	118
ANEXO	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

RESUMO

A isquemia cerebral é a terceira maior causa de morte em países industrializados, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em indivíduos de meia idade e idosos. A redução do suprimento de glicose e oxigênio ao cérebro, o que ocorre na isquemia, leva a uma complexa cascata de eventos celulares, resultando em degeneração neuronal e, conseqüentemente, na perda das funções cerebrais. Altas concentrações extracelulares de glutamato ocorrem em decorrência a um episódio isquêmico devido ao bloqueio da captação de glutamato, assim como ao aumento na sua liberação e a uma reversão de seus transportadores. A manutenção de seus níveis abaixo dos neurotóxicos é realizada por transportadores de alta afinidade dependentes de sódio, principalmente nos astrócitos.

Modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo* foram utilizados nos trabalhos que compõem esta tese. No primeiro capítulo, usamos um modelo de privação de oxigênio e glicose (POG) em fatias de hipocampo de ratos jovens e adultos. A POG diminuiu a captação de glutamato em todos os tempos de reperfusão estudados em ambas as idades, sendo essa diminuição menos pronunciada em animais jovens. Fatias de hipocampo de animais adultos parecem ser mais resistentes ao insulto que as provenientes de animais jovens, visto que o dano celular se dá primeiramente nestes. A guanosina (GUO) foi capaz de evitar a queda da captação somente em animais jovens 3hs após a POG e também foi capaz de reduzir o dano celular em ambas as idades.

A padronização da metodologia da captação de glutamato em cultura organotípica de fatias de hipocampo foi montada a fim de estudar alterações neste parâmetro após a POG. Nesse modelo, há um aumento da captação após 1h de

reperusão e uma queda após 24hs. A morte celular medida, pela incorporação de iodeto de propídio, foi significativa a partir das 13hs e há uma queda nos níveis de GLT-1 24hs pós-POG. A GUO protegeu parcialmente a morte induzida pela POG, mas não foi capaz de reverter a queda da captação de glutamato 24hs pós-insulto.

O modelo *in vivo* de isquemia utilizado foi a hipóxia-isquemia (HI) neonatal. Houve um aumento da captação de glutamato 24hs pós-insulto no hemisfério ipsilateral e uma queda significativa 72hs após nos dois hemisférios. Alterações de GFAP e S100B foram analisadas. Houve um aumento dos níveis de GFAP dependente de idade nos três tempos estudados e nas duas estruturas. Nos animais submetidos à HI, o aumento de GFAP foi significativamente maior no hemisfério ipsilateral e esse foi diferente de seu respectivo controle 48 e 72hs após o insulto. Houve um aumento nos níveis de S100B dependente de idade no córtex, sem diferença entre o grupo controle e o HI. No hipocampo ipsilateral, observamos um aumento de S100B dependente de tempo no grupo HI e HI-GUO, mas somente o grupo HI-GUO foi diferente de seu controle 48 e 72hs após o insulto. A GUO não teve nenhum efeito sobre a captação de glutamato em córtex, sobre os níveis de GFAP em ambas as estruturas e sobre a S100B em córtex.

O APDC, um potente agonista de receptor metabotrópico de grupo II, foi testado no modelo *in vitro* de POG com fatias de hipocampo. Ele foi capaz de evitar, parcialmente, a queda da captação de glutamato e esse efeito foi inibido por APICA, um antagonista de grupo II. Esses dados são preliminares e necessitam de maiores estudos.

Podemos concluir que quando se usam diferentes modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, estes podem nos fornecer dados distintos sobre um mesmo parâmetro ou uma mesma droga em estudo e, mesmo assim, são importantes, pois cada modelo pode representar uma situação completamente diferente da outra.

ABSTRACT

Cerebral ischemia is the third leading cause of death in the industrialized countries being the major cause of morbidity and mortality in middle and later life. The reduction in the supply of glucose and oxygen to the brain that occurs in cerebral ischemia leads to a complex cascade of cellular events, resulting in neuronal degeneration and, consequently, in loss of brain functions. It has been shown that stroke and ischemia increase the extracellular glutamate levels due to impairment of glutamate uptake, as well as an increase in glutamate release and reversal of glutamate transporters. The maintenance of extracellular glutamate below neurotoxic levels is an essential role for glial cells and this is achieved through high affinity sodium-dependent glutamate transporters present mainly in astrocytes.

Ischemic models *in vitro* and *in vivo* were used in this work. In the first chapter, we used a model of oxygen and glucose deprivation (OGD) in hippocampal slices of young and adult rats. OGD decreased glutamate uptake in all reperfusion times and in both ages studied, being this decrease less pronounced in young rats. Hippocampal slices of adult animals seemed to be more resistant to OGD than youngs, since cell damage was first seen in young. Guanosine (GUO) was able to avoid the decrease in glutamate uptake only in young animals 3h after OGD e also to reduce cell damage in both ages.

To study glutamate uptake alterations after OGD in organotypic culture of hippocampal slices, we first standardized this method. There is an increase in glutamate uptake after 1h of reperfusion and a decrease 24h later. Cell death was measured by propidium iodide incorporation and it was significative increased from 13h. There is a

decrease in GLT1 levels 24h after OGD. GUO was able in partially protect cells from death, but not able in recovering glutamate uptake decrease 24h after the insult.

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) was the *in vivo* model used here. There was an increase in glutamate uptake 24h after the insult in the ipsilateral hemisphere and a decrease 72h later in both hemispheres. GFAP and S100B alterations were also analyzed. There was an increase in GFAP levels dependent of age in all times studied and in both structures. In the HI group, the increase of GFAP was significantly higher in the ipsilateral hemisphere and this was different from its control 48 and 72h after the insult. There was an increase in S100B levels dependent of age in cortex, without difference between control and HI group. In the ipsilateral hippocampus, there was an increase of S100B dependent of time in HI and HI-GUO group, but only HI-GUO was different from its control 48 and 72h after the insult. GUO had no effect over glutamate uptake in cortex, GFAP levels in both structures, and S100B in cortex.

APDC, a potent agonist of metabotropic receptors of group II, was tested in the same OGD model used in the first chapter. APDC was able in partially avoid glutamate decrease induced by OGD in hippocampal slices, and this effect was abolished by APICA, a group II antagonist. These results are preliminary and deserve more study.

We could conclude that when different experimental models are used, as *in vitro* or *in vivo*, these could give us distinct data about the same parameter or about the same drug in study, and even that happens, they are very important since each model might represent a complete different situation.

APRESENTAÇÃO

Essa tese de Doutorado está organizada da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Artigos Científicos publicados e submetidos, Resultados preliminares, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** mostra o embasamento teórico para a realização dessa tese. Os Materiais e Métodos, os Resultados, assim como as Referências Bibliográficas específicas, encontram-se no corpo de cada trabalho, os quais estão apresentados na forma de **Artigos Científicos** em 3 (três) capítulos. O 4º e último capítulo descreve resultados preliminares obtidos que serão utilizados para confecção do próximo artigo científico.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos.

A seção **Conclusões** descreve as conclusões gerais da tese.

A seção **Perspectivas** discute as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir dos resultados obtidos nos trabalhos descritos nos Capítulos, assim como a seqüência que terá o capítulo 4.

A seção **Referências Bibliográficas** lista as referências citadas na Introdução, Capítulo 4 e Discussão da Tese e que não aparecem nos Artigos Científicos.

Todos os trabalhos descritos nessa Tese foram desenvolvidos no Departamento de Bioquímica da UFRGS, no laboratório 35, sob a coordenação da Profa. Susana Wofchuk, e também em associação com os laboratórios coordenados pelos professores Carlos Alberto Gonçalves, Christianne Salbego e Carlos Alexandre Netto.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

<i>Figura 1:</i> Sinapse glutamatérgica	5
<i>Figura 2:</i> Rotas isquêmicas	13
<i>Figura 3:</i> Atrofia cerebral	15

CAPÍTULO 1

<i>Figure 1:</i> Glutamate uptake profile in slices of hippocampus from 10- (A) and 60- (B) day-old rats exposed or not to OGD	24
<i>Figure 2:</i> Effect of GUO on Glu-uptake in hippocampal slices hippocampus from 10- (A) and 60- (B) day-old rats, 1 and 3 h after an OGD exposition	25
<i>Figure 3:</i> Effect of GUO on cell viability, measured by MTT method, in hippocampal slices from 10- (A) and 60- (B) day-old rats	25
<i>Figure 4:</i> Effect of GUO treatment on slice viability after OGD exposition in slices of hippocampus from 10- (A) and 60- (B) day-old rats	26
<i>Figure 5:</i> Effect of GUO treatment on membrane damage in slices of hippocampus, from 10- (A) and 60- (B and C) day-old rats, submitted to OGD for 60 min as assessed by trypan blue permeability and LDH release into the medium ...	26

CAPÍTULO 2

<i>Figure 1:</i> Time course for glutamate uptake using three different methods.....	48
<i>Figure 2:</i> Concentration course for glutamate uptake using method 1 and 5 min	49
<i>Figure 3:</i> Profile of glutamate uptake in organotypic culture of hippocampus exposed or not to OGD	50
<i>Figure 4:</i> Effect of OGD in CA1 area on propidium iodide staining	51

<i>Figure 5: Effect of guanosine on cell damage (A) and glutamate uptake (B) in culture of hippocampus after OGD</i>	<i>52 e 53</i>
--	----------------

CAPÍTULO 3

<i>Figure 1: Glutamate uptake in cortical slices after HI insult in right (A) and left hemisphere (B) and with GUO treatment (C)</i>	<i>79 e 80</i>
--	----------------

<i>Figure 2: GFAP concentration in hippocampus of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO</i>	<i>81</i>
---	-----------

<i>Figure 3: GFAP concentration in cortex of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO</i>	<i>82</i>
--	-----------

<i>Figure 4: S100B concentration in hippocampus of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO</i>	<i>83</i>
--	-----------

<i>Figure 5: S100B concentration in cortex of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO</i>	<i>84</i>
---	-----------

<i>Figure 6: Measurement of hippocampal volume of rats with 30 (A) and 90 days-old (B), submitted to HI insult and treated or not with GUO</i>	<i>85</i>
--	-----------

<i>Figure 7: Measurement of cortical area of rats with 30 (A) and 90 days-old (B), submitted to HI insult and treated or not with GUO</i>	<i>86</i>
---	-----------

CAPÍTULO 4

<i>Figura 1: Efeito do APDC sobre a captação de glutamato em fatias hipocâmpais de ratos de 60 dias 3h após POG</i>	<i>94</i>
---	-----------

<i>Figura 2: Efeito inibitório do LY sobre o APDC</i>	<i>95</i>
---	-----------

<i>Figura 3: Efeito inibitório da APICA sobre o APDC</i>	<i>96</i>
--	-----------

ANEXO

<i>Figura 1: Quantificação dos transportadores de glutamato GLT-1 e GLAST após POG</i>	<i>123</i>
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT/PKB	proteína quinase B
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-APDC	(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-aminopirrolidina-2,4-dicarboxilato
(<i>RS</i>)-APICA	(<i>RS</i>)-1-amino-5-fosfonoindan-1-ácido carboxílico
ATP	adenosina trifosfato
Ca ²⁺	íon cálcio
DCG-IV	2 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -2-(2,3-dicarbóxiciclopropil)glicina
EAAC	carreador de aminoácidos excitatórios
EAAT	transportador de aminoácidos excitatórios
GDP	guanosina difosfato
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador de glutamato e aspartato
GLT-1	transportador de glutamato 1
GMP	guanosina monofosfato
GTP	guanosina trifosfato
GUO	guanosina
H ⁺	íon hidrogênio
HI	hipóxia-isquemia
K ⁺	íon potássio
LY 341495	(2 <i>S</i>)-2-amino-2-[(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-2-carboxicicloprop-1-yl]-3-(xanti-9-yl) ácido propanóico
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos

mGluRs	receptores metabotrópicos de glutamato
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridinium
Na ⁺	íon sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PI3-K	fosfatidil inositol 3-quinase
PKA	proteína quinase A
POG	privação de oxigênio e glicose
SNC	sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

1. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

No final da década de 50, Curtis e colaboradores demonstraram pela primeira vez que o ácido glutâmico tinha um efeito excitatório sobre o cérebro de mamíferos (Bennett and Balcar, 1999). Entretanto, foi somente no final dos anos 70 que o L-glutamato foi amplamente reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório do SNC, estando presente na maioria das sinapses (Meldrum, 2000; Ozawa et al., 1998).

O glutamato está envolvido em diversas funções fisiológicas do cérebro tais como aprendizado e memória (Izquierdo and Medina, 1997), desenvolvimento e envelhecimento (Segovia et al., 2001), como proliferação, migração celular, diferenciação e morte (McDonald and Johnston, 1990).

O glutamato pode ser sintetizado a partir da glutamina ou do α -cetoglutarato por transaminação (Schousboe and Waagepetersen, 2005). O destino do glutamato nas células depende da condição metabólica, podendo seguir para o metabolismo oxidativo através do ciclo do ácido cítrico (TCA) e gerar ATP, ou ser transformado em glutamina. Em situações onde a concentração extracelular de glutamato for menor que 0,2 mM, grande parte do glutamato astrocitário será convertido à glutamina; em concentrações acima de 0,2 mM, a preferência é que o glutamato siga pela via do TCA (Sonnewald et al., 1997). O ciclo glutamato-glutamina entre astrócitos e neurônios tem sido proposto como a maior via de reciclagem do glutamato, que ao ser captado é primeiramente convertido à glutamina, pela ação da glutamina sintetase, a qual é posteriormente transportada ao neurônio e convertida a glutamato pela ação da glutaminase (Amara and Fontana, 2002; Danbolt, 2001). Uma vez no neurônio, o glutamato é estocado em vesículas, sendo o processo de captação vesicular independente de Na^+ , e sua incorporação é possível devido a um potencial interno de membrana positivo que é gerado por uma H^+ -ATPase vacuolar, a qual media o transporte de H^+ para dentro da

vesícula (Tabb et al., 1992). A liberação do glutamato das vesículas dos terminais pré-sinápticos ocorre por exocitose e é Ca^{2+} -dependente, ou seja, quando ocorre despolarização do terminal pré-sináptico, há abertura de canais de cálcio e a entrada desse íon estimula sua liberação vesicular (Nicholls and Attwell, 1990) e/ou também do “pool” citosólico (Nedergaard et al., 2002). O glutamato também pode ser liberado pelos astrócitos através de canais dependentes de cálcio em resposta a um aumento de seus níveis intracelulares mediado por receptores (Pasti et al., 2001), em consequência ao inchaço astrocitário através de canais de ânions orgânicos volume-sensitivos (Eggermont et al., 2001), e através de uma reversão no transporte de glutamato (Warr et al., 1999). Uma vez liberado, o glutamato exerce suas funções em seus receptores, presentes nas membranas dos terminais pré e pós-sinápticos e também na membrana das células gliais (Nedergaard et al., 2002; Ozawa et al., 1998). O término de sua ação ocorre através de sua remoção por um processo de captação, visto que não existe nenhum mecanismo enzimático capaz de degradá-lo na fenda (Danbolt, 2001). Essa remoção é realizada principalmente pelas células astrocitárias através de um sistema de alta afinidade dependente de sódio (Anderson and Swanson, 2000; Attwell, 2000; Chen and Swanson, 2003).

A concentração de glutamato varia de acordo com a sua localização intra e extracelular. Em condições fisiológicas, a concentração de glutamato na fenda sináptica é em torno de 1-2 μM , 10 μM no líquido, 2 mM no citoplasma das células astrocitárias, 10 mM no citoplasma das células neuronais, e 100 mM nas vesículas sinápticas (Danbolt, 2001; Nedergaard et al., 2002). Desta forma, sendo a concentração extracelular de glutamato menor que sua concentração intracelular e sendo o potencial interno de membrana negativo, assim como a carga do glutamato, o processo de captação ocorre contra o gradiente de concentração, requerendo, por isso, gasto

energético. Entretanto, este gasto não provém diretamente do ATP, mas sim de um sistema de co-transporte de íons a favor de seu gradiente de concentração, que levam consigo uma molécula de glutamato. Assim, 3 íons Na^+ e 1 íon H^+ são co-transportados para dentro da célula, juntamente com uma molécula de glutamato, contra a saída de um íon K^+ (Figura 1) (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001; Levy et al., 1998). O gasto energético se dá pela manutenção do gradiente transmembrana de Na^+/K^+ através da bomba Na^+/K^+ -ATPase (Nicholls and Attwell, 1990).

O glutamato, como mediador de sinapses excitatórias, tem um papel importante em funções fisiológicas do SNC; entretanto, uma ativação excessiva do sistema glutamatérgico pode provocar dano, ou até mesmo morte neuronal (Lipton and Rosenberg, 1994; Price, 1999). Essa situação, denominada excitotoxicidade, tem sido relacionada a diversas doenças agudas e crônicas do SNC, tais como isquemia, hipoglicemia, hipóxia e trauma (Choi, 1988; Lipton, 1999), Huntington, Alzheimer e *status epilepticus*, respectivamente (Danbolt, 2001; Maragakis and Rothstein, 2004; Segovia et al., 2001)

1.1. Receptores glutamatérgicos

Os receptores de glutamato medeiam a maioria da neurotransmissão excitatória no SNC de mamíferos. Esses receptores são classificados em dois grandes grupos, ionotrópicos e metabotrópicos, de acordo com suas características farmacológicas e moleculares, os quais geralmente coexistem em uma única sinapse (Ozawa et al., 1998; Pin and Duvoisin, 1995). NMDA e AMPA encontram-se espalhados na densidade pós-sináptica (DPS), enquanto os mGluRs estão localizados na periferia da DPS (Ozawa et al., 1998).

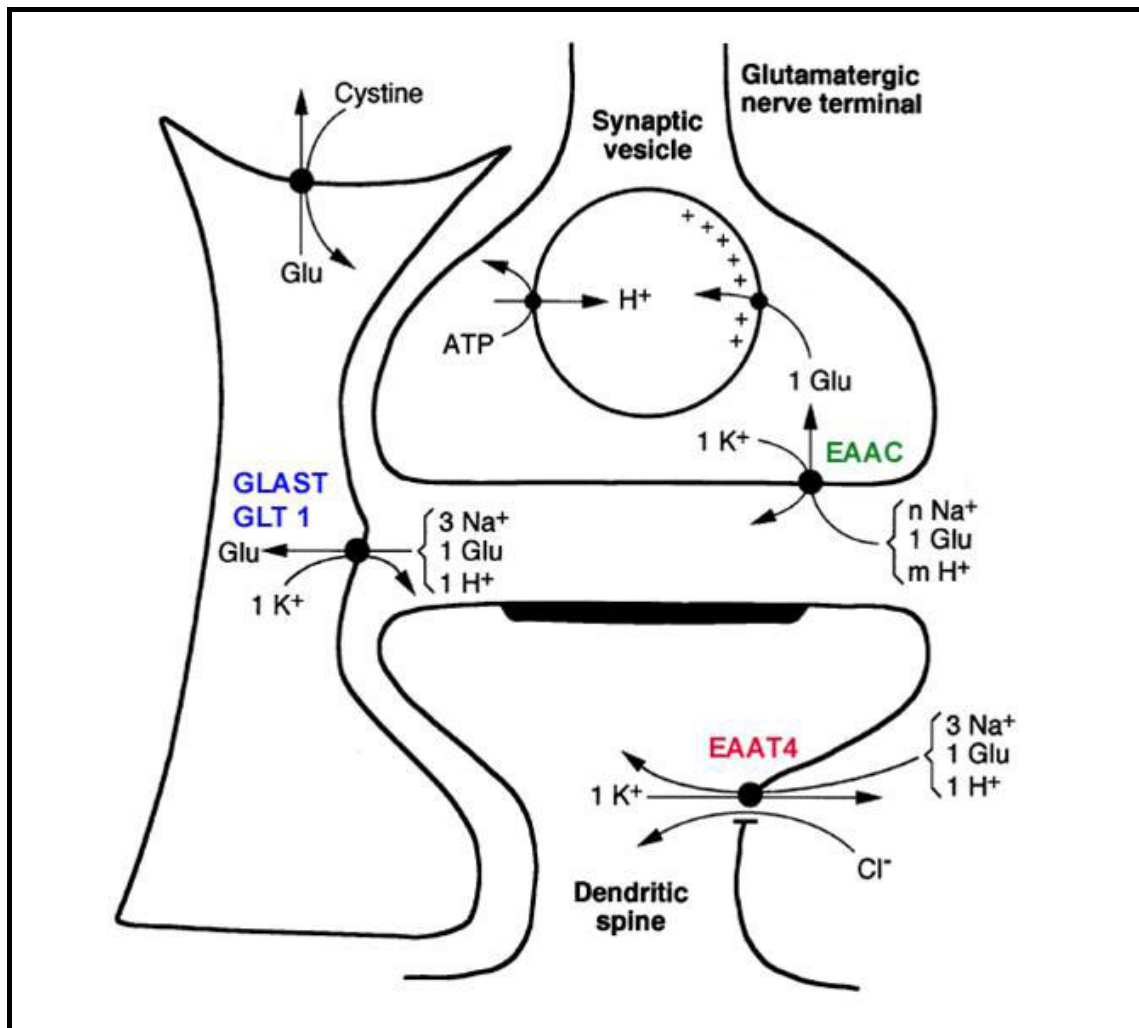


FIGURA 1 – Sinapse glutamatergica. Mecanismo de transporte de glutamato e localização de seus transportadores nos astrócitos e neurônios. O transporte de glutamato é dependente de um gradiente de sódio gerado pela bomba Na⁺/K⁺-ATPase. Os astrócitos são os principais responsáveis pela captação de glutamato no SNC. (Adaptado de: Danbolt, 2001).

Os receptores ionotrópicos (iGluRs) são canais iônicos que quando ativos se tornam permeáveis a cátions como sódio, cálcio e potássio (Schoepp et al., 1995) e são classificados em NMDA, AMPA e cainato, sendo os dois últimos frequentemente chamados de receptores não-NMDA (Ozawa et al., 1998). Os receptores NMDA medeiam a transmissão sináptica lenta, são altamente permeáveis a Ca²⁺ (Meldrum, 2000; Ozawa et al., 1998), são voltagem dependentes e possuem glicina como co-agonista (Johnson and Ascher, 1992). Em potenciais de repouso estão normalmente

bloqueados por magnésio e a liberação do canal NMDA depende da despolarização da membrana (Edmonds et al., 1995). Os receptores AMPA, assim como os cainato, medeiam a transmissão sináptica excitatória rápida e estão associados primariamente a canais independentes de voltagem, sendo canais permeáveis principalmente ao sódio e potássio, com baixa permeabilidade ao Ca^{2+} (Ozawa et al., 1998). A ativação destes receptores não-NMDA produz despolarização, a qual promove a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Este é o caso da despolarização mediada por AMPA estimulando receptores NMDA pelo deslocamento do Mg^{2+} (Cotman et al., 1981).

Os receptores metabotrópicos (mGluRs) são moléculas ligadas a sistemas de segundos mensageiros através de proteína G, modulando a atividade de diversas enzimas como adenilato ciclase, guanilato ciclase e fosfolipase C (Ozawa et al., 1998; Pin and Duvoisin, 1995). Esses receptores são subdivididos em: grupo I (mGluR1 e 5), grupo II (mGluR2 e 3) e grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8). Os mGluRs do grupo I estão acoplados à hidrólise de fosfoinositídeos de membrana, e os do grupo II e III estão ligados à modulação da adenilato ciclase e síntese de AMPc. Estes receptores estão localizados nos terminais pré e pós-sinápticos e nas células gliais e estão relacionados tanto a efeitos excitotóxicos quanto inibitórios (Ozawa et al., 1998). Os mGluRs localizados nos terminais pós-sinápticos estão ligados a modulação da atividade dos canais iônicos e os localizados nos terminais pré-sinápticos estão ligados a regulação da transmissão sináptica (parece modular canais de Ca^{+}) (Ozawa et al., 1998).

A neurotoxicidade do glutamato está intimamente ligada a um aumento de Ca^{2+} intracelular causada pela estimulação excessiva de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos e à subsequente perda da homeostase intracelular do Ca^{2+} . Sendo o receptor NMDA altamente permeável ao Ca^{2+} , sua hiperestimulação tem sido considerada como a principal responsável pela morte celular devido à excitotoxicidade

do glutamato (Meldrum, 2000; Ozawa et al., 1998). Em consequência da ativação de mGluRs de grupo I, trabalhos apontam efeitos neurotóxicos (Kohara et al., 2008; Nicoletti et al., 1999). Os mGluRs de grupo II e III têm sido relacionados a situações de neuroproteção em diversos modelos experimentais (Berent-Spillson and Russell, 2007; Vernon et al., 2007; Zhou et al., 2006). Desordens neurológicas nas quais os mecanismos de excitotoxicidade através da estimulação dos receptores glutamatérgicos podem estar envolvidos incluem isquemia, hipoglicemia, hiperglicemia, trauma, epilepsia, Parkinson, Alzheimer e Huntington (Choi, 1988; Danbolt, 2001; Ikonomidou et al., 1989; Lipton, 1999; Maragakis and Rothstein, 2001).

1.2. Transportadores de glutamato

Concentrações extracelulares de glutamato são mantidas em níveis fisiológicos exclusivamente por transportadores de alta afinidade Na^+ -dependentes (EAATs). Os EAATs, localizados tanto em células neuronais quanto gliais, são os responsáveis pela captação do glutamato extracelular, permitindo a transmissão excitatória normal, assim como protegendo da excitotoxicidade do glutamato (Beart and O'Shea, 2007; Danbolt, 2001).

Cinco transportadores de glutamato de alta afinidade foram clonados até o momento, alguns neuronais e outros gliais, sendo sua distribuição dependente de região e idade dependente. São eles: GLAST/EAAT1 (Storck et al., 1992), GLT-1/EAAT2 (Pines et al., 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai and Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995) e EAAT5 (Arriza et al., 1997). Estes cinco transportadores de glutamato fazem parte de uma única família de proteínas e apresentam entre 50 e 60% de homologia na seqüência de aminoácidos entre si (Beart and O'Shea, 2007).

GLAST e GLT-1 foram primeiramente detectados em astrócitos (Rothstein et al., 1994) e são quantitativamente os principais transportadores de glutamato, sendo responsáveis pela maior parte da captação deste aminoácido no SNC (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001). GLAST está presente nas células gliais de todo SNC. Encontra-se em altas concentrações na glia de Bergmann do cerebelo e em níveis mais baixos no restante do SNC (Danbolt, 2001; Kanai and Hediger, 2004; O'Shea, 2002). Seus níveis são maiores que os de GLT-1 no bulbo olfatório e está presente, ao contrário do GLT-1, nas células de Müller da retina (Danbolt, 2001). O GLT-1 é quase exclusivamente glial e está amplamente distribuído por todo SNC em altas concentrações (Danbolt, 2001; Kanai and Hediger, 2004; O'Shea, 2002). Os níveis cerebrais de GLT-1 são aproximadamente quatro vezes maiores que os de GLAST em hipocampo e seis vezes menores no cerebelo (Lehre and Danbolt, 1998). Estudos recentes mostram a existência de uma forma variante de GLT-1 em neurônios; entretanto, essa forma não parece estar envolvida com as propriedades de transporte de aminoácidos, mas sim na regulação do extravasamento de glutamato na fenda sináptica (Chen et al., 2004; Sullivan et al., 2004). GLAST e GLT-1 encontram-se em maiores concentrações nas membranas astrocitárias que circundam o neuropil (terminal nervoso, axônios e espinhas dendríticas) do que nas demais partes da membrana plasmática que circunda a pia mater, o endotélio capilar, outros astrócitos e corpos celulares e ambos transportadores podem coexistir numa mesma célula, mas em proporções diferentes dependendo da região (Chaudhry et al., 1995; Lehre and Danbolt, 1998).

GLAST e GLT-1 estão presentes no SNC em baixas concentrações desde estágios precoces de desenvolvimento e aumentam até a idade adulta (Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997). No cérebro imaturo ou em desenvolvimento, os níveis de GLAST predominam sobre os de GLT-1, o qual não é detectado ao nascimento

(Levy et al., 1995). Após a primeira semana pós-natal, o GLT-1 pode ser detectado no "forebrain" e, após a segunda semana, no cerebelo, e ambos transportadores atingem níveis adultos a partir da quinta semana (Ullensvang et al., 1997). As concentrações de GLAST e GLT-1 aumentam drasticamente no período de maior atividade de sinaptogênese (do final da segunda ao final da quarta semana pós-natal), atingindo níveis adultos após trinta e cinco dias de vida.

Os demais transportadores de glutamato, EAAC1, EAAT4 e EAAT5, são encontrados predominantemente em neurônios (Gegelashvili and Schousboe, 1998). O EAAC1 é encontrado na maioria dos neurônios do sistema glutamatérgico, assim como nos neurônios do sistema gabaérgico (células de Purkinje), e está localizado no corpo celular dos neurônios e dendritos, evitando os terminais nervosos (Danbolt et al., 1998; Nedergaard et al., 2002). Sua posição estratégica parece estar relacionada ao controle da perfusão do glutamato (Rothstein et al., 1994), e a utilização do glutamato como precursor para síntese de GABA (Sheldon and Robinson, 2007). EAAT4 está predominantemente localizado nas células GABAérgicas cerebelares de Purkinje (Furuta et al., 1997) e EAAT5 está presente nas células fotoreceptoras bipolares da retina de roedores (Arriza et al., 1997). Os transportadores neuronais EAAC1 e EAAT4 não são quantitativamente os responsáveis pela manutenção da concentração de glutamato extracelular abaixo de seus níveis neurotóxicos (Danbolt, 2001); seu papel parece estar mais relacionado a mecanismos de controle do sistema glutamatérgico (Sheldon and Robinson, 2007).

EAAC1 está presente desde estágios iniciais de desenvolvimento e atinge seu pico de concentração no quinto dia pós-natal, enquanto o EAAT4 está presente desde o primeiro dia pós-natal atingindo níveis adultos na segunda semana de vida (Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997).

Assim como a maioria das proteínas, os transportadores são regulados por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Há aproximadamente uma década, estudos mostraram que astrócitos não expressam GLT-1, mas quando co-cultivadas com neurônios sim. Esse efeito também pode ser mimetizado usando meio condicionado de cultura de neurônios, indicando que fatores secretados pelas células neuronais induzem a expressão de GLT-1 (Swanson et al., 1997). Outros estudos mostram que situações de excitotoxicidade induzida em co-cultura com conseqüente morte neuronal, resultaram na diminuição da expressão de GLT-1 e um aumento da expressão de GLAST nos astrócitos remanescentes (Schlag et al., 1998). O efeito observado em GLT-1 se repetiu em estudos *in vivo*, mas o contrário foi observado para GLAST (Levy et al., 1995), mostra a contribuição dos neurônios na expressão dos transportadores. Ativação de quinases parece ser um potente sinal na regulação da atividade dos EAATs: PKC, PKA e PI3K (Davis et al., 1998; Lortet et al., 1999), estão relacionadas a um aumento da atividade, quantidade ou expressão de transportadores na membrana celular. A expressão de GLAST na membrana celular pode ser rapidamente modulada por alterações nas concentrações extracelulares de glutamato, onde se observa uma rápida migração desse transportador do citoplasma para a membrana (Duan et al., 1999).

Alterações na expressão dos transportadores de glutamato têm sido relacionadas a uma variedade de desordens do SNC. Na Esclerose Amiotrófica Lateral, estudos mostram uma diminuição da atividade funcional dos transportadores com uma diminuição dos níveis de GLT-1 (Rothstein et al., 1995). Uma diminuição de GLAST e GLT-1, também foi observada na Doença de Alzheimer e na Epilepsia (Maragakis and Rothstein, 2001; Maragakis and Rothstein, 2004). Na Doença de Huntington, uma diminuição da expressão de GLT-1 acompanhada de uma diminuição da captação de glutamato foi observada em estriado e córtex de ratos (Maragakis and Rothstein, 2006).

2. ISQUEMIA CEREBRAL

A isquemia cerebral é o resultado de uma redução transitória ou permanente do fluxo sanguíneo. A redução do fluxo sanguíneo é geralmente causada pela oclusão da artéria cerebral por um êmbolo ou trombose local. Com uma incidência de aproximadamente 250-400 em 100.000 indivíduos e uma mortalidade de aproximadamente 30%, a isquemia continua sendo a terceira maior causa de morte em países industrializados. Nos Estados Unidos, 4.000.000 de vítimas sobreviventes de uma isquemia, sofrem das seqüelas isquêmicas (Dirnagl et al., 1999). A injúria cerebral em consequência à isquemia resulta em uma cascata de eventos patofisiológicos, durante o processo isquêmico ou durante a reperfusão, que incluem: excitotoxicidade, despolarização, inflamação e morte celular (White et al., 2000). A figura 2 mostra alguns dos eventos que ocorrem durante e após um episódio isquêmico.

O cérebro é altamente dependente de fluxo sanguíneo contínuo para o suprimento de oxigênio e glicose, sendo mais vulnerável ao dano isquêmico que os outros tecidos. A fonte energética cerebral depende quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para a produção de energia (Deitmer, 2001). Como consequência da perda energética, há perda do potencial de membrana e despolarização das células neuronais e gliais, levando à ativação dos canais dependentes de Ca^{2+} e liberação de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato. A ativação dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato contribuem para o aumento do Ca^{2+} intracelular o que inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que culminam em morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (Taoufik and Probert, 2008). Altos níveis de Ca^{2+} intracelular desencadeiam ativação de proteases, fosfolipases e ciclooxigenases e conseqüente formação de radicais livres que sinalizam moléculas pró-inflamatórias e

pró-apoptóticas (Dirnagl et al., 1999; Lipton, 1999). A elevação do Ca^{2+} também leva à formação de peróxido nítrico o qual causa dano na membrana celular (Iadecola, 1997).

Com a quebra energética, o funcionamento da bomba Na^+/K^+ -ATPase, que consome aproximadamente 60% da energia cerebral (Deitmer, 2001), está prejudicado, levando ao aumento extracelular de K^+ e intracelular de Na^+ e Cl^- , causando edema celular com conseqüente aumento da pressão intracraniana, herniação e dificuldade de acesso do fluxo sanguíneo à zona central da isquemia. Ao mesmo tempo, outro processo dependente de energia, a captação de glutamato, está prejudicado, aumentando ainda mais os níveis de glutamato no terminal sináptico (Bonde et al., 2003).

Uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio, a mitocôndria, tem sua membrana interna comprometida devido à ação dos radicais livres (Dugan and Choi, 1994). Sua membrana torna-se permeável, o que leva ao inchaço mitocondrial, à suspensão na produção de ATP e a um acúmulo de radicais livres (Kristian and Siesjo, 1998). O citocromo C é liberado ativando uma cascata de caspases, podendo desencadear morte por apoptose (Fujimura et al., 1998).

Mecanismos inflamatórios estão associados a altos riscos de derrame e recorrência após um primeiro derrame isquêmico. Diversas moléculas inflamatórias estão implicadas durante a fase aguda da isquemia, como citocinas, moléculas de adesão celular e metaloproteinases (Rodriguez-Yanez and Castillo, 2008).

No centro da zona isquêmica, o fluxo sanguíneo é 20% menor que o normal. Sendo assim, anoxia e despolarizações permanentes começam minutos após o início da isquemia. As células morrem rapidamente por lipólise, proteólise, desagregação de microtúbulos que seguem a falha bioenergética total e o seguimento da quebra de homeostase iônica. Entre o dano letal no centro e o cérebro normal, existe a zona de penumbra, uma área onde o metabolismo energético está parcialmente preservado. Sem

tratamento, células da zona de penumbra podem progredir para despolarização, inflamação e apoptose (Dirnagl et al., 1999; Lipton, 1999).

