

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

**MORTE NEURONAL E NEUROPROTEÇÃO EM CULTURAS DE
NEURÔNIOS CORTICAIS: A IMPORTÂNCIA DA
INTERAÇÃO NEURÔNIO-ASTRÓCITO**

MARCOS EMÍLIO DOS SANTOS FRIZZO

Orientadores

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Prof. Dr. Luis Barbeito

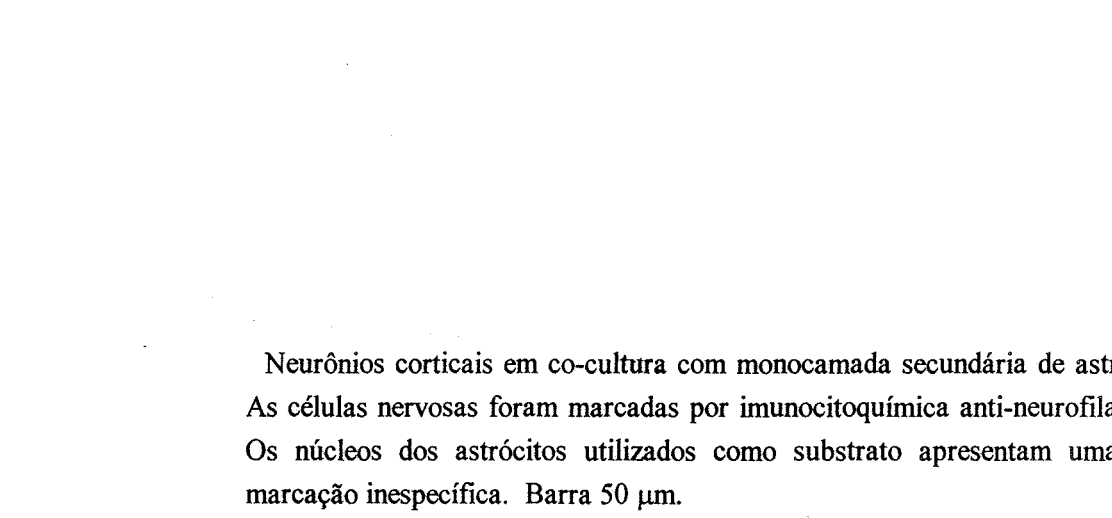
Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
concentração em Fisiologia, Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas
da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências

PORTO ALEGRE

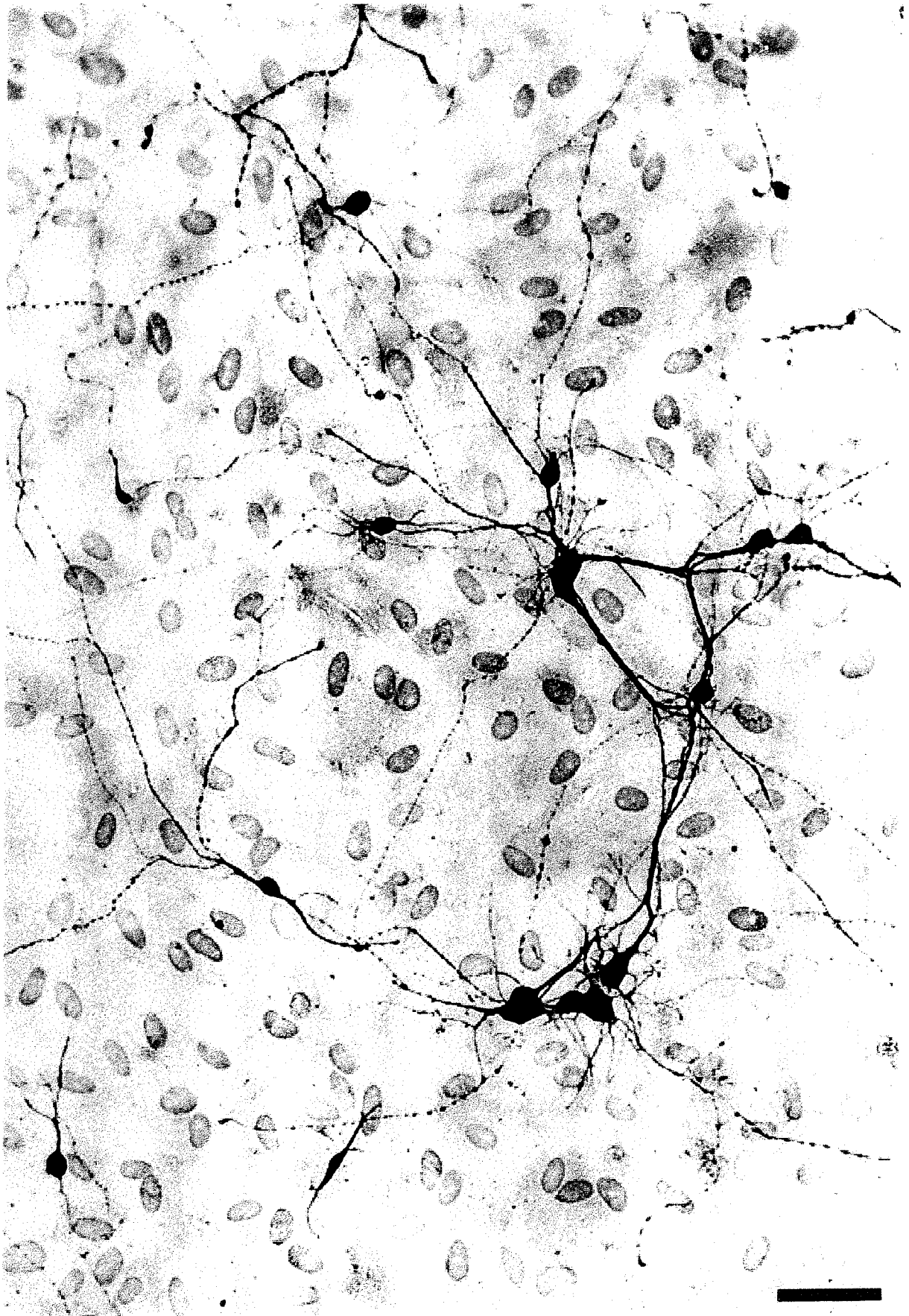
1998

**Para que se alcancem todos os desejos,
Volta os olhos para a luz da aurora!
Deixa-te levar por esse encantamento,
Afasta para longe o véu do sono!
Não tenhas medo de um gesto atrevido,
Enquanto o vulgo hesita e se extravia!
Tudo conseguem os nobres espíritos
Que sabem compreender e decidir.**

FAUSTO J. W. Goethe



Neurônios corticais em co-cultura com monocamada secundária de astrócitos. As células nervosas foram marcadas por imunocitoquímica anti-neurofilamento. Os núcleos dos astrócitos utilizados como substrato apresentam uma fraca marcação inespecífica. Barra 50 μm .



AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Carlos Alexandre Netto, por todo o seu estímulo, apoio nas correções e na troca de idéias.

Ao meu co-orientador Luis Barbeito, por todas as oportunidades de trabalho e aprendizagem, essenciais para a realização desta Tese.

Aos meus queridos amigos Daniel, Hugo e Miguel, por toda a ajuda e amizade.

Aos meus inesquecíveis amigos, Boli, Juan, Alejandra, Gallego, Coya, Aldo e todos mais de Biofísica, por dividirem comigo espaço, equipamentos e principalmente a alegria, o riso e as *charlas*.

Aos meus pais, irmãos e todos meus amigos.

À minha esposa Florencia, pelo amor e cumplicidade.

Agradeço também a CAPES, a Pró-Reitoria de Pesquisa e ao Curso de Pós-Graduação em Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XIV

INTRODUÇÃO

1. Morte celular	2
1.1. Morte celular programada e apoptose	6
1.1.1. Características do mecanismo apoptótico	8
1.2. Morte celular necrótica.....	11
2. Interação neurônio-astrocítico.....	13
2.1. Astrocitos: Substrato ideal para neurônios	13
2.2. Astrocitos: Condicionadores do meio de cultura	16
3. Neurônios corticais em cultura	17
4. Injúria neuronal <i>in vitro</i>.....	20
4.1. Estimulação de astrocitos com endotoxina.....	23
4.1.1. Mecanismo nitridérgico	24
4.1.2. Mecanismo inflamatório.....	28
4.2. Uso de excitotoxinas	29
4.3. Aumento do cálcio citosólico.....	33
4.4. Trocas de meio de cultura.....	35
5. Neuroproteção <i>in vitro</i>.....	35
5.1. Dependência de fatores tróficos.....	39
5.2. Efeito da alta concentração de potássio.....	41
5.3. Níveis de cálcio e canais do tipo L	42
6. Dendrotoxina e 4-aminopiridina.....	45
OBJETIVOS	47

MATERIAL E MÉTODO

1. Material	51
2. Meios de cultura e soluções.....	51
3. Modelo animal.....	54

3.1. Animais utilizados.....	54
3.2. Marcação das ratas.....	54
3.3. Ciclagem das ratas.....	54
3.4. Obtenção dos embriões.....	55
3.5. Obtenção dos neonatos.....	56
4. Culturas celulares.....	56
4.1. Citosina arabinosídeo.....	59
5. Preparação de culturas primárias de astrócitos corticais.....	59
5.1. Material.....	60
5.2. Preparação do material.....	60
5.3. Protocolo de preparação de culturas primárias de astrócitos corticais.....	61
6. Purificação de culturas primárias de astrócitos corticais.....	63
7. Tripsinização.....	65
8. Manutenção de culturas secundárias de astrócitos corticais.....	66
9. Preparação de culturas primárias de neurônios corticais.....	67
9.1. Material.....	67
9.2. Preparação do material.....	68
9.3. Protocolo de preparação de culturas primárias de neurônios corticais.....	68
10. Preparação de culturas neuronais puras.....	70
11. Preparação de culturas neuronais mistas.....	70
12. Preparação de co-culturas de neurônios e astrócitos corticais.....	70
13. Troca do meio de cultura.....	71
14. Culturas de células PC12.....	71
15. Substrato.....	72
16. Substrato para células PC12.....	75
16.1. Protocolo de extração de colágeno para células PC12.....	75
16.2. Preparação de substrato para manutenção de células PC12.....	76
16.3. Preparação de substrato para experimentos com células PC12.....	79
17. Substrato para neurônios corticais.....	79
18. Contagem do número de células no hemocitômetro.....	80
19. Determinação da viabilidade celular.....	81
19.1. Quantificação através da contagem do número de neurônios.....	81
19.2. Quantificação através da atividade lactato-desidrogenase.....	82
19.3. Quantificação através da atividade redutora mitocondrial.....	86
20. Fixação do material.....	88
21. Citoquímica para NADPH-diaforase.....	88
22. Determinação dos níveis de nitrito no meio de cultura.....	89
23. Imunocitoquímica para neurofilamento 200 kDa.....	90

RESULTADOS

1. Modelos de injúria e neuroproteção	93
1.1. Aumento do cálcio citosólico: Uso do ionóforo A23187	93
1.2. Sensibilidade a excitotoxinas: Adição de NMDA	94
1.2.1. Determinação da viabilidade neuronal com uso do MTT	96
1.2.2. Determinação da viabilidade neuronal com uso de LDH.....	97
1.2.3. Determinação da viabilidade neuronal por contagem de neurônios	102
1.3. Trocas de meio: Injúria neuronal por privação de fatores tróficos	104
1.3.1. Meio condicionado por astrócitos: Redução do dano mediado por trocas de meio	104
1.3.2. Modelo da co-cultura: Neurônios semeados sobre monocamadas secundárias de astrócitos corticais	106
1.3.3. Bloqueadores de canais de potássio tipo I _A : Ação semelhante a altas concentrações de potássio	110
1.3.4. Neuroproteção mediada por α -DTX e 4-AP: Participação de canais de cálcio do tipo L	114
2. Interação neurônio-astrócito e injúria neuronal	116
2.1. Modelo para o estudo do <i>estresse</i> oxidativo endógeno: Co-cultura de células PC12 e monocamadas secundárias de astrócitos corticais.....	117
2.1.1. Efeito do LPS sobre a viabilidade de células PC12	117
2.1.2. Monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas por LPS em co-cultura com células PC12	119
2.1.3. Monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas por LPS em co-cultura com células PC12 neuronais.....	120
2.2. Neurotoxicidade mediada por astrócitos estimulados por LPS: Modelo da co-cultura e do meio condicionado	122
2.2.1. Efeito da adição de LPS sobre culturas neuronais puras	122
2.2.2. Efeito da adição de LPS sobre culturas corticais mistas.....	123
2.2.3. Monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas com LPS em co-cultura com neurônios corticais	125
2.2.4. Culturas puras de neurônios corticais tratadas com meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos LPS-estimuladas.....	127
2.2.5. Determinação da atividade da enzima NADPH-diaforase em monocamadas secundárias de astrócitos.....	132
2.2.5.1. Detecção dos níveis de nitritos no meio condicionado	132
2.2.5.2. Marcação da atividade NADPH-diaforase.....	132

DISCUSSÃO	
Aumento do cálcio citosólico.....	135
Sensibilidade a excitotoxinas.....	138
Trocas de meio: Fator promotor de injúria neuronal.....	143
Interação neurônio-astrocítico e injúria neuronal	158
Considerações finais	164
CONCLUSÕES	168
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
ABSTRACT	199
APÊNDICE	201
ANEXO.....	202

