SUELY KUNIMI KUBO ARIGA

Modulação térmica da lesão isquêmica:
estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Fisiopatologia Experimental da
Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Dr. Renato Corrêa Baena

São Paulo

2005

Ao meu marido, Marcelo

e meu filho, Rafael,

Dedico este trabalho pelos muitos
momentos de especial
compreensão e de carinho.

Amo vocês!

Aos meus pais, Kazuzo e Haru (*in memoriam*)
minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Massashi e Kyoko,
à minha cunhada Namiko,
às minhas sobrinhas Andréia e Celene
e à minha sogra Tamae
obrigado por estarem sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco pela oportunidade de desenvolver este trabalho dentro do Laboratório de Emergências Clínicas da FMUSP

Ao Prof. Dr. Renato Corrêa Baena pelo apoio e orientação deste trabalho.

Ao Laboratório de Emergências Clínicas – LIM 51 da Faculdade de Medicina - USP pelo suporte financeiro.

Ao LIM 56 em especial à Camila Cacere pela constante colaboração nas análises de citometria de fluxo.

Ao laboratório de Imunologia Humoral – LIM 17 por ceder uma alíquota de células da linhagem de Neuro 2a para o LIM 51.

Ao Laboratório de Metabolismo Ósseo – LIM 17 e ao Laboratório de Osteodistrofia Renal e Doenças Ósseas Metabólicas – LIM 16 por permitirem que as células de manutenção permanecessem em suas estufas durante os experimentos.

A Dra. Walcy Rosolia Teodoro pela colaboração, disposição em sempre ajudar e amizade.

Ao Dr. Isac de Castro pelas orientações nas análises estatísticas e amizade de longa data.

Aos amigos Fátima, Hermes, Denise, Kelli e Érica pelos momentos de desabafos, alegrias e amizade.

A todos os colegas do laboratório – LIM 51 e as secretárias da Clínica Médica pela amizade e apoio na realização deste trabalho.

As secretárias do Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Experimental pela paciência e por estarem sempre prestativos.

E todos aqueles que em algum momento, me ofereceram alguma ajuda, palavra de atenção ou ensinamento ou colaboração direta ou indiretamente para a confecção deste estudo e não foram citados, muito obrigado.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
Fisiopatologia da isquemia.....	6
Figura 2 - Apoptose versus necrose (fonte: catálogo BioAgency).....	7
Figura 3 – Apoptose e Isquemia	8
Apoptose e Isquemia	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Linhagem celular	13
3.2 Cultura de células.....	13
3.3. Protocolos experimentais	14
3.3.1. PROTOCOLO 1 - Desenvolvimento do Modelo de Isquemia in vitro. Composição dos fatores de privação associados a isquemia (glicose, soro fetal e oxigênio).....	14
3.3.2. PROTOCOLO 2 - Desenvolvimento do Modelo de Isquemia in vitro. Privação conjunta dos fatores associados: glicose, soro fetal e oxigênio. Avaliação dos processos de morte celular na isquemia.....	16
3.3.3. PROTOCOLO 3 - Modulação térmica da lesão isquêmica	18
3.4. Métodos de avaliação	20
3.4.1. Avaliação da viabilidade celular (método de exclusão com Azul de Tripan).....	20
3.4.2. Avaliação morfológica das células (coloração de hematoxilina-eosina)	21

3.4.3. Quantificação dos processos de morte celular na isquemia (método de Anexina V / Iodeto de Propídeo com análise em citometria de fluxo).	22
3.4.4. Avaliação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas (técnica de DNA ladder).....	24
3.4.5. Avaliação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas (marcação de TUNEL)	25
3.5. Métodos estatísticos.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Desenvolvimento do modelo de isquemia in vitro, composição dos fatores de privação associados a isquemia	29
4.1.1 Avaliação da viabilidade celular	29
4.1.2. Avaliação morfológica das células	30
4.2. Desenvolvimento do modelo de isquemia in vitro, avaliação dos processos de morte celular envolvidos na isquemia	32
4.2.1. Quantificação de morte celular.....	32
4.3. Modulação da lesão isquêmica	34
4.3.1. Avaliação morfológica das células	34
4.3.2. Quantificação da morte celular.....	35
4.3.3. Avaliação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas	40
4.3.4. Confirmação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Lista de abreviaturas

ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	solução de tripsina (0,2%) e EDTA (0,02%)
Bax	BCI family
Bcl	B cell lymphoma
CA1-4	Hippocampal area (Ammon's Horn)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	fluorescein isothiocyanate
HCl	ácido clorídrico
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
IP	iodeto de propídeo
ME	meio enriquecido
NF- κ B	nuclear factor - κ B
PBS	Solução salina em tampão fosfato
SFB	soro fetal bovino
TBE	tampão Tris Borato-EDTA
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TUNEL	terminal nucleotidyl transferase mediated dUTP end labelling

RESUMO

Ariga, S.K.K. Modulação térmica da lesão isquêmica: estudo *in vitro*. São Paulo, 2005. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Episódios transitórios de parada cardíaca constituem importante causa de morbidade neurológica na população mundial. A isquemia cerebral ou, mais especificamente, a privação de glicose, oxigênio e fatores de crescimento causam desaparecimento de neurônios em áreas vulneráveis. No presente estudo desenvolvemos um modelo *in vitro* para investigar a participação de mecanismos de morte celular, apoptose e necrose, neste fenômeno. Células da linhagem de neuroblastoma (Neuro 2a) foram cultivadas em meio de cultura padrão com soro fetal bovino em estufa humidificada (5% CO₂ : 95% ar) à 37°C. O insulto isquêmico foi reproduzido pela reposição de meio de cultura desprovido de glicose e fatores de crescimento em ambiente hipóxico, produzido por um sistema de anaerobiose.

Amostras de células submetidas à isquemia por 12, 18 ou 24 horas foram coradas com Azul de Tripán ou marcadas com iodeto de propídeo (IP) e anexina para análise de viabilidade celular. Como esperado, o comprometimento celular foi progressivo seguindo o tempo de privação. Nos grupos submetidos a 24 horas de isquemia, cerca de 20% das células apresentaram alterações de permeabilidade características de processos necróticos e coraram com o Azul de Tripán. Já a citometria de fluxo revelou um comprometimento celular de mais de 46% da amostra, devido a somatória das alterações de permeabilidade marcadas pelo IP e dos processos apoptóticos marcados pela anexina. A avaliação morfológica com hematoxilina-eosina (HE) revelou a formação de corpos apoptóticos nos grupos submetidos à isquemia prolongada e, portanto, confirmou os achados da citometria.

A seguir, amostras de células submetidas à 24 horas de isquemia foram expostas à variação da temperatura de incubação. Por um lado, as células

expostas à hipotermia (34°C) apresentam menor comprometimento (14%), demonstrado pela diminuição da marcação tanto de apoptose quanto de necrose. Por outro lado, as células expostas à hipertermia (38,5°C) apresentaram comprometimento maior (93%), evidenciado pela elevação acentuada da marcação de apoptose. A modulação térmica dos processos de morte celular também foi confirmada pela avaliação morfológica com HE e pela análise de fragmentação do DNA das células lesadas (DNA ladder e TUNEL). Por fim, a análise conjugada das marcações com anexina e IP demonstrou a supervivência de processos necróticos em células em processo apoptótico, revelando uma nova dinâmica no fenômeno de desaparecimento neuronal pós-isquêmico.

Em suma, os resultados do presente estudo esclarecem aspectos relevantes dos processos de morte celular na lesão isquêmica, bem como, evidenciam o efeito modulador da temperatura no desenvolvimento da apoptose e na instalação da necrose secundária que, por sua vez, sugerem caminhos para a conquista de estratégias neuroprotetoras.

SUMMARY

Ariga, S.K.K. Temperature modulation of the ischemic neuronal loss in vitro. São Paulo, 2005. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Transient cardiac arrests are an important cause of neurological morbidity all over the world. These events are associated with ischemia, which mean deprivation of glucose, oxygen and growth factors and they were found to be responsible for an important neuronal loss in vulnerable brain areas.

At the present study we developed an *in vitro* model to investigate the participation of cell death mechanisms, apoptosis and necrosis, in the ischemic lesion. A neuroblastoma cell line, Neuro 2a, was cultivated in cell standard medium with fetal bovine serum in incubator at 37°C. The ischemic insult was reproduced with deprivation of glucose and growth factors in a hypoxic environment produced by an anaerobiosis system.

Cell samples submitted to ischemia during 12, 18 or 24 hours were stained with Trypan Blue or labeled with Propidium Iodate (PI) and Annexin for viability analysis. As expected, cell damage increased as the length of ischemia evolved. In groups submitted to long lasting ischemia (24 hours), around 20% of the cell population presented permeability changes, which are characteristic of necrosis, and stained with Trypan Blue. On the other hand, flow cytometry analysis showed 46% of damage, representing the permeability changes detected by PI as well as an apoptotic component detected by Annexin. Involvement of this apoptotic process was confirmed by morphological analyses in samples stained with hematoxilin-eosin (HE).