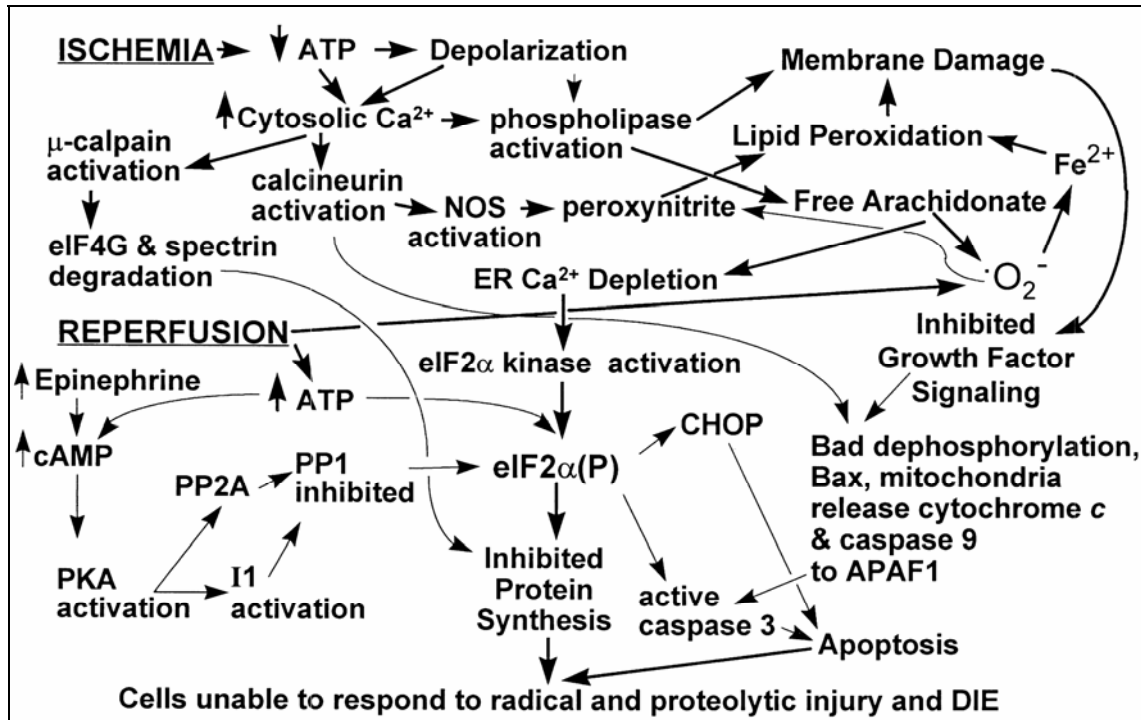


FIGURA 2: Rotas isquêmicas. Desenho esquemático dos eventos patofisiológicos que seguem um episódio isquêmico. (Fonte: White et al, 2000).

2.1. Isquemia e transportadores de glutamato

Em condições onde há falha energética, os transportadores de glutamato trabalham no sentido inverso, liberando glutamato na fenda sináptica e aumentando ainda mais as concentrações desse aminoácido (Sheldon and Robinson, 2007). Alterações na expressão dos transportadores de glutamato após um episódio isquêmico têm sido propostas como um mecanismo em potencial na contribuição da morte celular tardia. Alterações dos transportadores de glutamato ocorrem tão cedo quanto 3hs pós-reperfusão. Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* mostram uma diminuição da expressão de GLT-1 em hipocampo em diversos períodos pós-reperfusão, dependendo do modelo

experimental utilizado, e esse efeito não parece ser em consequência de uma disfunção astrocitária, visto que há um aumento de GFAP desde 4 até 21 dias pós-isquemia (Bruhn et al., 2000; Chen et al., 2005; Torp et al., 1995).

Estudos com pré-condicionamento isquêmico mostraram um efeito neuroprotetor quando seguidos de um insulto isquêmico, condição que foi capaz de produzir um aumento da expressão de GLT-1 e EAAC1 (Davis and Patel, 2003). Interessante foi o bloqueio dessa proteção por dihidrocinato (DHK), sugerindo que o aumento de GLT-1 pode ser o responsável pela neuroproteção no pré-condicionamento (Zhang et al., 2007).

Os transportadores de glutamato também podem aumentar o dano celular durante a isquemia. Estudos com culturas mostram que pré-tratamento com GDNF, um fator neurotrófico glial, aumenta a expressão de GLAST e GLT-1. O que ao primeiro olhar parece ser um fator positivo pode se tornar perigoso em situações de falha energética, pois durante o episódio isquêmico, os transportadores trabalham no sentido oposto, liberando glutamato para o meio extracelular e aumentando ainda mais a excitotoxicidade causada por esse aminoácido (Bonde et al., 2003). Na realidade, estudos apontam o transporte reverso do glutamato como o principal vilão no dano celular isquêmico (Bonde et al., 2003).

2.2. Modelos experimentais de lesão isquêmica

2.2.1. Modelos *in vivo*

2.2.1.1. Hipóxia-isquemia neonatal

A hipóxia-isquemia neonatal é um modelo que tem sido amplamente utilizado por mimetizar situações isquêmicas intra-útero, como o enforcamento pelo cordão umbilical, hemorragia intraventricular em bebês com baixo peso (< 1500g), ruptura de placenta e complicações durante o parto (Gill and Perez-Polo, 2008). O modelo mais aceito e mais utilizado é o modelo de Levine (Levine, 1960) adaptado para animais com 7 dias por Rice (Rice et al., 1981), o qual reproduz injúria cerebral unilateral causando dano no estriado, cortex e hipocampo (Vannucci and Vannucci, 1997).

O modelo consiste da obstrução de uma das carótidas, seguida da exposição a baixas tensões de oxigênio (8%) por 90 minutos e posterior recuperação. Nesse modelo, os animais são capazes de resistir por até 3-4 horas de exposição à hipóxia (Rice et al., 1981). Esse modelo leva à atrofia cerebral tardia de estruturas como hipocampo e córtex (Figura 3).

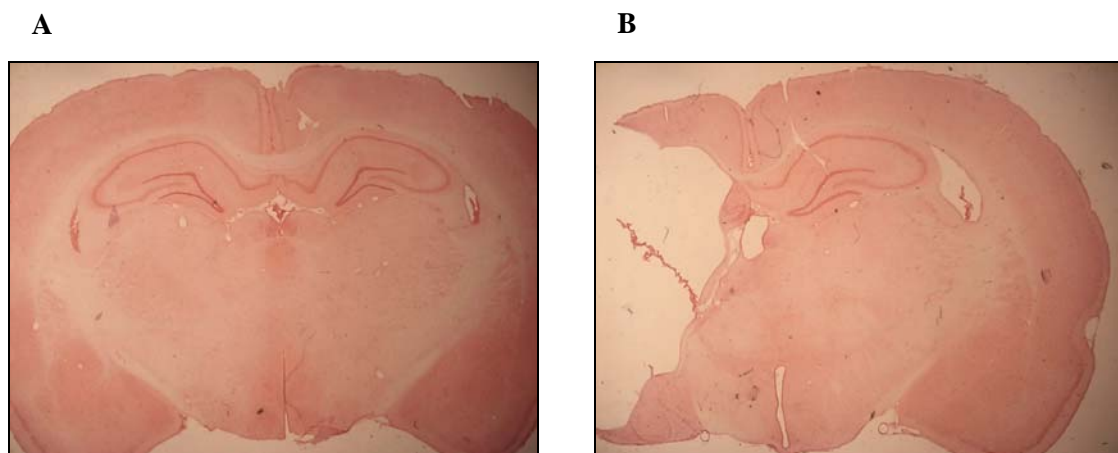


FIGURA 3: Atrofia cerebral. Imagens representativas de cérebro de ratos de 90 dias submetidos à hipóxia-isquemia com 7 dias pós-natal. A figura A mostra um cérebro de rato controle e a figura B a de um rato submetido a 90 minutos de hipóxia, com prévia obstrução da carótida esquerda. Coloração de hematoxilina-eosina. Essas imagens fazem parte de um dos trabalhos desenvolvidos nessa Tese, descrito no Capítulo 3.

2.2.1.2. Isquemia focal

O modelo de isquemia focal corresponde, clinicamente, a um derrame isquêmico (Mergenthaler et al., 2004). Nesse modelo, somente uma região do cérebro é afetada devido à obstrução de uma artéria média, e em alguns casos, também da carótida (Ley et al., 2007).

2.2.1.3. Isquemia global

O modelo de isquemia global corresponde, clinicamente, a uma parada cardíaca (Mergenthaler et al., 2004). O modelo mais usado é o dos 4 vasos, que incluem a cauterização das artérias cerebrais e a oclusão temporária das carótidas (Netto et al., 1993).

2.2.2. Modelos *in vitro*

Modelos de isquemia *in vitro* têm sido amplamente utilizados como uma alternativa para experimentação animal *in vivo*. Cultura organotípica de tecido e fatias agudamente isoladas, geralmente de hipocampo, são os modelos mais utilizados (Cardenas et al., 2000; Cimarosti et al., 2001). Tanto no primeiro quanto no segundo modelo, as fatias são expostas a uma situação de privação de oxigênio e glicose (POG), a fim de mimetizar os efeitos causados por um episódio isquêmico. Usando um meio sem glicose, as fatias ou cultura são submetidas a uma condição anaeróbica por um determinado período.

Os modelos de cultura organotípica e de fatias oferecem importantes vantagens devido à manutenção da arquitetura celular e das conexões interneurônios. O modelo de fatias agudamente isoladas é limitado a algumas horas, pois o estado metabólico celular

é rapidamente comprometido, fazendo com que seja um bom modelo para análise de alterações agudas (Dong et al., 1988). Em culturas, as células são mantidas viáveis por mais tempo que no modelo de fatias, permitindo investigar parâmetros bioquímicos em períodos mais longos após um episódio isquêmico (Cho et al., 2004), além de mimetizar rotas metabólicas em tecidos vivos e facilitar o design de agentes terapêuticos (Stoppini et al., 1991).

3. GUANOSINA

Os derivados da guanina estão intimamente relacionados ao sistema de transdução de sinal via proteína G, através da modulação da atividade de efetores intracelulares (Gudermann et al., 1997). No SNC, essa forma de transdução de sinal está associada a subtipos de praticamente todos os receptores estudados, entre eles os glutamatérgicos (Ozawa et al., 1998). Além de seus efeitos intracelulares, evidências indicam que as bases púricas derivadas da guanina (GTP, GDP, GMP) e o nucleosídeo guanosina, têm sido relacionados a efeitos de sinalização extracelulares sem o envolvimento de proteína G, e exercem efeitos tróficos tanto nos neurônios quanto nas células gliais, sendo importantes durante o desenvolvimento, na manutenção do sistema nervoso e em resposta a doenças ou injúria. Os efeitos tróficos incluem estimulação da proliferação astrocitária, efeitos tróficos e mitóticos em neurônios e em células da glia (Ciccarelli et al., 2000; Rathbone et al., 1999).

As concentrações extracelulares das purinas são dependentes de um balanço entre sua liberação, captação e metabolismo, sendo as ectonucleotidases responsáveis por sua metabolização extracelular (Rathbone et al., 1999). Estudos mostram que tanto os neurônios quanto as células gliais liberam guanosina e que bases púricas são

liberadas a partir de astrócitos tanto em situações fisiológicas quanto patológicas (Ballerini et al., 1995). A inibição da atividade da ecto-5'-nucleotidase mostrou uma redução significativa no acúmulo extracelular de guanosina, indicando que esta é derivada amplamente do metabolismo extracelular dos nucleotídeos da guanina (Schmidt et al., 2007). Recentemente, sítios de ligação específicos para guanosina foram descritos (Traversa et al., 2002).

Diversos são os trabalhos mostrando os efeitos dos derivados da guanina no SNC e sua íntima ligação com o sistema glutamatérgico. Em concentrações que variam de 100 μ M a 1 mM, os derivados da guanina bloqueiam respostas celulares à ação de glutamato ou seus agonistas tais como: bloqueiam o influxo de cálcio induzido por NMDA em retinas de pintos (Burgos et al., 2000), diminuem a fosforilação de GFAP (Tasca et al., 1995) e o aumento de AMPc induzido por glutamato (Tasca and Souza, 2000), inibem a união do glutamato e agonistas (KA, L-AP4 e NMDA) a seus receptores (Porciuncula et al., 2002; Souza and Ramirez, 1991), assim como de antagonistas (Barnes et al., 1993). Astrócitos liberam nucleotídeos derivados da guanina e guanosina em situações de repouso e sua liberação é aumentada em situações de hipóxia/hipoglicemia (Ciccarelli et al., 1999), um processo que envolve excitotoxicidade glutamatérgica. Altas concentrações extracelulares de guanosina são encontradas após isquemia e seus níveis permanecem elevados por vários dias após o insulto (Uemura et al., 1991). A guanosina parece possuir um efeito anti-apoptótico através da ativação de PI3-K/AKT/PKB em cultura de astrócitos (Di Iorio et al., 2004).

Trabalhos realizados neste departamento têm demonstrado um efeito neuroprotetor dos derivados da guanina contra desordens do sistema glutamatérgico, assim como efeitos fisiológicos envolvendo esse sistema. Guanosina e GMP são capazes de proteger camundongos adultos de convulsões induzidas por ácido

quinolínico (agonista glutamatérgico), mas não por picrotoxina (antagonista GABA_A) quando injetados intraperitonealmente (Schmidt et al., 2000), indicando, assim, uma certa seletividade destes derivados púricos pelo sistema glutamatérgico. Quando administrada oralmente, a guanosina protegeu de convulsões induzidas por ácido quinolínico, atenuou convulsões e morte induzidas por alfa-dendrotoxina, mas não protegeu de convulsões quando ácido caínico foi utilizado (Lara et al., 2001). A cafeína, um antagonista de receptores de adenosina, não inibiu as convulsões induzidas por ácido quinolínico, demonstrando que a ação da guanosina não envolve receptores adenosinérgicos. A guanosina apresenta efeitos amnésicos no teste da esQUIVA inibitória, efeitos semelhantes aos dos antagonistas glutamatérgicos (Saute et al., 2006).

A guanosina exerce um efeito sobre a captação de glutamato ainda não totalmente elucidado. Essa base púrica derivada da guanina foi capaz de aumentar a captação de glutamato em cultura de astrócitos sem envolvimento de receptores adenosinérgicos (Frizzo et al., 2001) e em fatias de córtex parietal de ratos de 10 dias, submetidas ou não à isquemia (Frizzo et al., 2002); também foi capaz de evitar a diminuição da captação induzida pela hipóxia-isquemia neonatal em fatias de hipocampo (Moretto et al., 2005), e proteger fatias de hipocampo, expostas à privação de oxigênio e glicose, de dano celular e ainda prevenir a queda da captação que ocorre após o insulto (Thomazi et al., 2008). Além disto, o efeito da guanosina em relação à captação de glutamato parece variar de acordo com o período de cultivo celular, visto que há um aumento na captação de glutamato em cultura cortical de astrócitos com 10 dias de cultivo *in vitro*, mas não naquelas com 40 dias (Gottfried et al., 2002), assim como em fatias de hipocampo de ratos de 10 dias (Thomazi et al., 2004). A administração crônica de guanosina por via oral foi capaz de aumentar a captação de glutamato em fatias corticais de cérebro de ratos, com um aumento nos níveis de

guanosina no líquido em relação ao grupo tratado (Vinade et al., 2005). O efeito sobre a captação de glutamato parece ser específico da guanosina, uma vez que os nucleotídeos precisam ser hidrolisados para exercer esse efeito (Frizzo et al., 2003).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Estudar as possíveis alterações na captação de glutamato em diferentes modelos, *in vitro* e *in vivo*, de isquemia cerebral, e a correlação de algumas drogas neuroprotetoras com esse sistema de transporte.

4.2. Objetivos Específicos

- Investigar alterações na captação de glutamato em um modelo *in vitro* de lesão isquêmica, usando fatias de hipocampo de ratos expostas à POG. Verificar se há alteração tempo-dependente durante a reperfusão na captação de glutamato, assim como dano celular, e um possível efeito da GUO sobre o sistema de transporte.
- Padronizar a metodologia de captação de glutamato em cultura organotípica de hipocampo e investigar o perfil da captação em diversos tempos de reperfusão. Também, investigar se o efeito neuroprotetor da GUO em cultura organotípica de hipocampo sobre a morte causada por POG estaria relacionado com alterações na captação de glutamato como observado em fatias.

- Usando um modelo *in vivo* de hipóxia-isquemia, investigar algumas alterações bioquímicas precoces em diferentes tempos pós-insulto, como captação de glutamato, expressão de GFAP e S100B. Também avaliar o envolvimento da GUO sobre esses parâmetros e se esta é capaz de proteger de atrofia cerebral tardia em consequência do insulto precoce.
- Investigar um possível efeito do APDC, agonista metabotrópico de grupo II, sobre a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos expostas à POG.

CAPÍTULO 1

*PROFILE OF GLUTAMATE UPTAKE AND CELLULAR VIABILITY IN
HIPPOCAMPAL SLICES EXPOSED TO OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION:
DEVELOPMENTAL ASPECTS AND PROTECTION BY GUANOSINE*

Brain Research, 10: 233-240, 2008.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres

**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: Developmental aspects and protection by guanosine

Ana Paula Thomazi*, Bruna Boff, Tales D. Pires, Graça Godinho, Cintia E. Battú, Carmem Gottfried, Diogo O. Souza, Christianne Salbego, Susana T. Wofchuk

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO
Article history:

Accepted 17 October 2007

Available online 22 October 2007

Keywords:

Glutamate uptake
Oxygen and glucose deprivation
Guanosine
Development
Cell viability

ABSTRACT

Stroke syndromes are a major cause of disability in middle and later life resulting in severe neuronal degeneration and loss of brain functions. In situations with energy failure, glutamate transport is impaired and high levels of this amino acid accumulate on the synaptic cleft. Our group has showed that guanosine exerts neuroprotection against neurotoxicity situations. The aim of this work is draw a post-ischemic profile of glutamate uptake and cell damage using an oxygen and glucose deprivation model (OGD) in hippocampal slices from young (P10) and adult (P60) rats, analyzing guanosine effect. OGD decreases glutamate uptake in both ages and recovery times, although decrease in cell viability was only observed 1 and 3 h after OGD in young and adult animals, respectively. Guanosine partially protected cell damage from 1 h in P10 and at 3 h in P60 rats and avoided glutamate uptake decrease from P10 rats at 3 h. The impairment of glutamate transporters since immediately after the insult observed here is probably due to an energetic failure; loss of cell viability was only observed from 1 h after OGD. The mechanism by which guanosine acts in the 'ischemic' model used here is still unknown, but evidence leads to its antiapoptotic effect.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The brain is highly dependent on continuous supply of oxygen and glucose and a transient or permanent reduction in the blood flow to the brain leads to a complex cascade of cellular events, resulting in neuronal degeneration and, consequently, in loss of brain functions (Lipton, 1999). Stroke syndromes are a major cause of morbidity and mortality in middle and later life. The three main natural causes of ischemia are thrombosis,

embolism, and systemic decrease in blood perfusion (Caplan, 1993; Zemke et al., 2004).

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). It is involved in most brain functions (Meldrum, 2000; Danbolt, 2001), such as memory and learning (Izquierdo and Medina, 1997), development and aging (Segovia et al., 2001), and adaptation to the environment (Danbolt, 2001; Mattson et al., 2000). However, the glutamate concentration profile in the synaptic cleft is variable

* Corresponding author. Fax: +55 51 3308 5540.

E-mail address: athomazi2000@hotmail.com (A.P. Thomazi).

and it may also act as an excitotoxin when its receptors are over-stimulated (Anderson and Swanson, 2000; Meldrum, 2000; Danbolt, 2001; Maragakis and Rothstein, 2001, 2004).

The maintenance of extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels is an essential role of glial cells and this is achieved through high affinity sodium-dependent glutamate transporters present mainly in astrocytes (Anderson and Swanson, 2000; Attwell, 2000; Danbolt, 2001; Chen and Swanson, 2003). During CNS development, the expression of glutamate transporter subtypes is differentially regulated and regionally coordinated (Furuta et al., 1997; Danbolt, 2001). Concerning astrocytes, GLAST seems to be the major transporter expressed neonatally and GLT1 expression increasing later in development (Rothstein et al., 1994; Levy et al., 1995; Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997). Previously, in an age-related study, we showed that glutamate uptake presented higher activity in younger, which coincides with the most active period of synaptogenesis (Ullensvang et al., 1997), than in older rats (Thomazi et al., 2004).

In a condition of energy failure, as occurs in an ischemic episode, glutamate transport is impaired and high levels of this amino acid accumulate on the synaptic cleft, over-stimulating glutamate receptors, leading to neuronal damage. When glutamate transporters are affected due to a disruption of membrane gradient, the reverse transport might aggravate the situation (Phillis et al., 2000; Bonde et al., 2003). The susceptibility of brain to ischemia is age related, with the pattern of damage being dependent on development stage (Vannucci and Vannucci, 1997; Yager and Thornhill, 1997). Hippocampus is remarkably resistant to hypoxic-ischemic insult at 2–3 postnatal days but becomes progressively vulnerable. The CA1 hippocampus region is especially susceptible to ischemia, becoming relatively vulnerable between P7 and P13 and remaining so at later ages (Vannucci and Vannucci, 1997).

Among the *in vitro* models used to study ischemic-induced injuries, the exposition of brain tissue to oxygen and glucose deprivation (OGD) has been used as an experimental model of ischemia in order to investigate mechanisms of cell death and neuroprotection (Strasser and Fischer, 1995; Cimarosti et al., 2001, 2005; Siqueira et al., 2004a,b; Fontella et al., 2005). It offers important advantages because cell composition, such as neural cells, inflammatory competent cells, locally released effectors, and intercellular connections, is preserved (Taylor et al., 1995). Hippocampal slices have been largely used because this brain structure is particularly susceptible to ischemia, especially the CA1 cells (Moro et al., 1998; Cárdenas et al., 2000).

Beside its intracellular roles, the nucleoside guanosine (GUO) has demonstrated various extracellular signaling effects such as antagonistic effects on the glutamatergic system. A considerable number of experimental approaches performed by our group have provided evidences that GUO exerts neuroprotection against neurotoxicity situations by protecting from seizures (Schmidt et al., 2000, 2005; Lara et al., 2001; Vinadé et al., 2003; Soares et al., 2004) and by enhancing glutamate uptake in some excitotoxic situations (Frizzo et al., 2002; Gottfried et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Moretto et al., 2005a).

Considering that excessive glutamate levels are found in synaptic cleft in an ischemic condition, that the profile of

glutamate uptake differs during development as well as the profile of cell damage, and that guanosine has neuroprotective effects under neurotoxic situations, the aim of this work was to investigate a post-ischemic pattern of glutamate uptake as well as of cell damage in young and adult rats.

2. Results

The basal glutamate uptake in young rats was higher than in old rats. Oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices from 10-day-old rats and 60-day-old rats significantly decreased glutamate uptake in all reperfusion time intervals analyzed (Fig. 1). Into the control group, there was a significant

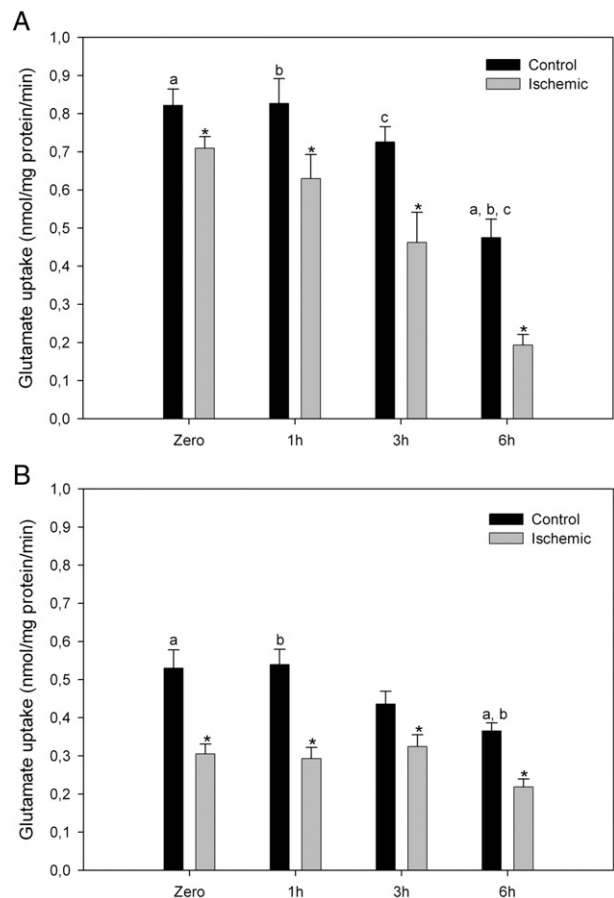


Fig. 1 – Glutamate uptake profile in slices of hippocampus from 10- (A) and 60- (B) day-old rats exposed or not to OGD. Slices were submitted to 60 min of OGD, followed by different periods of recovery. Glu-uptake was performed immediately (zero time), 1, 3 and 6 h after OGD exposure. Each determination is a mean of 8–10 independent experiments for each age, carried out in triplicate. Bars represent mean ± S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test (letters) and by Student's *t* test between control and OGD groups (*). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference among groups, while * means significant difference between OGD slices and its respective control. A: a, b $P < 0.001$ and c $P < 0.01$. B: a, b $P < 0.01$.

decrease in Glu-uptake 6 h after the insult in both ages studied (Fig. 1). In both ages and in all times, OGD group presented lower Glu-uptake than control group.

Fig. 2 shows that 100 μ M GUO avoided Glu-uptake decrease 3 h after the insult in P10 rats (Fig. 2A), while it had no effect in P60 rats 1 and 3 h after OGD (Fig. 2B).

Fig. 3 illustrates cell viability after OGD exposition evaluated by MTT method. A decrease in cell viability is time and age dependent. In young animals, cells start to decrease their

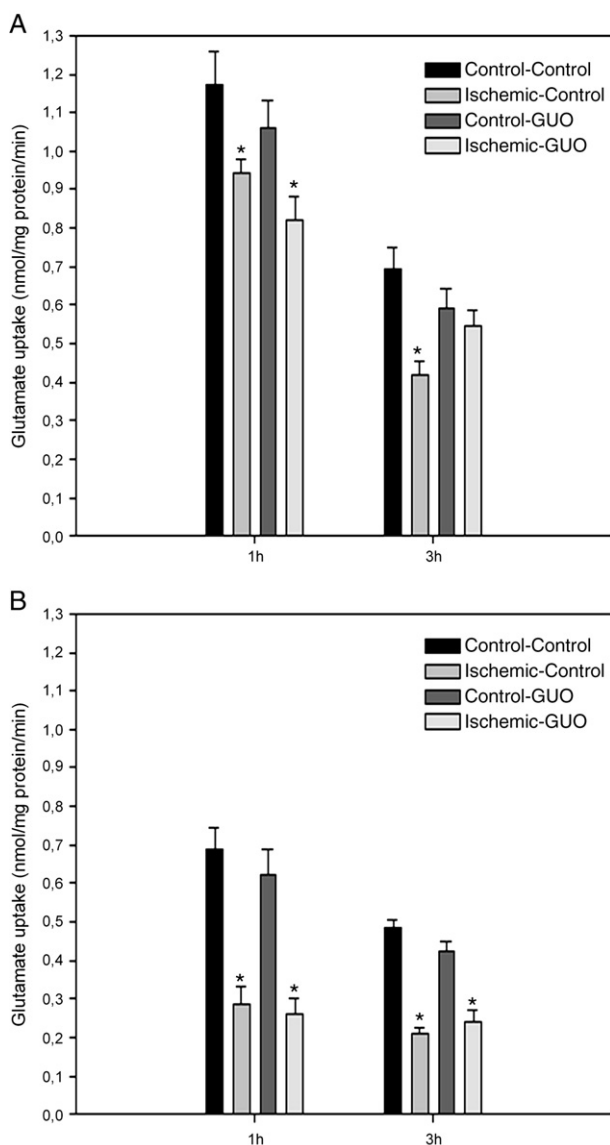


Fig. 2 – Effect of guanosine on Glu-uptake in hippocampal slices from 10- (A) and 60- (B) day-old rats, 1 and 3 h after an OGD exposition. Slices were treated with 100 μ M of GUO from the beginning of the experiment (P60) or only after OGD (P10). Each determination is a mean of 6–8 independent experiments, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistics among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test, and by Student's *t* test into groups (control \times OGD). Differences were considered significant when $P < 0.05$. * means significant difference between OGD slices and its respective control.

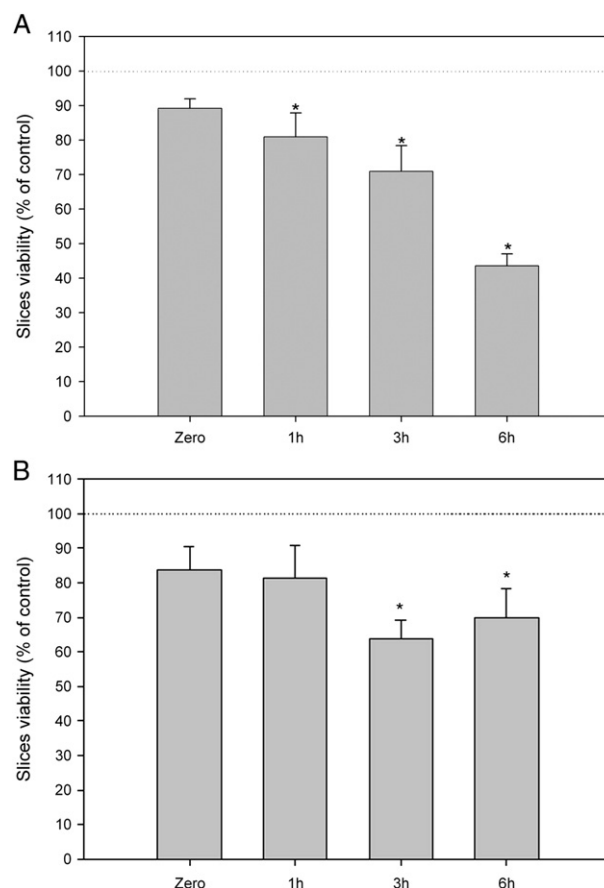


Fig. 3 – Effect of OGD on cell viability, measured by MTT method, in hippocampal slices from 10- (A) and 60- (B) day-old rats. Slices were submitted to 60 min of OGD, followed by different periods of recovery. MTT was performed immediately (zero time), 1, 3 and 6 h after OGD exposition. Each determination is a mean of 8–10 independent experiments for each age. Control slices were considered as 100% of viability. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test, and by Student's *t* test into groups (control \times OGD). Differences were considered significant when $P < 0.05$. * means statistical difference from its respective control.

viability 1 h after OGD (Fig. 3A) while this decrease starts only 3 h after the insult in adult animals (Fig. 3B). Slices treated with GUO had no alteration on its viability when compared with the non-treated group in both ages (Figs. 4A and B).

Cell membrane permeability is illustrated in Fig. 5 using trypan blue exclusion and LDH assays. In young animals, there was an increase in cell membrane permeability from 1 h after OGD (Fig. 5A), although this cell damage is only observed 3 h after the insult in adult animals (Fig. 5B). LDH leakage was able to detect only in 60-day-old rats and it was significantly higher in OGD slices when compared to its control at 1 and 3 h after the insult. Treatment with guanosine 100 μ M was able to protect membrane damage by reducing partially cell permeability 1 and 3 h after OGD in young (Fig. 5A) and 3 h after OGD in adult animals (Fig. 5B). Although GUO decreases LDH

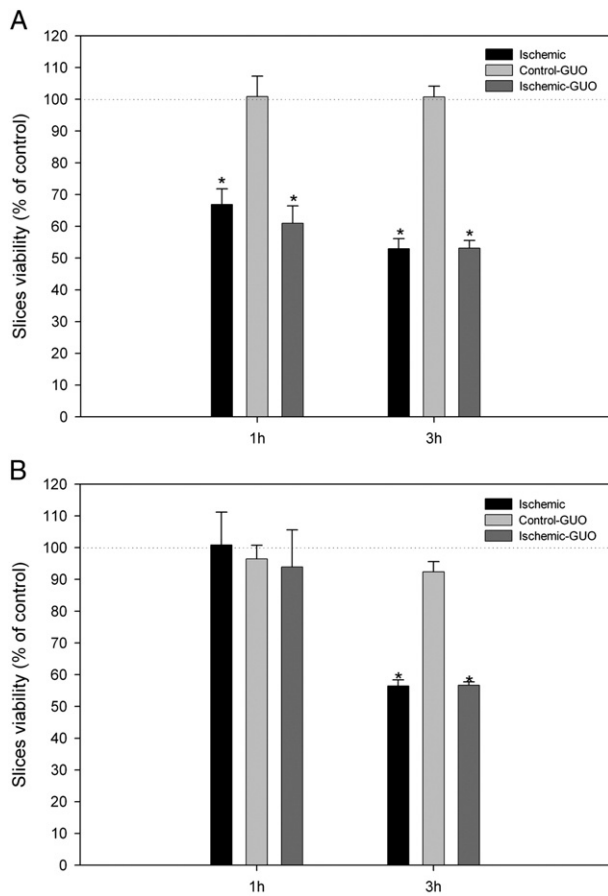


Fig. 4 – Effect of guanosine treatment on slice viability after OGD exposition in slices of hippocampus from 10- (A) and 60- (B) day-old rats. Slices were treated with 100 μ M of GUO from the beginning of the experiment (P60) or only after OGD (P10). After 1 and 3 h of recovery, slice viability was tested by MTT assay. Each determination is a mean of 4–6 independent experiments. Control slices for each group were considered as 100% of viability. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test, and by Student's *t* test into groups (control \times OGD). Differences were considered significant when $P < 0.05$. * means statistical difference from its respective control.

release from 9 to 7% in OGD slices from P60 rats, this value means no significant cell damage (Fig. 5C).

3. Discussion

Stroke is the leading cause of serious, long-term disability in the United States, with about 600,000 people suffering a new or recurrent stroke each year (White et al., 2000). In order to reduce this neurologic morbidity, we must efficiently understand the mechanisms involved in neuronal injury and repair to design clinically effective therapy. There are as yet no clinically effective therapeutic protocols for amelioration of brain damage by ischemia and reperfusion (White et al., 2000).