RESUMO

Fatores neurotróficos secretados por astrócitos prolongam a sobrevivência e promovem o crescimento neuronal *in vitro*. Efeito semelhante é obtido pela despolarização com elevadas concentrações de K^+ numa variedade de tipos neuronais. Entretanto, os astrócitos também podem secretar agentes neurotóxicos. Uma das formas de provocar este tipo de reação é através da adição de LPS, que induz a expressão da enzima NOS além da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Nosso objetivo foi investigar a morte e a neuroproteção de neurônios corticais, com especial enfoque para a interação entre estas células nervosas e os astrócitos. Para tanto, estudamos o efeito da estimulação de astrócitos com LPS na tentativa de verificar se a mesma desencadearia neurotoxicidade. Por outro lado, para estudar a neuroproteção, propomos um modelo de injúria neuronal por insuficiência de fatores tróficos, no qual testamos o efeito de elevadas concentrações de K^+ e o bloqueio de canais de K^+ do tipo I_A . Na preparação das culturas primárias de neurônios corticais, utilizamos embriões com 16 dias de gestação e, para as de astrócitos, neonatos com no máximo 24 h, pertencentes a cepa *Sprague-Dawley*. Em nosso estudo sobre neurotoxicidade, empregamos o ionóforo de Ca^{2+} A23187 em culturas puras de neurônios corticais. Nestes casos, as concentrações neurotóxicas promoveram morte com características necróticas. Em outro paradigma, a substituição do meio de cultura demonstrou ser um eficiente promotor de dano neuronal. Observamos que este tipo de procedimento desencadeia um mecanismo excitotóxico mediado por receptores NMDA, dependente da idade da cultura, e um outro relacionado com a restrição de fatores tróficos que independe desta situação. Além disso, verificamos que o meio condicionado e as elevadas concentrações de K^+ apresentam significativos efeitos neuroprotetores contra a injúria provocada por trocas de meio e que a adição de DTX e 4-AP mimetiza esta ação trófica atuando através de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L, sensíveis a nifedipina. Por outro lado, a LPS não diminuiu a viabilidade de células PC12 indiferenciadas ou neuronais quando estas encontravam-se em co-cultura com astrócitos e também não provocou neurotoxicidade em culturas de neurônios corticais puras, mistas ou co-culturas. Entretanto, o meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos previamente estimuladas com a endotoxina, exerceu um efeito neurotóxico quando utilizado em culturas corticais puras. Desta forma, as monocamadas estimuladas parecem ter liberado um fator difusível cujo efeito só foi observado em culturas neuronais puras, parecendo depender da interação neurônio-astrócito, pois em co-cultura não foram observados danos neuronais. A atividade NOS destas culturas secundárias que condicionaram o meio, foi avaliada pela quantificação dos níveis de NO_2^- acumulados no meio, através da técnica de Griess e pela demonstração da atividade NADPH-diaforase. Não obtivemos evidências da participação da via nitridérgica, restando para ser estudada uma provável resposta inflamatória mediada por citocinas liberadas pelos astrócitos. Assim, observamos que os astrócitos corticais podem secretar no meio de cultura tanto fatores neurotóxicos quanto neuroprotetores. Demonstramos também, que as correntes de K^+ do tipo I_A podem ter um papel na sobrevivência de neurônios corticais embrionários.

ABREVIATURAS

μ l Microlitro
 μ m Micrômetro
 μ M Micromolar
 $^{\circ}$ C Graus centígrados
4-AP 4-Aminopiridina
AMPA Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propiónico
Anti-NF Anti-neurofilamento
Ara-C Citosina arabinosídeo
BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro
bFGF Fator de crescimento fibroblástico básico
C6 Glioma C6
 Ca^{2+} Cátion cálcio
cAMP 5'- Monofosfato de adenosina cíclico
CCVD Canal de cálcio voltagem-dependente
céls. Células
cIEGs Genes precoces imediatos celulares
 Cl^{-} Ânion cloro
 cm^2 Centímetro quadrado
 cm^3 Centímetro cúbico
CNTF Fator neurotrófico ciliar
CPT-cAMP 8-(4-clorofenil-tio)-3': 5'-monofosfato de adenosina cíclico
DAB Diaminobenzidina
DAG Diacilglicerol
DIV Dias *in vitro*
DMSO Dimetilsulfóxido
DNA Ácido desoxirribonucléico
DNase Desoxirribonuclease
DTX Dendrotoxina
E15 Embriões com 15 dias de gestação
E16 Embriões com 16 dias de gestação
EDTA Ácido etileno diamino tetra acético
EGF Fator de crescimento epidérmico
EGTA Ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)-tetra acético
eNOS Sintetase do NO^{\cdot} endotelial
g Grama
GABA Ácido γ -aminobutírico
h Hora
 H^{+} Cátion hidrogênio
 H_2O_2 Peróxido de hidrogênio
 H_3PO_4 Ácido fosfórico
HBSS Solução salina tamponada com HEPES
HEPES Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
HL-60 Linhagem celular HL-60

HPLC Cromatografia líquida de alta pressão
IFN Interferon
IL Interleucina
iNOS Sintetase do NO· induzível
IP₃ Trifosfato de inositol
K⁺ Cátion potássio
kDa Quilodaltons
kpb Quilopares de bases
l Litro
L-DOPA L-dihidroxi-fenil alanina
LDH Lactato desidrogenase
LPS Lipopolissacarideo
M Molar
MEM Meio essencial mínimo
mg Miligrama
min Minuto
ml Mililitro
mm Milímetro
mM Milimolar
mm² Milímetro quadrado
mm³ Milímetro cúbico
MPP⁺ Íon 1-metil-4-fenil-pirídio
MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
mRNA Ácido ribonucleico mensageiro
MTT Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
Na⁺ Cátion sódio
NaCl Cloreto de sódio
NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaHCO₃ Bicarbonato de sódio
NAME Metil de éster nitro-L-arginina
NaNO₂ Nitrito de sódio
NBT Azul de nitrotetrazólio
ng Nanogramas
NGF Fator de crescimento do nervo
nm Nanômetro
NMDA N-metil-D-aspartato
nNOS Sintetase do NO· neuronal
NO· Óxido nítrico
NO₂⁺ Cátion nitrônio
NO₂⁻ Ânion nitrito

NOS Sintetase do NO \cdot
O $_2^{\cdot-}$ Ânion superóxido
ONOO $^-$ Ânion peroxinitrito
pb Pares de bases
PBS Solução salina tamponada com fosfato
PC12 Linhagem celular PC12
PFA Paraformaldeído
PKC Proteína quinase C
pol Polegadas
rpm Rotações por minuto
SC Soro de cavalo
SFB Soro fetal bovino
SNC Sistema nervoso central
SOD Superóxido dismutase
SSC Solução salina controle
TGF β Fator de crescimento transformante- β
Trk Tirosina quinase
TNF α Fator da necrose tumoral- α
trans-ACPD Ácido trans-1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxílico
UAbs Unidades de absorvância
UV Ultravioleta
vol Volume
xG Aceleração da gravidade
Zn $^{2+}$ Cátion zinco