Cell samples submitted to long lasting ischemia (24 hours) were also exposed to different incubation temperatures. In one side, cells exposed to hypothermia (34 °C) presented less cell damage (14%) due to a decrease of both apoptotic and necrotic component. On the other hand, cells exposed to hyperthermia (38,5 °C) presented a major cell damage (93%) due to a huge

increase of the apoptotic component. Once more, the morphologic analysis in samples stained with HE as well as the DNA fragmentation assays (DNA ladder and TUNEL) confirm the thermal modulation of cell death processes. Finally, the combined labeling analysis of Annexin and PI disclosed a secondary necrotic component superseding a primary apoptotic process, suggesting a new dynamic for the ischemic neuronal loss.

Therefore, this study clarified some aspects of cell death mechanisms triggered by ischemia and brought new evidences for a thermal modulation of the apoptotic as well as the superseding necrotic component which may lead to new strategies to neuroprotection.

1. INTRODUÇÃO

1 Introdução

Anualmente, milhões de pessoas em todo o mundo sofrem episódios de parada cardíaca. Entre outras consequências, a diminuição abrupta da circulação sanguínea causa a redução da perfusão cerebral ou isquemia global do cérebro (Padosch et al., 2001).

Nos últimos anos, apesar de importantes aquisições em infraestrutura de resgate e de significantes avanços no suporte terapêutico, o número de vítimas que evoluem para a morte cerebral ou para déficit neurológico permanente não para de crescer (Mattson et al., 2000).

Na verdade, estudos demonstram que a minoria dos sobreviventes, cerca de 3-10%, conseguem retornar às suas atividades normais e o grande número de incapacitados constitui custo elevado para os sistemas de saúde e de previdência social (Hsu, 2000; Jain, 2000; White et al., 2000).

Na população brasileira as doenças circulatórias foram as principais causas de morte e entre essas, se destacam as doenças cerebrovasculares. Apesar disso, existe uma tendência decrescente do risco de morte por esta causa na população. (Mansur et al., 2001)

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas para reduzir a morbidade neurológica e o sofrimento pessoal e da sociedade passa pelo entendimento dos mecanismos envolvidos na perda neuronal (White et al., 2000). Esta perda é dependente da duração da isquemia e é caracterizada pelo desaparecimento seletivo de neurônios em áreas sensíveis do encéfalo (Hsu, 2000; Neumar, 2000; Leker; Shohami, 2002).

Vários autores como: Barinaga, 1996; Barinaga, 1998; Kumar K, 1998; Mattson et al., 2000; Neumar, 2000; Leker; Shohami, 2002 citam a seguinte ordem decrescente para a sensibilidade: neurônios piramidais da região CA1-4 do hipocampo, neurônios do corpo estriado, neurônios de purkinje do cerebelo, neurônios das camadas 4-6 do córtex, e outros.

A isquemia resulta na redução do suprimento de oxigênio, glicose e fatores nutritivos provocando alterações no metabolismo celular: na síntese de proteínas, na manutenção da homeostase iônica, na morfologia mitocondrial e na produção energética. (fisiopatologia na Figura 1) (Prough; Rogers, 1989; Kumar et al., 1994; Vaagenes et al., 1996).

Observações clínicas pós-parada cardíaca (Dikranian et al., 2001) , ensaios de isquemia global do cérebro (Ginsberg; Busto, 1989; Choi, 1996) e outros modelos de privação de oxigênio, glicose e fatores tróficos responsabilizaram um conjunto de alterações hemodinâmicas, bioquímicas e moleculares na ativação de processos de morte celular para explicar o desaparecimento neuronal (Milde, 1989; Hara et al., 1993; Kogure; Kogure, 1997).

A morte neuronal pode ser motivada por mecanismos passivos ou ativos, necrose ou apoptose , respectivamente (Buja et al., 1993)

A necrose envolve um processo de desorganização celular caracterizado por alterações da permeabilidade, edema e morte celular, geralmente como consequência de condições patológicas, tais como, infecção, inflamação e traumatismos (Gerschenson; Rotello, 1992; Kumar et al., 1994).

A apoptose é um termo sugerido por Kerr et al., 1972 que significa a perda das folhas das árvores no outono sugerindo o mecanismo fisiológico de morte celular programada. Este mecanismo de morte celular é essencial no desenvolvimento embrionário, no sistema imunológico e manutenção da homeostase do organismo multicelular (Ashkenazi; Dixit, 1998; Geske; Gerschenson, 2001).

Condições fisiopatológicas podem ser decorrentes da desregulação da apoptose como doenças neurodegenerativas, auto-imunes e câncer (Kumar et al., 1994; Ferraro et al., 2003; Moskowitz; Lo, 2003)

As diferenças morfológicas, bioquímicas e fisiológicas entre estes processos de morte celular estão descritas na Figura 2.

Estudos experimentais com modelos de isquemia global do cérebro em pequenos roedores também sugeriram a participação de diferentes processos de morte celular (Choi, 1996; Honkaniemi et al., 1996; Hara et al., 1999; Graham; Chen, 2001; Niwa et al., 2001). O entendimento dos mecanismos responsáveis por estas degenerações ainda está incerto e incompleto, mas alguns autores sugerem a participação de processos apoptóticos para explicar o fenômeno tardio (Gerschenson; Rotello, 1992; Araya et al., 1998; Neumar, 2000; Wei et al., 2003).

A descoberta do fenômeno de morte celular tardia e a possível participação de um mecanismo apoptótico revelam uma janela de tempo para possíveis abordagens terapêuticas visando preservar ou proteger os neurônios em processo degenerativo (Ginsberg; Pulsinelli, 1994; Zivin, 1998; Pazos et al., 1999).

Desta forma, esta janela de tempo permite avaliar a proposição de novas terapias que possam ser direcionadas à cascata de eventos estereotipados da apoptose e avaliar o efeito de várias abordagens neuroprotetoras (Akins et al., 1996; Dichter; Locke, 2003).

Entre as abordagens neuroprotetoras, a hipotermia moderada apresenta resultados consistentes e relevantes tanto em ensaios experimentais de isquemia cerebral (Macleod et al, 2003; (Colbourne; Corbett, 1994), quanto em pacientes pós-ressuscitação cardíaca (Eisenburger et al., 2001; Macleod et al., 2003; Sterz et al., 2003)

Embora existam algumas evidências acumuladas da participação de mecanismos apoptóticos (Figura 3 - isquemia e os mecanismos moleculares da apoptose) no desaparecimento celular em modelos de isquemia cerebral, a

importância dessas vias para a degeneração neuronal e para o entendimento de abordagens neuroprotetoras consagradas como a hipotermia ainda estão incertas (Ferrand-Drake; Wieloch, 1999; Pazos et al., 1999; McManus et al., 2004; Zhao et al., 2004). Em parte esta situação de incerteza é determinada pela insuficiência de métodos para a identificação, dimensionamento e quantificação dos eventos degenerativos *in vivo*. A complexidade da fisiopatologia da lesão isquêmica somada aos inúmeros fatores concorrentes do organismo vivo impedem o controle adequado da situação experimental e dificultam o desenho e a avaliação das abordagens terapêuticas.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos de estudo *in vitro* utilizando culturas celulares podem facilitar a padronização de parâmetros de análise de morte celular e estudos de neuroproteção.

Fisiopatologia da isquemia

Mecanismos principais:

- Privação de oxigênio.
 - { diminuição da fosforilação oxidativa,
 - redução da produção de ATP,
 - ativação da via glicolítica,
 - { condensação de cromatina,
 - redução da síntese proteica
 - enfraquecimento da membrana celular,
 - { perda do controle da permeabilidade da membrana celular
- Privação de glicose.
 - { redução da síntese de lipídeos
 - { redução da reposição dos componentes da membrana celular
 - enfraquecimento da membrana celular
- Reperfusão.
 - { aumento de radicais livres
- Privação de fatores de crescimento.
 - { diminuição dos sinais de transdução de proteínas,
 - { diminuição da sinalização de proteínas responsáveis pela proliferação celular.
- Excitotoxicidade neuronal,
 - { aumento da concentração de aminoácidos excitatórios durante a isquemia,
 - { aumento do influxo de Ca intracelular
 - lesão mitocondrial.

(Kumar et al., 1994; Mattson et al., 2000; White et al., 2000; DeGracia et al., 2002)

Figura 2 - Apoptose versus necrose (fonte: catálogo BioAgency)

(Gerschenson; Rotello, 1992; Sastry; Rao, 2000; Geske; Gerschenson, 2001; Van Cruchten; Van Den Broeck, 2002)

Figura 3 – Apoptose e Isquemia

Apoptose: representação esquemática das principais vias de sinalização apoptótica

Apoptose e Isquemia

- Privação de fatores de crescimento

desequilíbrio da expressão de Bax e Bcl

alteração da membrana mitocondrial

liberação do citocromo C

ativação da caspase-3

perda da sinalização que possibilita a expressão de NF-κB

indução de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) que bloqueiam caspase-3.