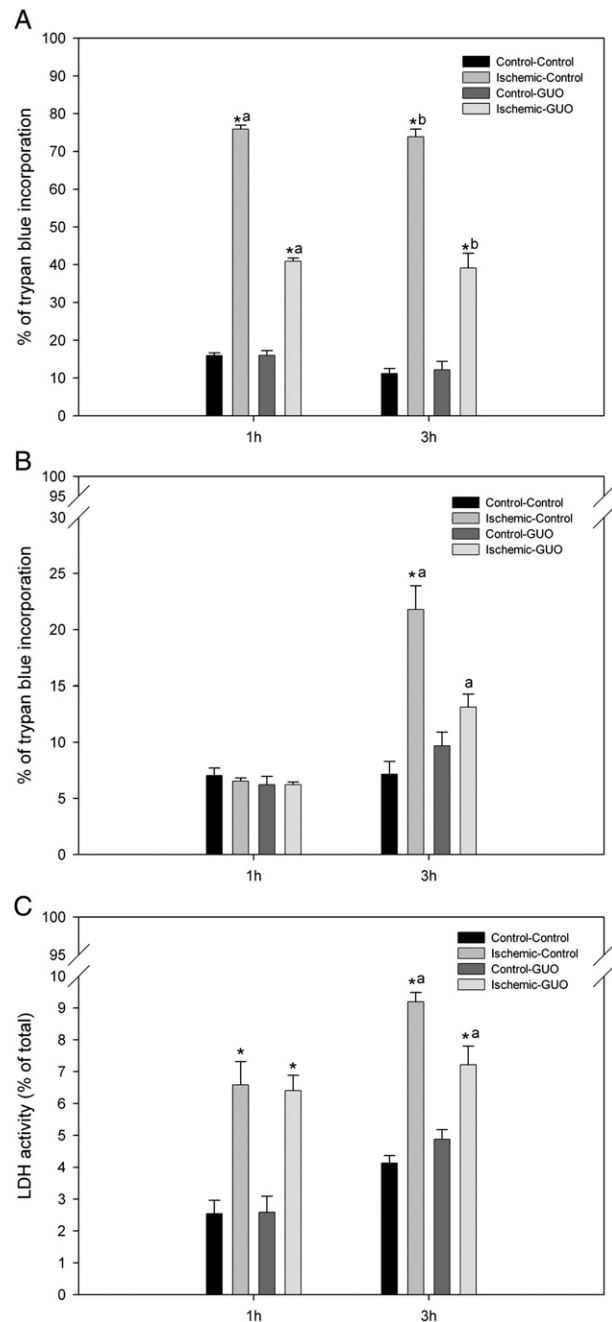


Fig. 5 – Effect of guanosine treatment on membrane damage in slices of hippocampus, from 10- (A) and 60- (B and C) day-old rats, submitted to OGD for 60 min as assessed by Trypan Blue permeability and LDH release into the medium. Slices were submitted to 60 min of OGD, followed by reoxygenation. Trypan blue and LDH release were performed 1 and 3 h after the insult. Each determination is a mean of 4–6 independent experiments. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test, and by Student's *t* test into groups (control \times OGD). Panel C shows the LDH activity released into the medium as a percent of total activity. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference among groups, while * means significant difference between OGD slices and its respective control. A: a, b $P < 0.001$. B, C: a $P < 0.01$.

It has been shown that stroke and ischemia increase the extracellular glutamate levels due to impairment of glutamate high-affinity uptake system (Massieu and Tapia, 1997), as well as an increase in glutamate release (Nishizawa, 2001; Fujimoto et al., 2004) and reversal of glutamate transporters (Bonde et al., 2003), and those seem to be involved in the neurotoxicity caused by these insults (Maragakis and Rothstein, 2004). Immediately after the insult, relevant mechanisms of damage include excitotoxicity, the production of reactive free radicals, tissue acidosis, periinfarct depolarizations, inflammation, and programmed cell death (apoptosis).

Astrocytes are involved in the normal maintenance of brain homeostasis, including several energy-dependent functions necessary for normal neuronal activity, e.g., regulation of extracellular K^+ , pH, and osmolality; export of metabolic intermediates; and rapid uptake of neurotransmitters (Walz, 2000), being mainly responsible for the maintenance of extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels (Anderson and Swanson, 2000; Attwell, 2000; Danbolt, 2001; Chen and Swanson, 2003). The ability of astrocytes to maintain these functions may, in fact, be a critical determinant of neuronal survival after ischemia (Stanimirovic et al., 1997).

The hippocampus is one of the most sensitive regions of the brain referring to the effects of global cerebral ischemia (Schmidt-Kastner and Freund, 1991). In the present study, we investigated the glutamate uptake in hippocampal slices exposed to OGD during 60 min, an *in vitro* model of ischemic injury. At all recovery times analyzed and in both ages studied (Fig. 1), we observed a decrease in glutamate uptake when compared to control slices. This is probably due to an energetic collapse that happens during an ischemic insult, since the supply of ATP in brain approaches zero within about 4 min after ischemia (Krause et al., 1988). Although high-energy phosphate charge recovers rapidly and approaches normal within 15 min of reperfusion (Siesjo and Ljunggren, 1973), no recovery in glutamate uptake was observed after 1, 3 and 6 h of reoxygenation in this model. In slices of young animals used here, the decrease in glutamate uptake was less pronounced than in adult animals. We suppose that this occurs probably due to the high plasticity of CNS at this age (Johnston et al., 2002), to its ability in readily utilized substrates other than glucose, since during the first 2 postnatal weeks suckling rodents are specially ketogenic (Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993), and to the higher activity of glutamate transporters in younger than in older animals (Fig. 1; Thomazi et al., 2004). This might be also related with the age-dependent susceptibility observed in hypoxic-ischemic models, where hippocampus CA1 region becomes relatively vulnerable between P7 and P13 and remained so at later ages (Vannucci and Vannucci, 1997). As shown in the present study, there was maintenance of glutamate uptake in control slices until 3 h of reperfusion (see Figs. 1A and B).

In the 'ischemic-like condition' model used here, we showed a decrease in cell viability (mitochondrial activity) as well as an increase in membrane permeability, measured by trypan blue, from 1 h in P10 rats (Figs. 3A and 5A), which differ from adult animals where the damage analyzed by both parameters is only observed 3 h after the insult (Figs. 3B and 5B). Previously, imaging studies have suggested that mito-

chondrial function in post-ischemic brains may be impaired for hours to days after an ischemic insult (Heiss et al., 1997; Takamatsu et al., 2000). We also observed that oxygen and glucose deprivation increased cell damage evaluated by LDH. It is possible that the decrease in glutamate uptake caused by OGD may be caused by loss in viability and/or cellular death.

Guanosine has many trophic and neuroprotective effects in astrocytes including the promotion of cell proliferation (Ciccarelli et al., 2000), the activation of synthesis and release of neurotrophic factors (Rathbone et al., 1998; Ciccarelli et al., 1999), and the stimulation of glutamate uptake (Frizzo et al., 2001). Astrocyte cultures submitted to hypoxia, a process that involves glutamatergic excitotoxicity, release guanosine (Ciccarelli et al., 1999), which level remains high for several days afterwards (Uemura et al., 1991). In a neonatal hypoxic-ischemic insult model, we (Moretto et al., 2005a) showed a decrease in glutamate uptake in hippocampal slices of pups submitted to this insult, and that guanosine administered intraperitoneally (immediately before, immediately after, 24 and 48 h after HI insult) avoided glutamate uptake decrease. In order to investigate whether guanosine might be neuroprotective in a model that has a direct access to the extracellular compartment due the lack of blood-brain barrier and where the environmental conditions can be directly controlled (Fernández-López et al., 2005), we added guanosine in the incubation medium of hippocampal slices and analyzed glutamate uptake, cell viability, and membrane permeability after an 'ischemic-like' episode. In the *in vitro* model used here, guanosine avoided glutamate uptake decreases in hippocampal slices of young rats 3 h after the insult (Fig. 2A), but not in hippocampal slices of adult rats (Fig. 2B). Guanosine also avoided partially an increase in cell permeability caused by OGD at 1 and 3 h in P10 (Fig. 5A) and at 3 h in P60 rats (Figs. 5B and C), although it had no effect on cell viability in both ages and in all recovery periods studied here (Figs. 4A and B).

Apoptosis or programmed cell death, rather than necrosis, is more prominent in immature brains (Johnston et al., 2002). Studies of animal models of stroke support the hypothesis that the brain responds to ischemic insults by activating antiapoptotic signaling pathways that involve several different neurotrophic factors and cytokines, which expression is rapidly increased following ischemic-related insults in the rodent brain (Mattson and Lindvall, 1997). Di Iorio and coworkers (2004) showed that guanosine has an antiapoptotic effect mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes induced to apoptosis by staurosporine. Considering the possible mechanisms of guanosine already described and the selective effect of guanosine on glutamate uptake in young rats showed here, also described by our group in another injury models (Frizzo et al., 2002; Oliveira et al., 2004; Moretto et al., 2005a), the mechanism by which guanosine increases glutamate uptake in P10 rats surely deserves more investigation.

The experimental model used in present work has been largely used as an *in vitro* method to mimic ischemic condition, being mainly used for pharmacological studies (Schurr et al., 1995; Ghisleni et al., 2003; Büyükuysal, 2005). However, the metabolic state of the slices is rapidly compromised, limiting the experimental period to some hours and

consequently results from this model of 'ischemia-like condition' have been restricted to acute effects, like loss of synaptic transmission, action potentials, and membrane potential (Dong et al., 1988). For this reason, other models should be used to corroborate whether guanosine modulates intracellular mechanisms, because it is not possible to investigate biochemical parameters in much longer periods in the 'ischemic-like condition' used here.

4. Experimental procedures

4.1. Chemicals

Guanosine, *N*-methyl-*D*-glucamine, HEPES and all the others reagents were purchased from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO). L-[³H]glutamate (specific activity 30 Ci/mmol) was purchased from Amersham International, UK.

4.2. Animals

Male Wistar rats 10 and 60 days old (P10 and P60, respectively) were obtained from our breeding colony. Animals were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 °C) and had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. All procedures were performed following the regulations of the local animal house authorities.

4.3. Slice preparation

Animals were decapitated, the hippocampi were quickly dissected out, and transverse sections (400 μm) were rapidly prepared using a McIlwain tissue chopper. Hippocampal slices were separated in two equal sets (control and OGD), placed into separated 24-well culture plates, and pre-incubated for 30 min in a modified Krebs–Henseleit solution (pre-incubation solution, pH 7.4 containing (mM): 120 NaCl, 2 KCl, 0.5 CaCl₂, 4 NaHCO₃, 10 MgSO₄, 1.18 KH₂PO₄, 25 HEPES, 11 glucose, at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂).

4.4. Oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation

After pre-incubation, the medium in the control plates was replaced with another modified Krebs–Henseleit solution (incubation solution, pH 7.4) containing (mM): 137 NaCl, 0.34 Na₂HPO₄, 4 NaHCO₃, 5.36 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 1.26 CaCl₂, 0.49 MgCl₂, 0.44 MgSO₄, 25 HEPES, 11 glucose, at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. For ischemic conditions, the slices were exposed to a model of oxygen and glucose deprivation described by Strasser and Fischer (1995), with some modifications (Cimarosti et al., 2001, 2005; Siqueira et al., 2004a,b). Briefly, after pre-incubation, OGD slices were washed twice with glucose free incubation medium and incubated for 60 min (OGD period) at 37 °C in an anaerobic chamber saturated with nitrogen. After the deprivation period, media from both control and OGD slices were replaced by incubation solution with glucose and were maintained at 37 °C for 1, 3 or 6 h of recovery.

4.5. Guanosine treatment

In an attempt to investigate its neuroprotective effect, 100 μM of guanosine was added into the medium, in control and OGD exposed slices, during (1) all the experiment (pre-incubation, incubation, and recovery period—1 or 3 h) in slices of P60 rats or (2) only during the recovery period in slices of P10 rats. Protocol 1 was also used in slices of P10 rats; however, the result was the same as protocol 2 (data not shown).

4.6. Cellular injury measurement

Cellular damage was assessed at different times—at the end of the OGD period (0 time) and after 1, 3 or 6 h of recovery, using three different methodologies as follows.

4.6.1. MTT assay

Slices viability assay was performed by the colorimetric [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) method. After each recovery time, slices were incubated with 0.5 mg/mL of MTT, followed by incubation at 37 °C for 45 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and measured at 560 and 630 nm. Only viable slices are able to reduce MTT. Results are expressed as a percentage of control.

4.6.2. Trypan blue incorporation

Membrane permeability was tested by Trypan blue exclusion assay as described by Moretto et al. (2005b). Briefly, at the end of each recovery time, slices were mechanically disrupted by a sequential passage through a Pasteur pipette in a solution containing 400 μL of Trypsin/EDTA (Gibco) and fetal calf serum at 37 °C, and allowed to settle during 10 min to remove residual intact tissue. An aliquot of the cell suspension was blended with 1.3% trypan blue solution. After 2 min, cells were counted in a hemocytometer by phase-contrast in an inverted light microscope at ×100 magnification. Each value indicates the percentage trypan blue labeled cells, counted in four squares of the chamber in 4–6 separated experiments, through a blinded analysis.

4.6.3. Lactate dehydrogenase activity in the incubation medium

Membrane damage was also determined by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) leakage into the incubation medium, using a spectrophotometric (490 nm) assay kit (Doles Reagents, Goiânia, Brazil). Total activity of LDH (100%) was performed by disrupting the slice by freezing/thawing and homogenization. The LDH activity released into the medium was expressed as a percent of total activity.

4.7. Glutamate uptake

Glutamate uptake (Glu-uptake) was assessed as fully detailed elsewhere (Thomazi et al., 2004). Briefly, after the recovery period, control and OGD slices were added 0.66 μCi mL⁻¹ L-[³H] glutamate with 100 μM unlabeled glutamate for 5 min in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (mM): 137 NaCl; 0.63 Na₂HPO₄; 4.17 NaHCO₃; 5.36 KCl; 0.44 KH₂PO₄; 1.26 CaCl₂; 0.41 MgSO₄; 0.49 MgCl₂ and 1.11 glucose, in pH 7.2. Sodium independent uptake was determined by using *N*-methyl-*D*-glucamine instead of sodium chloride. Sodium-

dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake of the total one to obtain the specific uptake. Protein content was determined following the method described by Peterson (1977) and the incorporated radioactivity was measured in a Wallac 1409 liquid scintillation counter.

4.8. Statistical analysis

Among groups, data were analyzed by a general factorial analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple range test. Data from control and OGD groups were analyzed by Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard error mean (S.E.M.) of 5–10 independent experiments.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, PROPESQ/UFRGS and FINEP (research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" # 01.06.0842-00).

REFERENCES

- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1–14.
- Attwell, D., 2000. Brain uptake of glutamate: food for thought. *J. Nutr.* 130, 1023S–1025S.
- Bonde, C., Sarup, A., Schousboe, A., Gegelashvili, G., Zimmer, J., Noraberg, J., 2003. Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem. Int.* 43, 371–380.
- Büyükuysal, R.L., 2005. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem. Int.* 47, 580–588.
- Caplan, L.R., 1993. *A Clinical Approach*, 2nd ed. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 23–66.
- Cárdenas, A., Moro, M.A.M., Hurtado, O., Leza, J.C., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bodelón, O.G., Boscá, O.G., Lizasoain, I., 2000. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J. Neurochem.* 74, 2041–2048.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 137–149.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M.P., 1999. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25, 93–98.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., D'Alimonte, I., Giuliani, P., Florio, T., Caciagli, F., Middlemiss, P.J., Rathbone, M.P., 2000. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29, 202–211.
- 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 cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* 315, 33–36.
- Cimarosti, H., Siqueira, I.R., Zamin, L.L., Nassif, M., Balk, R., Frozza, R., Dalmaz, C., Netto, C.A., Salbego, C., 2005. Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen–glucose deprivation. *Neurochem. Res.* 30, 583–589.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- Di Iorio, P., Ballerini, P., Traversa, U., Nicoletti, F., D'Alimonte, I., Kleywegt, S., Werstiuk, E.S., Rathbone, M.P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., 2004. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia* 46, 356–368.
- Dong, W.Q., Schurr, A., Reid, K.H., Shields, C.B., West, C.A., 1988. The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia. *Stroke* 19, 498–502.
- Fernández-López, D., Martínez-Orgado, J., Casanova, I., Bonet, B., Leza, J.C., Lorenzo, P., Moro, M.A., Lizasoain, I., 2005. Immature rat brain slices exposed to oxygen–glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic–ischemic encephalopathy. *J. Neurosci. Methods* 145, 205–212.
- Fontella, F.U., Cimarosti, H., Crema, L.M., Thomazi, A.P., Leite, M.C., Salbego, C., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S., Dalmaz, C., Netto, C.A., 2005. Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res. Bull.* 65, 443–450.
- Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Dahm, K.C.S., Prokopiuk, A.S., Swanson, R., Souza, D.O., 2001. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *NeuroReport* 12, 1–3.
- Frizzo, M.E.S., Lara, D.R., Prokopiuk, A.S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O., 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 353–363.
- Fujimoto, S., Katsuki, H., Kume, T., Kaneko, S., Akaike, A., 2004. Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci. Res.* 50, 179–187.
- Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17, 8363–8375.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L.O., Cimarosti, H., Batista, T.R.J., Salbego, C.G., Souza, D.O., 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase. *immunocontent*. *Brain Res.* 986, 196–199.
- Gottfried, C., Tramontina, F., Gonçalves, D., Gonçalves, C.A., Moriguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., 2002. Glutamate uptake in cultures astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech. Ageing Dev.* 123, 1333–1340.
- Heiss, W.D., Graf, R., Lottgen, J., Ohta, K., Fujita, T., Wagner, R., Grond, M., Weinhard, K., 1997. Repeat positron emission tomographic studies in transient middle cerebral artery occlusion in cats: residual perfusion and efficacy of postischemic reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 388–400.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn Mem.* 68, 285–316.
- Johnston, M.V., Nakajima, W., Hagberg, H., 2002. Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain. *Neurosci.* 8, 212–220.
- Krause, G.S., White, B.C., Aust, S.D., Nayini, N.R., Kumar, K., 1988. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Crit. Care Med.* 16, 714–726.
- Lara, D.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E.S., Burgos, J.S., Ramirez, G., Souza, D.O., 2001. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 912, 176–180.
- Levy, L.M., Lehre, K.P., Walaas, S.I., Storm-Mathise, J., Danbolt, N.C., 1995. Down-regulation of glial glutamate transporters after

- glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2036–2041.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neuron. *Physiol. Rev.* 79, 1431–1568.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2001. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58, 365–370.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol. Dis.* 15, 461–473.
- Massieu, L., Tapia, R., 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J. Neurochem.* 69, 1151–1160.
- Mattson, M.P., Lindvall, O., 1997. Neurotrophic factor and cytokine signaling in the aging brain. In: Mattson, M.P., Geddes, J.W. (Eds.), *The Aging Brain. Adv. Gerontol.*, vol. 2, pp. 299–345.
- Mattson, M.P., Culmsee, C., Yu, Z.F., 2000. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 301, 173–187.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130, 1007S–1015S.
- Moretto, M.B., Arteni, N.S., Lavinsky, D., Netto, C.A., Rocha, J.B.T., 2005a. Hypoxic–ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp. Neurol.* 195, 400–406.
- Moretto, M.B., Funchal, C., Santos, A.Q., Gottfried, C., Boff, B., Zeni, G., Pssoa-Pureur, R., Souza, D.O., Wofchuk, S., Rocha, J.B.T., 2005b. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg²⁺. *Toxicology* 214, 57–66.
- Moro, M.A., De Alba, J., Leza, J.C., Lorenzo, P., Fernández, A.P., Bentura, M.L., Boscá, L., Rodrigo, J., Lizasoain, I., 1998. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* 10, 445–456.
- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 40, 163–221.
- Nishizawa, Y., 2001. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 69, 369–381.
- Oliveira, D.L., Horn, J.F., Rodrigues, J.M., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S., 2004. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res.* 1018, 48–54.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Phillis, J.W., Ren, J., O'Regan, M.H., 2000. Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res.* 868, 105–112.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P., Andrew, C.M., Caciagli, F., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Huang, R., 1998. The trophic effects of purines and purinergic signalling in pathological reactions of astrocytes. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12, S36–S45.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kunczi, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13, 713–725.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., Maraschin, J.F., Perla, A.S., Souza, D.O., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864, 40–43.
- Schmidt, A.P., Ávila, T.T., Souza, D.O., 2005. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem. Res.* 30, 69–73.
- Schmidt-Kastner, R., Freund, T.F., 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 4, 599–636.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1–29.
- Siesjo, B.K., Ljunggren, B., 1973. Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Arch. Neurol.* 29, 400–407.
- Siqueira, I., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Nunes, D.S., Salbego, C., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2004a. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sci.* 75, 1897–1906.
- Siqueira, I.R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Salbego, C., Netto, C.A., 2004b. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1025, 226–230.
- Soares, F.A., Schmidt, A.P., Farina, M., Frizzo, M.E.S., Tavares, R.G., Portela, L.V.C., Lara, D.R., Souza, D.O., 2004. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.* 1005, 182–186.
- Stanimirovic, D.B., Ball, R., Durkin, J.P., 1997. Stimulation of glutamate uptake and Na,K-ATPase activity in rat astrocytes exposed to ischemia-like insults. *Glia* 19, 123–124.
- Strasser, U., Fischer, G., 1995. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J. Neurosci. Methods* 57, 177–186.
- Schurr, A., Payne, R.S., Heine, M.F., Rigor, H.B., 1995. Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. *J. Neurosci. Methods* 59, 129–138.
- Takamatsu, H., Tsukada, H., Nishiyama, S., Noda, A., Umemura, K., 2000. Detection of reperfusion injury using PET in a monkey model of cerebral ischemia. *J. Nucl. Med.* 41, 1409–1416.
- Taylor, C.P., Burke, S.P., Weber, M.L., 1995. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium channel blockade. *J. Neurosci. Methods* 59, 128.
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F.R.S., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech. Ageing Dev.* 125, 475–481.
- Uemura, Y., Miller, J.M., Matson, W.R., Beal, M.F., 1991. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke* 22, 1548–1553.
- Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1997. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter protein GLAST and GLT. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1646–1655.
- Vannucci, R.C., Vannucci, S.J., 1997. A model of perinatal hypoxic–ischemic brain damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 835, 234–249.
- Vinadé, E.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E., Izquierdo, I., Elisabetsky, E., Souza, D.O., 2003. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.* 977, 97–102.
- Zemke, D., Smith, J.L., Reeves, M.J., Majid, A., 2004. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 25, 895–904.
- Yager, J.Y., Thornhill, J.A., 1997. The effect of age on susceptibility to hypoxic–ischemic brain damage. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 167–174.
- Walz, W., 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* 36, 291–300.
- 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., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179, 1–33.

CAPÍTULO 2

*A SIMPLE METHOD FOR GLUTAMATE UPTAKE IN ORGANOTYPIC CULTURE
OF HIPPOCAMPUS: PROFILE OF GLUTAMATE UPTAKE IN AN OXYGEN-
GLUCOSE DEPRIVATION AND PROTECTION BY GUANOSINE*

Journal of Neuroscience Methods, submetido em 17.04.2009.

A simple method for glutamate uptake in organotypic culture of hippocampus: profile of glutamate uptake in an oxygen-glucose deprivation and protection by guanosine

Ana P. Thomazi*, Cristiana B. Reimann, Fabrício Simão, Rudimar L. Frozza, Félix A. Soares, Diogo O. Souza, Christianne G. Salbego, Susana T. Wofchuk

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

Number of pages: 22

Number of figures: 6

* Corresponding author:

Tel.: +55-51-3308-5568

Fax: +55-51-3308-5540

E-mail address: athomazi2000@hotmail.com

Abstract

The maintenance of extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels is an essential role of glial cells and is achieved through high affinity sodium-dependent glutamate transporters present mainly in astrocytes. Glutamate uptake has been widely performed in slices freshly prepared, astrocytes and neurons culture, but not for organotypic culture. Here we standardized a method for measure glutamate uptake in organotypic hippocampal slice culture, a feasible model for studies of cerebral ischemia. We also investigated a neuroprotective effect of guanosine, a drug with direct modulation over glutamatergic system, in an *in vitro* model of ischemia. For that, we tested three different methods for measure glutamate uptake and define the best time and concentration. A profile of glutamate uptake after oxygen and glucose deprivation (OGD) was also determined. Glutamate uptake increased 1 h after recovery and decreased 24 h later, while cell damage was detectable from 13 h after OGD. Guanosine protected cells from damage 24 h after recovery, but did not prevent the decrease in glutamate uptake. Here we propose a model to verify whether the effect of ischemic neuroprotective drugs is related to alterations in glutamate uptake using organotypic culture.

Key words: organotypic hippocampal slice culture; oxygen and glucose deprivation; glutamate uptake; cell damage; guanosine

1. Introduction

Cerebral ischemia is the third leading cause of death in the industrialized countries being the major cause of morbidity and mortality in middle and later life. The reduction in the supply of glucose and oxygen to the brain that occurs in cerebral ischemia leads to a complex cascade of cellular events, resulting in neuronal degeneration and, consequently, in loss of brain functions (Lipton, 1999). One of the most important events following an ischemic episode is the increase of extracellular concentration of glutamate to mM levels, while in normal conditions, its concentration is around 3-4 μ M (Danbolt, 2001). Under normal conditions, glutamate is removed from the synaptic cleft by sodium-dependent glutamate transporters (Attwell, 2000; Chen and Swanson, 2003). GLAST and GLT1 are quantitatively the main glutamate transporters and are responsible for most of the glutamate uptake activity (Anderson and Swanson, 2000; Danbolt, 2001). They are predominantly localized in astrocytes being GLAST found mainly in cerebellar Bergmann glia and GLT1 the major glutamate transporter throughout all brain regions (Rothstein et al., 1994).

Among the *in vitro* models used to study ischemic-induced injuries, the exposition of organotypic hippocampal slice cultures to oxygen-glucose deprivation (OGD) has been used as an experimental model of ischemia in order to investigate mechanisms of cell death and neuroprotection (Cimarosti et al., 2005; Strasser and Fischer, 1995). This model offers important advantages because the maintenance of cell architecture and interneuron connections, and neurons survive during the long-term culture and physiologically mature over this period, allow an extend survival study (Cho et al., 2004).

The nucleoside guanosine (GUO) has been related to some important neuromodulatory roles. Studies *in vitro* have shown that GUO exerts trophic effects on

neural cells (Rathbone et al., 1999), reduces neuronal damage in hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation (Thomazi et al., 2008) and stimulates glutamate uptake in slices of hippocampus (Thomazi et al., 2004). Also, *in vivo* studies point to an important role of GUO in neuroprotection against seizures induced by overstimulation of the glutamatergic system (Schmidt et al., 2005; Soares et al., 2004) and increasing glutamate transporters activity (Moretto et al., 2005). Taking in account that: a) guanosine has neuroprotective effects; b) the importance in maintaining extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels; c) the neuronal damage due to an impairment of glutamate uptake during ischemia; d) the organotypic hippocampal slice culture is a good model to study the effects of ischemia; the aim of this work was describe a method for measure glutamate uptake using hippocampal organotypic culture model exposed to oxygen-glucose deprivation, trying to explain the effect of GUO on protection cell death by this mechanism.

2. Material and Methods

2.1. Organotypic hippocampal slice cultures

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared as previously described (Stoppini et al., 1991). Briefly, 400- μ m-thick hippocampal slices were prepared from 6- to 8-day-old male Wistar rats using a McIlwain tissue chopper and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of (in 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/100 mL (Schering do Brasil, São Paulo, SP, Brazil); pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture insert (Millicell®-CM, 0.4 μ m, Millipore®, Bedford, MA, USA) and the inserts were transferred to a 6-well culture plate (Cell Culture Cluster, Costar®,

New York, NY, USA). Each well contained 1 mL of tissue culture medium consisting of 50% minimum essential medium (Gibco), 25% HBSS (Gibco), 25% heat inactivated horse serum (Gibco) supplemented with (mM final concentration, pH 7.3): glucose 36, HEPES 25 and NaHCO₃ 4; fungizone 1% (Gibco) and gentamicine 36 µL/100 mL (Schering do Brasil). Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Culture medium was changed three times a week. All animal procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA).

2.2. *Oxygen and Glucose Deprivation (OGD)*

OGD was achieved by combining hypoxia with aglycemia, according to the method previously described (Strasser and Fischer, 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 1 mL of OGD medium consisting of HBSS lacking glucose for 15 min to deplete glucose from intracellular stores and extracellular space. After that, the medium was exchanged for one with the same composition but previously bubbled with N₂ for 30 min and the plate 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 standard culture medium under normoxic conditions for 24 h, corresponding to the recovery periods.

2.3. *Glutamate uptake*

In order to describe an adequate method for glutamate uptake in organotypic hippocampal culture, we tested three distinct methods to draw glutamate uptake profile.

2.3.1. Time course of glutamate uptake

Method number 1: culture inserts were washed twice with Hank's balanced salt solution (HBSS) at 37°C containing (in mM): 137 NaCl; 0.63 Na₂HPO₄; 4.17 NaHCO₃; 5.36 KCl; 0.44 KH₂PO₄; 1.26 CaCl₂; 0.41 MgSO₄; 0.49 MgCl₂ and 1.11 glucose, in pH 7.2, to remove all culture medium. Slices were carefully removed from the Millicell culture insert and transferred to a 24-well plate, two slices per well. Glutamate uptake was assessed at 37°C adding 0.66 μCi mL⁻¹ L-[³H]glutamate with 100 μM unlabeled glutamate to each well during 3, 5, 10 and 15 min. Sodium independent uptake was determined by using N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. Sodium dependent glutamate uptake was obtained subtracting the non-specific uptake of the total one to obtain the specific uptake. Protein content was determined following the Lowry modified method (Peterson, 1977) and the incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

Method number 2: Millicell culture inserts were washed twice with HBSS at 37°C and glutamate uptake was assessed by adding 0.66 μCi mL⁻¹ L-[³H]glutamate with 100 μM unlabeled glutamate over each insert, without removing the slices, during 3, 5, 10 and 15 min. Sodium independent uptake was determined using the same methodology, replacing sodium chloride by N-methyl-D-glucamine. Sodium dependent glutamate uptake was obtained subtracting the non-specific uptake of the total one to obtain the specific uptake. Protein content was determined following the Lowry modified method (Peterson, 1977) and the incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

Method number 3: Millicell culture inserts were washed twice with HBSS at 37°C and glutamate uptake was assessed by adding 0.66 μCi mL⁻¹ L-[³H]glutamate with 100 μM unlabeled glutamate under each insert, without removing the slices, during 3, 5,

10 and 15 min. Sodium independent uptake was determined using the same methodology, replacing sodium chloride by N-methyl-D-glucamine. Sodium dependent glutamate uptake was obtained subtracting the non-specific uptake of the total one to obtain the specific uptake. Protein content was determined following the Lowry modified method (Peterson, 1977) and the incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

2.3.2. Concentration course of glutamate

Once defined the methodology and the optimal time for glutamate uptake, we draw a concentration course of glutamate. Method chosen was the number 1 and the time for uptake was 5 min. The glutamate concentrations used were 1, 10, 50, 100 and 1000 μM , maintaining 0.66 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ L-[^3H]glutamate. Sodium independent uptake was determined using the same methodology, time and concentrations, replacing sodium chloride by N-methyl-D-glucamine. Sodium dependent glutamate uptake was obtained subtracting the non-specific uptake of the total one to obtain the specific uptake. Protein content was determined following the Lowry modified method (Peterson, 1977) and the incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

2.3.3. Profile of glutamate uptake after OGD exposure

Glutamate uptake was performed in many times during recovery. Following methodology number 1 and using 100 μM of glutamate, uptake was evaluated 1, 3, 6, 13 and 24 h after OGD insult.

2.4. Quantification of Cell Death

Cell damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake (Noraberg et al., 1999). After a recovery period of 11 or 22 h, 5.0 μM 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 analyzed using Scion Image software. The area where PI fluorescence was detectable above background was determined using the “density slice” option of Scion Image software and compared to the CA1 area of hippocampus to obtain the percentage of damage (Valentim et al., 2003).

2.5. *Guanosine treatment*

Guanosine was purchased from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO) and dissolved in water in a maximum concentration of 1.5 mM. In attempt to investigate its neuroprotective effect, 100 μ M of guanosine was added into the medium, in control and OGD exposed slices, during: (1) 15 min of depletion + 60 min of OGD + during 24 h of recovery or (2) only in the recovery period.

2.6. *Statistical analysis*

Among groups, data were analyzed by a general factorial analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple range test. Data from control and OGD groups were analyzed by Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard error mean (S.E.M.).

3. Results

Figure 1 shows the three methods tested to measure glutamate uptake. We chose method number 1 since it is less expensive than the others and has a very similar profile of that observed for slices freshly prepared. Once chosen the best method, we draw a

concentration course for glutamate (Fig.2) and the concentration chose was 100 μ M, the same used for slices freshly prepared of hippocampus.

Figure 3 shows the profile of glutamate uptake at different recovery periods after 60 min of OGD. There is a significant increase in glutamate uptake 1 h after the insult and a significant decrease 24 h later. Figure 4 shows cell damage in CA1 region of hippocampus 13 and 24 h after OGD, agreeing with previously works of our group (Horn et al., 2005) in which cell damage was first detected 13 h after the insult, and after 24 h more than 50% of CA1 cells were stained by PI.

The effect of GUO is showed in figure 5. Guanosine was added during 15 min of depletion + 60 min of OGD + during 24 h of recovery (data not shown), or only during the recovery period, and in both, GUO was able to protect cells against OGD insult decreasing the PI labelling as showed in Fig. 5A. However, GUO was not able to avoid glutamate uptake decrease 24 h after OGD (Fig. 5B).

4. Discussion

During an ischemic episode, extracellular glutamate levels increase due to impairment of glutamate high-affinity uptake system (Massieu and Tapia, 1997), as well as an increase in glutamate release (Fujimoto et al., 2004) and a reversal of glutamate transporters (Bonde et al., 2003), processes involved in the neurotoxicity caused by these insult (Maragakis and Rothstein, 2004). Immediately after the insult, relevant mechanisms of damage include excitotoxicity, the production of reactive oxygen species, tissue acidosis, periinfarct depolarization, inflammation and programmed cell death (apoptosis). The main cells responsible in maintaining extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels are astrocytes throughout GLAST and GLT1 transporters (Danbolt, 2001). The ability of astrocytes to maintain these functions may

be, in fact, a critical determinant of neuronal survival after ischemia.

Taking in account the importance of glutamate uptake for neuronal survival (Maragakis and Rothstein, 2004) and that organotypic culture provides good experimental access to mimic pathophysiological pathways in living tissues and facilitate design of therapeutic agents (Stoppini et al., 1991), in the present study we described an usable method for measure glutamate uptake in organotypic culture of hippocampus since it is not well described in the literature until now. For that we tested three different methods as showed in figure 1. All methods had a very similar profile concerning time course until 10 min, when method number 2 had a peak at 15 min. Method number 1 and number 3 had almost the same profile; however the levels of uptake in number 3 were a little bit reduced than the 1. This might happen because in 3, labelled glutamate is added under Millicell membrane, which could represent an obstacle for its uptake. Here, we decided for method number 1, transferring hippocampal slices to another plate before add labelled glutamate, since it is cheaper than method number 3 due the fact that we usually use the inserts more than one time after a carefully sterilization, and we would not be able to do that using method 3. The time chose for uptake glutamate was 5 minutes, the same used for slices freshly prepared of hippocampus (Thomazi et al., 2004).

Once chose the method and the time for glutamate uptake, we delineated a concentration course by using since physiological to high concentrations of glutamate. We decided for 100 μ M of glutamate, the same concentration widely used for slices freshly prepared (Thomazi et al., 2004) and astrocyte cultures (Swanson et al., 2004).