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Relação de padrões de ramificação axonal com o tipo neuronal</i>	18
Figura 2. <i>Mudança morfológica associada à injúria neuronal</i>	19
Figura 3. <i>Possíveis mecanismos neurotóxicos em culturas neuronais mistas</i>	22
Figura 4. <i>Mecanismo de ação de alguns agentes neuroprotetores in vitro</i>	38
Figura 5. <i>Determinação de um substrato de alta aderência para células PC12</i>	78
Figura 6. <i>Curva de calibração de MTT para culturas de células PC12</i>	87
Figura 7. <i>Curva de calibração de MTT para culturas puras de neurônios</i>	87
Figura 8. <i>Curva de calibração para quantificação de NO_2^-</i>	90
Figura 9. <i>Efeito da adição do ionóforo A23187 sobre a morfologia de neurônios corticais em cultura</i>	95
Figura 10. <i>Efeito da adição de NMDA sobre a viabilidade de neurônios corticais em culturas mistas: Determinação através de MTT</i>	96
Figura 11. <i>Efeito da adição de NMDA sobre a viabilidade de neurônios corticais em culturas mistas: Determinação através de LDH</i>	98
Figura 12. <i>Dano neuronal causado por trocas de meio</i>	100
Figura 13. <i>Excitotoxicidade de culturas corticais mistas em função da idade</i>	101
Figura 14. <i>Efeito da adição de NMDA sobre neurônios corticais em co-cultura com monocamadas secundárias de astrócitos corticais</i>	103
Figura 15. <i>Neuroproteção mediada por meio condicionado</i>	105
Figura 16. <i>Modelo da co-cultura</i>	108
Figura 17. <i>Efeito de diferentes polipeptídeos de DTX sobre neurônios corticais em cultura</i>	111
Figura 18. <i>Efeito de diferentes polipeptídeos de DTX sobre a viabilidade neuronal</i>	112
Figura 19. <i>Efeito neuroprotetor da DTX na injúria mediada por trocas de meio</i>	113
Figura 20. <i>Neuroproteção por DTX: Envolvimento de canais de Ca^{2+} do tipo L sensíveis a nifedipina</i>	115
Figura 21. <i>Nifedipina anula a proteção induzida por DTX ou 4-AP em trocas repetitivas de meio</i>	116

Figura 22. <i>Efeito da adição de LPS sobre a viabilidade de células PC12</i>	118
Figura 23. <i>Efeito de monocamadas estimuladas com LPS sobre a viabilidade de células PC12, em co-culturas</i>	120
Figura 24. <i>Efeito de monocamadas estimuladas com LPS sobre a viabilidade de células PC12 neuronais, em co-culturas</i>	121
Figura 25. <i>Efeito da adição de LPS sobre a viabilidade de culturas neuronais puras</i>	123
Figura 26. <i>Efeito da adição de LPS sobre culturas corticais mistas</i>	124
Figura 27. <i>Substrato astrocitário previamente tratado com LPS não induz alterações morfológicas em neurônios corticais</i>	126
Figura 28. <i>Substrato astrocitário previamente tratado com LPS não altera a viabilidade neuronal</i>	128
Figura 29. <i>Meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos, tratadas com LPS, promove neurotoxicidade em culturas puras de neurônios corticais</i>	130
Figura 30. <i>Efeito do meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos, estimuladas com LPS, sobre culturas puras de neurônios corticais</i>	131
Figura 31. <i>Citoquímica para NADPH-diaforase de monocamadas secundárias de astrócitos corticais</i>	133
Figura 32. <i>Possível mecanismo de ação da DTX e 4-AP em co-culturas</i>	152

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Características da morte celular programada, apoptose e necrose</i>	3
Tabela 2. <i>Sumário dos três tipos principais de morte celular, segundo Clarke</i>	7
Tabela 3. <i>Alguns agentes e condições desencadeantes da apoptose</i>	9
Tabela 4. <i>Extensão neurítica não é afetada pelo meio condicionado</i>	15
Tabela 5. <i>Solução estoque de RPMI 1640</i>	51
Tabela 6. <i>Meio RPMI com soro</i>	52
Tabela 7. <i>Meio RPMI para PC12 diferenciadas</i>	52
Tabela 8. <i>Solução estoque de MEM</i>	52
Tabela 9. <i>Meio de cultura para neurônios corticais</i>	52
Tabela 10. <i>Meio de cultura para astrócitos corticais</i>	53
Tabela 11. <i>Solução salina controle (SSC)</i>	53
Tabela 12. <i>Solução salina tamponada com fosfato (PBS)</i>	53
Tabela 13. <i>Amostras para curva de calibração de NO_2^-</i>	90
Tabela 14. <i>Viabilidade de neurônios semeados sobre monocamadas secundárias de astrócitos, após duas trocas sucessivas de meio de cultura</i>	114

INTRODUÇÃO

1. Morte celular

Para uma célula eucarionte de um organismo multicelular o único evento indubitável, ao longo de seu ciclo vital, é a morte. Este processo pode ocorrer passivamente, advindo de uma injúria externa ou ativamente, em resposta a um requerimento interno com bases genéticas ou epigenéticas.

No primeiro caso, a célula irreversivelmente atingida apresenta um aumento significativo da permeabilidade de sua membrana plasmática, como consequência da ativação de fosfolipases dependentes de cálcio associadas a membrana (Farber et al., 1981; Trump et al., 1981; Trump et al., 1984; Orrenius et al., 1989). Este fenômeno acarreta um comprometimento da sua integridade, liberação de enzimas lisossômicas e cariólise. Tais eventos são acompanhados por inflamação exudativa e caracterizam um processo denominado *necrose* (ver Tab.1).

No segundo caso, a célula segue um programa de auto-destruição que obedece a uma determinação funcional, denominando-se morte celular programada. Em algumas circunstâncias deste caso, o aspecto morfo-funcional que a célula assume, de forma ativa, caracteriza um processo de morte chamado *apoptose* (ver Tab.1). Em ambas situações, não há extravasamento de material citoplasmático nem subsequente indução de resposta inflamatória (Raff, 1992).

Entretanto, é necessário ser criterioso com o uso destes termos, pois, embora muitos exemplos de apoptose se tratem de uma autêntica morte celular programada, nem toda morte programada ocorre sob forma de apoptose. Deve-se considerar que a morte

celular programada é uma descrição funcional e fisiológica, enquanto apoptose é um termo que descreve uma série distinta de características morfológicas, celulares e moleculares observadas em um tipo de morte celular. Talvez o exemplo mais claro desta diferença seja que, em alguns casos, pode-se induzir com drogas citotóxicas e estímulos físicos, a morte com características morfológicas e bioquímicas de apoptose, onde esta não ocorreria sem a alteração do meio celular (Martin et al., 1994).