- Privação de oxigênio e glicose (falência de energia).
 - { redução do ATP,
 - depolarização da membrana,
 - aumento do Ca intracelular
 - { ativação de caspases
- Ativação de receptores de morte (TNFR e FAS).
 - { ativa sinalização intracelular, via caspases
- Perda da assimetria da cadeia lipídica da membrana celular.
 - { externalização da fosfatidilserina

(Gerschenson; Rotello, 1992; Golstein, 1998; Curi, 1999; Hengartner, 2000; Sastry; Rao, 2000; Geske; Gerschenson, 2001; Love, 2003; Smaili et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2 Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi:

- 1) investigar os processos de morte neuronal associados a isquemia.

E os objetivos específicos foram:

- 1) desenvolver um modelo de isquemia neuronal *in vitro*.
- 2) quantificar a participação da apoptose e/ou necrose.
- 3) explorar os efeitos temperatura na isquemia neuronal *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e Métodos

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº115/02).

3.1. Linhagem celular

Neste estudo foram utilizadas células estabilizadas da linhagem “Neuro 2a”, procedentes do Banco de Células do Rio de Janeiro nºCR098 ATCC/nºCCL131, derivadas de um tumor espontâneo do sistema nervoso, um neuroblastoma de camundongo albino da raça A. Estas células foram isoladas de uma linhagem tumoral obtida nos Laboratórios Jackson e chamada de C1300, possui morfologia neuronal e amebóide, apresentando crescimento contínuo e em monocamada.

3.2 Cultura de células

As células utilizadas para estudo foram mantidas em estufa com atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5% CO₂ a 37 °C. O Meio Enriquecido (ME) de cultura utilizado na manutenção foi o Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM - SIGMA) suplementado com 2mM de L-glutamina, 1 g/l de glicose e 3,7 g/l bicarbonato de sódio, enriquecido com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB - CULTILAB).

As células foram removidas da placa de cultura com solução de tripsina (0.2%) e EDTA (0,02%) (ATV - Adolfo Lutz). A tripsina foi inativada pela adição de DMEM com 10% SFB. As células foram coletadas em tubo para centrífuga de 15 ml e centrifugadas à 1200 rpm por 2 minutos, o sedimento de células foi ressuspenso e contado o número de células em câmara de Neubauer. Em seguida, as células (quantidade específica para cada protocolo) foram semeadas em placas ou garrafas (NUNC) estéreis contendo ME e incubadas em estufa nas condições acima mencionadas.

3.3. Protocolos experimentais

3.3.1. PROTOCOLO 1 - Desenvolvimento do Modelo de Isquemia in vitro. Composição dos fatores de privação associados a isquemia (glicose, soro fetal e oxigênio).

Visando definir o modelo de isquemia in vitro, foi testada a privação de fatores envolvidos na isquemia, como oxigênio, glicose e fatores de crescimento individualmente ou em conjunto e em diferentes intervalos de tempo (12, 18 e 24 horas).

Para avaliação da lesão celular causada pela privação individual ou conjunta de fatores associados a isquemia, foi utilizada a técnica de exclusão com Azul de Tripán para verificar a viabilidade celular dos grupos incubados em poços. A coloração de hematoxilina-eosina foi utilizada para verificar alterações morfológicas das células lesadas dos grupos incubados em lamínulas.

Uma alíquota de células (10^5) foi semeada em cada um dos seis poços de cada placa estéril contendo 1 ml ME. A mesma concentração de células foi semeada em poços contendo lamínulas estéreis e ME. Estas placas foram incubadas em estufa de CO₂ por aproximadamente 18 horas a 37 °C para permitir a adesão das células.

Após o período de adesão, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por duas vezes e o meio de cultura foi trocado conforme o grupo experimental. Foram feitos dois experimentos sendo cada um deles em duplicata.

Cada poço foi denominado de acordo com a composição dos fatores de privação e o tempo de incubação, a seguir:

grupo CTL: DMEM + glicose + SFB + O₂: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas em estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C.

grupo -SFB: DMEM + glicose + O₂: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l mantidas em estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C.

grupo -GLU : DMEM + SFB + O₂: células incubadas com meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas em estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C.

grupo -O₂ : DMEM + glicose + SFB: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas em sistema de anaerobiose à temperatura de 37 °C.

grupo ISQ : DMEM: células incubadas com meio DMEM mantidas em sistema de anaerobiose à temperatura de 37 °C.

Cada um dos grupos acima foi incubado nos intervalos de tempo de 12, 18 e 24 horas.

Esquema representativo dos grupos descritos no protocolo 1.

Para produzir um ambiente hipóxico nos grupos de privação de oxigênio, foi utilizado um sistema de anaerobiose (CampyGen/OXOID) que consiste de uma jarra de 2,5 l com tampa hermética contendo um sachê descartável composto de ácido ascórbico. O ácido ascórbico reage com o oxigênio, sendo rapidamente adsorvido o O₂ livre mantendo apenas 5% de O₂ no interior da jarra. Este sistema não necessita de catalisador (Bolton et al., 1997).

3.3.2. PROTOCOLO 2 - Desenvolvimento do Modelo de Isquemia in vitro. Privação conjunta dos fatores associados: glicose, soro fetal e oxigênio. Avaliação dos processos de morte celular na isquemia.

Visando definir melhor o modelo de isquemia in vitro foram avaliados os processos de morte celular em diferentes intervalos de tempo (12, 18 e 24 horas). Para isto foi utilizado a marcação de Anexina V e Iodeto de Propídeo (IP). As células foram analisadas pela citometria de fluxo.

Uma alíquota de células (5×10^5) foi semeada em garrafa estéril de 25 cm² contendo ME e incubada por aproximadamente 18 horas, até a adesão.

Após o período de adesão, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e o meio de cultura foi trocado conforme o grupo experimental. Foram feitos 3 experimentos, sendo cada um deles, no mínimo em triplicata.

Cada grupo de garrafas foi denominado conforme o tempo de incubação e o teste experimental como descrito:

grupo CTL: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas em estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C.

grupo ISQ: células incubadas com meio DMEM mantidas em sistema de anaerobiose à temperatura de 37 °C.

Cada um dos grupos acima foi incubado nos intervalos de tempo de 12, 18 e 24 horas.

Esquema representativo dos grupos descritos no protocolo 2.

3.3.3. PROTOCOLO 3 - Modulação térmica da lesão isquêmica

Visando verificar a modulação da lesão isquêmica in vitro pela temperatura, foi avaliada a participação do processo apoptótico em diferentes temperaturas.

Para avaliar a participação do processo apoptótico foram utilizadas:

- 1) a coloração de hematoxilina-eosina para identificar as alterações morfológicas dos grupos incubados em lamínulas,
- 2) a técnica de marcação da anexinaV/IP com análise em citometria de fluxo para quantificar os processos de morte celular dos grupos incubados em garrafas,
- 3) a técnica de DNA Ladder observação da fragmentação de DNA dos grupos incubados em garrafas e
- 4) a marcação de TUNEL para observação dos pontos de quebra do DNA dos grupos incubados em lamínulas.

Uma alíquota de células (5×10^5) foi semeada em garrafa estéril de 25 cm² contendo ME e incubada por aproximadamente 18 horas, até a adesão.

Após o período de adesão, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e o meio de cultura foi trocado conforme o grupo experimental. Foram feitos 4 a 5 experimentos, sendo cada um deles, no mínimo em triplicata.

Cada grupo de garrafas foi denominado conforme a temperatura de incubação e o teste experimental como descrito:

grupo CTL HIPO: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas por 24 horas em estufa de CO₂ à temperatura de 34 °C.

grupo ISQ HIPO: células incubadas com meio DMEM mantidas por 24 horas em jarra de anaerobiose à temperatura de 34 °C.

grupo CTL NORMO: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas por 24 horas em estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C.

grupo ISQ NORMO: células incubadas com meio DMEM mantidas por 24 horas em jarra de anaerobiose à temperatura de 37 °C.

grupo CTL HIPER: células incubadas com meio DMEM contendo glicose 1 g/l enriquecido com soro fetal bovino 10% mantidas por 24 horas em estufa de CO₂ à temperatura de 38,5 °C.

grupo ISQ HIPER: células incubadas com meio DMEM mantidas por 24 horas em jarra de anaerobiose à temperatura de 38,5 °C

Uma alíquota de células (10^5) foi semeada em cada um dos seis poços de uma placa estéril contendo uma lamínula de vidro e ME e incubada por aproximadamente 18 horas, até a adesão.

Após o período de aderência, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e o meio de cultura foi trocado conforme o grupo experimental.

Cada lamínula recebeu um grupo conforme a temperatura de incubação e o teste experimental de acordo com a descrição anterior.

Esquema representativo dos grupos descritos no protocolo 3.

3.4. Métodos de avaliação

3.4.1. Avaliação da viabilidade celular (método de exclusão com Azul de Tripan).

A viabilidade celular pode ser quantificada pela relação entre o número de células vivas e o total de células contadas.

A identificação de células vivas ou mortas pode ser obtidas através da coloração com Azul de Tripan, um corante vital não permeável a membrana. Este processo baseia-se no princípio de que células vivas possuem permeabilidade seletiva de membrana portanto não adquirem citoplasma azulado, e que células mortas são permeáveis ao corante que penetra livremente adquirindo citoplasma e núcleo azulados (Curi, 1999).