As glutamate uptake is impaired following an ischemic episode (Thomazi et al., 2008), we decided to draw a profile of glutamate uptake after 60 min of OGD in organotypic cultures. Differing from that observed for slices freshly prepared of

hippocampus where there is a decrease in glutamate uptake since immediately until 6 h after OGD, here we showed an increase in glutamate uptake 1 h after the insult and a significantly decrease only 24 h later (Fig. 3). This increase might represent an exacerbated attempt to recover extracellular concentrations of glutamate to normality (Danbolt, 2001), since after an ischemic episode, normoxia is restored and brain glucose levels normally increase twofold (Vannucci, 1992), which might explain why astrocytes restore their capacity to uptake glutamate once the membrane gradient is recovered. The decrease observed at 24 h might be related to cell death, which starts 13 h after OGD, agreeing with previous work from our group (Horn et al., 2005), even with no decrease in glutamate uptake at this point. However, the most vulnerable cells to OGD are the pyramidal neurons of CA1, and neurons are not the most responsible for glutamate uptake from the synaptic cleft, but neuronal expression of GLT-1 and GLAST has been reported in pathological brain tissue of the pyramidal cell layers. Exposure to a severe insult like OGD resulted in a marked increase in the neuronal expression of GLAST and GLT-1 (Bonde et al., 2003), but the mechanism underlying neuronal expression after severe damage is unknown.

In a previous work of our group, Thomazi and coworkers (2008) demonstrated that GUO reduced neuronal damage in hippocampal slices freshly prepared submitted to OGD and avoided glutamate uptake decrease 3 h after the insult in slices of 10 days-old rats. Here, we showed that GUO partially protected cells from death, reducing PI incorporation from 53% to 31% 24 h after OGD (Fig. 5A). Even though, this protection is not, apparently, mediated by alterations in glutamate uptake, as shown in Fig. 5B. The experimental model used by Thomazi et al. (2008) has been mainly used for pharmacological studies (Buyukuysal, 2005; Schurr et al., 1995); however, the metabolic state of the slices is rapidly compromised, limiting the experimental period to

some hours and consequently results from this model of OGD have been restricted to acute effects. So, because of that, we decided to use an *in vitro* model of organotypic slice culture in which we could investigate biochemical parameters in much longer periods in an “ischemic-like condition”, and investigate if GUO modulates intracellular mechanisms. Some works suggested that guanosine has an antiapoptotic effect mediated by the activation of the PI3-k/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes (Di Iorio et al., 2004). Here, we showed that the neuroprotection effect of GUO is not mediated by increase in glutamate uptake, but more studies must be done to clarify this point and the difference from slices freshly prepared.

In conclusion, the model of glutamate uptake in organotypic hippocampal culture we standardized here is a good model to verify whether the effect of “ischemic” neuroprotective drugs is related to alterations in glutamate uptake. This study presents a cheap and usable model for glutamate uptake in organotypic slice culture.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, PROPESQ/UFRGS and FINEP / “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00) and INCT – National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

References

- Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 2000; 32: 1-14.
- Attwell D. Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr*, 2000; 130: 1023S-5S.
- Bonde C, Sarup A, Schousboe A, Gegelashvili G, Zimmer J, Noraberg J. Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int*, 2003; 43: 371-80.
- Buyukuysal RL. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*, 2005; 47: 580-8.
- Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003; 23: 137-49.
- Cho S, Liu D, Fairman D, Li P, Jenkins L, McGonigle P, Wood A. Spatiotemporal evidence of apoptosis-mediated ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int*, 2004; 45: 117-27.
- Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentim L, Rocha E, Salbego C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett*, 2001; 315: 33-6.
- Cimarosti H, Siqueira IR, Zamin LL, Nassif M, Balk R, Frozza R, Dalmaz C, Netto CA, Salbego C. Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res*, 2005; 30: 583-9.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 2001; 65: 1-105.
- Di Iorio P, Ballerini P, Traversa U, Nicoletti F, D'Alimonte I, Kleywegt S, Werstiuk ES, Rathbone MP, Caciagli F, Ciccarelli R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia*, 2004; 46: 356-68.
- Fujimoto S, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A. Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci Res*, 2004; 50: 179-87.
- Horn AP, Gerhardt D, Geyer AB, 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*, 2005; 30: 355-61.
- Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 1999; 79: 1431-568.
- Macklis JD, Madison RD. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods*, 1990; 31: 43-6.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis*, 2004; 15: 461-73.
- Massieu L, Tapia R. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem*, 1997; 69: 1151-60.
- Moretto MB, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Rocha JB, Souza DO, Wofchuk S. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp Neurol*, 2005; 195: 400-6.
- Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1999; 3: 278-90.

Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 1977; 83: 346-56.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol*, 1999; 59: 663-90.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 1994; 13: 713-25.

Schmidt AP, Avila TT, Souza DO. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem Res*, 2005; 30: 69-73.

Schurr A, Payne RS, Heine MF, Rigor BM. Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. *J Neurosci Methods*, 1995; 59: 129-38.

Soares FA, Schmidt AP, Farina M, Frizzo ME, Tavares RG, Portela LV, Lara DR, Souza DO. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res*, 2004; 1005: 182-6.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 1991; 37: 173-82.

Strasser U, Fischer G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods*, 1995; 57: 177-86.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 2004; 4: 193-205.

Thomazi AP, Boff B, Pires TD, Godinho G, Battu CE, Gottfried C, Souza DO, Salbego C, Wofchuk ST. Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Res*, 2008; 1188: 233-40.

Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk ST. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev*, 2004; 125: 475-81.

Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, Netto CA, Salbego CG. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*, 2003; 118: 379-86.

Vannucci RC. Cerebral carbohydrate and energy metabolism in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Pathol*, 1992; 2: 229-34.

Figure legends

Fig. 1. Time course for glutamate uptake using three different methods. In method 1, slices were transferred from Millicell insert to a 24 well-plate to perform glutamate uptake; in method 2, glutamate was added over Millicell insert; and in method 3, glutamate was added under Millicell insert. The concentration of glutamate was 100 μM ($0.66 \mu\text{Ci mL}^{-1} \text{ L-}[^3\text{H}]\text{glutamate}$) and the times were 3, 5, 10 and 15 min. Each determination is a mean of 6 independent experiments for each time, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M.

Fig. 2. Concentration course for glutamate uptake using method 1 and 5 min. Slices were transferred from Millicell insert to a 24 well-plate to perform glutamate uptake and the concentrations of glutamate were 1, 10, 50, 100 and 1000 μM ($0.66 \mu\text{Ci mL}^{-1} \text{ L-}[^3\text{H}]\text{glutamate}$). Each determination is a mean of 6 independent experiments for each time, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M.

Fig. 3. . Profile of glutamate uptake in organotypic culture of hippocampus exposed or not to OGD. Cultures were submitted to 60 min of OGD, followed by different periods of recovery. Glutamate uptake was performed 1, 3, 6, 13 and 24 h after OGD exposure following method 1 described in Materials and Methods. Each determination is a mean of 8-12 independent experiments for each time, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test and by Student's *t* test between control and OGD groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$. (#) means statistical difference among groups, while (*) means significant difference between OGD culture and its control. # $P < 0.01$ and * $P < 0.05$.

Fig. 4. Effect of OGD in CA1 area on propidium iodide staining. Cell damage was evaluated 13 and 24 h after OGD exposure. PI was added 2 h before image capture. Each determination is a mean of 4-6 independent experiments for each time, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test and by Student's *t* test between control and OGD groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$. (#) means statistical difference among groups, while (*) means significant difference between OGD culture and its control. # $P < 0.001$; * $P < 0.05$ for 13 h and $P < 0.001$ for 24 h.

Fig. 5. . Effect of guanosine on cell damage (A) and glutamate uptake (B) in culture of hippocampus after OGD. Culture slices were treated with 100 μ M of guanosine during the recovery time and PI and glutamate uptake was performed 24 h after 60 min of OGD exposure. Each determination is a mean of 6-12 independent experiments for each time, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences among groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test and by Student's *t* test between control and OGD groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$. (#) means statistical difference among groups, while (*) means significant difference between OGD culture and its control. # and * $P < 0.001$ for PI and * $P < 0.01$ for glutamate uptake.

Figure 1

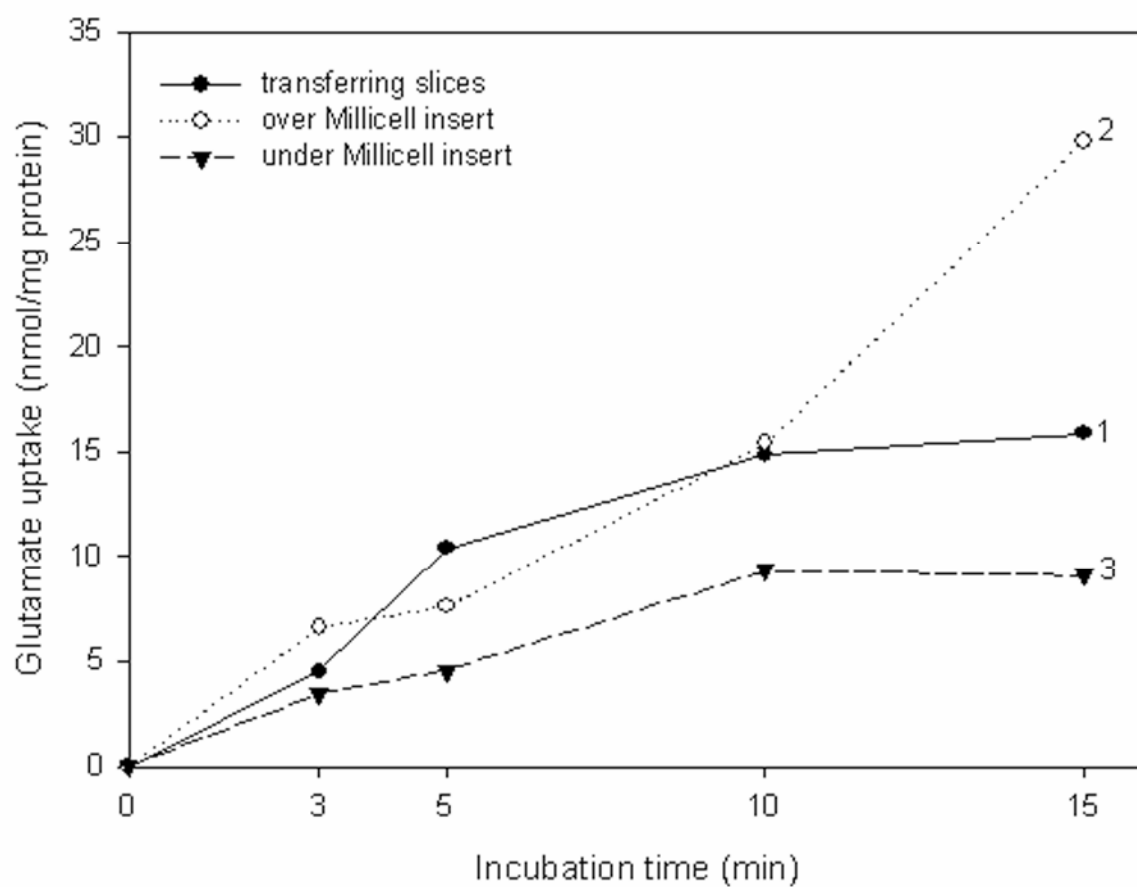


Figure 2

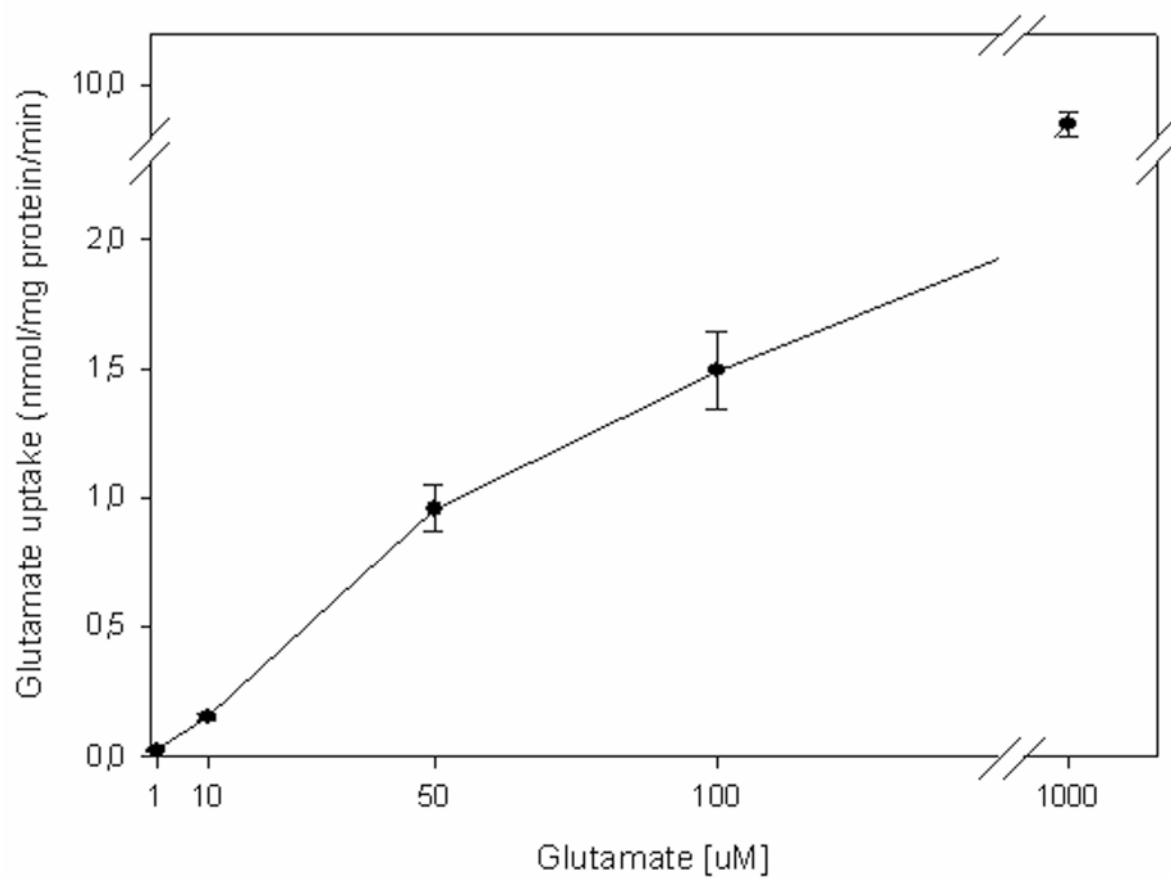


Figure 3

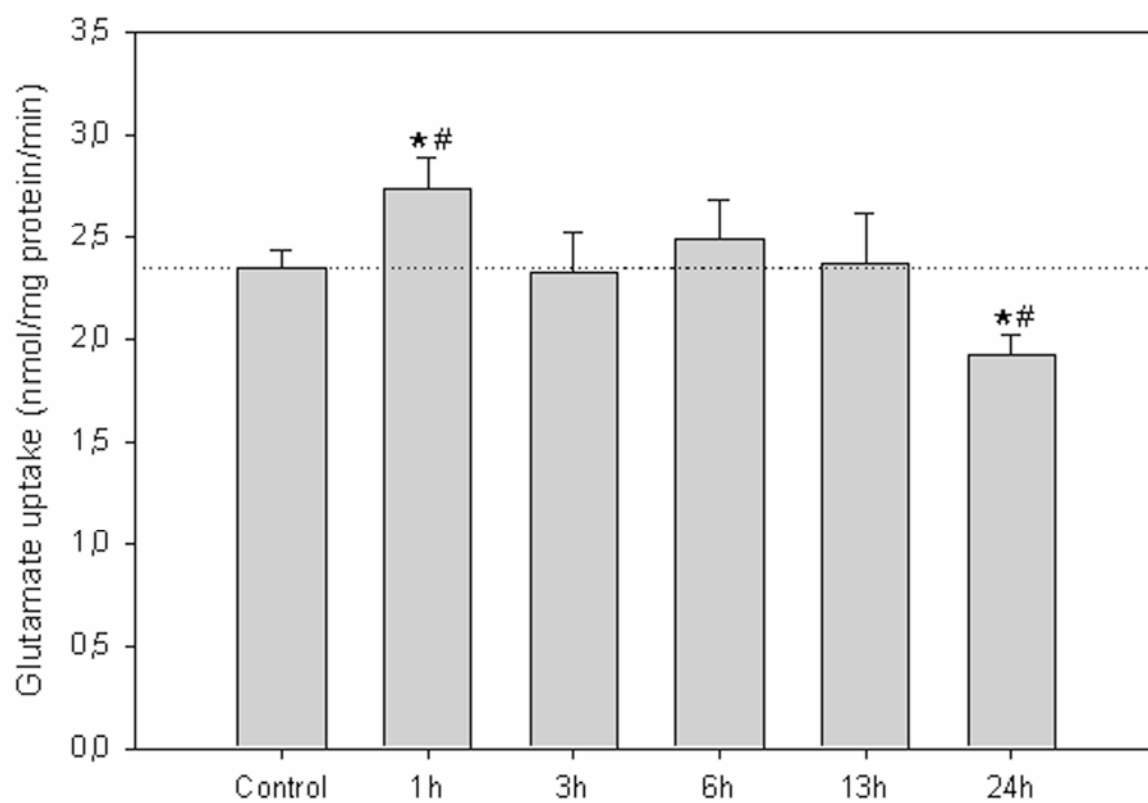


Figure 4

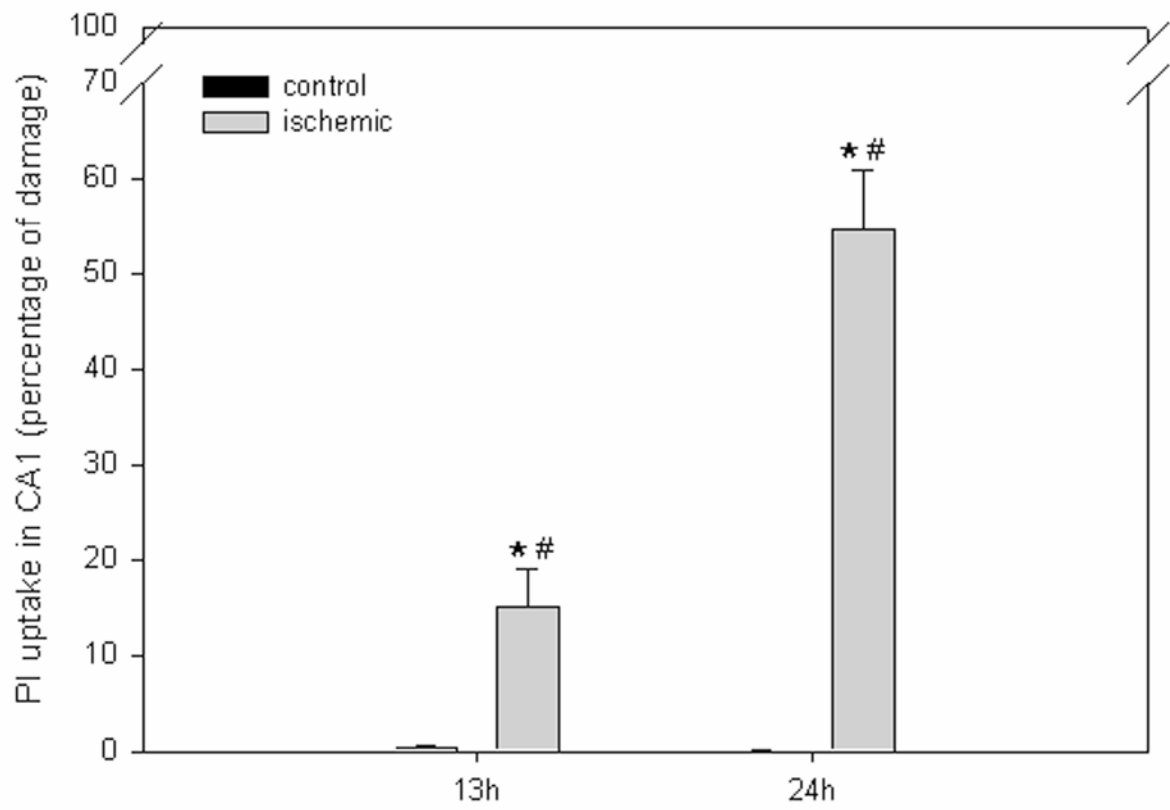


Figure 5A

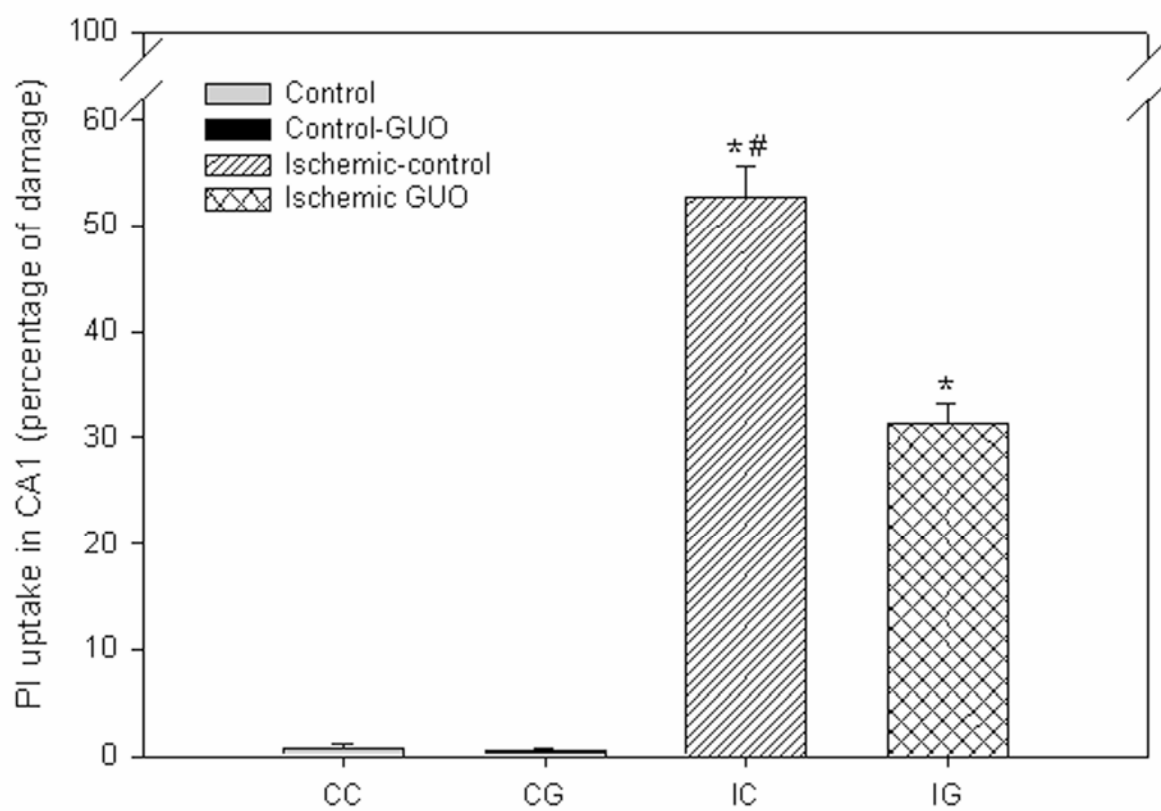
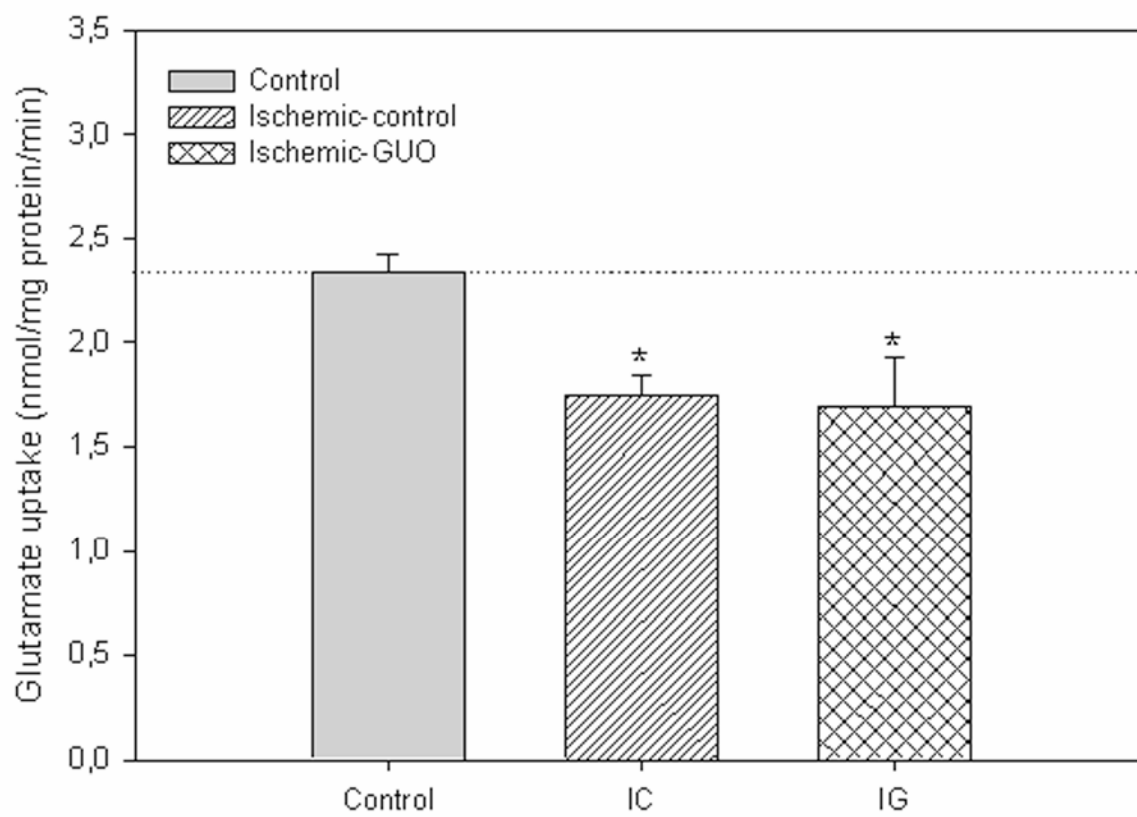


Figure 5B



JNEUMETH-D-09-00196

From: **ees.jneumeth.8.7bdc.47599bca@eesmail.elsevier.com** on behalf of **Greg Gerhardt** (NAEJNM@UKY.EDU)

Sent: 21 April 2009 13:03:32

To: athomazi2000@hotmail.com

Ref.: Ms. No. JNEUMETH-D-09-00196

A simple method for glutamate uptake in organotypic culture of hippocampus: profile of glutamate uptake in an oxygen-glucose deprivation and protection by guanosine
Journal of Neuroscience Methods

Dear PhD Thomazi,

Your manuscript entitled "A simple method for glutamate uptake in organotypic culture of hippocampus: profile of glutamate uptake in an oxygen-glucose deprivation and protection by guanosine" has been assigned the following manuscript number: JNEUMETH-D-09-00196. Please use this reference number for any correspondence to the Journal Office.

You will be able to 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/jneumeth/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Greg A. Gerhardt
Co-Editor-in-Chief
Journal of Neuroscience Methods

CAPÍTULO 3

*GLUTAMATE UPTAKE, GFAP, S100B AND CEREBRAL ATROPHY FOLLOWING
PERINATAL HYPOXIC-ISCHEMIC INSULT: PREVENTION BY GUANOSINE?*

Experimental Neurology, a ser submetido.

Glutamate uptake, GFAP, S100B and cerebral atrophy following perinatal hypoxic-ischemic insult: prevention by guanosine?

A.P. Thomazi*, C. Reimann, A.C.P. Strapasson, P.M. Nabinger, M.C. Leite, M.B. Moretto, C.A. Gonçalves, D.O. Souza, C.A. Netto, S.T. Wofchuk

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author:

Tel.: +55-51-3308-5568

Fax: +55-51-3308-5540

E-mail address: athomazi2000@hotmail.com

Abstract

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) has been extensively studied in a rat model characterized by unilateral brain damage (Rice-Vannucci Model) and this event is a major cause of acute mortality and chronic neurologic morbidity in infants and children. The early biochemical alterations that happen following a HI episode at 7 days-old animals is the aim of this paper as well as drug intervention therapy. Here, we analyze some biochemical parameters 24, 48 and 72 h after HI, as well as cerebral atrophy when animals get 30 and 90 days-old. There is an increase in glutamate uptake in the ipsilateral hemisphere 24 h after HI, decreasing afterwards in both hemispheres of cortices slices. Concerning GFAP immunocontent, we showed a very significant increase from on 48 h after the insult in the ipsilateral hemisphere in hippocampus and cortex. Analyzing S100B concentration, there is an increase at 48 h in both hemispheres in hippocampus, which is maintained at 72 h in the ipsilateral, only in guanosine treated animals; in cortex, there is an increase in insulted and not insulted animals at 72 h. Using this model of guanosine administration, cerebral atrophy was not prevented neither in cortex nor in hippocampus. These results could give us a clue to when new therapies could be introduced in this model of neonatal HI.

Keywords: hypoxia-ischemia, neonate, glutamate uptake, S100B, GFAP, cerebral atrophy, guanosine.

Introduction

Perinatal hypoxia-ischemia (HI) is a major cause of acute mortality and chronic neurologic morbidity in infants and children (Vannucci and Hagberg, 2004) and remains, in adulthood, as frequent cause of neurological handicaps as cerebral palsy, mental retardation and epilepsy (Amato and Donati, 2000, Robertson and Finer, 1993, Vannucci and Hagberg, 2004). After HI, several pathophysiological mechanisms such as excitotoxicity, apoptosis, inflammation and oxidative stress account for neuronal cell death in the immature brain (Berger, et al., 2002, Dirnagl, et al., 1999). Moreover, the susceptibility of brain to ischemia is age related, being the pattern of damage dependent on the developmental stage (Vannucci and Vannucci, 1997, Yager and Thornhill, 1997). One of the most frequently used models of HI brain damage in immature animals is the Levine model (Levine, 1960) adapted to 7-day postnatal rat by Rice (Rice, et al., 1981), which reproduces unilateral brain injury causing damage to striatum, cortex and hippocampus of the ipsilateral hemisphere to the carotid artery occlusion. Such neuropathological damage is rarely seen in the contralateral hemisphere and never in pups rendered hypoxic without carotid artery ligation (Vannucci and Vannucci, 1997). Thus, by the use of this model the effects of HI on glutamate excitotoxicity, energy metabolism, generation of reactive oxygen species and apoptotic cell death can be adequately studied.

Glutamate excitotoxicity is an important cause of cell death in ischemia (Choi, 1988), since the overstimulation of its receptors, mainly the NMDA, triggers the influx of Ca^{++} , which, if sustained, leads to neuronal death by several routes (Maragakis and Rothstein, 2004, Swanson, et al., 2004). In a condition of energy failure, as occurs in HI episode, the sodium-dependent glutamate uptake is impaired, (Danbolt, 2001) and high levels of this amino acid accumulate on the synaptic cleft; this is aggravated by the

reverse transport throughout glial glutamate transporters (Bonde, et al., 2003). During CNS development, the expression of glutamate transporters subtypes is differentially regulated and regionally coordinated, been GLAST the major transporter neonatally expressed and GLT1 the one increasing later in development (Danbolt, 2001, Furuta, et al., 1997, Ullensvang, et al., 1997).

S100B is a calcium-binding protein expressed and secreted by astrocytes and has intra and extracellular effects on glia and neurons. Some intracellular effects include modulation of cytoskeleton proteins, cell cycle, protein kinase C and phosphatase 2B (Donato, 2001, Leal, et al., 2004). Extracellular effects depend on its concentration: S100B acts as a neurotrophin at pico and nanomolar levels and can induce apoptosis at micromolar levels (Van Eldik and Wainwright, 2003). Astrocytes are the major S100B-containing compartment (Goncalves, et al., 2008) and its content increases in brain tissue during the development of rats (Tramontina, et al., 2000). Some *in vivo* studies have suggested that acute elevations of extracellular S100B could be beneficial for neuronal activity, particularly in hippocampus (Kleindienst, et al., 2005), and that high extracellular concentrations of glutamate inhibit S100B release in brain slices (Buyukuysal, 2005). A study with transgenic and knockout mice for S100B have showed that overexpression of S100B *in vivo* enhances pathological response to injury in perinatal hypoxia-ischemia (Wainwright, et al., 2004). The protein of intermediate filaments, GFAP, has been compared with S100B as a marker of brain injury, particularly for its high astrocyte specificity (Goncalves, et al., 2008). Within a few hours of virtually any type of brain injury, surviving astrocytes in the affected region begin to exhibit hypertrophy and proliferation, which is termed reactive astrogliosis (O'Callaghan and Sriram, 2005, Swanson, et al., 2004).

Along with its intracellular roles, the nucleoside guanosine (GUO) has demonstrated

various extracellular signaling effects such as of cell messenger and neuromodulator in the central nervous system (CNS) (Cicarelli, et al., 2001); one of the most prominent extracellular role of guanine derivatives seems to be its modulatory effect on glutamatergic system (Schmidt, et al., 2007). A considerable number of experimental approaches recently tested have provided evidence that GUO exerts neuroprotective effects against neurotoxicity situations by protecting from seizures (Schmidt, et al., 2005), reducing neuronal damage in hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation (Oleskovicz, et al., 2008, Thomazi, et al., 2008), increasing glutamate transporters activity (Frizzo, et al., 2002, Moretto, et al., 2005), and protecting from the decrease of glutamate uptake in cortex of immature rats exposed to quinolinic acid seizure (de Oliveira, et al., 2004).

Considering presented evidence and the interest to better understand injury mechanisms of perinatal hypoxic-ischemic insult, as well as to develop new therapeutic strategies, we used the Levine-Rice neonatal model of unilateral hypoxia-ischemia to study, in hippocampus and cortex: (a) the early biochemical alterations caused by this insult; (b) the putative neuroprotective effect of guanosine; and (c) the cerebral atrophy. Our working hypothesis is that many biochemical alterations might happen in the early stage of development and at this point drug intervention could be efficient.

Material and Methods

Chemicals

Antibody anti-S100B (SH-B1) was purchased from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal anti-S100 and anti-GFAP were obtained from DAKO. L-[³H] glutamate (specific activity 30 Ci/mmol) and conjugated-peroxidase anti-rabbit IgG were purchased from Amersham International, UK. Guanosine, N-methyl-D-glucamine,

HEPES and all the others reagents were purchased from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO).

Animals

Seven-days-old Wistar rats, weighting 12-16 g from the Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS were used. Eight pups per litter from both genders were maintained with their dams during the experiment time or until they reach 21 days-old. They were fed ad libitum and maintained on a 12 h light/12 h dark cycle, at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$. All animal procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA).

Hypoxia-ischemia (HI)

Animals were anesthetized with halothane and, through a ventral neck incision, left common carotid artery was isolated from the other anatomic structures and permanently occluded by surgical silk thread. After a 15 min-recovery under a heating lamp, animals were returned to their dams. Approximately 2 h after the surgical procedure, groups of five pups were placed in the hypoxic chamber, partially immersed in a 37°C water bath, and then exposed to the hypoxic atmosphere (8% oxygen and 92% nitrogen) for 90 min (Hypoxic-ischemic group - HI). Following that, animals were returned to their home cages; the mortality rate was less than 5%. Control animals (C) were submitted to sham surgery, consisting of anesthesia and neck incision, without arterial occlusion or hypoxia (Pereira, et al., 2007, Rodrigues, et al., 2004).

Guanosine treatment

The potential effect of guanosine was investigated using a protocol of drug administration already described (Moretto, et al., 2005). Animals were separated into four groups: sham-saline (SS), sham-guanosine (SG), HI-saline (HI-S) and HI-guanosine (HI-G). Pups were given intraperitoneal injections of guanosine (7.5 mg/kg) or saline (NaCl 0.9%) in four consecutive doses: immediately before, immediately after, 24 and 48 hours after HI insult. They were killed 24, 48 or 72 h after insult, or with 30 or 90 days-old. Rats killed 24 h after HI insult received only three doses of GUO. During experimental treatments, pups were maintained with their dams. A dose of 7.5 mg/kg was used, based upon various previous studies from our laboratory on other animal models, where a dose response curve established that 7.5 mg/kg exerted the maximum neuroprotective effect (Lara, et al., 2001, Schmidt, et al., 2000).