Tabela 1. Características da morte celular programada, apoptose e necrose

Característica	Morte Celular Programada	Apoptose	Necrose
Morfologia	Condensação celular, fragmentação	Condensação celular, fragmentação	Ruptura celular
Integridade da membrana	Persiste	Persiste	Perda precoce
Mitocôndrias	Freqüente onda específica de autofagocitose	Não afetadas	Edema, captura de Ca^{2+}
Cromatina	Condensada, eletrodensa	Disposição marginal	Picnótica
Fase oculta	Várias horas	Minutos ou horas	Ausente
Síntese proteica	Bloqueada algumas vezes pela actinomicina-D e cicloheximida	Bloqueada algumas vezes pela actinomicina-D e cicloheximida	Não afetada por antibióticos
Origem	Desenvolvimento embrionário e metamorfose	↓ hormônios tróficos ou estímulo hipertrófico, suave estímulo tóxico	Toxinas, trauma, hipoxia, grande variação do pH, etc.
Mudanças citoplasmáticas	Algumas vezes ↑ enzimas lisossômicas, expressão de c-myc e c-fos	Sem ↑ lisossomas; expressão de c-myc e c-fos ?	Ruptura de lisossomas
Mudanças nucleares	Sem DNA com padrão em escada	DNA com padrão em escada	Degradação difusa do DNA
Primeiro sinal	↓ síntese protéica	Ativação de endonuclease	Edema celular
↓ Diminuição de ↑ Aumento de		Modificado de Lockshin & Zakeri, 1991.	

Desta forma, a morte celular programada algumas vezes pode apresentar determinadas características que permitam denomina-la apoptótica. Este tipo de morte apresenta um significado biológico, função homeostática, e uma natureza essencialmente

distinta da morte necrótica (degenerativa), a qual parte de mudanças acidentais no ambiente das células afetadas (Ledda-Columbano & Columbano, 1991; Kerr & Harmon, 1991).

A morte celular parece desempenhar importante papel ontogenético, sendo uma etapa normal do desenvolvimento de muitos tipos diferentes de células, tecidos e órgãos. Pode servir para eliminar células cuja função transitória foi perdida (como a cauda do girino) sendo chamada de morte celular metamórfica (Kerr et al., 1974; Lockshin, 1981), e também para remover órgãos vestigiais (pró e mesonéfrons, arcos aórticos e cauda humana) que degeneram durante o desenvolvimento, denominando-se morte celular filogenética (Raynaud, 1977).

Há também células que são sacrificadas no processo de modelagem do corpo (Glucksman, 1951; Saunders, 1966), como nas regiões entre os dedos em desenvolvimento dos amniotas (Hammar & Mottet, 1971), em um processo referido como morte celular morfogenética, a qual também ocorre no sistema nervoso (Cuadros & Rios, 1988; Finlay & Pallas, 1989; Hanklin et al., 1988; Levi-Montalcini, 1950; Silver, 1978).

Finalmente, no sistema nervoso ocorre um outro tipo de morte celular que pode ser exclusiva deste tecido e que tem sido descrita como histogenética, fisiológica, probabilística, epigenética, programada ou do desenvolvimento. Neste processo há uma perda significativa de neurônios em determinadas populações (20-80%), num estágio relativamente tardio da maturação, sendo seguido pela expressão fenotípica de muitas

das características de determinadas células, tais como aumento do número de projeções axonais para alvos pós-sinápticos (Oppenheim, 1991).

Para muitos investigadores, foi difícil aceitar que mecanismos degenerativos fisiológicos ocorressem simultaneamente com a ontogênese, onde processos proliferativos e do desenvolvimento acontecem. Por exemplo, neurônios imaturos aparentemente saudáveis, podem passar a uma situação de morte e fagocitose em poucas horas (Oppenheim, 1991). Talvez por isso, casos de degeneração algumas vezes observados tenham sido desconsiderados ou relatados como patológicos.

Em adição, parece haver uma grande proximidade entre os mecanismos que regulam os processos proliferativos e os de morte celular (Ledda-Columbano & Columbano, 1991; Raff, 1992). Somando-se a isso, a sobrevivência celular aberrante resultante da inibição da morte celular programada (apoptótica) parece contribuir, em muitos casos, para a oncogênese. Surge assim um novo enfoque à oncologia molecular considerando-se que a taxa de morte, além do controle da proliferação, também é importante neste processo (Williams, 1991).

Hoje sabemos que a redução do número de células é fundamental para a constituição funcional de alguns tecidos, especialmente o nervoso. Desta forma, devemos ver um sentido biológico na morte celular programada (apoptótica), tanto na ontogênese quanto num organismo adulto, onde esta parece desempenhar importante função na regulação da taxa de reposição e na localização de determinadas células. De certa maneira, a morte celular parece ser essencial para a organização da vida.

1.1. Morte celular programada e apoptose

Embora a existência da morte celular em embriões já fosse conhecida desde o século XIX, apenas na década de 60 houve uma abordagem do tema de maneira experimental surgindo o termo "morte celular programada" (Lockshin & Beaulaton, 1974; Lockshin & Zakeri, 1991; Saunders, 1966). No mesmo período, com os estudos histoquímicos sobre alterações lisossômicas no fígado isquêmico realizados por Kerr (1965), surgiram evidências da existência de dois tipos morfológicamente distintos de morte celular, posteriormente identificados como *necrótico* e *apoptótico*. A palavra apoptose provém do grego e refere-se ao processo de queda das folhas das árvores ou pétalas das flores (Kerr et al., 1972).

Na concepção de Saunders (1966) as células poderiam cometer suicídio frente a uma solicitação do organismo, utilizando para tanto seus próprios meios. Esta ação responderia a um imperativo evolucionário de nutrição ou manutenção do organismo e, logo, as comparações foram extendidas para a diferenciação terminal da epiderme e aos eritrócitos de mamíferos.

Com este enfoque, a morte celular programada pode ser vista como um evento do desenvolvimento, originado como resposta a um estímulo determinado. Ainda não está claro se este fenômeno e a apoptose são essencialmente distintos ou se as diferenças observadas refletem meramente prioridades celulares diversas (Lockshin & Zakeri, 1991). Neste último caso, seria possível que as características do colapso variassem de acordo com a biologia da célula em questão.