Ao término dos períodos de incubação, o meio de cultura de cada um dos poços foi coletado em tubo de 15 ml para centrífuga (FALCON) e as células aderidas foram lavadas com PBS, removidas da placa com solução de tripsina. A

tripsina foi inativada pela adição de ME. As células foram adicionadas aos respectivos tubos e centrifugadas à 1200 rpm por 2 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 ml de ME.

De cada uma das suspensões celulares foram transferidos 20 µl para um tubo de 1,5 ml e adicionado 20 µl solução azul de tripan 0,4% (diluição 1:1). Desta suspensão foram transferidos 10 µl para uma câmara de Neubauer e contado o número de células vivas e mortas para obter a porcentagem da viabilidade celular (Curi, 1999).

3.4.2. Avaliação morfológica das células (coloração de hematoxilina-eosina)

A morte celular pode ser detectada pela microscopia ótica através do uso da técnica de coloração com hematoxilina-eosina. Esta técnica consiste de um corante que se liga aos ácidos nucleicos, a hematoxilina, apresentando a condensação e segregação da cromatina das células, associado a outro corante que identifica citoplasmas acidófilos, a eosina, apresentando as alterações do pH citoplasmático. Pode-se assim identificar aspectos morfológicos do processo de morte celular inclusive a formação de corpos ou vesículas apoptóticas que contém partes do citoplasma e do núcleo.

Ao término dos períodos de incubação as lamínulas com células aderidas de todos os grupos experimentais foram lavadas com PBS e fixadas com solução de metanol e acetona (1:1) mantidas a -20 °C por 18 horas. A solução de fixação foi retirada e as lamínulas secas a temperatura ambiente e armazenadas até completar todos os grupos experimentais.

As células aderidas em lamínulas foram fixadas com etanol (absoluto, 95° e 70°), lavadas com água corrente e incubadas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto para coloração de núcleos. Após lavagem com água corrente, as lamínulas

foram submetidas a banho com diferenciador (HCl 1%), banho de água corrente e banho de água amoniacal (Hidróxido de Amônia 1%) antes de nova lavagem com água corrente. Em seguida, as lamínulas foram submetidas à segunda desidratação com álcool 95° e incubadas com uma solução de Eosina + Floxina (composição em ml/L: eosina 1% 111,73; floxina 1% 11,17; álcool 95° 871,51; ácido acético Glacial 5,59) por 35 segundos. A seguir, as lamínulas sofreram novas desidratações com etanol (três vezes com álcool 95° e quatro com absoluto) para finalmente passar por lavagem com xilol (três vezes) e montagem em lâmina com resina sintética para fixação (Entellan® - Merck).

3.4.3. Quantificação dos processos de morte celular na isquemia (método de Anexina V / Iodeto de Propídeo com análise em citometria de fluxo).

O processo apoptótico produz uma perda da assimetria da cadeia lipídica da membrana celular, externalizando um fosfolípide, a fosfatidilserina na superfície celular. Este fosfolípide pode ser identificado pela proteína Anexina V marcada com fluoresceína (FITC), que pode ser detectado pelo citômetro de fluxo indicando as células apoptóticas.

A necrose celular produz uma perda da integridade da membrana citoplasmática, permitindo que um corante vital não permeável a membrana, como o iodeto de propídeo, penetre livremente ligando-se ao DNA, que pode ser detectado pelo citômetro de fluxo indicando as células em necrose.

Desta forma, podemos identificar e quantificar, pela citometria de fluxo, as células em apoptose (anexina positiva), em apoptose apresentando um componente necrótico (anexina e iodeto de propídeo positiva), em necrose (iodeto de propídeo positiva) e as células íntegras ou viáveis (anexina e iodeto de propídeo negativa).

Com a análise da citometria de fluxo das células marcadas com anexina V e/ou iodeto de propídeo foi obtido um gráfico representativo do número de células encontradas em cada marcação. Como pode ser observado cada um dos quadrantes do gráfico representa um estágio celular.

O quadrante D1 apresenta as células com marcação positiva apenas para anexina V representando células na fase inicial de apoptose, o D2 apresenta células com marcação positiva para anexina V e IP representando células em necrose secundária, o D3 apresenta células sem marcação representando células viáveis e D4 apresenta células com marcação positiva para IP representando células em necrose. Assim obtemos a quantificação dos processos de morte celular (Vermes et al., 1995; Cacere, 2003).

Ao término dos períodos de incubação, o meio de cultura de cada garrafa foi coletado em tubo de 15 ml para centrífuga (FALCON) e as células aderidas foram lavadas com PBS, removidas da garrafa com solução de tripsina. A tripsina foi inativada pela adição de ME. As células foram adicionadas aos respectivos

Gráfico representativo da análise de citometria de fluxo da marcação de Anexina V/ IP

tubos e centrifugadas à 1200 rpm por 2 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 ml de ME, mantidos a 4 °C durante um período mínimo de 60 minutos para reestabelecer possíveis alterações da membrana ocasionadas pelo uso da solução de ATV. De cada suspensão celular foi determinada a

concentração em câmara de Neubauer e separado uma alíquota com 1×10^5 células o qual foi ressuspendida em 100 μ l de tampão de ligação (10mM Hepes-NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2). Em seguida, a suspensão foi transferida para um tubo de citometria de 5 ml e adicionados a cada tubo 5 μ l de Annexin V-FITC, pronto para uso (BDPharmingen), um marcador específico para apoptose e 5 μ l de iodeto de propídeo (IP) (ICN) 50 μ g/ml, um marcador de permeabilidade de membrana (Vermes et al., 1995). A nova suspensão celular foi então, gentilmente misturada em agitador e incubada por 20 minutos à 4 °C, no escuro. A seguir, foram adicionados 400 μ l de tampão de ligação a cada tubo para análise de citometria de fluxo e detecção imediata de morte celular. Na análise de citometria foram contados 5.000 eventos (células) em cada tubo (Cacere, 2003).

3.4.4. Avaliação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas (técnica de DNA ladder)

As endonucleases que clivam o DNA durante a apoptose produz fragmentos de DNA com cerca de 180 pb e seus múltiplos. Estes segmentos podem ser observados em uma eletroforese em gel de agarose, apresentando um padrão típico de bandas em escada ("ladder"). Desta forma a eletroforese em gel de agarose do DNA total das células apoptóticas apresenta o padrão de bandas em escada.

Utilizamos a técnica de análise de DNA fragmentado por eletroforese do DNA em gel de agarose, para confirmação dos processos apoptóticos nas células submetidas à isquemia.

Ao término do período de incubação, o meio de cultura de cada garrafa foi coletado em tubo de 15 ml para centrífuga (FALCON), as células aderidas foram lavadas com PBS e removidas da garrafa com solução de tripsina. A tripsina foi inativada pela adição de ME. As células foram adicionadas aos respectivos tubos

e centrifugadas à 1200 rpm por 2 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 ml de ME. De cada suspensão celular foi contada a concentração em câmara de Neubauer e separado uma alíquota com 2×10^6 células ressuspensas em 200 μ l PBS. A seguir, as preparações receberam 200 μ l de tampão de lise (6 M guanidine-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl , 20% Triton X100(v/v), pH 4,4), e foram homogenizadas e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Ao material resultante do homogeneizado foi adicionado 100 μ l de isopropanol com agitação e filtragem e centrifugação para retenção do DNA. As preparações foram centrifugadas: primeiro, com tampão de lavagem (20 mM NaCl e 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 diluídos em álcool etílico) à 8000 rpm por um minuto por duas vezes e, posteriormente, sem tampão à 13000 rpm por 10 segundos, para retirar o excesso de tampão de lavagem. A seguir, os filtros foram transferidos para um tubo de 1,5 ml e, novamente, centrifugados à 8000 rpm com 200 μ l de tampão de eluição (10 mM Tris, pH 8,5) por 1 minuto, segundo instruções do Kit “Apoptotic DNA Ladder”, ROCHE.

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro.

Amostras de 2 μ g de DNA foram analisadas em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x , a 80 V por 50 minutos. Foi utilizado um transluminador e o sistema de fotodocumentação da Polaroid para fotografar o gel.

3.4.5. Avaliação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas (marcação de TUNEL)

A clivagem do DNA genômico durante a apoptose produz fragmentos de DNA que podem ser identificados utilizando a marcação das terminações livres 3'OH com nucleotídeos conjugados com fluoresceína (FITC) em uma reação enzimática. Utiliza-se a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) que cataliza a polimerização destes nucleotídeos com as regiões de quebra do DNA. Os

nucleotídeos incorporados podem ser detectados pelo microscópio de fluorescência apresentando as células apoptóticas ou os corpos apoptóticos.

Utilizamos a técnica de marcação de TUNEL para observação dos pontos de quebra do DNA decorrente da morte celular por apoptose em células submetidas à isquemia.

Ao término do período de incubação as células aderidas em lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com solução de metanol e acetona (1:1) e mantidas -20 °C por 12 horas. A seguir, a solução de fixação foi retirada e as lamínulas permaneceram expostas à temperatura ambiente para secagem.