Glutamate Uptake

Glutamate uptake was assessed as fully detailed elsewhere (Thomazi, et al., 2004). Briefly, 24, 48 or 72 h after the insult, animals were decapitated, the cortices of right and left hemisphere were quickly dissected out and transverse sections (400 μm) were rapidly prepared using a McIlwain tissue chopper. Slices were placed into separated 24-well culture plates and pre-incubated for 15 min at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl; 0.63 Na₂HPO₄; 4.17 NaHCO₃; 5.36 KCl; 0.44 KH₂PO₄; 1.26 CaCl₂; 0.41 MgSO₄; 0.49 MgCl₂ and 1.11 glucose, in pH 7.2. After pre-incubation time, 0.33 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$ L-[³H]glutamate with 100 μM unlabeled glutamate was added to each well during 7 min. Sodium independent uptake was determined by using N-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. Sodium dependent glutamate uptake was obtained subtracting the sodium independent uptake

from the total one to obtain the specific uptake. Protein content was determined following the Lowry modified method (Peterson, 1977) and the incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409).

Quantification of S100B and GFAP

Total S100B and GFAP concentrations were determined using the homogenate of small pieces of hippocampus and cortices of both hemispheres of pups sacrificed 24, 48 and 72 h after the insult. S100B content was measured by ELISA (Leite, et al., 2008). Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B and peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody were incubated for 1 h together. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.025 to 2.5 ng/mL. ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100 μ L samples containing 500 ng of protein overnight at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL (Tramontina, et al., 2007).

Long-term alterations: hippocampal volume and cortical area

Animals submitted or not to HI-insult were left to grow up until 30 or 90 days-old. At that time, animals were sacrificed under chloral hydrate anesthesia (30%, 10 ml/kg, i.p.). Rats had their brains fixed via transcardiac perfusion with 0.9% saline solution followed by a 4% formaldehyde solution, removed from the skull and reserved in the same formaldehyde solution. As for morphological analysis, brains were cryoprotected

in 30% sucrose solution until they sink and sectioned; coronal 50 μm thick sections were obtained using a cryostat (Leica). To investigate the atrophy levels consequent to hypoxic-ischemic and GUO effect, hippocampal volume and cortical area were calculated. As for the hippocampus, the Cavalieri method was applied. Briefly, coronal slices were made of the entire hippocampus; slices (50 μm) with 250 μm interval were mounted on gelatinized glass slides and stained with hematoxylin and eosin. To estimate the extent of cortical damage, the cortical area at level – 3.30 mm from bregma was measured (Paxinos, 1986). The areas were captured by a digital video camera Nikon DXM 1200C coupled to a Nikon Eclipse E600 microscope using a digital imaging computer program ACT-1C for CXM 1200C, and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA) was used to quantify hippocampus volume and cortical area.

The measurements of areas were estimated with a point-counting techniques (Gundersen and Jensen, 1987, Hermel, et al., 2006) using grids with point density of one point per 0.074 mm^2 and the following equation: $\hat{A} = \Sigma p \cdot a/p$ where \hat{A} is the area, Σp the sum of points and a/p the area/point value (0.074 mm^2). In order to estimate the hippocampus volume, the area of each individual hippocampus was measured and the value obtained was multiplied by the section interval (mm^3).

Statistical Analysis

Right hemisphere was analyzed separately from the left one, excepted for morphological analyzes. In cases where GUO was not included, data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. Data of experiments with GUO were analyzed by three-way ANOVA was used, followed by Tukey multiple range test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard error mean (S.E.M.) of 4-12 independent experiments. All

statistical analysis was performed using the SPSS 13.0 software package running on a compatible personal computer.

Results

For all parameters studied here, data of animals from both genders were used altogether, since no statistical difference between genders was observed.

Glutamate uptake

We analyzed the effect of HI on glutamate uptake by cortical slices, since its effect on hippocampal is already known (Moretto, et al., 2008). Figures 1A and 1B show the profile of glutamate uptake in cortex slices from contralateral (right) and ipsilateral (left) hemisphere, respectively, of sham and HI animals 24, 48 and 72 h after the insult. No changes in glutamate uptake throughout days in both hemispheres of sham animals were observed; however there was a decrease in animals submitted to HI 48 h after the insult. Only 72h after the insult this decrease in glutamate uptake was significant compared to its control. We also observed an increase in glutamate uptake 24 h after HI in the ipsilateral hemisphere (Fig. 1B).

Guanosine effect was tested following the protocol described in Material and Methods only 72 h after the insult, when there was a difference between HI and sham animals. As showed in Fig. 1C, guanosine was not able to prevent the decrease in glutamate uptake in both hemispheres.

GFAP

In hippocampus, there was a time dependent increase in GFAP levels in the contralateral hemisphere (Fig. 2A). In the ipsilateral hemisphere (Fig. 2B), there was an

expressive increase time depending on GFAP expression in HI group, when compared to sham one, without any GUO effect (Fig. 2B). In cortex (Fig 3A and B), we observed the same profile of GFAP expression showed in hippocampus.

S100B

Figure 4A shows a time dependent increase in S100B content in contralateral hemisphere of hippocampus in HI-saline animals 48 h after the insult, without GUO effect. On the ipsilateral hemisphere (Fig. 4B), there was an increase in HI-S and HI-GUO animals 48 h after the insult, which is maintained partially in HI-GUO group until 72 h.

In cortex we observed an increase of S100B content in both hemispheres (Fig. 5A and B), which was significant only 72 h after the insult. Although there was a time dependent increase in all groups, GUO had no effect over S100B content.

Long-term alterations: hippocampal volume and cortical area

Hippocampal atrophy was found consequent to hypoxia–ischemia only in the ipsilateral arterial occlusion in 90 days-old animals (Fig. 6B); no significant effect was caused by GUO treatment. Animals with 30 days-old showed a clear trend, but no hippocampal significant atrophy was revealed (Fig. 6A).

The same effect of HI insult was seen in cortex: atrophy in animals with 90 days-old without GUO effect (Fig. 7B) and no significant atrophy in cortex of animals with 30 days-old (Fig. 7A).

Discussion

The present study investigated some of the early biochemical alterations that happen following a hypoxia-ischemia event in neonatal rats, which results in late cerebral atrophy. The brain of mammalian neonates is more resistant to hypoxia-ischemia than that of the adult (Towfighi, et al., 1997); however, that depends on the specific developmental stage of the brain, being hippocampus resistant to hypoxic-ischemic insult at 2–3 postnatal days and becoming progressively vulnerable after that (Vannucci and Vannucci, 1997). A cerebral hypoxia-ischemia event of sufficient severity to deplete tissue energy reserves is rapidly followed by acidosis, glutamate excitotoxicity, generation of reactive oxygen species and oxidative stress, followed by prolonged periods of delayed cell death or apoptosis and inflammation (Vannucci and Hagberg, 2004).

Astrocytes are involved in the normal maintenance of brain homeostasis, including several energy-dependent functions necessary for normal neuronal activity, e.g., regulation of extracellular K^+ , pH and osmolality, export of metabolic intermediates and rapid uptake of neurotransmitters (Swanson, et al., 2004). The maintenance of extracellular glutamate concentrations below neurotoxic levels is an essential role of glial cells (Danbolt, 2001) and this is achieved through high affinity sodium-dependent glutamate transporters present mainly in astrocytes (Maragakis and Rothstein, 2006). The ability of astrocytes to maintain these functions may, in fact, be a critical determinant of neuronal survival after ischemia. It has been shown that stroke and ischemia increase extracellular glutamate levels due to impairment of glutamate high-affinity uptake system (Massieu and Tapia, 1997), as well as an increase in glutamate release (Fujimoto, et al., 2004) and reversal of glutamate transporters (Bonde, et al., 2003), and those seem to trigger the neurotoxicity caused by these insults.

Considering the importance in maintaining extracellular glutamate concentrations below its neurotoxic levels, we drew a profile of glutamate uptake in slices of cortex during the three subsequent days after HI insult in immature rats. Here we showed that there is a time dependent decrease in glutamate uptake in HI animals in both hemispheres, hypoxic (right) and hypoxic-ischemic (left), starting 48 h after the insult, but being different from its control only 72 h later (Fig. 1). As the energy involved in the process for clearing glutamate from the external space represents a large fraction of total synaptic ATP turnover, it is not surprising that complete ischemia leads to a decrease in glutamate uptake and a massive increase in extracellular glutamate concentrations (Maragakis and Rothstein, 2004). However, the ability of glutamate transporters showed here is not immediately affected. In the first day after HI, we could see a discreet increase in glutamate uptake that might represent an exacerbated attempt in recovering extracellular concentrations of glutamate to normality, since after an ischemic episode, normoxia is restored and brain glucose levels normally increase twofold (Vannucci, 1992), which might explain why astrocytes restores its capacity in uptake glutamate once membrane gradient is recovered. However, glutamate uptake is impaired from 48 h and decrease significantly at 72 h after HI.

Previous work demonstrated that there is a decrease of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1 at the ischemic core, in cortex and hippocampus, at 12 h following HI with subsequent recovery of GLAST and GLT1 in hippocampus, only in the ipsilateral hemisphere to the carotid artery ligation (Fukamachi, et al., 2001). We observed here that the insult leaves a marker even in the contralateral hemisphere concerning the ability of transporters in uptake glutamate (Fig. 1A), which is probably recovered afterwards, since no late atrophy (90 days-old) was seen in this hemisphere (Fig. 7). The decrease in glutamate uptake observed here in slices of cortex, when

compared with its respective control (sham animals), is not prevented by guanosine treatment, differing from that already showed in hippocampus (Moretto, et al., 2005), and in a more recent paper regarding the schedule administration of guanosine (Moretto, et al., 2008). The recovery in glutamate transporters after 12 h following HI insult only in hippocampus (Fukamachi, et al., 2001) might be the key for guanosine effect in this structure; however, more specific studies must be done to elucidate that.

In this model of perinatal hypoxia-ischemia, many apoptotic proteins are stimulated in the early phase of reperfusion after HI (Zhu, et al., 2003) and data suggest that many hybrid necrotic-apoptotic phenotypes are seen in this model (Carlioni, et al., 2007, Leist and Jaattela, 2001). Necrosis starts only thirty minutes after HI and after 6 h, necrosis is detectable in the CA2/CA3 region of the hippocampus, in the deep layer of cerebral cortex and in the striatum. This phenomenon expands over time especially to the superficial layers of the parietal and piriform cortex. These necrotic cells also express cleaved caspase-3, which starts from 6 h after HI, increasing up to 24 h and remaining almost the same until 96 h following HI (Carlioni, et al., 2007). We could see here that even cell death starting 6 h after HI, glutamate uptake decreased significantly only 72 h later. Cell death caused by this insult could be seen as cerebral atrophy in hippocampus and cortex in the ipsilateral hemisphere to the carotid ligation, but not in the contralateral one, when animals get 90 days-old (Fig. 6 and 7).

S100B is a protein predominantly expressed and secreted by astrocytes. Its release is independent of cell death and intracellular S100B is not necessarily produced for the extracellular medium (Goncalves, et al., 2008). As it has been showed by many data, high extracellular concentrations of S100B have been related to neuronal death, but when in low concentrations, stimulates glial proliferation, neuronal survival and protects neurons against glutamate excitotoxicity (Ahlemeyer, et al., 2000, Van Eldik

and Wainwright, 2003). Here, we analyze the total immunocontent of S100B using homogenates of hippocampus and cortex tissue. In hippocampus, we observed an increase in S100B immunocontent at 48 h after the insult in HI-S group in both hemispheres (Fig. 4). In the group treated with GUO, we showed a more prominent increase at 48 h than that with no treatment in the ipsilateral hemisphere, which is maintained until 72 h. In cortex, we had a time dependent increase in S100B immunocontent in both hemispheres and in all groups analyzed, with no ischemic effect over S100B immunocontent (Fig. 5). Following an ischemic episode as happens here, extracellular concentration of glutamate increases, which inhibit S100B release (Buyukuysal, 2005, Goncalves, et al., 2002) and maintain its extracellular concentration at pico and nanomolar, reducing neuronal death induced by high concentrations of glutamate (Ahlemeyer, et al., 2000, Kogel, et al., 2004). The effect of GUO on S100B concentration in hippocampus 72 h after HI could be related to the protective effect showed by Moretto et al. (2005) in the same moment, concerning glutamate uptake in slices of hippocampus, although GUO had no protective effect over hippocampal atrophy (Fig. 6).

Glial fibrillary acid protein (GFAP) is an intermediate filament protein that is known to be localized to astrocytes, although its precise contributions to astroglial physiology and function are not clear (Maragakis and Rothstein, 2006). All types of brain injury cause surviving astrocytes to become reactive, a condition characterized by an increase in GFAP (O'Callaghan and Sriram, 2005). Reactive astrocytes increase the expression of their structural protein, GFAP and vimentin, as well as many others proteins (Eng, et al., 2000). Here we showed that in hippocampus, there is an age dependent increase in GFAP immunocontent in the contralateral hemisphere with no HI response (Fig. 2A). However, in the ipsilateral hemisphere injured, there is a pronounced increase in GFAP

immunocontent from 48 h, increasing even more afterwards (Fig. 2B). In cortex, we have the same profile of that seen in hippocampus (Fig. 3). Otherwise, in a hypoxic-ischemic study using adult animals, astrocyte reactivity was significantly higher in the ipsilateral HI cortex, but in the contralateral hippocampus, when compared with its sham (Olson and McKeon, 2004). GFAP density was evident in the tissue surrounding the infarct zone on the ipsilateral side, but not within the core of the lesion, suggesting that astrocytes within the core have degenerated while astrocytes within the penumbra have become reactive in response to secondary effects (Olson and McKeon, 2004). Here, we are not able to say in which specific cerebral region affected by HI astrocytes became reactive, but we showed that there is a significant increase of GFAP immunocontent.

In conclusion, early biochemical alterations that happen following a perinatal hypoxia-ischemia might be relevant to the design of alternative therapies to prevent morphological alterations, since it is during the recovery period that the potential for neuroprotection exists. The therapeutic window, ie, the time interval after hypoxia-ischemia during which interventions might be efficacious in reducing the severity of ultimate brain injury, is estimated to vary from 2 to 6 hours (Perlman, 2006). Here we showed a specific time dependent astroglial changes in rats submitted to a hypoxic-ischemic insult, namely gliosis (based on GFAP and S100B contents), and reduced cortical glutamate uptake. The glial response as immunoreactive increase in GFAP are central to tissue remodeling following a neonatal HI and represent an important therapeutic target to improve repair and functional recovery, as the early decrease in glutamate uptake.

In the present study, we showed that GUO caused some early biochemical alterations; however, these effects did not prevent late hippocampal cerebral atrophy,

which may be related to acute treatment used in this model of HI. Perhaps future studies using chronic schedule of GUO treatment could be more successfully.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, PROPESQ/UFRGS and FINEP / “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00) and INCT – National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

References

1. Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C., and Kriegstein, J., 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res* 858, 121-128.
2. Amato, M., and Donati, F., 2000. Update on perinatal hypoxic insult: mechanism, diagnosis and interventions. *Eur J Paediatr Neurol* 4, 203-209.
3. Berger, R., Garnier, Y., and Jensen, A., 2002. Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 9, 319-328.
4. Bonde, C., Sarup, A., Schousboe, A., Gegelashvili, G., Zimmer, J., and Noraberg, J., 2003. Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int* 43, 371-380.
5. Buyukuysal, R. L., 2005. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int* 47, 580-588.
6. Carloni, S., Carnevali, A., Cimino, M., and Balduini, W., 2007. Extended role of necrotic cell death after hypoxia-ischemia-induced neurodegeneration in the neonatal rat. *Neurobiol Dis* 27, 354-361.
7. Choi, D. W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
8. Ciccarelli, R., Ballerini, P., Sabatino, G., Rathbone, M. P., D'Onofrio, M., Caciagli, F., and Di Iorio, P., 2001. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosci* 19, 395-414.
9. Danbolt, N. C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
10. de Oliveira, D. L., Horn, J. F., Rodrigues, J. M., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O., and Wofchuk, S., 2004. Quinolinic acid promotes seizures and

- decreases glutamate uptake in young rats: reversal by orally administered guanosine. *Brain Res* 1018, 48-54.
11. Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-397.
 12. Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 637-668.
 13. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., and Lee, Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-1451.
 14. Frizzo, M. E., Lara, D. R., Prokopiuk Ade, S., Vargas, C. R., Salbego, C. G., Wajner, M., and Souza, D. O., 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol* 22, 353-363.
 15. Fujimoto, S., Katsuki, H., Kume, T., Kaneko, S., and Akaike, A., 2004. Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci Res* 50, 179-187.
 16. Fukamachi, S., Furuta, A., Ikeda, T., Ikenoue, T., Kaneoka, T., Rothstein, J. D., and Iwaki, T., 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 132, 131-139.
 17. Furuta, A., Rothstein, J. D., and Martin, L. J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17, 8363-8375.
 18. Goncalves, C. A., Leite, M. C., and Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 41, 755-763.
 19. Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., and Goncalves, C. A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* 13, 1533-1535.
 20. Gundersen, H. J., and Jensen, E. B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147, 229-263.
 21. Hermel, E. E., Ilha, J., Xavier, L. L., Rasia-Filho, A. A., and Achaval, M., 2006. Influence of sex and estrous cycle, but not laterality, on the neuronal somatic volume of the posterodorsal medial amygdala of rats. *Neurosci Lett* 405, 153-158.
 22. Kleindienst, A., McGinn, M. J., Harvey, H. B., Colello, R. J., Hamm, R. J., and Bullock, M. R., 2005. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22, 645-655.
 23. Kogel, D., Peters, M., Konig, H. G., Hashemi, S. M., Bui, N. T., Arolt, V., Rothermundt, M., and Prehn, J. H., 2004. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience* 127, 913-920.
 24. Lara, D. R., Schmidt, A. P., Frizzo, M. E., Burgos, J. S., Ramirez, G., and Souza, D. O., 2001. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res* 912, 176-180.
 25. Leal, R. B., Frizzo, J. K., Tramontina, F., Fieuw-Makaroff, S., Bobrovskaya, L., Dunkley, P. R., and Goncalves, C. A., 2004. S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport* 15, 317-320.

26. Leist, M., and Jaattela, M., 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
27. Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C., and Goncalves, C. A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169, 93-99.
28. Levine, S., 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36, 1-17.
29. Maragakis, N. J., and Rothstein, J. D., 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis* 15, 461-473.
30. Maragakis, N. J., and Rothstein, J. D., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 679-689.
31. Massieu, L., and Tapia, R., 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem* 69, 1151-1160.
32. Moretto, M. B., Arteni, N. S., Lavinsky, D., Netto, C. A., Rocha, J. B., Souza, D. O., and Wofchuk, S., 2005. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp Neurol* 195, 400-406.
33. Moretto, M. B., Boff, B., Lavinsky, D., Netto, C. A., Rocha, J. B., Souza, D. O., and Wofchuk, S. T., 2008. Importance of Schedule of Administration in the Therapeutic Efficacy of Guanosine: Early Intervention After Injury Enhances Glutamate Uptake in Model of Hypoxia-ischemia. *J Mol Neurosci*.
34. O'Callaghan, J. P., and Sriram, K., 2005. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 4, 433-442.
35. Oleskovicz, S. P., Martins, W. C., Leal, R. B., and Tasca, C. I., 2008. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Int* 52, 411-418.
36. Olson, E. E., and McKeon, R. J., 2004. Characterization of cellular and neurological damage following unilateral hypoxia/ischemia. *J Neurol Sci* 227, 7-19.
37. Paxinos, G., Watson, C., 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 2nd ed.
38. Pereira, L. O., Arteni, N. S., Petersen, R. C., da Rocha, A. P., Achaval, M., and Netto, C. A., 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87, 101-108.
39. Perlman, J. M., 2006. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 28, 1353-1365.
40. Peterson, G. L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-356.
41. Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C., and Brierley, J. B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9, 131-141.
42. Robertson, C. M., and Finer, N. N., 1993. Long-term follow-up of term neonates with perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 20, 483-500.
43. Rodrigues, A. L., Arteni, N. S., Abel, C., Zylbersztejn, D., Chazan, R., Viola, G., Xavier, L., Achaval, M., and Netto, C. A., 2004. Tactile stimulation and

- maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1002, 94-99.
44. Schmidt, A. P., Avila, T. T., and Souza, D. O., 2005. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem Res* 30, 69-73.
 45. Schmidt, A. P., Lara, D. R., de Faria Maraschin, J., da Silveira Perla, A., and Onofre Souza, D., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 864, 40-43.
 46. Schmidt, A. P., Lara, D. R., and Souza, D. O., 2007. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* 116, 401-416.
 47. Swanson, R. A., Ying, W., and Kauppinen, T. M., 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4, 193-205.
 48. Thomazi, A. P., Boff, B., Pires, T. D., Godinho, G., Battu, C. E., Gottfried, C., Souza, D. O., Salbego, C., and Wofchuk, S. T., 2008. Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Res* 1188, 233-240.
 49. Thomazi, A. P., Godinho, G. F., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O., and Wofchuk, S. T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev* 125, 475-481.
 50. Towfighi, J., Mauger, D., Vannucci, R. C., and Vannucci, S. J., 1997. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 100, 149-160.
 51. Tramontina, F., Karl, J., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Portela, L. V., and Goncalves, C. A., 2000. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Brain Res Protoc* 6, 86-90.
 52. Tramontina, F., Leite, M. C., Cereser, K., de Souza, D. F., Tramontina, A. C., Nardin, P., Andrezza, A. C., Gottfried, C., Kapczinski, F., and Goncalves, C. A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162, 282-286.
 53. Ullensvang, K., Lehre, K. P., Storm-Mathisen, J., and Danbolt, N. C., 1997. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur J Neurosci* 9, 1646-1655.
 54. Van Eldik, L. J., and Wainwright, M. S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21, 97-108.
 55. Vannucci, R. C., 1992. Cerebral carbohydrate and energy metabolism in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Pathol* 2, 229-234.
 56. Vannucci, R. C., and Vannucci, S. J., 1997. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 835, 234-249.
 57. Vannucci, S. J., and Hagberg, H., 2004. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 207, 3149-3154.
 58. Wainwright, M. S., Craft, J. M., Griffin, W. S., Marks, A., Pineda, J., Padgett, K. R., and Van Eldik, L. J., 2004. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol* 56, 61-67.

59. Yager, J. Y., and Thornhill, J. A., 1997. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 167-174.
60. Zhu, C., Qiu, L., Wang, X., Hallin, U., Cande, C., Kroemer, G., Hagberg, H., and Blomgren, K., 2003. Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 86, 306-317.

Figure legends

Fig. 1. Glutamate uptake in cortical slices after HI insult in right (A) and left hemisphere (B) and with GUO treatment (C). Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min, followed by different periods of recovery. Glutamate uptake was performed 24, 48 and 72 h after HI and GUO effect was analyzed 72 h after the insult. Each determination is a mean of 5-8 independent experiments for each time, carried out in triplicate. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference between groups, while * means significant difference between HI and its respective control. Fig. A: a $P < 0.05$ and b $P < 0.001$. Fig. B: a $P < 0.05$ and b $P < 0.001$. Fig. C: * $P < 0.01$.

Fig. 2. GFAP concentration in hippocampus of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO. Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min, followed by different periods of recovery. GFAP concentration was performed 24, 48 and 72 h after HI insult. Each determination is a mean of 4-12 independent experiments for each time. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test.

Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference between groups, while * means significant difference between HI and its respective control. Fig. A: a,b,c $P < 0.001$. Fig. B: a,b,c,d,* $P < 0.001$.

Fig. 3. GFAP concentration in cortex of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO. Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min, followed by different periods of recovery. GFAP concentration was performed 24, 48 and 72 h after HI insult. Each determination is a mean of 4-12 independent experiments for each time. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference between groups, while * means significant difference between HI and its respective control. Fig. A: a,b,c $P < 0.01$, d $P < 0.001$. Fig. B: a $P < 0.05$, b,c,d,e,* $P < 0.001$.

Fig. 4. S100B concentration in hippocampus of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO. Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min, followed by different periods of recovery. S100B concentration was performed 24, 48 and 72 h after HI insult. Each determination is a mean of 4-12 independent experiments for each time. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference between groups, while * means significant difference between HI and its respective control. Fig. A: a,b $P < 0.001$. Fig. B: a,b,* $P < 0.05$ and c,d $P < 0.001$.

Fig. 5. S100B concentration in cortex of rats submitted to HI insult in right (A) and left hemisphere (B), treated or not with GUO. Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min, followed by different periods of recovery. S100B concentration was performed 24, 48 and 72 h after HI insult. Each determination is a mean of 4-12 independent experiments for each time. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Same letter means statistical difference between groups. Fig. A: a,b $P < 0.05$, c $P < 0.001$. Fig. B: a $P < 0.05$, b,c,d $P < 0.001$.

Fig. 6. Measurement of hippocampal volume of rats with 30 (A) and 90 days-old (B), submitted to HI insult and treated or not with GUO. Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min. Hippocampal volume was analyzed in right and left hemispheres, contra and ipsilateral hemisphere to the carotid artery occlusion, respectively, when animals reach 30 or 90 day-old. Each determination is a mean of 4-7 independent experiments for each age. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences between groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. * means significant difference from all groups. Fig. B: * $P < 0.01$.

Fig. 7. Measurement of cortical area of rats with 30 (A) and 90 days-old (B), submitted to HI insult and treated or not with GUO. Seven day-old animals were submitted to hypoxia-ischemia for 90 min. Cortical area was analyzed in right and left hemispheres, contra and ipsilateral hemisphere to the carotid artery occlusion, respectively, when animals reach 30 or 90 day-old. Each determination is a mean of 4-7 independent

experiments for each age. Bars represent mean \pm S.E.M. Statistical differences between groups were determined by ANOVA followed by Tukey's test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. * means significant difference from all groups.

Fig. B: * $P < 0.01$.