Além disso, outros autores têm apontado a possibilidade de uma maior diversidade de mortes fisiológicas. Por exemplo, Schweichel & Merker (1973) identificaram três tipos de morte celular que ocorrem no desenvolvimento dos tecidos: a) degeneração sem qualquer papel detectável dos lisossomas da própria célula, seguida pela destruição dos fragmentos celulares nos lisossomas secundários de células fagocíticas (heterofagocitose); b) degeneração resultante da atividade lisossomal endógena (autofagocitose), e c) morte celular sem qualquer envolvimento aparente destas organelas. Clarke (1990) subdividiu este último tipo, descrevendo assim, um número ainda maior de casos morfológicos de mortes celulares não patológicas (ver Tab. 2).

Tabela 2. *Sumário dos três tipos principais de morte celular, segundo Clarke*

	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3 A	Tipo 3 B
Designações	Apoptose Necrose de contração Picnose precoce Morte celular de tipo nuclear	Morte celular autofágica	Desintegração não lisossomal	Tipo citoplasmático
Núcleo	Condensação nuclear Agrupamento de cromatina produzindo picnose evidente	Picnose em alguns casos Partes do núcleo podem evaginar ou segregar	Vacuolização tardia; subsequente desintegração	Aumento tardio na granulosidade da cromatina
Membrana Celular	Convoluta, formando bolhas	Endocitose, aspecto borbulhento	Rupturas	Arredondamento celular
Citoplasma	Perda de ribossomas do RER e dos polisomas; citoplasma reduzido em volume, tornando-se eletrodense	Vacúolos autofágicos abundantes; RE e mitocôndrias algumas vezes dilatados; Golgi geralmente alargado	Desintegração geral; dilatação de organelas, formando espaços "vazios" que fusionam-se entre si e com o espaço extracelular	Dilatação do RE, carioteca, Golgi, e algumas vezes de mitocôndrias, formando-se espaços "vazios"
Modificado de Clarke, 1990.				

O significado de uma classificação rígida de vários tipos de degeneração morfológica entra em choque com a possibilidade de que cada tipo possa refletir diferentes mecanismos celulares e moleculares estado-dependentes, com correspondente

diversidade de etapas indutíveis e vias intracelulares. Seria de considerável interesse saber se todos os neurônios exibem modos similares de degeneração quando privados de moléculas tróficas, e se a morte celular fisiológica e a que ocorre na doença neurodegenerativa ocorrem por vias de degeneração similares ou não (Lockshin & Zakeri, 1991).

1.1.1. Características do mecanismo apoptótico

A apoptose ocorre a partir da ativação de um programa de suicídio intrínseco da célula. O maquinismo básico para desencadear a apoptose parece estar presente em todas as células de um mamífero, mas a ativação do programa de suicídio é regulada por muitos tipos diferentes de sinais dos meios intra e extracelular. Pelo menos alguns componentes deste programa têm sido conservados ao longo da filogênese (Steller, 1995).

Até o presente, foram relacionados vários agentes e condições capazes de provocar morte apoptótica (ver Tab. 3). Esta designação poderia advir de um estímulo nocivo ou mesmo de algum que, em determinadas circunstâncias seria benéfico (i. e., citocinas). A partir daí, recruta-se uma ou mais das diferentes vias de transdução de sinal paralelas que convergem para a ativação de genes da morte (Thompson, 1995).

O ionóforo A23187, que permeia o Ca^{2+} aumentando os níveis citoplasmáticos deste íon, é conhecido como um potente indutor apoptótico em muitos tipos celulares, sugerindo que o influxo deste cátion seja um requisito básico para a apoptose. Isto está de acordo com o efeito do Ca^{2+} citosólico livre que pode causar profundas alterações do

citoesqueleto, provocando as mudanças de forma e tamanho celular características da apoptose. Em adição, pelo menos duas das enzimas envolvidas na auto-destruição celular, a endonuclease e a trans-glutaminase tecidual, são dependentes de cálcio (Martin et al., 1994).

Tabela 3. *Alguns agentes e condições desencadeantes da apoptose*

Ativadores fisiológicos	Indutores patológicos	Agentes terapêuticos	Toxinas
Família TNF	Oncogens myc, rel e E1A	Drogas quimioterápicas	Cicloheximida
TGFβ	Supressor tumoral p53	Cisplatina	Actinomicina-D
Glutamato e dopamina	Toxinas bacterianas	Vincristina	Peptideoβ-amilóide
↓ fatores tróficos	Choque térmico	Doxorubicina	A23187
↓ matriz extracelular	Infecção viral	Metotrexato	Etanol
Cálcio	Células T citotóxicas	Citosina Arabinosídeo	
Glicocorticóides	Oxidantes		
Óxido nítrico	Radicais livres	Radiação gama, beta e UV	
↓ Privação de		Modificado de Thompson, 1995.	

Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} nem sempre acompanha a morte apoptótica, havendo vários exemplos de sua ocorrência na ausência deste íon (Rodrigues-Tarduchy et al., 1990; Lee et al., 1993). Além disso, foi descrito que o uso de A23187 retarda a apoptose espontânea de neutrófilos humanos senescentes (Whyte et al., 1993). Talvez a aparente ação controversa deste ionóforo seja devida a sua relativa tolerância a outros cátions divalentes como o Zn^{2+} , que bloqueia a apoptose em muitos sistemas (Thompson, 1995). Em adição, a carbamazepina, indutora de morte apoptótica de neurônios cerebelares em cultura, parece mediar a neurotoxicidade ao limitar a concentração intracitoplasmática de Ca^{2+} , mantida a partir da ação do glutamato endógeno sobre receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) (Gao et al., 1995).

Igualmente contraditória é a participação da proteína quinase C (PKC) na apoptose, pois foi demonstrado que tanto sua ativação (Rodrigues-Tarduchy & Lopes-Rivas, 1989), quanto sua inibição (Kizaki et al., 1989), impedem a apoptose. Somando-se a isso, na linhagem celular HL-60, este tipo de morte é relativamente independente da ativação ou inibição desta enzima (Martin et al., 1994).

O cátion Zn^{2+} tem sido descrito como um bloqueador apoptótico cujo sítio de ação ainda é desconhecido, embora a endonuclease atuante neste processo tenha sua atividade suprimida na presença deste íon (Nieto & Lopes-Rivas, 1989; Martin & Cotter, 1991). Se o Zn^{2+} é capaz de inibir alterações nucleares características da apoptose, parece que o mesmo não acontece com aquelas que transcorrem a nível citoplasmático, o que está de acordo com estudos que demonstram que a maioria dos aspectos deste processo independem da expressão de novos genes (Steller, 1995).

Outra condição capaz de desencadear morte apoptótica é o *estresse* oxidativo (Buttke & Sandstrom, 1994), o qual provoca apoptose em neurônios corticais em cultura (Ratan et al., 1994). A morte apoptótica destes neurônios, induzida por *estresse* oxidativo, foi proposta como modelo para estudo do mecanismo de ação de radicais livres neste neurônios (Ratan & Baraban, 1995). Neste modelo *in vitro*, um dos critérios utilizados para determinar a ocorrência de apoptose foi a clivagem do ácido desoxirribonucleico (DNA).