Num segundo momento, as preparações foram submetidas a novo procedimento de fixação com solução à 4% de paraformaldeído em PBS e incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida as preparações foram lavadas com PBS e incubadas com solução de água oxigenada 3% e metanol (1:1) à temperatura ambiente por 10 minutos, para bloqueio de antígenos inespecíficos. Na seqüência, as preparações foram lavadas com PBS e incubadas com Triton X-100 0,1% em solução tampão de citrato de sódio incubados por 2 minutos sobre o gelo, para permeabilização da membrana celular. A seguir, cada preparação foi lavada com PBS e incubada com solução enzimática de TUNEL (5 µl da enzima que identifica os pontos de quebra e 45 µl do diluente) à 37 °C por 60 minutos, e lavadas com PBS. As lamínulas foram então incubadas em solução de Azul de Evans (0,04%) durante 90 minutos. Finalmente, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas com solução de glicerina em lâmina histológica para observação microscópica da fluorescência, conforme instruções do kit “In Situ Cell Death Detection”, ROCHE.

3.5. Métodos estatísticos

O teste de Kruskal –Wallis com pós-teste de Dunn foi utilizado para a comparação dos resultados encontrados nos diferentes estados celulares, nos diversos tempos estudados e nas diferentes temperaturas.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4 Resultados

4.1. Desenvolvimento do modelo de isquemia in vitro, composição dos fatores de privação associados a isquemia

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular

Células neuro 2a em cultura foram submetidas às condições do protocolo 1 para identificar a combinação de fatores necessária para a redução da viabilidade celular entre 20 e 60%. Utilizamos a coloração com azul de tripan para avaliar a mortalidade celular frente a diferentes regimes de privação dos fatores associados à isquemia: oxigênio, glicose e fatores de crescimento. Estes resultados estão apresentados na Figura 4. Observamos uma redução de 1 - 7% da viabilidade celular em relação ao grupo controle com a privação de cada um dos fatores isoladamente e uma redução mais importante com a privação combinada dos três fatores, 4% em 12, 9% em 18 e 21% em 24 horas de privação. O regime combinado de privação prolongado por 24 horas produz o equivalente a um insulto isquêmico importante, capaz de um grande comprometimento e uma perda definitiva superior a 20% das células em cultura.

Figura 4: Avaliação da viabilidade celular frente a diferentes regimes de privação dos fatores associados à isquemia (oxigênio, glicose e/ou fatores de crescimento) (dados expressos em média $\pm$ epm * $p < 0,05$ comparado com CTL24).

4.1.2. Avaliação morfológica das células

Células de neuro 2a em cultura foram submetidas às condições do protocolo 1 nos grupos isquemia e controle mantidos durante 24 horas.

Utilizamos a coloração de hematoxilina-eosina na cultura de células para confirmação morfológica da participação dos processo de morte, apoptose e necrose, pós isquemia. Resultados apresentados na figura 5.

As observações morfológicas das células sugerem a ocorrência de diferentes processos de morte celular no grupo submetido à isquemia e a presença de células em processo de divisão celular no grupo mantido em condições controle.

Figura 5: Coloração de hematoxilina-eosina das células Neuro 2a submetidas a isquemia ou controle mantidas durante 24 h.

4.2. Desenvolvimento do modelo de isquemia in vitro, avaliação dos processos de morte celular envolvidos na isquemia

4.2.1. Quantificação de morte celular

Células Neuro 2a em cultura foram submetidas às condições do protocolo 2 para aprofundar a análise e dimensionar os processos de morte celular envolvidos. Considerando os processos conhecidos, apoptose e necrose, avaliamos o envolvimento de cada um destes fenômenos no desaparecimento celular observado na figura 4. Utilizamos a citometria de fluxo para análise quantitativa das marcações de apoptose e de necrose. Desta forma, a anexina V marcou a externalização de fosfatidilserina nas células em apoptose e o iodeto de propídeo (IP) marcou a perda da integridade e da permeabilidade seletiva da membrana das células em necrose.

Na figura 6 apresentamos a porcentagem de células marcadas com anexina V ou iodeto de propídeo em relação ao tempo de privação ou isquemia. Observamos um crescimento significativo da participação da morte celular por apoptose ou necrose com o aumento do tempo.

E a porcentagem de células marcadas nos grupos controle não apresentam diferenças sendo que a participação de morte celular por necrose e apoptose não atingem 10%, resultados apresentados na figura 7.

Figura 6: Quantificação da morte celular: apoptose (A) e necrose (B), em células Neuro 2a submetidas a isquemia por 12, 18 ou 24 horas (dados expressos em porcentagem da média $\pm$ epm * $p < 0,05$ comparado com 12 h, ** $p < 0,0001$ comparado com 12 h e *** $p < 0,01$ comparado com 18 h).

Figura 7: Quantificação da morte celular: apoptose (A) e necrose (B), em células Neuro 2a mantidos em condição controle por 12, 18 ou 24 horas (dados expressos em porcentagem da média $\pm$ epm)

Os resultados observados pela análise quantitativa da marcação com anexina e IP expandem nossos achados anteriores com a coloração de Azul de Tripán pois, detectam um comprometimento mais precoce, cerca de 26% em 18 horas e ainda maior da viabilidade celular, cerca de 46% após 24 horas de isquemia.

4.3. Modulação da lesão isquêmica

4.3.1. Avaliação morfológica das células

Células de Neuro 2a em cultura foram submetidas às condições do protocolo 3, utilizamos a temperatura como fator modulador da lesão isquêmica. Submetemos as células isquêmicas às temperaturas de hipotermia (34 °C), normotermia (37 °C) e hipertermia (38,5 °C).

Avaliamos as alterações morfológicas das células isquêmicas e controles submetidas às diferentes temperaturas pela coloração de hematoxilina-eosina. Observamos nos grupos controles maior quantidade de células em processo de divisão celular e sem alteração morfológica, no grupo isquêmico submetido a normotermia observamos células mais eosinofílicas e presença da formação de vesículas apoptóticas, no grupo hipertermia notamos a presença de corpos apoptóticos e no grupo hipotermia não observamos alterações morfológicas (Figura 8).

Figura 8: Coloração de hematoxilina-eosina das células Neuro 2a submetidas a 24 h isquemia e controle mantidas em hipotermia, normotermia e hipertermia.

4.3.2. Quantificação da morte celular

Células de Neuro 2a em cultura foram submetidas às condições do protocolo 3, para simular as condições de isquemia neuronal nos grupos isquemia e controle mantidos durante 24 horas e impostas a diferentes temperaturas, hipotermia (34 °C), normotermia (37 °C) ou hipertermia (38,5 °C).

Na Figura 9 apresentamos porcentagem das contagens de células anexina V positiva, ou seja, em apoptose (A) ou iodeto de propídeo positiva, ou seja, em necrose (B) nos grupos submetidos à isquemia e diferentes condições térmicas. Observamos um crescimento significativo da participação da morte celular por apoptose correlacionado com o aumento da temperatura e uma redução da necrose no grupo submetido a hipotermia.

Figura 9: Quantificação da morte celular: apoptose (A) e necrose (B), das células Neuro 2a submetidas a isquemia e mantidas em diferentes temperaturas (dados expressos em média $\pm$ epm * $p<0,05$).

A citometria de fluxo da marcação de anexina V e IP permite identificar quatro estados celulares: 1) células em apoptose (anexina+ / IP-) com alteração da matrix lipídica da membrana celular; 2) células em apoptose com componente de necrose secundária (anexina+ / IP+) caracterizado pela perda da permeabilidade seletiva da membrana celular; 3) células viáveis (anexina- / IP-) sem nenhuma marcação e 4) células em necrose (anexina- / IP+), apenas com sinais da perda da integridade da membrana celular.

Na figura 10 apresentamos gráficos representativos da citometria de fluxo. Observamos que a população de células dos grupos controle, independente da temperatura imposta, se concentra na região D3, característica das células viáveis. Já nos grupos de isquemia, as populações celulares se distribuem em

maior concentração nas regiões D1 e D2, características de processos

apoptóticos, de acordo com a elevação da temperatura.

	Apoptose inicial (D1)	Necrose 2ária (D2)	Viáveis (D3)	Necrose (D4)
Anexina	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
Iodeto de propídeo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo

Figura 10: Esquema representativo da quantificação dos estados celulares de células Neuro 2a submetidas à isquemia e controle por 24 h e mantidas em hipotermia, normotermia ou hipertermia.

Os resultados da citometria de fluxo das células mantidas em condições controle e em diferentes temperaturas podem ser observadas na figura 11, onde são apresentadas as porcentagens de células em cada estado celular. Não foram observadas diferenças significativas entre as porcentagens dos grupos experimentais.

Figura 11: Quantificação dos estados celulares de células Neuro 2a submetidas a condição controle e mantidas em diferentes temperaturas (dados expressos em porcentagem da média $\pm$ epm).

Da mesma forma os resultados da análise de citometria de fluxo das células submetidas à isquemia e em diferentes temperaturas, podem ser observadas na

figura 12 onde são apresentadas as porcentagens das médias da contagem de células em cada estado celular. Apresentamos os estados celulares analisados pelo citômetro de fluxo. Observamos aumento dos processos de morte celular tanto da apoptose como da necrose com a elevação de temperatura e como consequência notamos a redução progressiva do número de células viáveis. Por

outro lado, a condição de hipotermia reduziu a necrose e a necrose secundária à apoptose, preservando o número de células em cultura.