Figure 1A

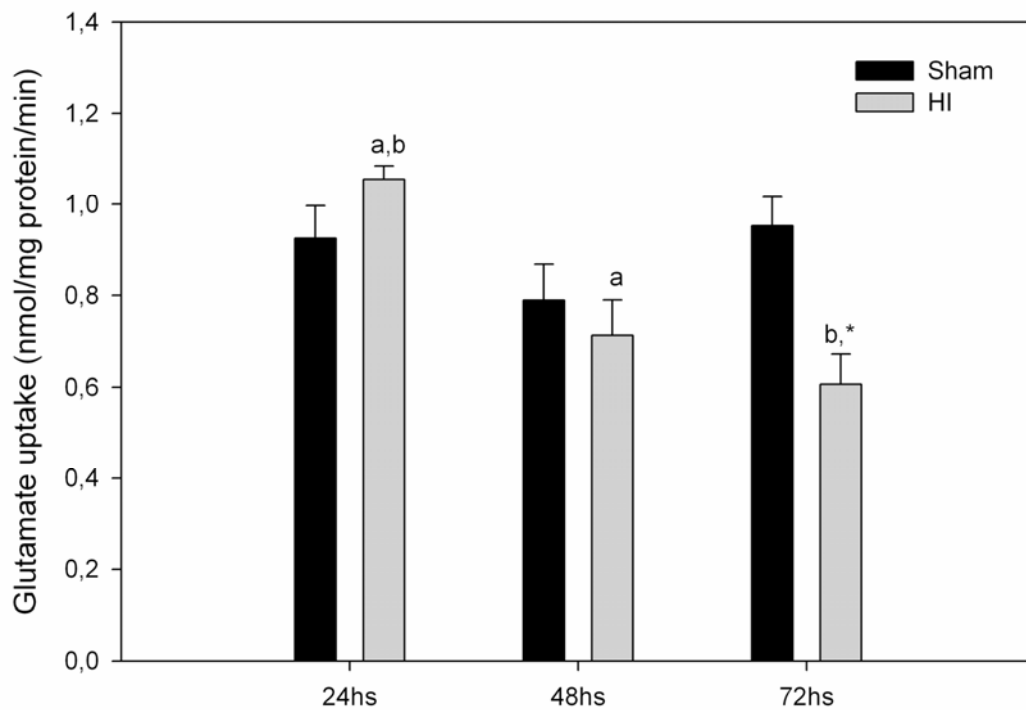


Figure 1B

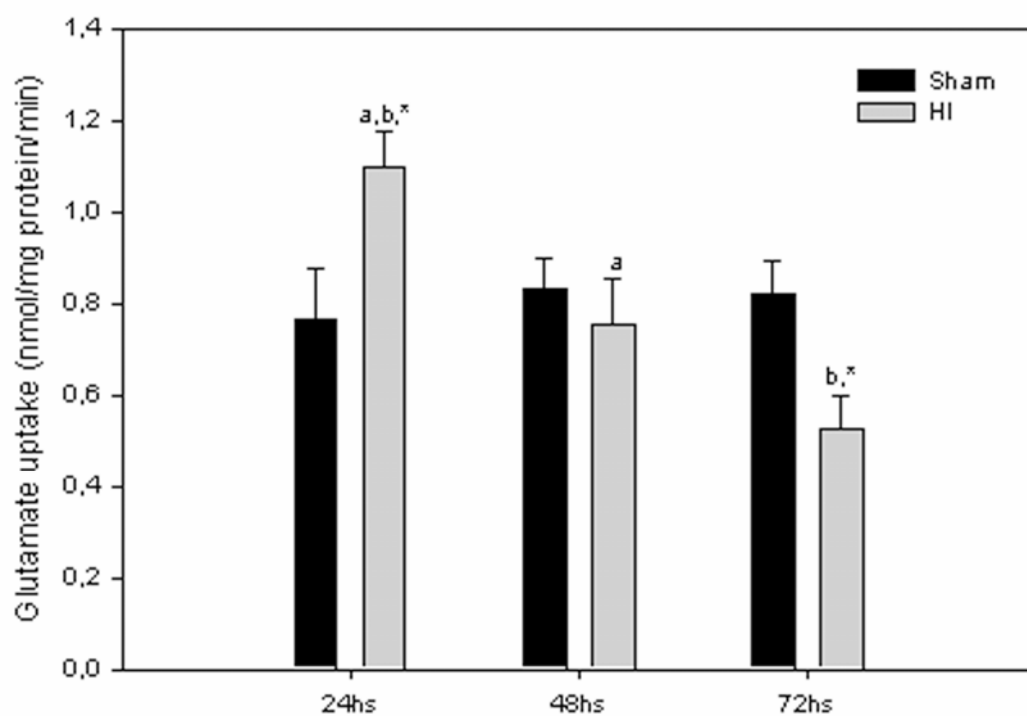


Figure 1C

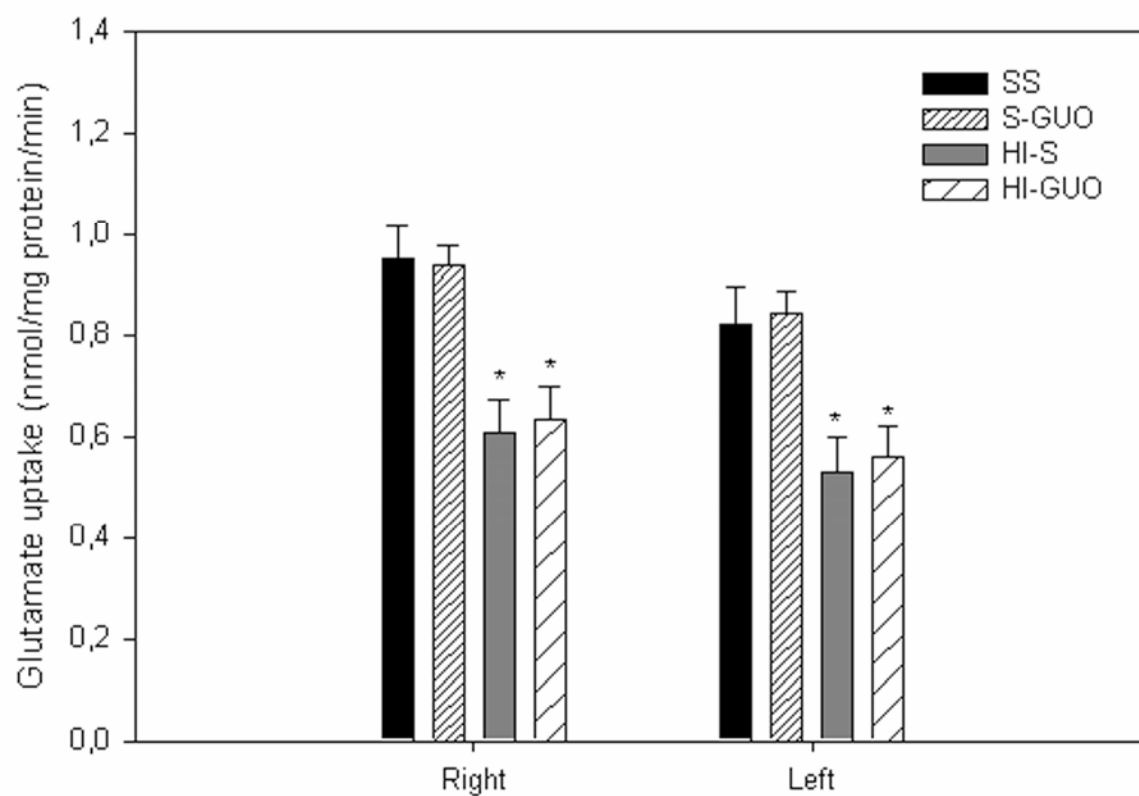


Figure 2A

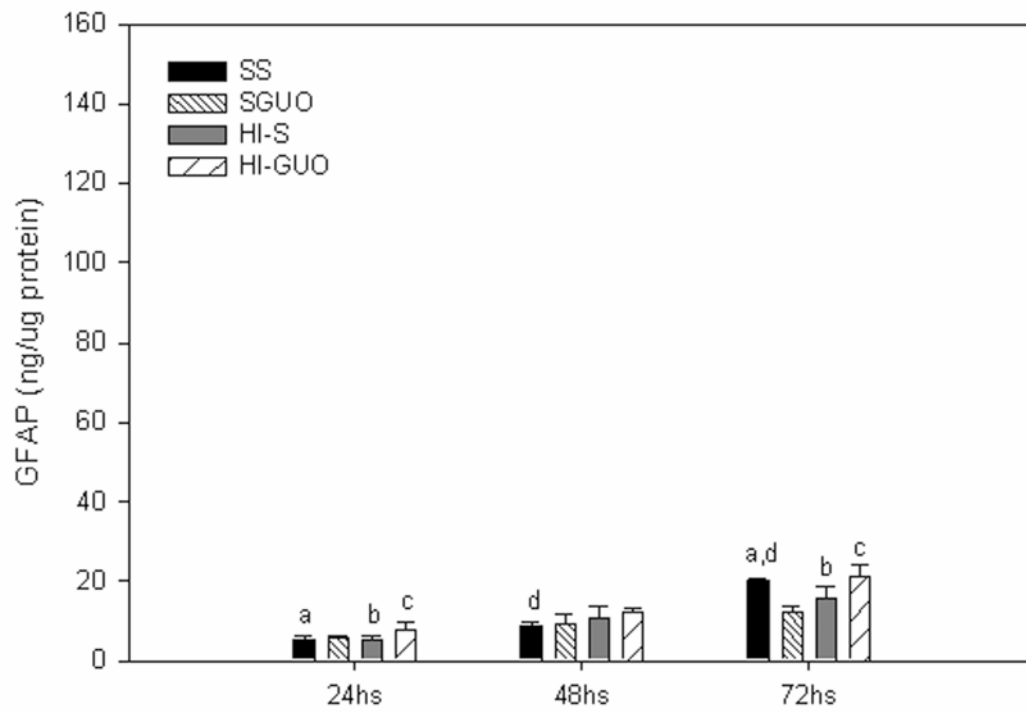


Figure 2B

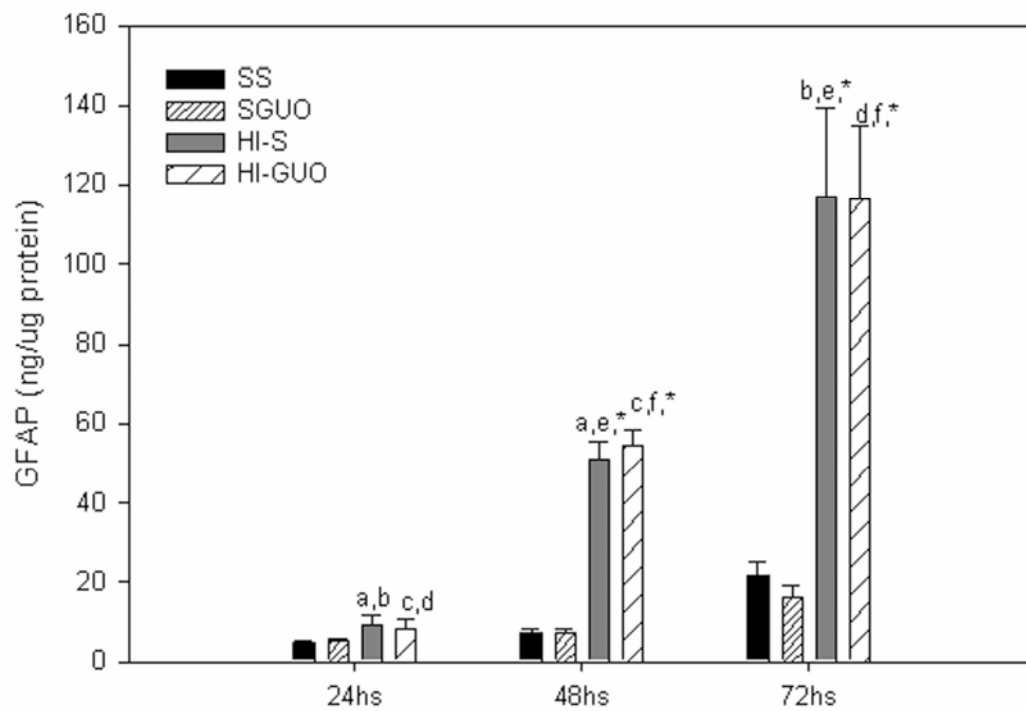


Figure 3A

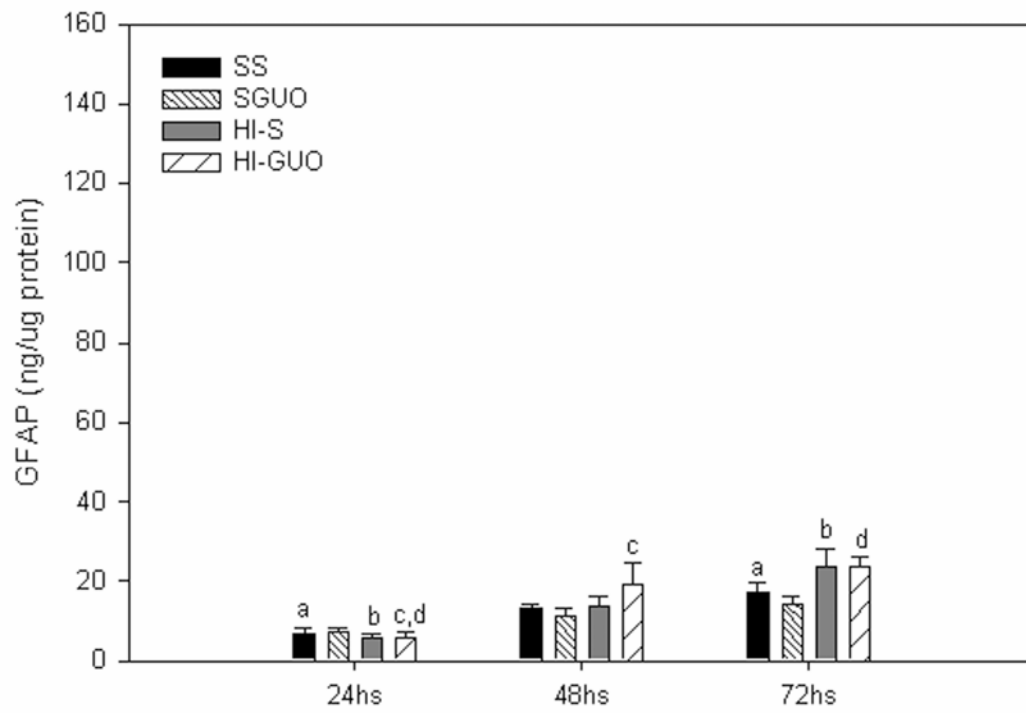


Figure 3B

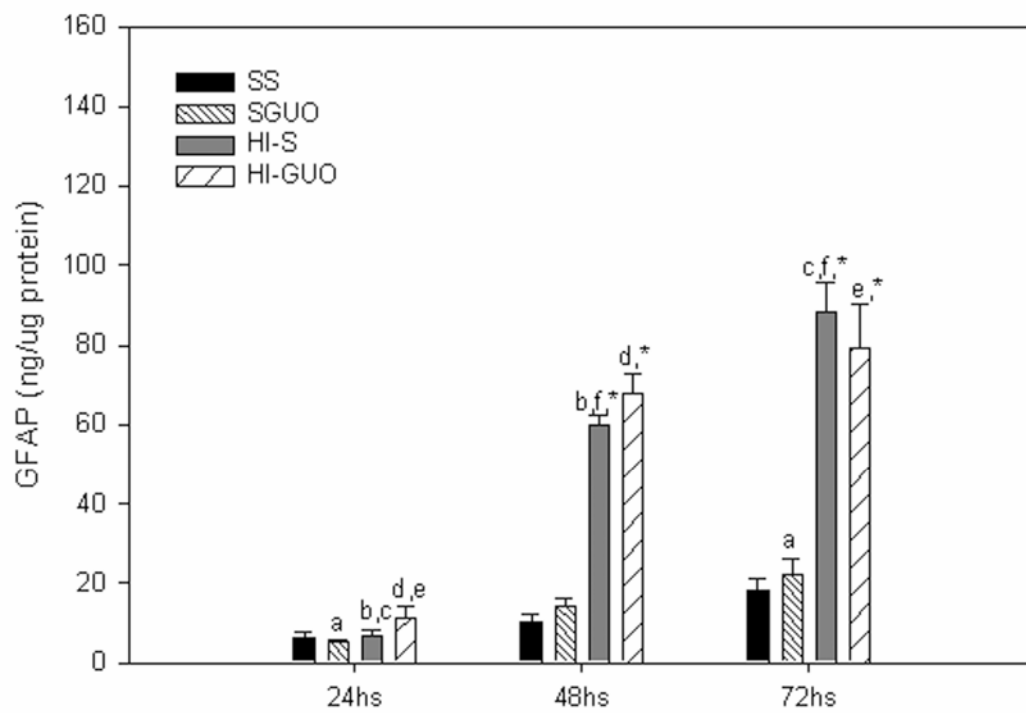


Figure 4A

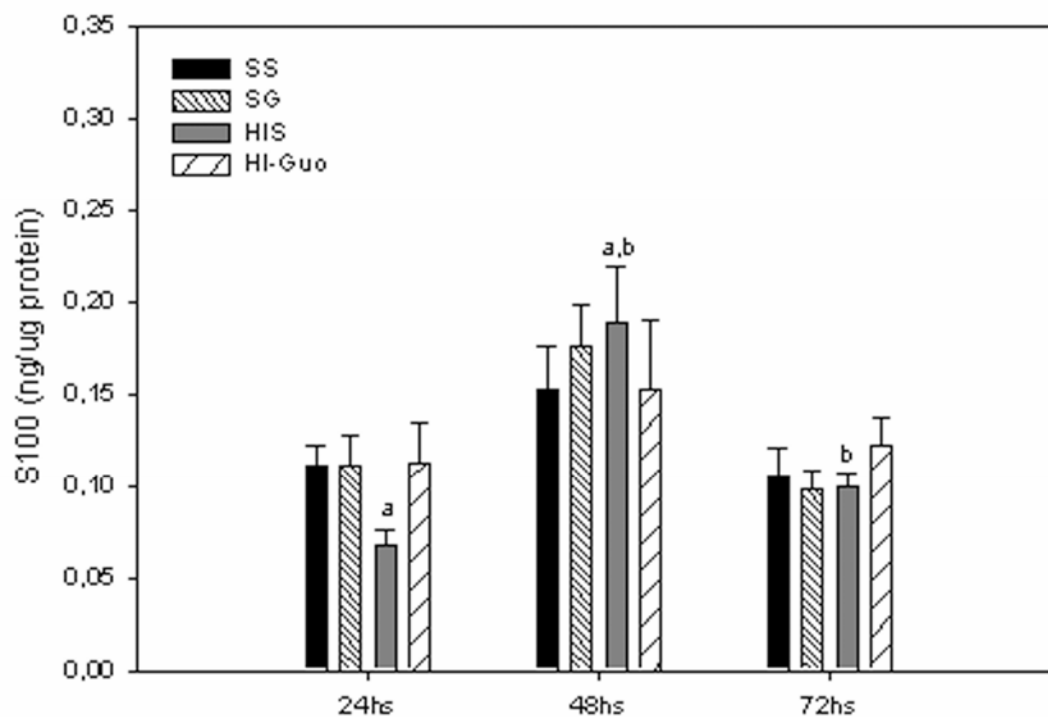


Figure 4B

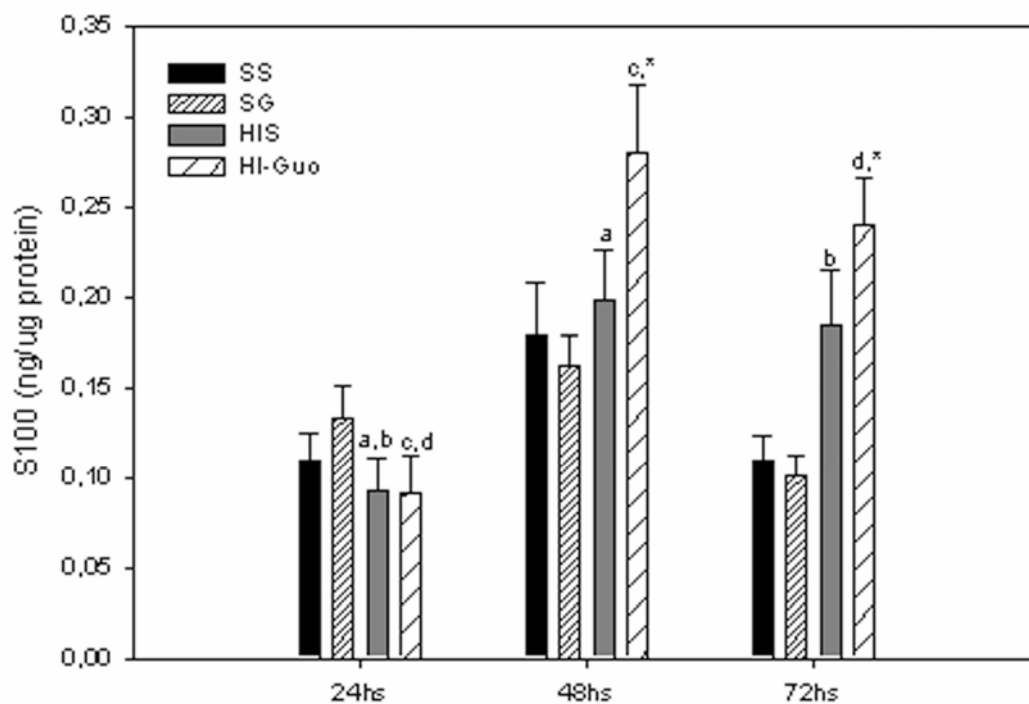


Figure 5A

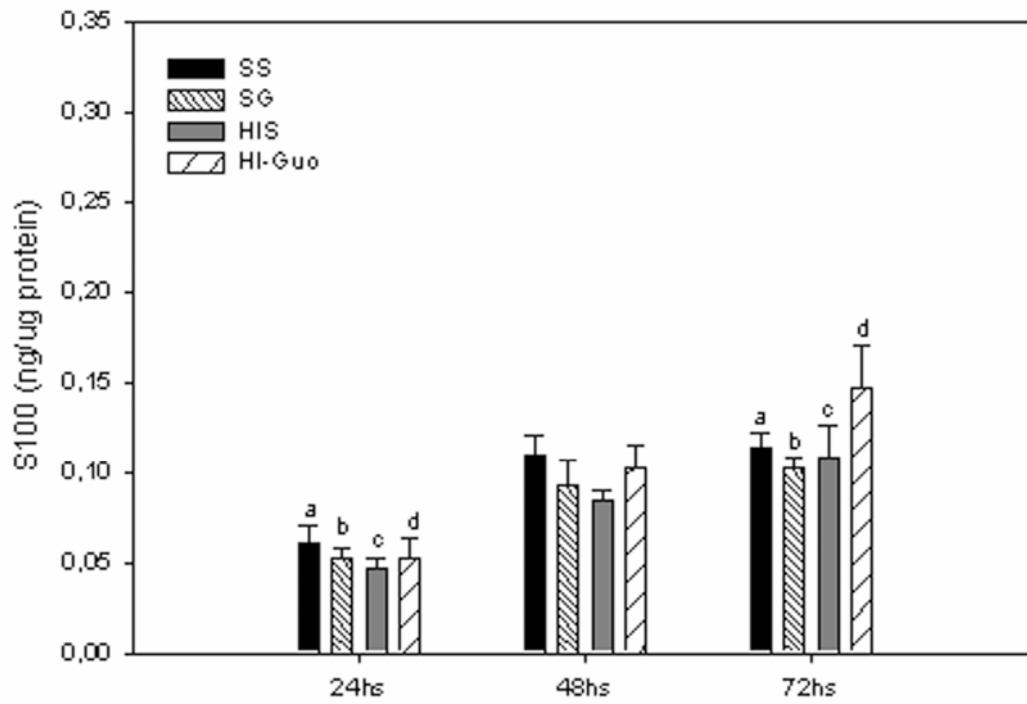


Figure 5B

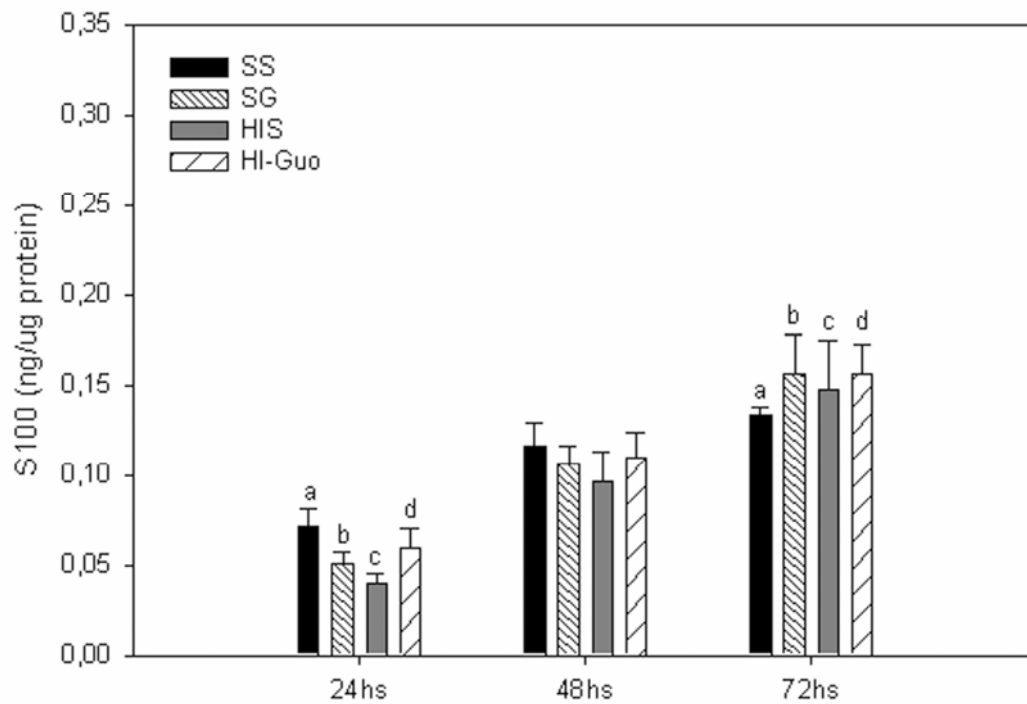


Figure 6A

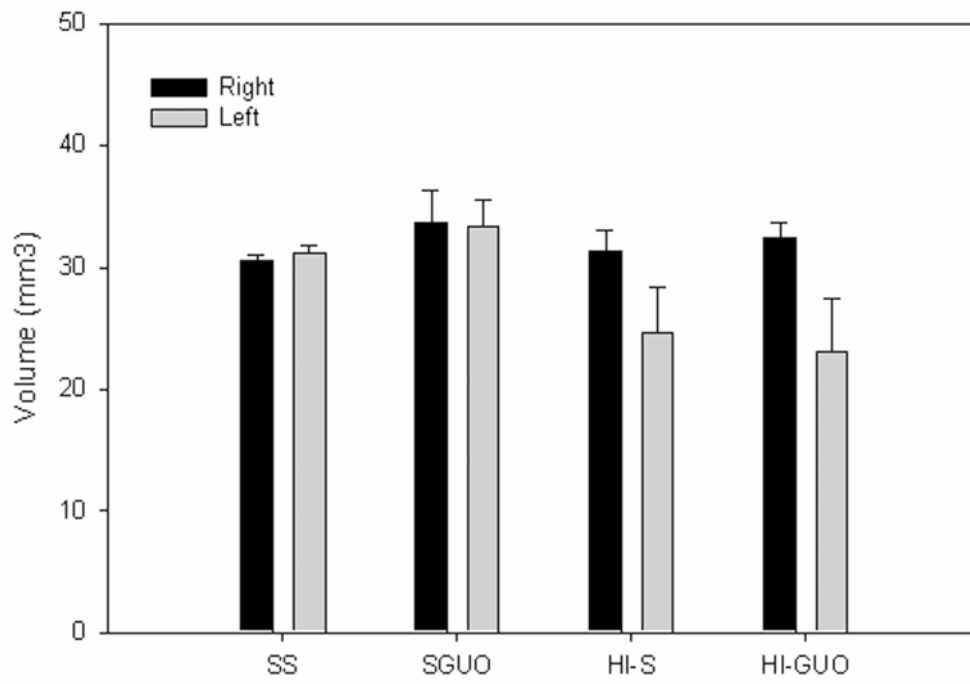


Figure 6B

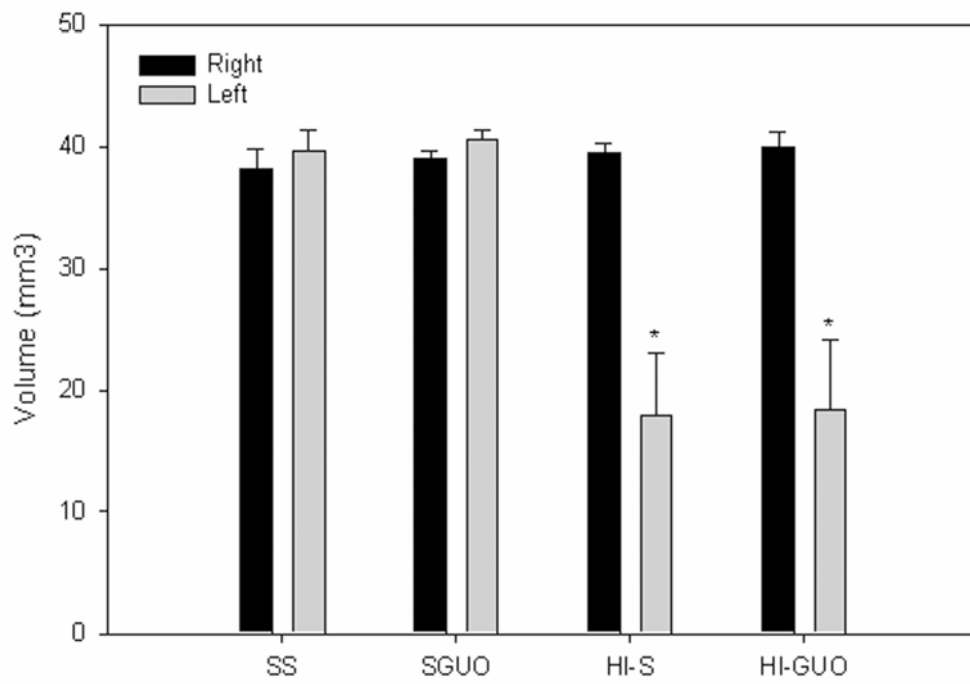


Figure 7A

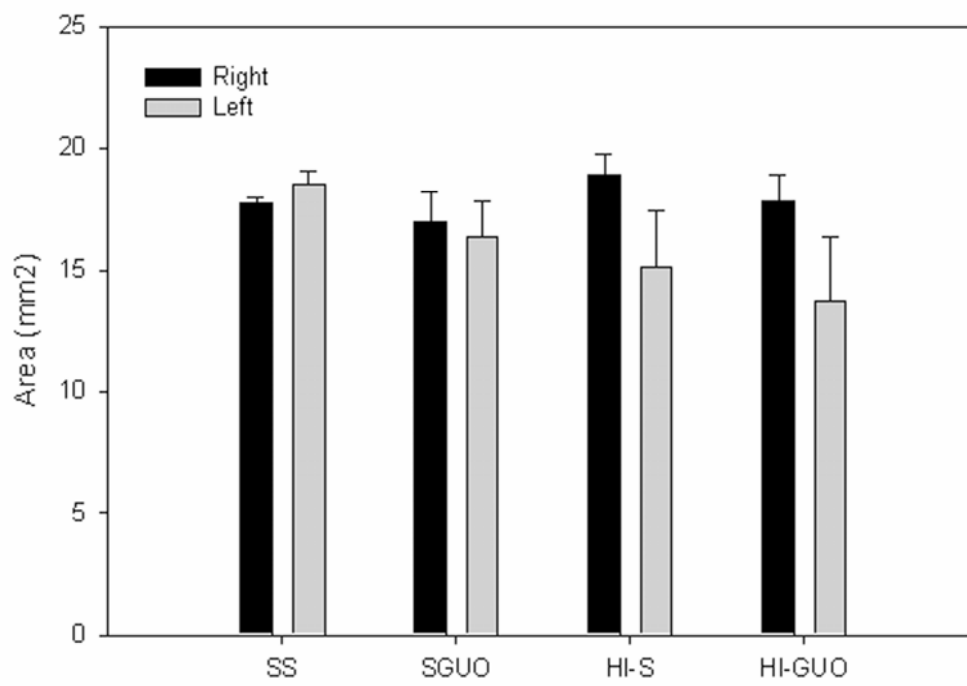
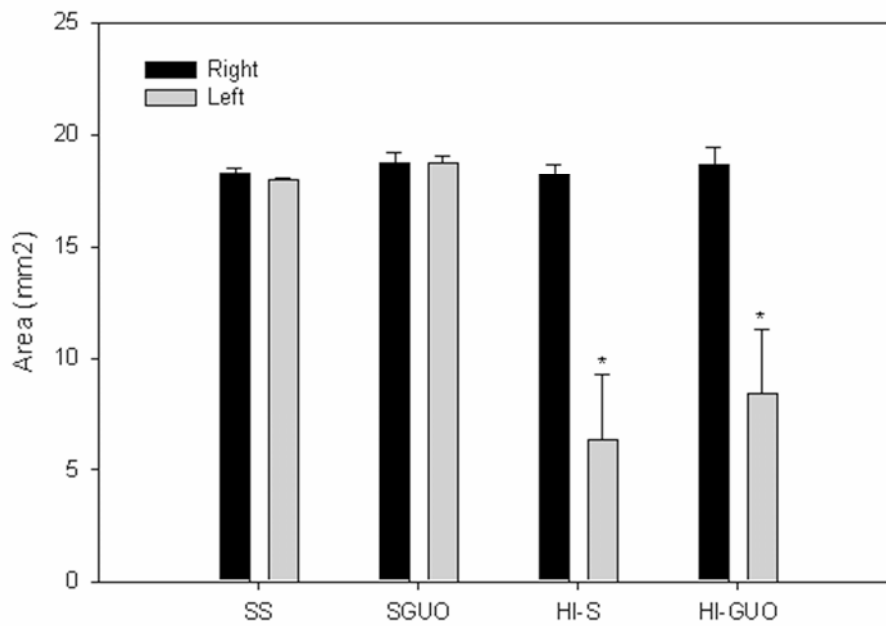


Figure 7B



CAPÍTULO 4

*EFEITO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DE RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS METABOTRÓPICOS DE GRUPO II SOBRE A CAPTAÇÃO
DE GLUTAMATO EM FATIAS DE HIPOCAMPO SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE
OXIGÊNIO E GLICOSE*

Dados preliminares.

Autores: *Ana P. Thomazi, Cristiana B. Reimann, Christianne G. Salbego, Susana T. Wofchuk*

1. INTRODUÇÃO

A função dos receptores metabotrópicos (mGluRs) não é mediar, mas sim modular a excitabilidade sináptica via mecanismos pré-sinápticos, pós-sinápticos e gliais (Schoepp, 2001). Os mGluRs se dividem em: grupo I (mGluR1 e 5), grupo II (mGluR2 e 3) e grupo III (mGluR4, 6, 7 e 8) (Ozawa et al., 1998), e encontram-se amplamente distribuídos pelo SNC (Schoepp et al., 1999). Nesse capítulo, abordaremos somente os receptores de grupo II, os quais estão ligados negativamente à modulação da adenilato ciclase (Schoepp et al., 1999).

A ativação de mGluRs de grupo II tem sido relacionada à neuroproteção em modelos de convulsão (Folbergrova et al., 2005), em modelos de injúria traumática atenuando o dano neuronal (Zwienenberg et al., 2001), na redução da lesão estriatal induzida por ácido quinolínico (Colwell et al., 1996), na proteção de culturas corticais de neurônios contra degeneração em situações de excitotoxicidade (Battaglia et al., 1998), entre outros efeitos. O efeito neuroprotetor, tanto dos agonistas de mGluRs de grupo II quanto de grupo III, tem sido geralmente atribuído a ativação dos receptores neuronais, os quais estão localizados pré-sinápticamente e inibem a liberação de glutamato (Yao et al., 2005).

Existem diversos agentes farmacológicos capazes de ativar ou inibir os efeitos dos mGluRs de grupo II. Seus efeitos podem ser ativados por L-CCG-I, DCG-IV, (2*R*,4*R*)-APDC e (5*S*)-3C4HPG, e inibidos por LY341495, MTPG e MCCG, por exemplo. Neste trabalho utilizamos o (2*R*,4*R*)-APDC, um potente agonista de grupo II, com efeitos neuroprotetores previamente demonstrados: efeito anticonvulsivante

(Moldrich et al., 2001), prevenção de morte celular em neurônios induzida por altas concentrações de glicose (Berent-Spillson and Russell, 2007), e como modulador da captação de glutamato (Yao et al., 2005).

O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da ativação dos mGluRs de grupo II sobre a captação de glutamato, frente a uma situação de privação de oxigênio e glicose (POG) em fatias de hipocampo de ratos adultos.

1. MATERIAS E MÉTODOS

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no **Capítulo 1**.

1.1. Reagentes

(2*R*,4*R*)-APDC, LY341495 e (*RS*)-PICA foram obtidos da Tocris Cookson. L-[³H]glutamate (specific activity 30 Ci/mmol) foi adquirido da Amersham International, UK, e os demais reagentes foram obtidos da Sigma Chemical CO (St. Louis, MO).

1.2. Animais

Ratos Wistar machos com 60 dias foram obtidos no Departamento de Bioquímica/UFRGS. Os animais foram mantidos sobre controle de luz e temperatura (12 horas de luz/12 horas de escuro numa temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$) e tiveram livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as regras provenientes das autoridades locais responsáveis pelo controle de animais.

1.3. Preparação das fatias

Os animais foram decapitados, seus hipocampos rapidamente separados e fatiados (400 μm) usando um fatiador de tecidos (McIlwain). As fatias foram então

separadas e colocadas em duas placas de 24 poços, uma controle e outra POG. As fatias foram pré-incubadas por 30min num meio de Krebs modificado, pH 7,4, contendo (mM): 120 NaCl, 2 KCl, 0,5 CaCl₂, 4 NaHCO₃, 10 MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄, 25 HEPES, 11 glicose, a 37° C.

1.4. Privação de oxigênio e glicose (POG) seguida de reperfusão

Após o período de pré-incubação, as fatias foram lavadas 2 vezes com um meio de Krebs modificado (solução de incubação, pH 7,4) contendo (mM): 137 NaCl, 0,34 Na₂HPO₄, 4 NaHCO₃, 5,36 KCl, 0,44 KH₂PO₄, 1,26 CaCl₂, 0,49 MgCl₂, 0,44 MgSO₄, 25 HEPES, 11 glicose, a 37° C. A fim de mimetizar uma situação isquêmica, as fatias foram expostas a um modelo de POG previamente descrito (Strasser and Fischer, 1995), com algumas modificações (Cimarosti et al., 2001). Resumidamente, após o período de pré-incubação, fatias POG foram lavadas 2 vezes com meio de incubação sem glicose e incubadas por 60min a 37°C numa câmara de anóxia saturada com nitrogênio. Após o período de anóxia, o meio de ambas as placas foi substituído por um meio de incubação com glicose e mantidas a 37°C por 1h (período de reperfusão).

1.5. Tratamento com agonista e antagonistas de mGluRs de grupo II

Com a pretensão de investigar um possível efeito do APDC (agonista seletivo de mGluRs de grupo II) nesse modelo de isquemia *in vitro*, 100µM foi adicionado às fatias durante todo tempo experimental, exceto nos primeiros 30min de estabilização. LY341495 e APICA, antagonistas de mGluRs de grupo II, foram usados a fim de reverter o efeito do APDC, e quando de sua utilização, o tempo experimental foi prolongado por mais 1h. Para LY341495, a concentração utilizada foi 1µM, e para APICA, 300µM. Nos experimentos onde os antagonistas foram testados, estes foram

adicionados 1h antes do APDC.

1.6. Captação de glutamato

A captação de glutamato foi realizada como previamente descrita (Thomazi et al., 2004). Resumidamente, após o período de reperfusão, $0,66\mu\text{Ci mL}^{-1}$ L- $[\text{}^3\text{H}]$ glutamate numa concentração final de $100\mu\text{M}$ foi adicionado às fatias controles e isquêmicas durante 5min usando uma solução balanceada de Hank (HBSS) contendo (mM): 137 NaCl; 0,63 Na_2HPO_4 ; 4,17 NaHCO_3 ; 5,36 KCl; 0,44 KH_2PO_4 ; 1,26 CaCl_2 ; 0,41 MgSO_4 ; 0,49 MgCl_2 and 1,11 glicose, em pH 7,2. A captação independente de sódio foi determinada usando N-methyl-D-glucamine em substituição ao sódio. A captação dependente de sódio foi obtida subtraindo a captação sódio-independente da captação total. A quantidade de proteína foi dosada pelo método modificado de Lowry (Peterson, 1977) e a incorporação da radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquido (Wallac 1409).

1.7. Análise estatística

Entre grupos, os dados foram analisados pela ANOVA seguida pelo teste de múltiplas variáveis de Tukey. Dados intra-grupos (controle x POG) foram analisados pelo teste *t* de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão provenientes de 3 experimentos independentes.

2. RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A figura 1 mostra o efeito da POG sobre a captação de glutamato em fatias de

hipocampo submetidas à POG e também o efeito do APDC sobre esse parâmetro. A POG causa uma diminuição da captação de glutamato, o que corrobora dados prévios descritos no Capítulo 1 desta Tese. Como descrito, essa queda não é consequência de perda da viabilidade ou de morte celular significativa (Capítulo 1, fig.3B e fig. 5B e C). O APDC inibiu parcialmente a queda da captação de glutamato em fatias expostas à POG. O mecanismo pelo qual esse potente e seletivo agonista de grupo II exerce esse efeito ainda deve ser elucidado.

Estudos com MPP⁺ (inibidor do complexo I mitocondrial), que leva a uma diminuição da captação de glutamato em culturas, apontam para um mecanismo de neuroproteção envolvendo a inibição da iNOS, e conseqüente formação de NO, pelo DCG-IV (também um potente agonista de grupo II) cujo efeito foi revertido por 200µM APICA (Yao et al., 2005). Nesse mesmo estudo, APDC 10 e 100µM também foram capazes de aumentar a captação de glutamato, o que foi revertido por 1µM de LY341495. A ação desses agonistas parece não ser sobre os receptores neuronais, mas sim gliais, pois DCG-IV não foi capaz de proteger cultura de neurônios expostas ao meio condicionado de cultura de astrócitos exposto ao MPP⁺.

O poder antioxidante da glutathione pode ser outro mecanismo de ação dos agonistas sobre a captação de glutamato. Os agonistas são capazes de recuperar a glutathione endógena reduzida em situações de excitotoxicidade, onde há, geralmente, formação de espécies reativas de oxigênio. Nesses casos, pode haver oxidação dos transportadores de glutamato (Trotti et al., 1999), comprometendo sua atividade.

Na figura 2, observamos que LY341495 1µM (potente antagonista de mGluR de grupo II) não foi capaz de inibir o efeito do APDC sobre a captação de glutamato em fatias isquêmicas, o que pode estar relacionado a concentração de LY341495 utilizada, pois o efeito inibitório observado por Yao e colaboradores (2005) foi em cultura, onde

se trabalha com uma única camada de células, e aqui nós trabalhamos com fatias de 400µm de espessura. Entretanto, APICA 300µM (também um potente antagonista de mGluR de grupo II), concentração maior que a utilizada por Yao et al., foi capaz de reverter o efeito do APDC (fig. 3).

Outro possível mecanismo dos agonistas de mGluRs de grupo II pode ser via modulação direta sobre os transportadores de glutamato, visto que DCG-IV é capaz de estimular a expressão de GLAST e GLT-1 em astrócitos através das vias da MAPK e PI3-K (Aronica et al., 2003), o que pode aumentar a quantidade de glutamato captado.

Levando em consideração os resultados preliminares desse trabalho e os dados da literatura, muitos experimentos ainda devem ser realizados a fim de elucidar o mecanismo que o APDC exerce sobre a captação de glutamato nesse modelo de injúria. Um importante achado desse trabalho foi o efeito do APDC, pois a maioria dos trabalhos usa DCG-IV como agonista de grupo II, o qual também pode agir como agonista NMDA, dependendo da concentração utilizada. Outro importante achado foi o poder da recuperação, mesmo que parcial, da captação de glutamato em fatias expostas a um modelo de isquemia *in vitro*. O mecanismo ainda deve ser elucidado, mas dados da literatura já nos guiam para um possível efeito antioxidante e/ou de aumento na expressão dos transportadores gliais.