A fragmentação internucleosomal do DNA de células apoptóticas, descrita pela primeira vez por Wyllie (1980), é uma medida qualitativa de uma etapa nem sempre

presente neste processo (Oberhammer et al., 1993), mas que segue sendo largamente utilizada na identificação deste tipo de morte celular.

O significado da quebra do DNA ainda não está claro, podendo ser simples consequência da alteração iônica ou apresentar uma função biológica como a de tornar o evento irreversível pela destruição da informação genética ou facilitar a fagocitose dos corpos apoptóticos (Martin et al., 1994).

Antes da fragmentação internucleosomal do DNA, este é clivado em fragmentos de 300 e/ou 50 kpb (Oberhammer et al., 1993), talvez pela topoisomerase II, que ocorre com uma periodicidade de 300 kpb ao longo da cromatina (Martin et al., 1994). A formação destes fragmentos ocorre em células que não clivam seu DNA em regiões internucleosomais mas que apresentam condensação da cromatina, indicando que este aspecto deve ser decorrente da formação destes fragmentos longos (Oberhammer et al., 1993).

1.2. Morte celular necrótica

Este tipo de morte se caracteriza pelo edema celular, ruptura da membrana plasmática e do sistema de membranas internas e culmina com a subsequente liberação do conteúdo celular. Este extravasamento, devido a perda da integridade das membranas, acarreta um processo inflamatório (Raff, 1992). A necrose geralmente se verifica em situações patológicas ou de injúria, decorrente de um desvio radical das condições fisiológicas. Este tipo de morte celular, quando desencadeado, é irreversível mesmo após intervenção terapêutica (Tomei & Cope, 1991).

O edema neuronal seguido de morte, decorrente da exposição de culturas corticais ao aminoácido glutamato, foi descrito por Choi e colaboradores (1987). Desde então, este neurotransmissor e seus agonistas, vem sendo utilizados como agentes neurotóxicos mediadores de excitotoxicidade. O termo “excitotoxicidade” se refere a propriedade paradoxal, partilhada pelo glutamato e outros análogos excitatórios específicos, de causar neurodegeneração aguda pela excessiva estimulação de receptores ionotrópicos para aminoácidos excitatórios (receptores através dos quais o glutamato funciona fisiologicamente como neurotransmissor). Os mecanismos precisos pelos quais a ativação excessiva destes receptores conduz a morte neuronal aguda não são bem compreendidos, embora o aumento da permeabilidade da membrana e o influxo anormal de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} desempenhem importantes papéis (Olney, 1994).

O agonista glutamatérgico NMDA, quando administrado em baixas concentrações a culturas de neurônios corticais, demonstrou desencadear morte neuronal com características apoptóticas. Entretanto, a exposição intensa das culturas a altas concentrações de NMDA, induziu dano neuronal necrótico caracterizado por edema agudo e ruptura neuronal (Bonfoco et al., 1995). A ação promotora de necrose do NMDA em culturas de neurônios corticais pode ser potenciada por neurotrofinas (Koh et al., 1995) e depende da densidade de astrócitos nestas culturas (Rosenberg & Aizenman, 1989).

2. Interação neurônio-astrocítico

Os astrócitos foram inicialmente considerados elementos passivos de suporte estrutural e metabólico para os neurônios. Atualmente, atribui-se papéis decisivos à estas células na fisiologia, no desenvolvimento e na patologia do sistema nervoso (Bronstein et al., 1995; Desagher et al., 1996; Giulian et al., 1993; Hewett et al., 1994; Kim & Täuber, 1996; Rosenberg & Aizenman, 1989). Constituem uma família de células que apresenta heterogeneidade regional com respeito aos tipos de enzimas, marcadores antigênicos, transportadores, receptores, e aos canais iônicos que possuem (Hansson, 1990; Wilkin et al., 1990).

Os astrócitos têm essencial participação na manutenção neuronal *in vivo*. Da mesma forma, estas células mantêm neurônios *in vitro*, secretando um grande número de fatores neurotróficos que prolongam a sobrevivência e promovem o crescimento de neurônios em cultura (Giulian et al., 1993). Além do suporte trófico, astrócitos em cultura protegem neurônios da toxicidade mediada por aminoácidos excitatórios (Rosenberg & Aizenman, 1989), influenciando a excitotoxicidade através da modulação dos níveis extracelulares de glutamato, K^+ e H^+ (Hewett et al., 1994). Da mesma forma, preservam os neurônios da toxicidade mediada por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principalmente através da ação de catalases (Desagher et al., 1996). Por essa razão, em estudos de neurotoxicidade, são utilizadas em geral culturas neuronais pobres em astrócitos, que são tipicamente mais sensíveis a neurotoxinas (Bronstein et al., 1995).

2.1. Astrócitos: Substrato ideal para neurônios

Inicialmente, a partir de estudos anatômicos, determinou-se que os astrócitos cumprem uma função de substrato durante o desenvolvimento do sistema nervoso

central (SNC). A glia radial (Schmechel & Rakic, 1979) por exemplo, está presente em todas as regiões do cérebro durante o pico de migração dos somas neuronais (Levitt & Rakic, 1980). Entretanto, apesar dos indícios da importância da superfície astrocitária durante o desenvolvimento, estudos de interação neurônio-glia *in vitro* enfocaram predominantemente os efeitos dos fatores difusíveis produzidos pela glia, sendo um exemplo o trabalho de Varon & Adler (1981).

No sentido de esclarecer a importância de astrócitos utilizados como substratos, Noble e colaboradores (1984) examinaram as consequências de interações de superfície destas células sobre o crescimento de diferentes tipos de neurônios centrais *in vitro*. Neste caso, o crescimento neuronal sobre monocamadas de astrócitos corticais apresentou três efeitos: **a)** a extensão neurítica foi maior quando comparada com substratos não gliais, **b)** os corpos celulares geralmente permaneceram dissociados, e **c)** os neuritos demonstraram a tendência de não formar fascículos, preferindo a superfície astrocitária que a de outros prolongamentos. Quando semeados sobre substratos não gliais, o crescimento neurítico foi substancialmente reduzido, formando-se agregados de somas e reunião de prolongamentos, originando-se fascículos.

A influência dos astrócitos sobre o crescimento neuronal poderia teoricamente ser devida a interações de superfície celular ou a fatores solúveis (Adler et al., 1981). Entretanto, Noble e colaboradores (1984), demonstraram que neurônios semeados sobre astrócitos, crescendo em meio condicionado por células não gliais ou sobre células não gliais crescendo com meio condicionado por astrócitos, apresentaram crescimento neuronal característico para a monocamada sobre a qual estavam em contato.