Figura 12: Quantificação dos estados celulares de células Neuro 2a submetidas a isquemia e mantidas em diferentes temperaturas (dados expressos em média $\pm$ epm * $p < 0,05$ comparado com normo, ** $p < 0,01$ comparado com normo e * $p < 0,001$ comparado com normo).**

4.3.3. Avaliação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas

Para avaliação da modulação térmica da lesão isquêmica utilizamos a técnica de detecção da fragmentação de DNA em gel de agarose. Os resultados revelam a presença do padrão em escada, representativo da degradação do DNA e característico dos processos apoptóticos, apenas nos grupos isquêmicos submetidos a normo e hipertermia. Nestes grupos isquêmicos a concentração dos fragmentos de DNA aumenta de acordo com o aumento da temperatura. Nos demais grupos, controle e isquêmico submetido a hipotermia, não houve fragmentação do DNA e nem a formação do padrão em escada. (Figura 13).

Figura 13: Fragmentação do DNA das células Neuro 2a submetidas a 24 h isquemia e controle e mantidas em hipotermia, normotermia e hipertermia.

4.3.4. Confirmação da participação do processo apoptótico na isquemia submetida a diferentes temperaturas

Para confirmação da modulação térmica da lesão isquêmica utilizamos a técnica de marcação de TUNEL nas células isquêmicas e controles submetidas a diferentes temperaturas. Observamos a presença de marcação nas células mantidas em condições de normo e hipertermia. Nos grupos controle e no grupo isquêmico mantido em hipotermia não observamos marcação celular (Figura 14).

Figura 14: Marcação de TUNEL das células Neuro 2a submetidas a 24 h isquemia e controle e mantidas em hipotermia, normotermia e hipertermia.

5. DISCUSSÃO

5 Discussão

A revisão da literatura sobre isquemia cerebral revelou uma profusão de ensaios e modelos experimentais, compreendendo desde investigações em animais, *in vivo*, (Ginsberg; Busto, 1989; Charriaut-Marlangue et al., 1996; Honkaniemi et al., 1996; Baena et al., 1997; Colbourne et al., 1999; Iwai et al., 2000; Ginsberg, 2003) até estudos em culturas celulares, *in vitro* (Dong et al., 1988; Zieger et al., 1991; Copin et al., 1996; Araya et al., 1998; Velly et al., 2003).

Os modelos de isquemia cerebral *in vivo* utilizam, geralmente, a obstrução da circulação cerebral em pequenos roedores como ratos, camundongos e gerbils para reduzir a irrigação sangüínea e produzir lesão isquêmica. Esta obstrução quando localizada, compromete todos os tipos celulares da região e quando generalizada e transitória, compromete apenas alguns grupos celulares sensíveis em diversas regiões do cérebro.

Contudo, a complexidade característica do organismo e a inevitável manipulação nos modelos *in vivo* acabam por criar interferências que comprometem o controle de variáveis experimentais e dificultam a análise pormenorizada de aspectos relevantes da biologia celular.

Já os modelos de isquemia cerebral *in vitro* utilizam, geralmente, a cultura primária de neurônios de roedores em desenvolvimento, animais recém-nascidos/fetos, (Karliner et al., 2000; Yu et al., 2001) ou a cultura de neurônios imortalizados de linhagem tumoral (Araya et al., 1998; Solovyan et al., 1998; Rossler et al., 2001).

A utilização de cultura primária soluciona alguns dos problemas apresentados pelos modelos *in vivo* pois, reduzem a complexidade da situação

experimental. Contudo, ainda envolvem heterogeneidade e dificuldades nos processos de obtenção e manutenção celular. Já a utilização de linhagem unicelular, como a de neuroblastomas, permite estabilidade, simplicidade e um grande controle sobre as variáveis experimentais.

Quanto ao insulto isquêmico *in vitro*, a literatura apresenta ensaios com privações de: glicose (Goldberg; Choi, 1993; Rytter et al., 2003), oxigênio (Mackert et al., 1996; Bruer et al., 1997; Araya et al., 1998; Xu et al., 2000), fatores de crescimento (Akins et al., 1996; Boix et al., 1998; Solovyan et al., 1998) ou a combinação destes (Monyer et al., 1992; Laake et al., 1999; Wang et al., 2002) por diferentes intervalos de tempo, com ou sem, retorno às condições normais antes da privação.

Estas abordagens experimentais estão fundamentadas no entendimento dos principais mecanismos responsáveis pela fisiopatologia da isquemia. A redução de glicose e oxigênio afeta a fosforilação oxidativa nos tecidos, reduzindo a produção de energia que altera o funcionamento da bomba de sódio e potássio, alterando o equilíbrio iônico, reduzindo a síntese de lipídios e aumentando a glicólise anaeróbica que eleva a produção de ácido láctico, diminui o pH celular e promove alterações celulares como a condensação da cromatina e a diminuição da síntese protéica. Por outro lado, a redução de fatores de crescimento diminui a síntese protéica e promove importantes alterações celulares (Kumar et al., 1994; White et al., 2000).

Considerando a facilidade para obtenção e manutenção celular, o grande controle sobre variáveis experimentais e a possibilidade de aplicação de novas metodologias, resolvemos pelo desenvolvimento de modelo *in vitro* com cultura de neurônios imortalizados de linhagem de neuroblastoma, Neuro 2a (Mackert et al., 1996; Calderon et al., 1999).

De acordo com a literatura, submetemos a cultura de neuroblastomas à privação de fatores associados à isquemia sem a reintrodução dos mesmos para eliminar a interferência de fenômenos conhecidos da isquêmica neuronal: como a

lesão de reperfusão mediada pela formação de radicais livres e a excitotoxicidade mediada pela liberação de neurotransmissores excitatórios.

Nossos estudos com a marcação de Azul de Tripan revelaram uma mortalidade celular superior a 20% com a privação combinada de fatores (oxigênio, glicose e fatores de crescimento) por 24 horas. Como esperado, a privação de cada um dos fatores isoladamente ou a privação combinada por pequenos intervalos de tempo produziram redução menor da viabilidade celular.

Provavelmente, a perda celular detectada não representa todo o potencial de desaparecimento celular programado. A marcação com o Azul de Tripan evidencia apenas as células em necrose, com transtorno irreversível da permeabilidade celular, mas não identifica a atividade de mecanismos genético-moleculares de morte celular em curso. Estudos anteriores dos nossos laboratórios corroboram esta avaliação ao demonstrar a participação de processos apoptóticos na lesão isquêmica do cérebro de gerbils (Baena et al, 2001). Portanto, avançamos com avaliações complementares para confirmar a participação de processos apoptóticos nos ensaios in vitro e revalidar o percentual de comprometimento celular pós-isquêmico.

Inicialmente, a análise com microscopia comum de amostras celulares coradas com hematoxilina-eosina revelou grande quantidade de corpos apoptóticos nos grupos submetidos à isquemia quando comparados ao grupo controle.

Posteriormente, a citometria de fluxo de amostras celulares marcadas com iodeto de propídeo para identificar a necrose e com anexina V para identificar a apoptose, confirmou a participação de processos necróticos, revelou a participação de processos apoptóticos a partir de 12 horas de privação e demonstrou um comprometimento celular crescente, proporcional à duração da isquemia. Nos grupos submetidos a 24 horas de privação, a somatória dos dois processos de morte, necrose e apoptose, comprometeu cerca de 46% da população celular confirmando a estimativa parcial da primeira avaliação com o Azul de Tripan.

Estes estudos preliminares serviram para definir o modelo experimental e os métodos de investigação para avaliar os mecanismos de morte celular pós-isquemia. Em suma, optamos por:

- a) uma preparação simples e estável com cultura de células Neuro 2a,
- b) um insulto completo e bem controlado durante 24 horas e
- c) um comprometimento celular consistente e moderado passível de sofrer modulação no sentido tanto da mitigação quanto do agravamento da lesão celular.

Encontramos fortes elementos para justificar nossa estratégia experimental no próprio processo apoptótico, descrito por Gerschenson; Rotello, 1992; Barinaga, 1998; White; Sullivan, 1998; Horvitz, 1999. De acordo com estes autores, a apoptose constitui processo de morte celular programada dependente da ativação em série de uma cascata estereotipada de eventos moleculares que se desdobram por dias, ditando um curso protraído e proporcionando inúmeras possibilidades para interrupções terapêuticas.

No caso do tecido nervoso, estas intervenções são chamadas de neuroproteção e visam a preservação da população original de neurônios. Entre os diversos fatores conhecidos com potencial para alterar a perda celular pós-isquêmica um parece se destacar: a temperatura (Busto et al., 1989; Coimbra; Cavalheiro, 1990; Ginsberg et al., 1992; Pazos et al., 1999; Eisenburger et al., 2001). Tanto ensaios experimentais (Niwa et al., 1998; Ferrand-Drake; Wieloch, 1999) quanto ensaios clínicos (Marion et al., 1996; Felberg et al., 2001; Ginsberg, 2003) tem atribuído à hipotermia moderada (30-34oC) um importante efeito neuroprotetor, representando mais uma esperança para pacientes com lesões associadas a traumas, doenças cerebrovasculares, parada cardíaca e cirurgias em grandes vasos.