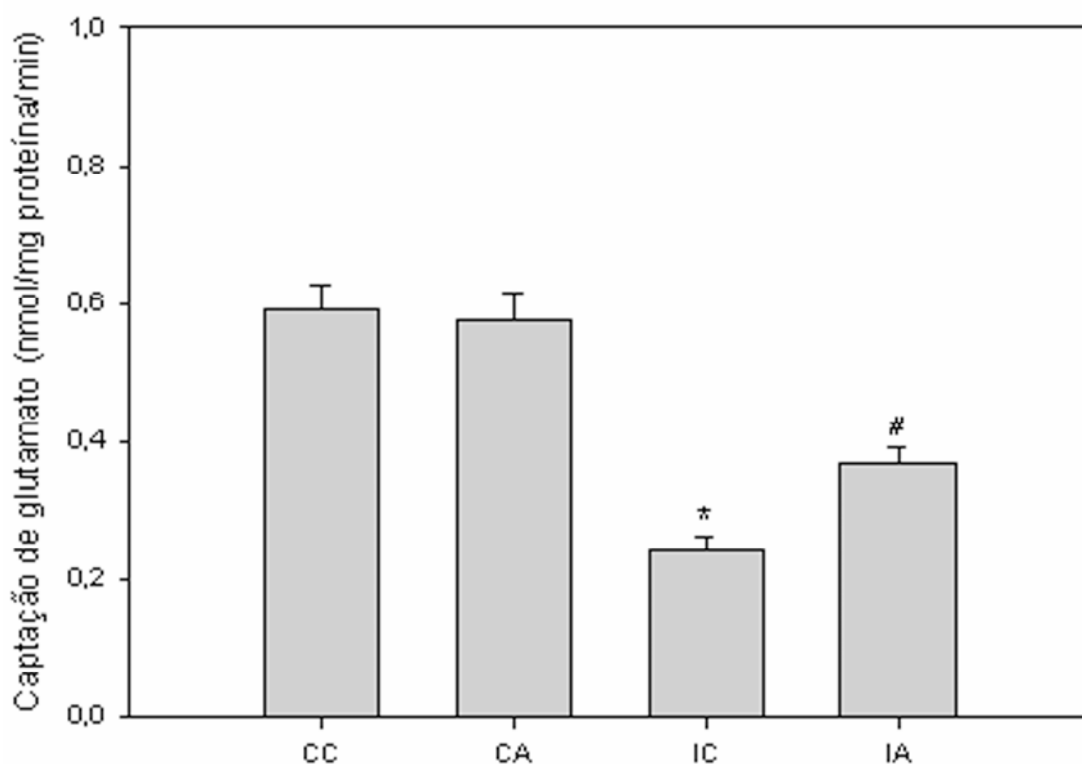


Figura 1. Efeito do APDC sobre a captação de glutamato em fatias hipocâmpais de ratos de 60 dias 3h após POG. As fatias foram tratadas com 100 μ M de APDC 1h antes, durante e após o insulto. Cada determinação é a média de 3 experimentos independentes. As barras representam a média \pm erro. Estatística entre grupos foi determinada por ANOVA seguida de Tukey e teste *t* de Student foi usado para comparação intra-grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. * # diferente de todos.

Legenda

CC: controle-controle

CA: controle-APDC

IC: isquêmico-controle

IA: isquêmico-APDC

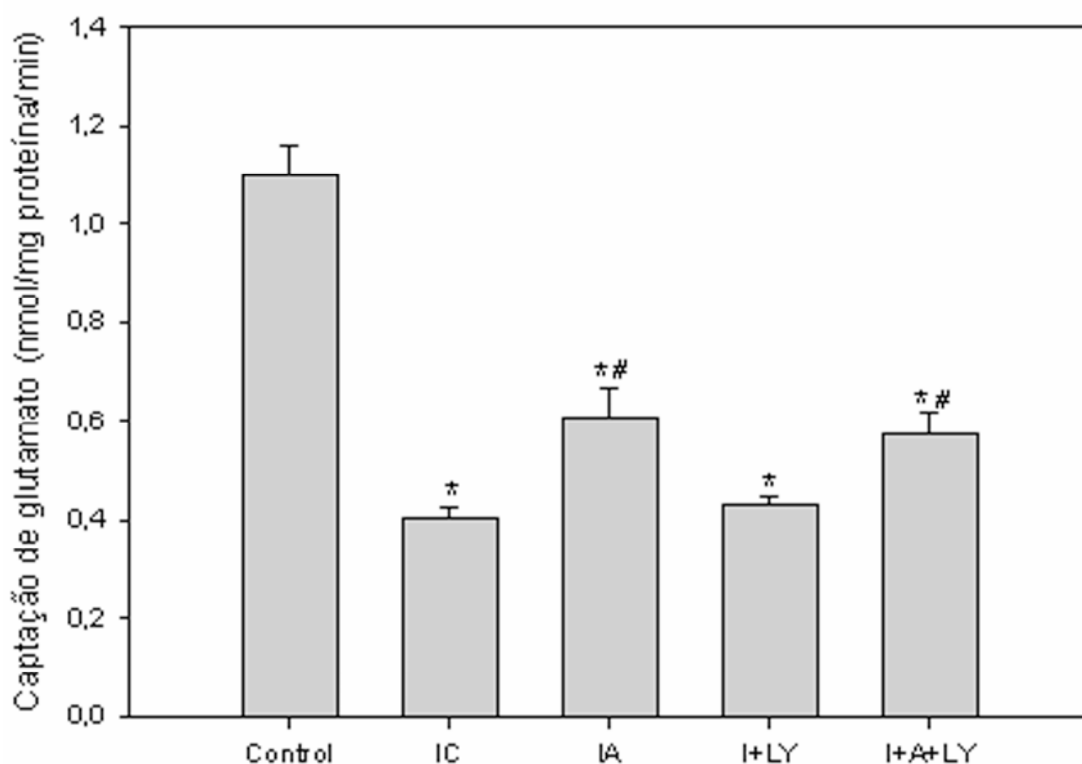


Figura 2. Efeito inibitório do LY sobre o APDC. As fatias receberam um pré-tratamento de 1h com LY3414951 μ M antes do tratamento com 100 μ M de APDC. Cada determinação é a média de 3 experimentos independentes. As barras representam a média \pm erro. Estatística entre grupos foi determinada por ANOVA seguida de Tukey e teste *t* de Student foi usado para comparação intra-grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. * diferente do controle, # diferente dos isquêmicos sem APDC.

Legenda

IC: isquêmico-controle

IA: isquêmico-APDC

I+LY: isquêmico-LY

I+A+LY: isquêmico-APDC-LY

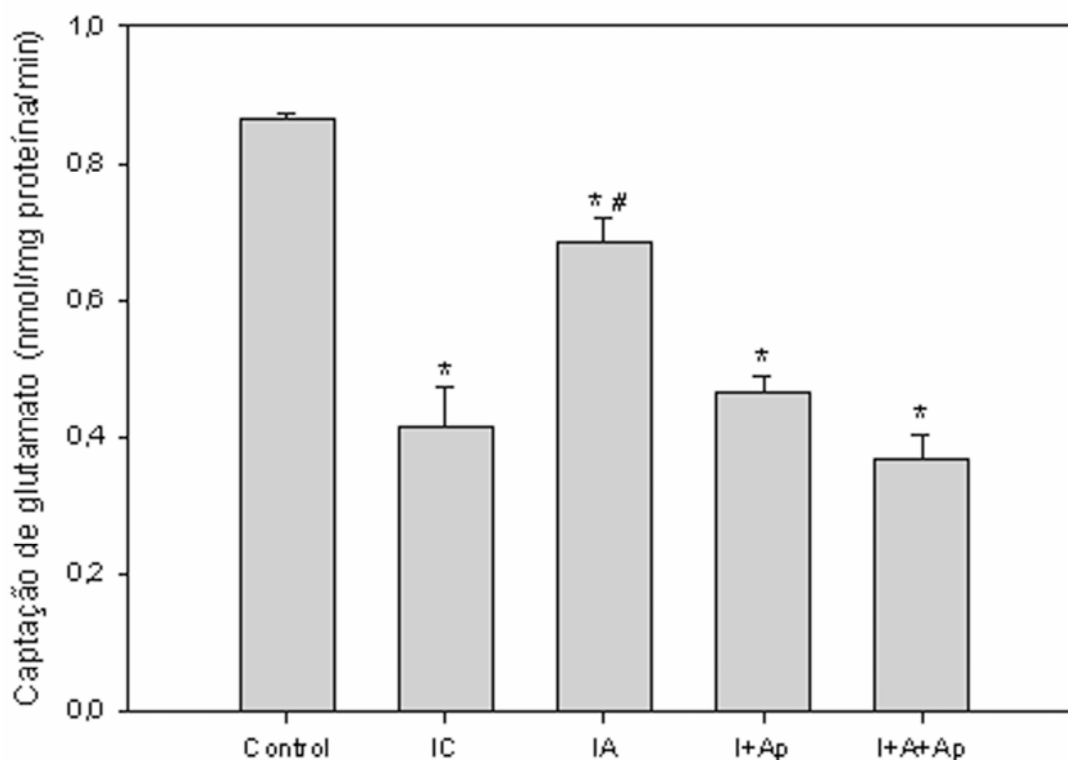


Figura 3. Efeito inibitório da APICA sobre o APDC. As fatias receberam um pré-tratamento de 1h com APICA 300 μ M antes do tratamento com 100 μ M de APDC. Cada determinação é a média de 3 experimentos independentes. As barras representam a média \pm erro. Estatística entre grupos foi determinada por ANOVA seguida de Tukey e teste *t* de Student foi usado para comparação intra-grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$. * diferente do controle, # diferente de todos os isquêmicos.

Legenda

IC: isquêmico-controle

IA: isquêmico-APDC

I+Ap: isquêmico-APICA

I+A+Ap: isquêmico-APDC-APICA

DISCUSSÃO

O cérebro é um dos órgãos mais sensíveis à injúria. O fluxo contínuo de sangue ao cérebro é essencial para o transporte de oxigênio e glicose aos neurônios. Se esse fluxo é obstruído, mesmo que por um curto período de tempo, o resultado é o dano ou a morte celular. Uma vez danificados, os neurônios são raramente substituídos, sendo então a região permanentemente afetada. Existem várias causas de obstrução do fluxo sanguíneo ao cérebro e elas podem ser coletivamente denominadas de derrame. As causas de derrame podem ser divididas em duas grandes categorias, hemorragia e isquemia. Hemorragia é a ruptura de uma veia cerebral, o que leva ao extravasamento de sangue nas cavidades cerebrais, causando dano cerebral. Na isquemia, o dano ao cérebro é causado pela redução ou completo bloqueio do sangue a partes específicas do cérebro, resultando na deficiência de glicose e oxigênio. As três maiores causas de isquemia são trombose, embolismo e diminuição sistêmica da perfusão sanguínea (Zemke et al., 2004). A isquemia ainda é a terceira maior causa de morte nos EUA, afetando mais de 1.000.000 de vítimas por ano. Dessas, um terço irá morrer e outro terço será vítima de incapacidade severa e permanente dependendo da área cerebral afetada. Apesar de já se saber muito sobre as alterações que ocorrem na anatomia, fisiologia e bioquímica do sistema nervoso em situações de isquemia, muito ainda deve ser estudado sobre como essas alterações contribuem para a vulnerabilidade do cérebro ao derrame a fim de desenvolver terapias clínicas efetivas (White et al., 2000).

Já é sabido que o sistema glutamatérgico está intimamente ligado ao dano causado por um episódio isquêmico, e que este leva a um aumento significativo de glutamato na fenda sináptica (Maragakis and Rothstein, 2004). Esse aumento ocorre devido ao bloqueio da captação de glutamato (Massieu and Tapia, 1997), assim como ao aumento na sua liberação (Fujimoto et al., 2004) e a uma reversão de seus transportadores (Bonde et al., 2003).

Os astrócitos estão envolvidos na manutenção normal da homeostase cerebral, incluindo diversas funções dependentes de energia necessárias para a atividade neuronal normal, por exemplo, regulação extracelular de K^+ , pH e osmolalidade; exportação de intermediários metabólicos; rápida captação de neurotransmissores (Walz, 2000); sendo o principal responsável pela manutenção das concentrações extracelulares de glutamato abaixo de seus níveis neurotóxicos (Attwell, 2000; Danbolt, 2001). A habilidade dos astrócitos em manter essas funções pode ser um fator determinante para a sobrevivência neuronal após a isquemia (Schousboe and Waagepetersen, 2005).

A guanosina tem sido insistentemente explorada por nosso grupo de pesquisa e tem demonstrado diversos efeitos neuroprotetores. Nesses estudos, o grupo tem demonstrado que esses efeitos benéficos da guanosina são exercidos por modulações extracelulares (Frizzo et al., 2002; Frizzo et al., 2003) e não através de seus mecanismos clássicos intracelulares (Rathbone et al., 1999). Seus efeitos benéficos tem sido relacionados a modulações do sistema glutamatérgico (Schmidt et al., 2000; Thomazi et al., 2008).

Os capítulos dessa Tese discorrem sobre um modelo de injúria cerebral, a isquemia, ao qual o sistema glutamatérgico está intimamente interligado. Utilizamos modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo* já padronizados por outros pesquisadores (Cimarosti et al., 2001; Cimarosti et al., 2005; Levine, 1960; Rice et al., 1981). Nosso principal foco foi a captação de glutamato nos diferentes modelos de isquemia utilizados, assim como a avaliação de um possível efeito de drogas com potencial neuroprotetor.

No capítulo 1, analisamos o perfil da captação de glutamato após um modelo de isquemia *in vitro*. Nesse mesmo trabalho, introduzimos a guanosina (GUO) e avaliamos seu papel neuroprotetor nesse modelo de injúria celular. Aqui o modelo empregado foi

o de privação de oxigênio e glicose (POG) em fatias de hipocampo de ratos adultos e jovens. Observamos uma diminuição da captação de glutamato em ambas as idades desde imediatamente após a injúria, o que não é recuperado em nenhum dos períodos de reperfusão estudados (Fig.1, Cap.1). A queda observada imediatamente após a isquemia pode ser explicada pelo colapso energético que ocorre durante um episódio isquêmico; entretanto, a carga energética é recuperada rapidamente após a perfusão, sendo normalizada em 15 minutos (Siesjo and Ljunggren, 1973). Em ratos jovens, a diminuição da captação foi menos pronunciada do que em adultos, o que pode estar relacionado à alta plasticidade do SNC nessa idade (Johnston et al., 2002), à habilidade em utilizar outros substratos que não a glicose (Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993) e à alta atividade dos transportadores de glutamato (Thomazi et al., 2004). Houve uma diminuição da viabilidade celular, assim como um aumento da permeabilidade de membrana após 1h de reperfusão em ratos jovens e após 3hs em ratos adultos (Fig.2, Cap.1). Após uma isquemia, a atividade mitocondrial pode estar prejudicada por horas e até dias após o insulto (Takamatsu et al., 2000), o que pode explicar essa perda funcional da mitocôndria. O cérebro adulto parece ser mais resistente às alterações causadas após um insulto isquêmico, pelo menos no modelo utilizado nesse trabalho. Em modelos de hipóxia-isquemia, o hipocampo é relativamente mais vulnerável em animais entre 7 e 13 dias de vida (Vannucci and Vannucci, 1997).

Muitos trabalhos apontam para o grande potencial modulatório dos nucleotídeos da guanina sobre a neurotransmissão glutamatérgica, modulação essa que se dá pela conversão dos nucleotídeos derivados da guanina à GUO, a qual exerce suas ações no meio extracelular (Schmidt et al., 2007); entretanto, seu efeito modulatório ainda não está totalmente esclarecido. Estudos prévios mostram um estímulo da GUO sobre a captação de glutamato em cultura de astrócitos e fatias cerebrais. Em condições

fisiológicas, o efeito da GUO sobre a captação de glutamato em fatias cerebrais parece ser dependente de idade (mais em jovens) e de estrutura (mais em córtex), mas em situações excitotóxicas, a GUO parece estar amplamente envolvida na modulação da captação de glutamato (Frizzo et al., 2005; Gottfried et al., 2002; Thomazi et al., 2004; Thomazi et al., 2008). Aqui, a GUO foi capaz de evitar a queda da captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos jovens (P10) após 3hs de reperfusão, mas não de ratos adultos (Fig.2, Cap.1). Quando avaliamos o dano celular, a GUO foi capaz de proteger parcialmente fatias de ratos adultos e jovens (Fig.5, Cap.1). Essa proteção da GUO sobre o dano celular parece não estar relacionada a uma ação antagonista sobre os receptores glutamatérgicos, visto que a GUO não é uma boa deslocadora do “binding” de glutamato (Porciuncula et al., 2002; Souza and Ramirez, 1991). Nós sugerimos que o efeito neuroprotetor da GUO, pode ser em consequência de um aumento na captação de glutamato, o que evitaria o aumento de sua concentração extracelular e consequente hiper-estimulação dos receptores glutamatérgicos, situação que ocorre onde há quebra energética, como no modelo utilizado nesse trabalho. A GUO também tem um efeito anti-apoptótico em situações de injúria celular através da ativação das vias da PI3-K/AKT/PKB e/ou da MAPK (Di Iorio et al., 2004), demonstrando que a GUO protege células de apoptose através da ativação de receptores ligados a proteína G. Um parêntese deve ser feito em relação à descrição de um possível receptor específico para GUO (Traversa et al., 2002), mas sua específica localização ainda não foi demonstrada, apesar de resultados de nosso grupo, ainda não publicados, demonstrarem a preferência do “binding” da GUO em preparação astrocitária. Tendo em vista que os transportadores de glutamato podem sofrer modulação por diversas quinases, é possível sugerir que uma das vias de sinalização ativadas pela GUO seja

capaz de ativar os transportadores, ou ainda, ativar um aumento na translocação dos transportadores (Holman and Cushman, 1994).

Esse modelo com fatias agudamente isoladas é um bom modelo para estudos farmacológicos, mas é um modelo com algumas restrições importantes, pois o estado metabólico das fatias torna-se rapidamente comprometido, limitando o período experimental a algumas horas e, conseqüentemente, os resultados a partir desse modelo de condição isquêmica têm sido restritos a efeitos agudos. Nesse trabalho, nós mostramos como um efeito funcional é afetado com o decorrer das horas, pois ocorre uma diminuição importante da captação de glutamato em fatias controle após 6hs de reperfusão (Fig.1, Cap.1).

Tendo em vista a limitação de tempo no modelo com fatias, nós decidimos investir no modelo de cultura organotípica de fatias de hipocampo. Da mesma forma que nas fatias agudamente isoladas, esse modelo nos proporciona trabalhar com uma situação onde há manutenção da organização do tecido e da integridade das células, permitindo a comunicação entre neurônios e entre neurônios e glia, e isso é um fator importante para melhor entender os mecanismos estudados. Na cultura, não trabalhamos com limite de tempo, pois a adesão das fatias a uma membrana e o fornecimento de fatores e nutrientes essenciais, não somente uma situação que mimetiza os sais encontrados no líquido, faz com que as células sobrevivam por períodos superiores a 30 dias (Noraberg et al., 2005). Usando esse modelo de cultura de tecidos, forjamos uma situação de isquemia *in vitro* como a utilizada no modelo com fatias. Nosso objetivo era o mesmo, avaliar o perfil da captação de glutamato, em períodos mais longos, após submeter as culturas à POG e correlacionar uma possível queda da captação com o dano celular medido pela incorporação de iodeto de propídio. Entretanto, somente um artigo na literatura mostra captação de glutamato em cultura organotípica de hipocampo (Zou

and Crews, 2005). Portanto, havia a necessidade de padronizar esse parâmetro nesse modelo. Traçamos então uma curva de tempo de captação e uma curva de concentração de glutamato. Mas antes, testamos qual seria a melhor maneira de fazer isso, pois na cultura organotípica, as fatias são cultivadas sobre uma membrana semi-permeável e estão aderidas a ela, além de ser um método caro. No nosso grupo, nós reutilizamos as membranas pelo menos 2 vezes sem afetar os resultados obtidos, cuidando, evidentemente, da esterilização das mesmas. Assim, 3 métodos distintos foram testados, como descrito no capítulo 2. O método número 1 (Fig.1, Cap.2), onde nós removemos cuidadosamente as fatias da membrana e as transferimos para uma placa de 24 poços foi o escolhido. É um método econômico, pois podemos reutilizar as membranas e o perfil de captação aproximou-se muito do usado para fatias agudamente isoladas. A concentração escolhida de glutamato ($100\mu\text{M}$) também foi a mesma usada em fatias agudamente isoladas.

Seguindo a padronização da captação, submetemos as fatias organotípicas à POG e traçamos o perfil da captação de glutamato em vários tempos de reperusão. Surpreendentemente e diferindo dos resultados encontrados em fatias agudas, houve um aumento da captação após 1h de reperusão (Fig.3, Cap.2). Esse aumento pode representar uma tentativa em normalizar os níveis extracelulares de glutamato, pois depois de um episódio isquêmico, o fluxo sanguíneo é restabelecido e, teoricamente, os astrócitos recuperam sua capacidade de captar, visto que o gradiente transmembrana é normalizado. O aumento 1h após e a não variação da captação nos tempos subsequentes, pode ser devido à maior estabilidade das fatias cultivadas quando comparadas às fatias agudamente isoladas. Uma diminuição da captação foi observada somente 24h depois do insulto e esse achado pode estar relacionado ao dano celular que

ocorre a partir de 13h de reperfusão (Fig.4, Cap.2), o que está de acordo com dados previamente descritos por nosso grupo (Horn et al., 2005).

Nesse modelo de POG *in vitro*, a região do hipocampo mais afetada é a região CA1, em especial, as células da camada piramidal. Estudos indicam que essa morte induzida pela POG em consequência do aumento extracelular de glutamato, é devida ao transporte reverso através de seus transportadores (Bonde et al., 2003; Bonde et al., 2005). Não podemos afirmar se a diminuição da captação de glutamato observada 24hs pós POG é em consequência da morte celular observada nesse modelo, pois o dano foi observado somente na região CA1 do hipocampo e nós medimos a captação usando toda a estrutura. Então, para melhor esclarecer esse ponto, nós medimos a expressão dos transportadores, 1 e 24hs após o insulto, usando um homogeneizado total de hipocampo. Esses dados são prévios e necessitam de maiores comprovações, por isso não estão inseridos nesse artigo, mas estão descritos no capítulo ANEXO dessa tese. Observamos uma diminuição da expressão de GLT-1 24hs após a POG, o que poderia estar relacionado com a queda da captação nesse momento, visto que o GLT-1 é o maior transportador de glutamato em hipocampo (Lehre and Danbolt, 1998). Apesar dessa diminuição de GLT-1, estudos mostram um aumento de GLAST e GLT1 nas células piramidais da região CA1 após POG, a região mais afetada nesse modelo de isquemia (Bonde et al., 2003; Bonde et al., 2005). Entretanto, a função desses transportadores quando expressos em neurônios ainda não está esclarecida, mas provavelmente não está relacionada à sua função de transporte. Nossos dados prévios também apontam para uma tendência no aumento da expressão de GLAST. Essa diferença não foi significativa, mas o *n* dessas dosagens ainda é pequeno. Se esse aumento fosse significativo, corroboraria com dados descritos por Fukamachi et al. (2001), que mostra uma relação entre o aumento de GLAST em alguns astrócitos com características

apoptóticas e neurônios piramidais atrofiados. O aumento observado após 1h de reperfusão não parece ser devido a um aumento na expressão dos transportadores de glutamato analisados (anexo).

Um possível efeito neuroprotetor da GUO também foi testado usando o modelo de POG em cultura de fatias. Usamos dois protocolos para GUO: 1) GUO foi adicionada durante todo tempo experimental, e 2) somente depois da POG. Em ambos protocolos, GUO foi capaz de proteger parcialmente as células de morte, ou seja, reduziu de 53% para 31% a incorporação de iodeto de propídio após 24hs de reperfusão (Fig.5A, Cap.2). Entretanto, ao contrário do descrito em fatias agudamente isoladas, a GUO não foi capaz de evitar a queda da captação de glutamato (Fig.5B, Cap.2). Nesse modelo, a proteção da GUO sobre a morte celular não está diretamente ligada à modulação da captação de glutamato.

Dessa forma podemos concluir que a escolha do modelo pode influenciar os resultados, ou seja, dependendo do perfil do modelo utilizado, podemos obter informações distintas sobre a droga em estudo. Nessa tese, por exemplo, os experimentos que mimetizam uma isquemia *in vitro* têm características diferentes. O modelo em fatias agudamente isoladas é principalmente utilizado para estudos farmacológicos e está restrito a efeitos agudos (Dong et al., 1988). Dessa forma, pudemos avaliar o efeito agudo da GUO em um modelo de falha energética. O modelo em cultura de fatias nos fornece outras informações importantes. É um modelo mais estável, onde podemos avaliar alterações a longo prazo. É um ótimo modelo para estudar as alterações pós-isquêmicas, como síntese proteica, alterações morfológicas, sinalização intracelular, entre outras (Bonde et al., 2005). Assim, utilizando esse modelo de cultura, mostramos que a GUO tem um importante efeito neuroprotetor e que esse

não está relacionado a um aumento da captação de glutamato, como o mostrado no modelo agudo com fatias.

No terceiro capítulo dessa tese nós usamos o modelo neonatal de hipóxia-isquemia (HI) como modelo *in vivo* de isquemia cerebral. A HI neonatal é a maior causa de mortalidade e morbidade neurológica crônica em crianças e continua, na vida adulta, como a causa mais freqüente de paralisia cerebral, retardo mental e epilepsia (Vannucci and Hagberg, 2004). Esse modelo reproduz injúria cerebral unilateral causando dano no estriado, córtex e hipocampo no hemisfério ipsilateral a oclusão da artéria. Tal dano neuropatológico é raramente observado no hemisfério contralateral e nunca em animais submetidos somente à hipóxia (Vannucci and Vannucci, 1997). O cérebro de neonatos é mais resistente a HI que o de adulto (Towfighi et al., 1997); entretanto, isso depende do estágio específico de desenvolvimento cerebral, sendo o hipocampo resistente a HI no 2-3 dia pós-natal e tornando-se progressivamente vulnerável após esse período (Vannucci and Vannucci, 1997). Um evento hipóxico-isquêmico com suficiente severidade para depletar as reservas energéticas teciduais é rapidamente seguido por acidose, excitotoxicidade glutamatérgica, formação de espécies reativas de oxigênio, ao que se segue prolongados períodos de morte celular ou apoptose, e inflamação (Vannucci and Hagberg, 2004).

Além da importante função dos astrócitos na manutenção normal da homeostase cerebral, eles possuem uma proteína de citoesqueleto específica que os diferencia dos demais tipos celulares, a GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (O'Callaghan and Sriram, 2005). Em apenas poucas horas de virtualmente qualquer tipo de injúria cerebral, os astrócitos sobreviventes da região afetada começam a hipertrofiar e proliferar, evento esse denominado de astrogliose reativa (Swanson et al., 2004). Outra proteína específica de astrócitos, mas não do citoesqueleto, é a S100B, que é uma proteína ligada ao cálcio,

expressa e secretada por astrócitos, que exerce efeitos intra e extracelulares na glia e nos neurônios (Donato, 2001). Intracelularmente, modula algumas proteínas do citoesqueleto e proteínas sinalizadoras, e extracelularmente, seu efeito depende de sua concentração (Van Eldik and Wainwright, 2003). A proteína S100B pertence a uma família envolvida na modulação da proliferação celular e regulação do citoesqueleto (Donato, 2001). Os níveis de S100B aumentam durante o desenvolvimento e é sintetizada e secretada por astrócitos (Tramontina et al., 2000). Seus efeitos dependem de sua concentração: age como neurotrofina em níveis de pico e nanomolares e pode induzir apoptose em níveis micromolares (Van Eldik and Wainwright, 2003).

Nesse trabalho, nosso objetivo foi avaliar alguns parâmetros bioquímicos nos primeiros dias pós HI, não somente a captação de glutamato, mas também os níveis de S100B e de GFAP, assim como avaliar o efeito da GUO sobre esses parâmetros e sobre a atrofia cerebral. Todos os parâmetros foram medidos em córtex; no hipocampo, não medimos a captação de glutamato, pois esta avaliação já havia sido realizado por nosso laboratório (Moretto et al., 2005).

Em córtex, observamos uma diminuição da captação de glutamato no grupo HI, tanto no hemisfério ipsilateral quanto no contralateral (Fig.1 e 2, Cap.3). Essa diminuição é tempo dependente e se torna diferente de seu controle somente no terceiro dia pós-insulto. Considerando que o GLT-1 é o principal transportador de glutamato no córtex e que há uma queda acentuada em seus níveis no centro da isquemia desde 24hs após o insulto, assim como do GLAST (Fukamachi et al., 2001), não surpreende o fato de obtermos uma diminuição significativa da captação nesse ponto. Entretanto, na zona da penumbra, há um aumento de GLAST e não de GLT-1, mas ambos aparecem principalmente nas células astrocíticas positivas para S100B e com características apoptóticas e também nos neurônios piramidais atrofiados. Deve-se ressaltar que a

expressão de GLAST e GLT-1 é baixa no cérebro imaturo e aumenta durante a maturação atingindo níveis máximos na vida adulta, enquanto a expressão do EAAC1 é maior no cérebro neonatal quando comparado com o cérebro adulto (Furuta et al., 1997; Ullensvang et al., 1997), mas este não parece ser responsável pela manutenção dos níveis de glutamato extracelular abaixo de seus níveis tóxicos, mas participar de algum processo de modulação do sistema glutamatérgico (Rothstein et al., 1994). Aqui nós mostramos que a captação de glutamato foi também afetada no hemisfério contralateral (Fig.1A, Cap.3), ou seja, no hemisfério que sofreu somente hipóxia. Estudos mostram que durante a hipóxia, há uma diminuição de 25-30% na pressão sangüínea (Vannucci and Hagberg, 2004). Nós medimos a captação somente até o terceiro dia pós HI e, até então, a captação no hemisfério contralateral estava diminuída, mostrando que a privação de oxigênio é capaz de mexer com a funcionabilidade dos transportadores, apesar de não causar atrofia cerebral no hemisfério hipóxico, somente no hipóxico-isquêmico (Fig.7, Cap.3).

A redução dos níveis de GLT-1 tem sido proposta como patogênese da isquemia cerebral (Torp et al., 1995). Entretanto, a relação entre a expressão dos transportadores de glutamato e neuroproteção continua em questão, pois o desbalanço energético durante a HI leva ao transporte reverso, o que promove morte celular por excitotoxicidade (Rossi et al., 2000). Então, seguindo o observado nesse estudo e no de Moretto et al. (2005), sugerimos que a diminuição da captação de glutamato 72hs após o insulto no hemisfério ipsilateral pode estar relacionada a uma diminuição dos seus transportadores na zona central isquêmica, e que um possível aumento desses transportadores na zona de penumbra (Fukamachi et al., 2001) pode estar relacionada a atrofia cerebral observada quando os animais atingem 90 dias de vida, tanto em córtex quanto em hipocampo (Fig.6 e 7, Cap.3). O aumento da captação no hemisfério

ipsilateral observado 24hs após o insulto pode ser uma resposta imediata das células na tentativa de restabelecer os níveis extracelulares de glutamato (Fig.1B, Cap.3).

Nesse modelo de HI neonatal, a morte celular é principalmente por necrose na região central e apoptose na região de penumbra, mas uma mistura de apoptose e apoptose-necrose continua sendo implicada no mecanismo de morte celular na HI neonatal (Carloni et al., 2007). Apoptose em consequência à HI ocorre mais freqüentemente no cérebro imaturo que no cérebro adulto (Carloni et al., 2007; McLean and Ferriero, 2004). GLAST e GLT-1 têm sido encontrados em neurônios em culturas exposta à POG (Bonde et al., 2003) e na HI (Fukamachi et al., 2001). Não se sabe muito bem a função dessas moléculas em neurônios, mas elas podem estar relacionadas com vias tanto de sobrevivência quanto de eliminação das células danificadas. Concluindo, os transportadores de glutamato podem ter funções tanto neuroprotetoras quanto neurotóxicas, dependendo da severidade do insulto na HI neonatal.

Nesse trabalho, nós medimos o imunocontéudo total da S100B em homogeneizado de hipocampo e córtex, mas não a S100B liberada. Em córtex, observamos um aumento dos níveis de S100B dependente de tempo em todos os grupos estudados, sem efeito da HI, em ambos os hemisférios (Fig.5, Cap.3). No hipocampo ipsilateral, observamos um aumento de S100B dependente de tempo no grupo HI e HI-GUO, mas somente o grupo HI-GUO foi diferente de seu controle 48 e 72hs após o insulto (Fig.4B, Cap.3). Na isquemia aguda ou trauma cerebral, há um aumento nos níveis de S100B no líquido e no soro (Rothermundt et al., 2003), e esse aumento é ainda mais acentuado durante a reperfusão (Buyukuysal, 2005). Um episódio isquêmico, seguido de reperfusão, causa um aumento muito maior na liberação de S100B no hipocampo do que em outras regiões cerebrais (Buyukuysal, 2005), o que corrobora com os dados desse trabalho. Quando em concentrações micromolares, S100B tem sido

relacionada a efeitos neurotóxicos, o que pode estar relacionado a desordens neurológicas severas como derrame e trauma (Huttunen et al., 2000). Aqui, os níveis de S100B não ultrapassaram 0,30ng/mg de proteína, indicando que nessas concentrações a S100B pode estar exercendo efeitos neuroprotetores (Kogel et al., 2004), mas, mesmo assim, não é capaz de evitar a atrofia cerebral observada em hipocampo (Fig.6, Cap.3). Além disso, estudos mostram que altas concentrações de glutamato, o que ocorre durante um episódio isquêmico, diminuem a secreção de S100B (Goncalves et al., 2002), e pode ser por isso que os níveis de S100B não aumentem tanto, apesar de trabalhos *in vitro* mostrarem que a POG não inibe a liberação de S100B e que essa é ainda maior durante a reperfusão (Buyukuysal, 2005). Existem diversos trabalhos mostrando que S100B extracelular, em concentrações nanomolares, protege neurônios hipocampais do dano excitotóxico induzido pelo glutamato (Ahlemeyer et al., 2000; Kogel et al., 2004). A liberação de S100B pode estar relacionada ao mecanismo de captação de glutamato, visto que em outro trabalho de nosso grupo, usando o mesmo modelo de injúria utilizado aqui, Moretto et al. (2005) mostraram uma diminuição de captação de glutamato em fatias de hipocampo 72hs pós HI, e uma inibição dos transportadores gliais de glutamato pode estar relacionada a um aumento na liberação de S100B (Tramontina et al., 2006).

Estudos mostram que a GUO é capaz de estimular a síntese e a liberação de S100B de cultura de astrócitos (Cicarelli et al., 1999). Aqui, mostramos que a GUO aumenta os níveis de S100B no hipocampo dos animais submetidos a HI, e pode ser que esse aumento tenha alguma relação com os dados obtidos por Moretto et al. (2005), onde a GUO foi capaz de evitar a queda da captação de glutamato 72hs pós HI, mas a mesma não foi capaz de evitar a atrofia hipocampal (Fig.6, Cap.3). Assim, esse aumento nos níveis de S100B parece ser uma tentativa de sobrevivência celular, mas mais

estudos e parâmetros devem ser analisados a fim de melhor elucidar esse mecanismo e o significado do aumento de S100B, até porque aqui nós medimos S100B total e a maioria dos trabalhos se baseiam nos efeitos da S100B secretada.