Por outro lado, alguns autores responsabilizam a elevação da temperatura corporal ou a ocorrência de episódios de febre durante o período pós-isquêmico como os verdadeiros culpados por agravamentos da área de lesão, déficits cognitivos e piora de prognóstico (Baena et al., 1997; Ginsberg; Busto, 1998; Baena et al., 2001; Boysen; Christensen, 2001).

Com intuito de confirmar os efeitos da modulação térmica sobre a lesão isquêmica mas, principalmente, visando revelar a importância da apoptose na reversão da perda neuronal visto que a necrose é concebida como um processo irreversível, repetimos ensaios anteriores e impusemos alterações térmicas ao ambiente da cultura celular.

Inicialmente, a avaliação morfológica de amostras de células coradas com hematoxilina-eosina revelou que, isoladamente, as alterações de temperatura não produzem nenhum efeito. Porém, quando combinadas com o insulto isquêmico, tanto os sinais característicos de lesão isquêmica quanto as evidências de processo apoptótico se intensificam com a elevação da temperatura. Inversamente, os sinais de lesão isquêmica e as evidências do processo apoptótico são menos freqüentes ou até ausentes na hipotermia.

Posteriormente, procedemos a citometria de fluxo que confirmou os achados morfológicos e ainda quantificou os processos necróticos e apoptóticos nos grupos submetidos as diferentes temperaturas. Em suma, a elevação da temperatura ambiente elevou o comprometimento celular para 93% sendo que 35% das células marcaram para necrose e 79% para apoptose. Inversamente, a redução da temperatura ambiente diminuiu o comprometimento celular para 14% sendo que 5% das células marcaram para a necrose e 11% para a apoptose. Apesar da população identificada pela dupla marcação, podemos observar que os processos apoptóticos estão consistentemente associados as variações da temperatura.

Para confirmar estes resultados repetimos os ensaios de modulação térmica e utilizamos novas metodologias para identificar os processos apoptóticos. As duas técnicas empregadas, a eletroforese de DNA em gel de agarose (Gavrieli et al., 1992) e a marcação de TUNEL (Hara et al., 1999), detectam a fragmentação de DNA resultante da ativação da cascata apoptótica no núcleo das células lesadas. Tanto a eletroforese quanto a marcação de TUNEL identificaram padrões característicos dos processos apoptóticos nos ensaios isquêmicos que se tornaram mais evidentes na hipertermia e desapareceram na hipotermia,

confirmando a participação da apoptose na lesão isquêmica e sua modulação pela temperatura.

A citometria conjugada das duas marcações de morte celular permite distinguir quatro estados celulares possíveis: a) viável, sem nenhuma marcação; b) apoptose, marcação com anexina; c) necrose, marcação com IP; e d) apoptose e necrose, dupla marcação. Segundo Wyllie, 1993 e Louagie et al., 1998, este último grupo representa uma transformação do processo de morte celular ou, mais especificamente, o desencadeamento de processo necrótico, finalizando um processo apoptótico inicial, chamado de necrose secundária ou tardia.

A revisão dos resultados de ensaios anteriores sob a análise conjugada permitiu ampliar ainda mais o entendimento da situação experimental. A identificação do grupo de necrose secundária ou tardia sugere uma transformação dinâmica do fenômeno e aponta para os possíveis mecanismos responsáveis pela modulação térmica. Por um lado, a neuroproteção proporcionada pela hipotermia parece resultar tanto da diminuição da ativação de processos apoptóticos quanto da inibição da superposição do processo necrótico secundário, indicadas pela elevação das quantidades de células viáveis e apoptóticas, respectivamente. Por outro lado, o agravamento da lesão consequente à hipertermia parece depender de um aumento acentuado da ativação dos processos apoptóticos e de um comprometimento necrótico secundário, parcialmente, capturado pelo intervalo de análise do modelo experimental.

Por fim, considerando os achados obtidos no presente estudo, sugerimos a continuidade das investigações:

- 1) para a localização na cascata apoptótica do efeito modulador;
- 2) para a identificação completa dos agentes envolvidos,
- 3) para determinação do padrão de ativação gênica associada ao efeito térmico;
- 4) para avaliação de possíveis abordagens farmacológicas e principalmente,
- 5) para demonstrar o equivalente funcional da preservação ou proteção neuronal,

antes de extrapolar possíveis aplicações ou benefícios para a situação clínica.

6. CONCLUSÕES

6 Conclusões

- 1) A privação combinada, oxigênio, glicose e fatores de crescimento, em cultura de neurônios imortalizados constitui modelo experimental simples, estável e coerente, capaz de avançar o entendimento dos processos biomoleculares do desaparecimento neuronal pós-isquêmico.
- 2) A confirmação da ativação de processos de morte celular programada e a identificação do envolvimento de mecanismos apoptóticos na lesão isquêmica reforçam as esperanças para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na neuroproteção.
- 3) A identificação de efeito modulador da temperatura na ocorrência de processos apoptóticos e na supervivência de necrose secundária define um caminho para o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 Referências bibliográficas

Akins PT,Liu PK,Hsu CY. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke*. 1996; 27(9):1682-7.

Araya R,Uehara T,Nomura Y. Hypoxia induces apoptosis in human neuroblastoma SK-N-MC cells by caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria. *FEBS Lett*. 1998; 439(1-2):168-72.

Ashkenazi A,Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381):1305-8.

Baena RC,Kubo SK,Abatepaulo F,M M. *Temperature modulates apoptosis in the gerbil hippocampus following global ischemia*. FeSBE; 2001.

Baena RC,Busto R,Dietrich WD,Globus MY,Ginsberg MD. Hyperthermia delayed by 24 hours aggravates neuronal damage in rat hippocampus following global ischemia. *Neurology*. 1997; 48(3):768-73.

Barinaga M. Life-death balance within the cell. *Science*. 1996; 274(5288):724.

Barinaga M. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science*. 1998; 281(5381):1302-3.

Boix J,Fibla J,Yuste V,Piulats JM,Llecha N,Comella JX. Serum deprivation and protein synthesis inhibition induce two different apoptotic processes in N18 neuroblastoma cells. *Exp Cell Res*. 1998; 238(2):422-9.

Bolton FJ,Wareing DR,Sails AD. Comparison of a novel microaerobic system with three other gas-generating systems for the recovery of *Campylobacter* species from human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997; 16(11):839-42.

Boysen G, Christensen H. Stroke severity determines body temperature in acute stroke. *Stroke*. 2001; 32(2):413-7.

Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U. Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett*. 1997; 414(1):117-21.

Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med*. 1993; 117(12):1208-14.

Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD. The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke*. 1989; 20(8):1113-4.

Cacere CR. *Importância da apoptose na hiporreatividade das células T antígeno-específicas em pacientes com paracoccidioidomicose*. São Paulo: ICB - microbiologia; 2003

Calderon FH, Bonnefont A, Munoz FJ, Fernandez V, Videla LA, Inestrosa NC. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide. *J Neurosci Res*. 1999; 56(6):620-31.

Charriaut-Marlangue C, Margaill I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16(2):186-94.

Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*. 1996; 6(5):667-72.

Coimbra CG, Cavalheiro EA. Protective effect of short-term post-ischemic hypothermia on the gerbil brain. *Braz J Med Biol Res*. 1990; 23(6-7):605-11.

Colbourne F, Corbett D. Delayed and prolonged post-ischemic hypothermia is neuroprotective in the gerbil. *Brain Res*. 1994; 654(2):265-72.

Colbourne F, Li H, Buchan AM. Indefatigable CA1 sector neuroprotection with mild hypothermia induced 6 hours after severe forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19(7):742-9.

Copin JC, Reola LF, Chan TY, Li Y, Epstein CJ, Chan PH. Oxygen deprivation but not a combination of oxygen, glucose, and serum deprivation induces DNA degradation in mouse cortical neurons in vitro: attenuation by transgenic overexpression of CuZn-superoxide dismutase. *J Neurotrauma.* 1996; 13(5):233-44.

Curi R. *Curso Teórico-Prático de Treinamento Básico em Cultura de Células*. São Paulo: USP-ICB-Depto. Fisiologia e Biofísica-Laboratório de Fisiologia Celular; 1999.

DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22(2):127-41.

Dichter MA, Locke RE. Clinical trials in neuroprotection. 23-25 January 2003, Key Biscayne, Florida, USA. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2003; 8(1):267-71.

Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C, Olney JW. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(3):359-79.

Dong WQ, Schurr A, Reid KH, Shields CB, West CA. The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia. *Stroke.* 1988; 19(4):498-502.

Eisenburger P, Sterz F, Holzer M, Zeiner A, Scheinecker W, Havel C, Losert H. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care.* 2001; 7(3):184-8.

Felberg RA, Krieger DW, Chuang R, Persse DE, Burgin WS, Hickenbottom SL, Morgenstern LB, Rosales O, Grotta JC. Hypothermia after cardiac arrest: feasibility and safety of an external cooling protocol. *Circulation.* 2001; 104(15):1799-804.