A GFAP é um filamento intermediário superexpresso em situações de injúria ao SNC e tem sido usada como um marcador para a reatividade astrocitária no cérebro. A astrogliose reativa, caracterizada por um aumento da atividade proliferativa que segue um episódio isquêmico, persiste por várias semanas (Sizonenko et al., 2008). A real contribuição do aumento de GFAP em situações de injúria cerebral ainda não está bem esclarecida, mas sua medida é amplamente usada no auxílio de estudos acerca de injúria, doenças e desenvolvimento (Eng et al., 2000). Nos três tempos estudados e nas duas estruturas, há um aumento de GFAP dependente de idade nos cérebros controles em ambos os hemisférios e também no hemisfério contralateral que sofreu somente hipóxia (Fig.2 e 3, Cap.3). Nos animais submetidos à HI, o aumento de GFAP foi significativamente maior no hemisfério ipsilateral e esse foi diferente de seu respectivo controle 48 e 72hs após o insulto. Esses achados podem implicar que a resposta glial a esse insulto pode significar uma remodelação do tecido e representa um importante alvo terapêutico. A GUO não teve nenhum efeito sobre os níveis de GFAP.

Tendo em vista a facilidade em trabalhar com o modelo de privação de oxigênio e glicose *in vitro* usando fatias, e que esse modelo de POG é um modelo que nos fornece dados farmacológicos rápidos, no quarto capítulo dessa tese descrevemos um trabalho com resultados preliminares usando esse modelo. Submetemos fatias de hipocampo de ratos adultos a POG e avaliamos o efeito de um agonista de receptores glutamatérgicos de grupo II sobre a captação de glutamato. Os mGluRs de grupo II têm sido implicados em efeitos neuroprotetores em diversos modelos de injúria cerebral (Battaglia et al., 1998; Folbergrova et al., 2005; Zwienenberg et al., 2001). O (2R,4R)-

APDC, um potente agonista de mGluRs de grupo II, foi utilizado nesse trabalho. A maioria dos estudos usa DCG-IV como agonista de grupo II, mas esse, dependendo de sua concentração, pode agir em receptores NMDA e ser excitotóxico.

Nas condições utilizadas, mostramos que o (2*R*,4*R*)-APDC foi capaz de evitar parcialmente a queda da captação de glutamato causada pela POG (Fig.1, Cap.4), e que esse efeito foi inibido por APICA e não por LY341495, ambos potentes antagonistas de mGluRs de grupo II (Fig.2 e 3, Cap.4).

O mecanismo pelo qual o (2*R*,4*R*)-APDC evita parcialmente a queda da captação de glutamato deve ser elucidada, mas trabalhos apontam para uma modulação direta sobre a expressão de GLAST e GLT-1 (Aronica et al., 2003). Entretanto, utilizando este modelo onde, como discutido anteriormente, as fatias não ficam viáveis por muito tempo, talvez fosse difícil identificar um aumento da expressão desses transportadores relacionado com a ação do (2*R*,4*R*)-APDC. Outro mecanismo possível seria a ação do (2*R*,4*R*)-APDC sobre a recuperação da glutamina endógena (Trotti et al., 1999), o que evitaria o ataque dos radicais livres sobre os transportadores de glutamato.

De qualquer forma, os resultados apresentados nesse capítulo ainda são prévios e necessitam de estudos mais aprofundados. Mas um grande achado foi o efeito do (2*R*,4*R*)-APDC na captação de glutamato, que aparece como um candidato putativo a neuroprotetor, na condição de agonista glutamatérgico metabotrópico de grupo II, uma vez que a maioria dos trabalhos usa o DCG-IV. A ação modulatória ainda é uma incógnita, mas sendo os mGluRs de grupo II ligados à modulação da adenilato ciclase, pode ser que mecanismos de sinalização intracelulares intervenham na funcionabilidade dos transportadores gliais de glutamato.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. No modelo *in vitro* de isquemia cerebral:

1.1. No modelo com fatias hipocampais preparadas a fresco:

1.1.1. Com guanosina:

- A POG altera a captação de glutamato em fatias de hipocampo de ratos jovens e adultos;
- Fatias de animais jovens são mais sensíveis a POG, pois há uma perda de viabilidade mitocondrial, assim como um aumento da permeabilidade da membrana celular desde 1h pós-insulto;
- A GUO foi capaz de evitar a queda da captação de glutamato 3hs pós-insulto somente nos ratos jovens;
- A GUO protegeu parcialmente as fatias expostas a POG do dano a membrana celular em ambas idades.

Esses dados sugerem que o dano celular causado após um insulto isquêmico pode estar relacionado a uma diminuição da captação de glutamato, e que a GUO exerce modulação sobre os transportadores de glutamato em animais jovens por um mecanismo ainda desconhecido.

1.1.2. Com (2R,4R)-APDC:

- A diminuição da captação de glutamato devido a POG foi parcialmente prevenida pelo (2R,4R)-APDC;

- O efeito do (2*R*,4*R*)-APDC não foi revertido por LY 341495, mas sim por APICA.

Esses dados sugerem que o (2*R*,4*R*)-APDC, como agonista de mGluRs de grupo II, também é um bom candidato para se estudar os efeitos neuroprotetores desse grupo de receptores metabotrópicos na proteção contra o dano isquêmico.

1.2. No modelo de cultura organotípica de fatias hipocâmpais:

- O método número 1 descrito no capítulo 2 é o melhor método e o mais econômico para estudos da captação de glutamato em cultura organotípica de fatias de hipocampo;
- A concentração de 100µM e o tempo de 5 minutos são os mais indicados para avaliar a captação de glutamato, assemelhando-se aos parâmetros usados em fatias agudamente isoladas;
- A POG em cultura leva a um aumento da captação de glutamato 1h após o insulto e esse aumento não é devido a um aumento da expressão dos transportadores de glutamato;
- Não há alteração na captação de glutamato nas fatias nos períodos de 3, 6 e 13hs após submetidas à POG, mesmo já havendo morte celular significativa após 13hs de reperfusão;
- Há uma diminuição da captação de glutamato 24hs após a POG, assim como morte celular na região CA1, o que pode ser em consequência da queda da captação;
- Há uma diminuição dos níveis de GLT-1 24hs pós POG, e isso pode ser a causa da queda da captação observada nesse ponto.

Esses dados sugerem que avaliar a captação de glutamato em cultura de tecidos é um forte candidato para elucidação da morte celular tardia frente a drogas com potencial neuroprotetor e que a GUO foi capaz de proteger as células de morte por um processo que não envolve captação de glutamato.

2. No modelo *in vivo* de isquemia cerebral:

2.1. Hipóxia-isquemia neonatal

- Em fatias de córtex, a HI aumenta a captação de glutamato 24hs pós-insulto no hemisfério ipsilateral;
- A HI leva a uma diminuição progressiva da captação de glutamato em ambos hemisférios, sendo diferente de seu controle apenas 72hs pós-insulto;
- A GUO não foi capaz de evitar a queda da captação de glutamato em fatias de córtex de ratos submetidos à HI;
- Os níveis de GFAP aumentam com a idade, e seus níveis são muito maiores nos animais submetidos à HI, mas somente no hemisfério ipsilateral, tanto em córtex quanto em hipocampo;
- A GUO não exerceu nenhum efeito sobre os níveis de GFAP;
- Os níveis totais de S100B aumentam progressivamente com a idade em córtex, e não há diferença entre animais controles e os submetidos à HI;
- Os níveis de S100B em hipocampo aumentam 48hs após o insulto, mas retornam a seus níveis normais às 72hs no hemisfério contralateral (somente hipóxico);
- Nos animais HI, os níveis de S100B no hemisfério ipsilateral aumentam significativamente, mas somente nos tratados com GUO os níveis de S100B foram diferentes de seu controle;

- A atrofia cerebral tanto em córtex quanto em hipocampo não foi evitada pelo tratamento com GUO.

Esses dados sugerem a importância do conhecimento das alterações bioquímicas precoces através deste modelo de HI neonatal, a fim de melhor compreender as intervenções cabíveis. Nesse modelo, a GUO não foi capaz de modular a captação de glutamato em fatias de córtex, como o observado por Moretto et al. (2005) em fatias de hipocampo, nem de evitar a atrofia cerebral em ambas as estruturas. Entretanto, a GUO aumentou os níveis de S100B em hipocampo, o que pode estar relacionado ao efeito da GUO em evitar a diminuição da captação de glutamato 72hs pós-HI (Moretto et al., 2005), nessa estrutura.

PERSPECTIVAS

Como continuação deste trabalho e para melhor definir os mecanismos envolvidos em cada capítulo, os experimentos sugeridos são:

- Determinar os níveis dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1, nas fatias de ratos jovens submetidas à POG a fim de verificar se a modulação da GUO sobre a captação em fatias de ratos dessa idade tem alguma relação com os níveis dos transportadores de glutamato.
- Determinar os parâmetros de dano celular nos experimentos de POG com APDC, assim como explorar o efeito do APDC de evitar parcialmente a diminuição na captação de glutamato em fatias agudamente isoladas. Identificar o quanto este efeito é específico de mGluRs de grupo II. Investigar esta linha de efeito em animais jovens, considerando diferenças nas respostas a estes agonistas em diferentes fases do desenvolvimento.
- Em culturas organotípicas submetidas a POG e na presença de GUO, avaliar alguns sinalizadores intracelulares envolvidos em mecanismos de neuroproteção, como a via da AKT/PKB por exemplo, a fim de verificar o envolvimento da GUO em alguma dessas vias.
- Determinar os níveis dos transportadores de glutamato no modelo de HI, a fim de verificar as alterações observadas na captação de glutamato nesse modelo, assim como modificar o esquema de tratamento da GUO e verificar outros parâmetros bioquímicos com essas doses.

ANEXO

Dados não publicados e citados em “Discussão”

Ensaio para Western Blotting

A fim de investigar o imunocontéudo dos transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1 (anticorpos gentilmente cedidos por Dr. D. Pow, Universidade de Newcastle, Australia) fatias de cultura organotípica de hipocampo foram homogeneizadas em solução de lise (4% sódio dodecilsulfato-SDS; 2,1mM EDTA e 50mM Tris) 1h e 24hs após a POG. Alíquotas foram retiradas para dosagem de proteínas (Peterson, 1977) e β -mercaptoetanol (Sigma Chemical) foi adicionado em uma concentração final de 5%. Amostras contendo 50 μ g de proteína foram aplicadas em um gel para eletroforese contendo 10% de SDS-poliacrilamida (Sigma Chemical). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond, GE Healthcare) usando um aparato semi-seco (Bio-Rad Trans-Blot SD, Hercules, CA, USA).

As membranas foram incubadas por 60min a 4°C em solução bloqueadora (Tris-tampão salina contendo 5% de leite em pó e 0,1% de Tween-20) e posteriormente incubadas a 4°C com o anticorpo primário apropriado, dissolvido em solução bloqueadora, durante a noite. Anticorpos primários contra as seguintes proteínas foram usados: GLAST e GLT-1 (ambos diluídos 1:4000, rabbit polyclonal). As mesmas membranas foram re-incubadas com anticorpo para β -actin (diluída 1:2000, Sigma Chemical) como um controle interno. Subseqüentemente, as membranas foram lavadas e incubadas por 2hs com o anticorpo secundário *horseradish* conjugado a peroxidase, reconhecendo antígenos correspondentes ao anticorpo primário (diluído 1:1000 em solução bloqueadora, GE Healthcare). A quimioluminescência (ECL, GE Healthcare) foi detectada usando filmes de raio-X (Kodak X-Omat, Rochester, NY, USA). Os

filmes foram escaneados e a percentagem da intensidade das bandas foi analisada usando o programa Optiquant (Packard Instrument). Para cada experimento, grupos testes foram comparados com os grupos controles não expostos a POG, os quais foram considerados como 100%, assegurando então a mesma intensidade de sinal para todos os grupos.

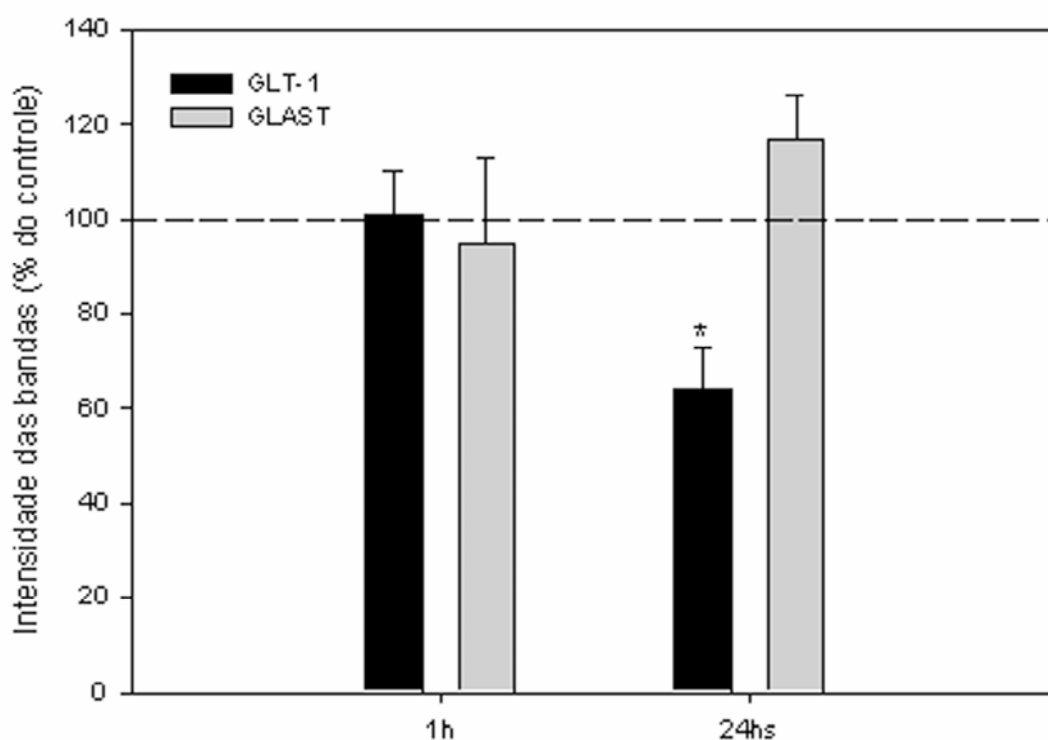


Figura 1: Quantificação dos transportadores de glutamato GLUT-1 e GLAST após POG. O imunocontéudo foi analisado 1h e 24hs após 60min de POG em cultura organotípica de fatias de hipocampo. As barras representam a média \pm E.P.M. e o $n = 6$ para cada tempo. Diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste t de Student. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. (*) significa diferença estatisticamente significativa de seu controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C., Kriegstein, J., 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858, 121-8.
- Amara, S.G., Fontana, A.C., 2002. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int.* 41, 313-8.
- Anderson, C.M., Swanson, R.A., 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 32, 1-14.
- Aronica, E., Gorter, J.A., Ijlst-Keizers, H., Rozemuller, A.J., Yankaya, B., Leenstra, S., Troost, D., 2003. Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci.* 17, 2106-18.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 4155-60.
- Attwell, D., 2000. Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr.* 130, 1023S-5S.
- Ballerini, P., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., Caciagli, F., 1995. Influence of Ca²⁺ channel modulators on [3H]purine release from rat cultured glial cells. *Neurochem Res.* 20, 697-704.
- Barnes, J.M., Murphy, P.A., Kirkham, D., Henley, J.M., 1993. Interaction of guanine nucleotides with [3H]kainate and 6-[3H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *J Neurochem.* 61, 1685-91.
- Battaglia, G., Bruno, V., Ngomba, R.T., Di Grezia, R., Copani, A., Nicoletti, F., 1998. Selective activation of group-II metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *Eur J Pharmacol.* 356, 271-4.
- Beart, P.M., O'Shea, R.D., 2007. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol.* 150, 5-17.
- Bennett, M.R., Balcar, V.J., 1999. Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochem Int.* 35, 269-80.
- Berent-Spillson, A., Russell, J.W., 2007. Metabotropic glutamate receptor 3 protects neurons from glucose-induced oxidative injury by increasing intracellular glutathione concentration. *J Neurochem.* 101, 342-54.

- Bonde, C., Sarup, A., Schousboe, A., Gegelashvili, G., Zimmer, J., Noraberg, J., 2003. Neurotoxic and neuroprotective effects of the glutamate transporter inhibitor DL-threo-beta-benzyloxyaspartate (DL-TBOA) during physiological and ischemia-like conditions. *Neurochem Int.* 43, 371-80.
- Bonde, C., Noraberg, J., Noer, H., Zimmer, J., 2005. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience.* 136, 779-94.
- Bruhn, T., Levy, L.M., Nielsen, M., Christensen, T., Johansen, F.F., Diemer, N.H., 2000. Ischemia induced changes in expression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 in hippocampus of the rat. *Neurochem Int.* 37, 277-85.
- Burgos, J.S., Barat, A., Ramirez, G., 2000. Guanine nucleotides block agonist-driven 45Ca^{2+} influx in chick embryo retinal explants. *Neuroreport.* 11, 2303-5.
- Buyukuysal, R.L., 2005. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int.* 47, 580-8.
- Cardenas, A., Moro, M.A., Hurtado, O., Leza, J.C., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bodelon, O.G., Bosca, L., Lizasoain, I., 2000. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem.* 74, 2041-8.
- Carlioni, S., Carnevali, A., Cimino, M., Balduini, W., 2007. Extended role of necrotic cell death after hypoxia-ischemia-induced neurodegeneration in the neonatal rat. *Neurobiol Dis.* 27, 354-61.
- Chaudhry, F.A., Lehre, K.P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O.P., Danbolt, N.C., Storm-Mathisen, J., 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron.* 15, 711-20.
- Chen, J.C., Hsu-Chou, H., Lu, J.L., Chiang, Y.C., Huang, H.M., Wang, H.L., Wu, T., Liao, J.J., Yeh, T.S., 2005. Down-regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 in rat hippocampus and striatum and its modulation by a group III metabotropic glutamate receptor antagonist following transient global forebrain ischemia. *Neuropharmacology.* 49, 703-14.

- Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U.V., Bassan, M., DeSilva, T., Tanaka, K., Irwin, N., Aoki, C., Rosenberg, P.A., 2004. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci.* 24, 1136-48.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23, 137-49.
- 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, 117-27.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1, 623-34.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Giuliani, P., D'Alimonte, I., Ballerini, P., Caciagli, F., Rathbone, M.P., 1999. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia.* 25, 93-8.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., D'Alimonte, I., Giuliani, P., Florio, T., Caciagli, F., Middlemiss, P.J., Rathbone, M.P., 2000. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia.* 29, 202-11.
- 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 cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett.* 315, 33-6.
- Cimarosti, H., Siqueira, I.R., Zamin, L.L., Nassif, M., Balk, R., Frozza, R., Dalmaz, C., Netto, C.A., Salbego, C., 2005. Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res.* 30, 583-9.
- Colwell, C.S., Altemus, K.L., Cepeda, C., Levine, M.S., 1996. Regulation of N-methyl-D-aspartate-induced toxicity in the neostriatum: a role for metabotropic glutamate receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 1200-4.
- Cotman, C.W., Foster, A., Lanthorn, T., 1981. An overview of glutamate as a neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 27, 1-27.

- Danbolt, N.C., Chaudhry, F.A., Dehnes, Y., Lehre, K.P., Levy, L.M., Ullensvang, K., Storm-Mathisen, J., 1998. Properties and localization of glutamate transporters. *Prog Brain Res.* 116, 23-43.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65, 1-105.
- Davis, D.P., Patel, P.M., 2003. Ischemic preconditioning in the brain. *Curr Opin Anaesthesiol.* 16, 447-52.
- Davis, K.E., Straff, D.J., Weinstein, E.A., Bannerman, P.G., Correale, D.M., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 1998. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci.* 18, 2475-85.
- Deitmer, J.W., 2001. Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol.* 129, 71-81.
- Di Iorio, P., Ballerini, P., Traversa, U., Nicoletti, F., D'Alimonte, I., Kleywegt, S., Werstiuk, E.S., Rathbone, M.P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., 2004. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia.* 46, 356-68.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22, 391-7.
- Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.
- Dong, W.Q., Schurr, A., Reid, K.H., Shields, C.B., West, C.A., 1988. The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia. *Stroke.* 19, 498-502.
- Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A., Swanson, R.A., 1999. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci.* 19, 10193-200.
- Dugan, L.L., Choi, D.W., 1994. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol.* 35 Suppl, S17-21.
- Edmonds, B., Gibb, A.J., Colquhoun, D., 1995. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents. *Annu Rev Physiol.* 57, 495-519.

- Eggermont, J., Trouet, D., Carton, I., Nilius, B., 2001. Cellular function and control of volume-regulated anion channels. *Cell Biochem Biophys.* 35, 263-74.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25, 1439-51.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375, 599-603.
- Folbergrova, J., Druga, R., Otahal, J., Haugvicova, R., Mares, P., Kubova, H., 2005. Seizures induced in immature rats by homocysteic acid and the associated brain damage are prevented by group II metabotropic glutamate receptor agonist (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate. *Exp Neurol.* 192, 420-36.
- Frizzo, M.E., Lara, D.R., Dahm, K.C., Prokopiuk, A.S., Swanson, R.A., Souza, D.O., 2001. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport.* 12, 879-81.
- Frizzo, M.E., Lara, D.R., Prokopiuk Ade, S., Vargas, C.R., Salbego, C.G., Wajner, M., Souza, D.O., 2002. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol.* 22, 353-63.
- Frizzo, M.E., Antunes Soares, F.A., Dall'Onder, L.P., Lara, D.R., Swanson, R.A., Souza, D.O., 2003. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Res.* 972, 84-9.
- Frizzo, M.E., Schwalm, F.D., Frizzo, J.K., Soares, F.A., Souza, D.O., 2005. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. *Cell Mol Neurobiol.* 25, 913-21.
- Fujimoto, S., Katsuki, H., Kume, T., Kaneko, S., Akaike, A., 2004. Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neurosci Res.* 50, 179-87.
- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Murakami, K., Kawase, M., Chan, P.H., 1998. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18, 1239-47.
- Fukamachi, S., Furuta, A., Ikeda, T., Ikenoue, T., Kaneoka, T., Rothstein, J.D., Iwaki, T., 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res.* 132, 131-9.

- Furuta, A., Rothstein, J.D., Martin, L.J., 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci.* 17, 8363-75.
- Gegelashvili, G., Schousboe, A., 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull.* 45, 233-8.
- Gill, M.B., Perez-Polo, J.R., 2008. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochem Res.* 33, 2379-89.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., Goncalves, C.A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport.* 13, 1533-5.
- Gottfried, C., Tramontina, F., Goncalves, D., Goncalves, C.A., Moriguchi, E., Dias, R.D., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev.* 123, 1333-40.
- Gudermann, T., Schoneberg, T., Schultz, G., 1997. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci.* 20, 399-427.
- Holman, G.D., Cushman, S.W., 1994. Subcellular localization and trafficking of the GLUT4 glucose transporter isoform in insulin-responsive cells. *Bioessays.* 16, 753-9.
- Horn, A.P., Gerhardt, D., Geyer, A.B., Valentim, 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, 355-61.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., Rauvala, H., 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 275, 40096-105.
- Iadecola, C., 1997. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20, 132-9.

- Ikonomidou, C., Price, M.T., Mosinger, J.L., Friedrich, G., Labruyere, J., Salles, K.S., Olney, J.W., 1989. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J Neurosci.* 9, 1693-700.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68, 285-316.
- Johnson, J.W., Ascher, P., 1992. Equilibrium and kinetic study of glycine action on the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured mouse brain neurons. *J Physiol.* 455, 339-65.
- Johnston, M.V., Nakajima, W., Hagberg, H., 2002. Mechanisms of hypoxic neurodegeneration in the developing brain. *Neuroscientist.* 8, 212-20.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360, 467-71.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447, 469-79.
- Kogel, D., Peters, M., Konig, H.G., Hashemi, S.M., Bui, N.T., Arolt, V., Rothermundt, M., Prehn, J.H., 2004. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience.* 127, 913-20.
- Kohara, A., Takahashi, M., Yatsugi, S., Tamura, S., Shitaka, Y., Hayashibe, S., Kawabata, S., Okada, M., 2008. Neuroprotective effects of the selective type 1 metabotropic glutamate receptor antagonist YM-202074 in rat stroke models. *Brain Res.* 1191, 168-79.
- Kristian, T., Siesjo, B.K., 1998. Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 29, 705-18.
- Lara, D.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E., Burgos, J.S., Ramirez, G., Souza, D.O., 2001. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.* 912, 176-80.
- Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci.* 18, 8751-7.
- Levine, S., 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 36, 1-17.

- Levy, L.M., Lehre, K.P., Walaas, S.I., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 7, 2036-41.
- Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci.* 18, 9620-8.
- Ley, J.J., Belayev, L., Saul, I., Becker, D.A., Ginsberg, M.D., 2007. Neuroprotective effect of STAZN, a novel azulenyl nitron antioxidant, in focal cerebral ischemia in rats: dose-response and therapeutic window. *Brain Res.* 1180, 101-10.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-568.
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* 330, 613-22.
- Lortet, S., Samuel, D., Had-Aissouni, L., Masméjean, F., Kerkerian-Le Goff, L., Pisano, P., 1999. Effects of PKA and PKC modulators on high affinity glutamate uptake in primary neuronal cell cultures from rat cerebral cortex. *Neuropharmacology.* 38, 395-402.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2001. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol.* 58, 365-70.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis.* 15, 461-73.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2, 679-89.
- Massieu, L., Tapia, R., 1997. Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem.* 69, 1151-60.
- McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev.* 15, 41-70.
- McLean, C., Ferriero, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol.* 28, 425-32.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 130, 1007S-15S.

- Mergenthaler, P., Dirnagl, U., Meisel, A., 2004. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* 19, 151-67.
- Moldrich, R.X., Talebi, A., Beart, P.M., Chapman, A.G., Meldrum, B.S., 2001. The mGlu(2/3) agonist 2R,4R-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate, is anti- and proconvulsant in DBA/2 mice. *Neurosci Lett.* 299, 125-9.
- Moretto, M.B., Arteni, N.S., Lavinsky, D., Netto, C.A., Rocha, J.B., Souza, D.O., Wofchuk, S., 2005. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp Neurol.* 195, 400-6.
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 3, 748-55.
- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A., 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol.* 40, 163-221.
- Netto, C.A., Hodges, H., Sinden, J.D., Le Peillet, E., Kershaw, T., Sowinski, P., Meldrum, B.S., Gray, J.A., 1993. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience.* 54, 69-92.
- Nicholls, D., Attwell, D., 1990. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 462-8.
- Nicoletti, F., Bruno, V., Catania, M.V., Battaglia, G., Copani, A., Barbagallo, G., Cena, V., Sanchez-Prieto, J., Spano, P.F., Pizzi, M., 1999. Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology.* 38, 1477-84.
- Noraberg, J., Poulsen, F.R., Blaabjerg, M., Kristensen, B.W., Bonde, C., Montero, M., Meyer, M., Gramsbergen, J.B., Zimmer, J., 2005. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 4, 435-52.
- O'Callaghan, J.P., Sriram, K., 2005. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 4, 433-42.
- O'Shea, R.D., 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29, 1018-23.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54, 581-618.

- Pasti, L., Zonta, M., Pozzan, T., Vicini, S., Carmignoto, G., 2001. Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. *J Neurosci.* 21, 477-84.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83, 346-56.
- Pin, J.P., Duvoisin, R., 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* 34, 1-26.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., Kanner, B.I., 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 360, 464-7.
- Porciuncula, L.O., Vinade, L., Wofchuk, S., Souza, D.O., 2002. Guanine based purines inhibit [(3)H]glutamate and [(3)H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Res.* 928, 106-12.
- Price, D.L., 1999. New order from neurological disorders. *Nature.* 399, A3-5.
- Rathbone, M.P., Middlemiss, P.J., Gysbers, J.W., Andrew, C., Herman, M.A., Reed, J.K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., 1999. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 59, 663-90.
- Rice, J.E., 3rd, Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 9, 131-41.
- Rodriguez-Yanez, M., Castillo, J., 2008. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol.* 21, 353-7.
- Rossi, D.J., Oshima, T., Attwell, D., 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 403, 316-21.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60, 614-32.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron.* 13, 713-25.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W., 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 38, 73-84.

- Saute, J.A., da Silveira, L.E., Soares, F.A., Martini, L.H., Souza, D.O., Ganzella, M., 2006. Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Neurobiol Learn Mem.* 85, 206-12.
- Schlag, B.D., Vondrasek, J.R., Munir, M., Kalandadze, A., Zeleniaia, O.A., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 1998. Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol.* 53, 355-69.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., de Faria Maraschin, J., da Silveira Perla, A., Onofre Souza, D., 2000. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864, 40-3.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., Souza, D.O., 2007. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther.* 116, 401-16.
- Schoepp, D.D., Johnson, B.G., Salhoff, C.R., Wright, R.A., Goldsworthy, J.S., Baker, S.R., 1995. Second-messenger responses in brain slices to elucidate novel glutamate receptors. *J Neurosci Methods.* 59, 105-10.
- Schoepp, D.D., Jane, D.E., Monn, J.A., 1999. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 38, 1431-76.
- Schoepp, D.D., 2001. Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 12-20.
- Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2005. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res.* 8, 221-5.
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F., 2001. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* 122, 1-29.
- Sheldon, A.L., Robinson, M.B., 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int.* 51, 333-55.
- Siesjo, B.K., Ljunggren, B., 1973. Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Arch Neurol.* 29, 400-7.
- Sizonenko, S.V., Camm, E.J., Dayer, A., Kiss, J.Z., 2008. Glial responses to neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci.* 26, 37-45.
- Sonnwald, U., Westergaard, N., Schousboe, A., 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia.* 21, 56-63.

- Souza, D.O., Ramirez, G., 1991. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J Mol Neurosci.* 3, 39-45.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., Muller, D., 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 37, 173-82.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 10955-9.
- Strasser, U., Fischer, G., 1995. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods.* 57, 177-86.
- Sullivan, R., Rauen, T., Fischer, F., Wiessner, M., Grever, C., Bicho, A., Pow, D.V., 2004. Cloning, transport properties, and differential localization of two splice variants of GLT-1 in the rat CNS: implications for CNS glutamate homeostasis. *Glia.* 45, 155-69.
- Swanson, R.A., Liu, J., Miller, J.W., Rothstein, J.D., Farrell, K., Stein, B.A., Longuemare, M.C., 1997. Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci.* 17, 932-40.
- Swanson, R.A., Ying, W., Kauppinen, T.M., 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* 4, 193-205.
- Tabb, J.S., Kish, P.E., Van Dyke, R., Ueda, T., 1992. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem.* 267, 15412-8.
- Takamatsu, H., Tsukada, H., Kakiuchi, T., Nishiyama, S., Noda, A., Umemura, K., 2000. Detection of reperfusion injury using PET in a monkey model of cerebral ischemia. *J Nucl Med.* 41, 1409-16.
- Taoufik, E., Probert, L., 2008. Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des.* 14, 3565-73.
- Tasca, C.I., Wofchuk, S.T., Souza, D.O., Ramirez, G., Rodnight, R., 1995. Guanine nucleotides inhibit the stimulation of GFAP phosphorylation by glutamate. *Neuroreport.* 6, 249-52.

- Tasca, C.I., Souza, D.O., 2000. Interaction of adenosine and guanine derivatives in the rat hippocampus: effects on cyclic AMP levels and on the binding of adenosine analogues and GMP. *Neurochem Res.* 25, 181-8.
- Thomazi, A.P., Godinho, G.F., Rodrigues, J.M., Schwalm, F.D., Frizzo, M.E., Moriguchi, E., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev.* 125, 475-81.
- Thomazi, A.P., Boff, B., Pires, T.D., Godinho, G., Battu, C.E., Gottfried, C., Souza, D.O., Salbego, C., Wofchuk, S.T., 2008. Profile of glutamate uptake and cellular viability in hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation: developmental aspects and protection by guanosine. *Brain Res.* 1188, 233-40.
- Torp, R., Lekieffre, D., Levy, L.M., Haug, F.M., Danbolt, N.C., Meldrum, B.S., Ottersen, O.P., 1995. Reduced postischemic expression of a glial glutamate transporter, GLT1, in the rat hippocampus. *Exp Brain Res.* 103, 51-8.
- Towfighi, J., Mauger, D., Vannucci, R.C., Vannucci, S.J., 1997. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res.* 100, 149-60.
- Tramontina, F., Karl, J., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Portela, L.V., Goncalves, C.A., 2000. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Brain Res Protoc.* 6, 86-90.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Goncalves, D., Tramontina, A.C., Souza, D.F., Frizzo, J.K., Nardin, P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Goncalves, C.A., 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 31, 815-20.
- Traversa, U., Bombi, G., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Werstiuk, E.S., Rathbone, M.P., 2002. Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br J Pharmacol.* 135, 969-76.
- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H., Jr., Hediger, M.A., 1999. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci.* 2, 848.
- Uemura, Y., Miller, J.M., Matson, W.R., Beal, M.F., 1991. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke.* 22, 1548-53.

- Ullensvang, K., Lehre, K.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1997. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur J Neurosci.* 9, 1646-55.
- Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 21, 97-108.
- Vannucci, R.C., Vannucci, S.J., 1997. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci.* 835, 234-49.
- Vannucci, S.J., Hagberg, H., 2004. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol.* 207, 3149-54.
- Vernon, A.C., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T., Croucher, M.J., 2007. Selective activation of group III metabotropic glutamate receptors by L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid protects the nigrostriatal system against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 320, 397-409.
- Vinade, E.R., Schmidt, A.P., Frizzo, M.E., Portela, L.V., Soares, F.A., Schwalm, F.D., Elisabetsky, E., Izquierdo, I., Souza, D.O., 2005. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. *J Neurosci Res.* 79, 248-53.
- Walz, W., 2000. Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int.* 36, 291-300.
- Warr, O., Takahashi, M., Attwell, D., 1999. Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *J Physiol.* 514 (Pt 3), 783-93.
- 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., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 179, 1-33.
- Yao, H.H., Ding, J.H., Zhou, F., Wang, F., Hu, L.F., Sun, T., Hu, G., 2005. Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes. *J Neurochem.* 92, 948-61.
- Zemke, D., Smith, J.L., Reeves, M.J., Majid, A., 2004. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology.* 25, 895-904.

- Zhang, M., Li, W.B., Geng, J.X., Li, Q.J., Sun, X.C., Xian, X.H., Qi, J., Li, S.Q., 2007. The upregulation of glial glutamate transporter-1 participates in the induction of brain ischemic tolerance in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 1352-68.
- Zhou, F., Yao, H.H., Wu, J.Y., Yang, Y.J., Ding, J.H., Zhang, J., Hu, G., 2006. Activation of Group II/III metabotropic glutamate receptors attenuates LPS-induced astroglial neurotoxicity via promoting glutamate uptake. *J Neurosci Res.* 84, 268-77.
- Zou, J.Y., Crews, F.T., 2005. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res.* 1034, 11-24.
- Zwienenberg, M., Gong, Q.Z., Berman, R.F., Muizelaar, J.P., Lyeth, B.G., 2001. The effect of groups II and III metabotropic glutamate receptor activation on neuronal injury in a rodent model of traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 48, 1119-26; discussion 1126-7.