Ferrand-Drake M,Wieloch T. The time-course of DNA fragmentation in the choroid plexus and the CA1 region following transient global ischemia in the rat brain. The effect of intra-ischemic hypothermia. *Neuroscience*. 1999; 93(2):537-49.

Ferraro E,Corvaro M,Cecconi F. Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J Cell Mol Med*. 2003; 7(1):21-34.

Gavrieli Y,Sherman Y,Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119(3):493-501.

Gerschenson LE,Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J*. 1992; 6(7):2450-5.

Geske FJ,Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol*. 2001; 32(10):1029-38.

Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke*. 2003; 34(1):214-23.

Ginsberg MD,Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989; 20(12):1627-42.

Ginsberg MD,Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol*. 1994; 36(4):553-4.

Ginsberg MD,Busto R. Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern. *Stroke*. 1998; 29(2):529-34.

Ginsberg MD,Sternau LL,Globus MY,Dietrich WD,Busto R. Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1992; 4(3):189-225.

Goldberg MP,Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci*. 1993; 13(8):3510-24.

Golstein P. Cell death in us and others. *Science*. 1998; 281(5381):1283.

Graham SH,Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21(2):99-109.

Hara A,Niwa M,Iwai T,Nakashima M,Bunai Y,Uematsu T,Yoshimi N,Mori H. Neuronal apoptosis studied by a sequential TUNEL technique: a method for tract-tracing. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1999; 4(2):140-6.

Hara H,Sukamoto T,Kogure K. Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol*. 1993; 40(6):645-70.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407(6805):770-6.

Honkaniemi J,Massa SM,Breckinridge M,Sharp FR. Global ischemia induces apoptosis-associated genes in hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 42(1):79-88.

Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res*. 1999; 59(7 Suppl):1701s-06s.

Hsu CY, Ahmed H, Lees K R. The Therapeutic Time Window-Theoretical and Practical Considerations. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2000; 9(6):24-31.

Iwai T,Niwa M,Hara A,Mori H,Uematsu T,Sakai N. DNA fragmentation in the CA2 sector of gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2000; 857(1-2):275-8.

Jain KK. Neuroprotection in cerebrovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2000; 9(4):695-711.

Karliner JS,Honbo N,Epstein CJ,Xian M,Lau YF,Gray MO. Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic

preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(10):1779-86.

Kerr JF,Wyllie AH,Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4):239-57.

Kogure T,Kogure K. Molecular and biochemical events within the brain subjected to cerebral ischemia (targets for therapeutical intervention). *Clin Neurosci.* 1997; 4(4):179-83.

Kumar K SBK, Evans A T. Brain Ischemia Research: from benchside to bedside. *Neurology and clinical neurophysiology.* 1998; 3(5):

Kumar V,Cotran RS,Robbins SL. Lesão e Adaptação Celular. Patologia Básica. 5a. 1994. 3-20

Laake JH,Haug FM,Wieloch T,Ottersen OP. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1999; 4(2):173-84.

Leker RR,Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* 2002; 39(1):55-73.

Louagie H,Cornelissen M,Philippe J,Vral A,Thierens H,De Ridder L. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. *Cell Biol Int.* 1998; 22(4):277-83.

Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003; 27(2):267-82.

Mackert BM,Staub F,Peters J,Baethmann A,Kempski O. Anoxia in vitro does not induce neuronal swelling or death. *J Neurol Sci.* 1996; 139(1):39-47.

Macleod MR,Johansson IM,Soderstrom I,Lai M,Gido G,Wieloch T,Seckl JR,Olsson T. Mineralocorticoid receptor expression and increased survival following neuronal injury. *Eur J Neurosci.* 2003; 17(8):1549-55.

Mansur AP,Favarato D,Souza MF,Avakian SD,Aldrighi JM,Cesar LA,Ramires JA. Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 76(6):497-510.

Marion DW,Leonov Y,Ginsberg M,Katz LM,Kochanek PM,Lechleuthner A,Nemoto EM,Obrist W,Safar P,Sterz F,Tisherman SA,White RJ,Xiao F,Zar H. Resuscitative hypothermia. *Crit Care Med.* 1996; 24(2 Suppl):S81-9.

Mattson MP,Culmsee C,Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 2000; 301(1):173-87.

McManus T,Sadgrove M,Pringle AK,Chad JE,Sundstrom LE. Intraischemic hypothermia reduces free radical production and protects against ischaemic insults in cultured hippocampal slices. *J Neurochem.* 2004; 91(2):327-36.

Milde LN. Pathophysiology of ischemic brain injury. *Crit Care Clin.* 1989; 5(4):729-53.

Monyer H,Giffard RG,Hartley DM,Dugan LL,Goldberg MP,Choi DW. Oxygen or glucose deprivation-induced neuronal injury in cortical cell cultures is reduced by tetanus toxin. *Neuron.* 1992; 8(5):967-73.

Moskowitz MA,Lo EH. Neurogenesis and apoptotic cell death. *Stroke.* 2003; 34(2):324-6.

Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med.* 2000; 36(5):483-506.

Niwa M,Hara A,Iwai T,Wang S,Hotta K,Mori H,Uematsu T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett.* 2001; 300(2):103-6.

Niwa M,Hara A,Iwai T,Nakashima M,Yano H,Yoshimi N,Mori H,Uematsu T. Relationship between magnitude of hypothermia during ischemia and preventive effect against post-ischemic DNA fragmentation in the gerbil hippocampus. *Brain Res.* 1998; 794(2):338-42.

Padosch SA,Vogel P,Bottiger BW. [Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies]. *Anaesthesist*. 2001; 50(12):905-20.

Pazos AJ,Green EJ,Busto R,McCabe PM,Baena RC,Ginsberg MD,Globus MY,Schneiderman N,Dietrich WD. Effects of combined postischemic hypothermia and delayed N-tert-butyl-alpha-phenylnitron (PBN) administration on histopathological and behavioral deficits associated with transient global ischemia in rats. *Brain Res*. 1999; 846(2):186-95.

Prough DS,Rogers AT. Physiology and pharmacology of cerebral blood flow and metabolism. *Crit Care Clin*. 1989; 5(4):713-28.

Rosler J,Schwab M,Havers W,Schweigerer L. Hypoxia promotes apoptosis of human neuroblastoma cell lines with enhanced N-myc expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281(2):272-6.

Rytter A,Cronberg T,Asztely F,Nemali S,Wieloch T. Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro "ischemia" show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003; 23(1):23-33.

Sastry PS,Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem*. 2000; 74(1):1-20.

Smaili SS,Hsu YT,Carvalho AC,Rosenstock TR,Sharpe JC,Youle RJ. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(2):183-90.

Solovyan V,Bezvenyuk Z,Huotari V,Tapiola T,Suuronen T,Salminen A. Distinct mode of apoptosis induced by genotoxic agent etoposide and serum withdrawal in neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 62(1):43-55.

Sterz F,Holzer M,Roine R,Zeiner A,Losert H,Eisenburger P,Uray T,Behringer W. Hypothermia after cardiac arrest: a treatment that works. *Curr Opin Crit Care*. 2003; 9(3):205-10.

Vaagenes P, Ginsberg M, Ebmeyer U, Ernster L, Fischer M, Gisvold SE, Gurvitch A, Hossmann KA, Nemoto EM, Radovsky A, Severinghaus JW, Safar P, Schlichtig R, Sterz F, Tonnessen T, White RJ, Xiao F, Zhou Y. Cerebral resuscitation from cardiac arrest: pathophysiologic mechanisms. *Crit Care Med.* 1996; 24(2 Suppl):S57-68.

Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002; 31(4):214-23.

Velly LJ, Guillet BA, Masmajeau FM, Nieoullon AL, Bruder NJ, Gouin FM, Pisano PM. Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate and its transporters. *Anesthesiology.* 2003; 99(2):368-75.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1):39-51.

Wang C, Nguyen HN, Maguire JL, Perry DC. Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22(2):206-14.

Wei L, Yu SP, Gottron F, Snider BJ, Zipfel GJ, Choi DW. Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo. *Stroke.* 2003; 34(5):1281-6.

White BC, Sullivan JM. Apoptosis. *Acad Emerg Med.* 1998; 5(10):1019-29.

White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci.* 2000; 179(S 1-2):1-33.

Wyllie AH. Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer.* 1993; 67(2):205-8.

Xu J,He L,Ahmed SH,Chen SW,Goldberg MP,Beckman JS,Hsu CY. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke*. 2000; 31(7):1744-51.

Yu AC,Wong HK,Yung HW,Lau LT. Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia*. 2001; 35(2):121-30.

Zhao H,Yenari MA,Sapolsky RM,Steinberg GK. Mild postischemic hypothermia prolongs the time window for gene therapy by inhibiting cytochrome C release. *Stroke*. 2004; 35(2):572-7.

Zieger MA,Glofcheski DJ,Lepock JR,Kruuv J. Factors influencing survival of mammalian cells exposed to hypothermia. V. Effects of hepes, free radicals, and H₂O₂ under light and dark conditions. *Cryobiology*. 1991; 28(1):8-17.

Zivin JA. Factors determining the therapeutic window for stroke. *Neurology*. 1998; 50(3):599-603.