Além disso, quando os neurônios cresceram sobre monocamadas de astrócitos mortos por calor, o padrão morfológico foi o mesmo dos que estavam em contato com monocamadas irmãs vivas. Estes autores sugerem a existência de hierarquias de aderência para neurônios no SNC, afirmando que o uso de monocamadas de astrócitos como substrato padrão seria útil no estudo de populações neuronais em culturas de células dissociadas.

Assim, ficou caracterizada a preferência por uma monocamada de astrócitos corticais, para a extensão neurítica, demonstrando que este efeito relaciona-se com moléculas de superfície destas células gliais (Fallon, 1985). Além disso, nestes casos, o meio condicionado por astrócitos não mimetiza o efeito da presença destas células gliais (ver Tab. 4).

Tabela 4. *Extensão neurítica não é afetada pelo meio condicionado*

Fonte do meio condicionado	Tipo de monocamada	Crescimento ($\mu\text{m h}^{-1}$)
Astrócitos	Astrócitos	31 ± 1
Fibroblastos	Astrócitos	33 ± 3
Controle	Astrócitos	34 ± 2
Astrócitos	Fibroblastos	< 5
Fibroblastos	Fibroblastos	< 5
Controle	Fibroblastos	< 5

Extraído de Fallon, 1985.

Desta forma demonstrou-se uma relação de interação do tipo célula-específica, coerente com estudos que demonstram que neurônios são dependentes da matriz extracelular para sobreviver (Ernsberger et al., 1989).

2.2. Astrócitos: Condicionadores do meio de cultura

Há muito tempo atribui-se às células gliais um papel trófico na manutenção neuronal, corroborando esta atribuição, astrócitos suportam o crescimento e a sobrevivência de neurônios *in vitro* (Ferrara et al., 1988; Manthorpe et al., 1989). Estas células gliais liberam constitutivamente no meio de cultura, proteínas com peso molecular maior do que 10 kDa que promovem o crescimento neuronal (Giulian et al., 1993).

Conforme Banker (1980), culturas primárias de astrócitos liberam fatores no meio que promovem o crescimento e prolongam a sobrevivência de neurônios hipocámpais de rato *in vitro*. Estes efeitos neurotróficos, mediados pelo meio condicionado por monocamadas de astrócitos, demonstraram ser reversíveis. Neste caso, quando o meio condicionado foi substituído por meio controle, o número de neurônios com prolongamentos diminuiu rapidamente aos níveis dos controles. O fator promotor de crescimento produzido pelos astrócitos parece ter de estar continuamente presente no meio para ser efetivo. Talvez este não se ligue ao substrato em quantidades suficientes para mediar a extensão neurítica quando o meio condicionado é trocado pelo meio controle. Além disso, o autor propõe o uso do meio condicionado por astrócitos na manutenção de neurônios centrais em culturas desprovidas de células gliais.

Para evitar a excitotoxicidade pelo glutamato presente no soro fetal bovino, Kim & Täuber (1996) expuseram o meio com soro a uma monocamada astrocitária durante 24 h, antes de utilizá-lo nas culturas neuronais, para remoção do aminoácido. Em outro exemplo de neuroproteção mediada pelo meio condicionado, neurônios dopaminérgicos

do mesencéfalo foram protegidos dos efeitos tóxicos da L-dihidroxi-fenil alanina (L-DOPA) por fatores neurotróficos solúveis produzidos pela glia (Mena et al., 1996).

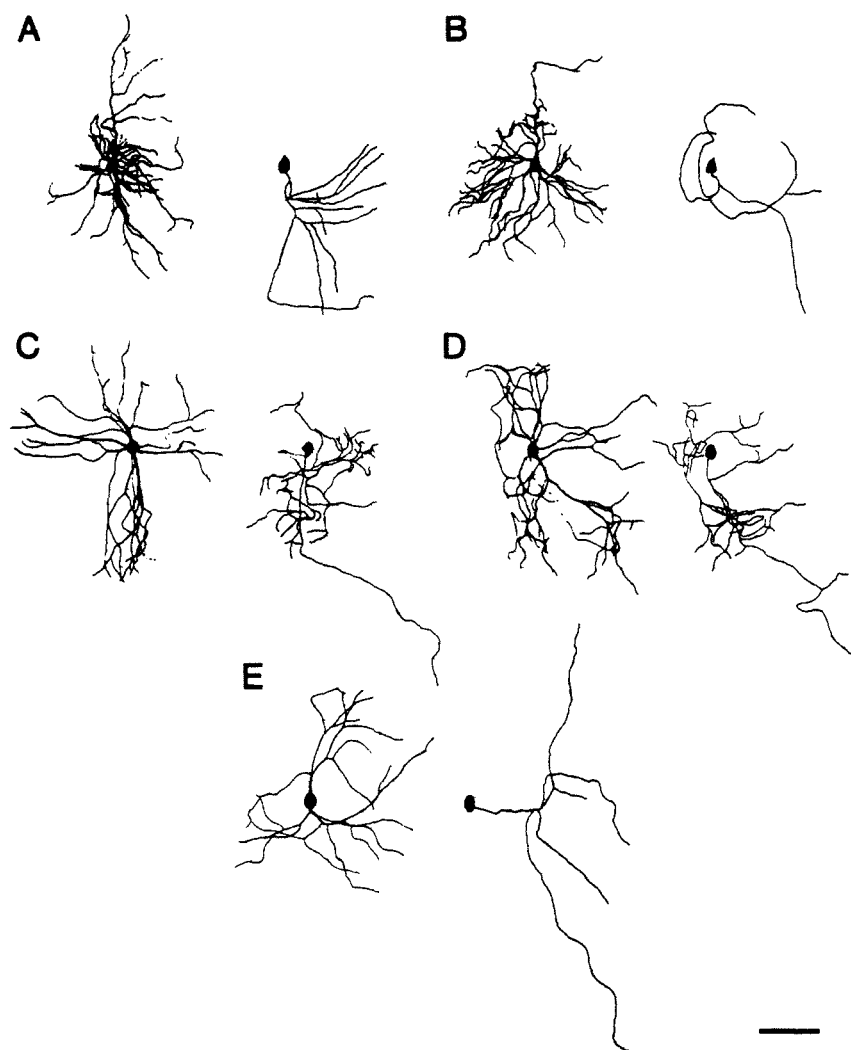
3. Neurônios corticais em cultura

O córtex cerebral é uma estrutura laminar composta de muitos tipos neuronais distintos, os quais podem ser dissociados para estudo *in vitro* (Huettner & Baughman, 1986). A cultura celular é uma técnica útil para o estudo da função e desenvolvimento de células dos sistemas nervoso central e periférico (Fischbach & Nelson, 1977). Em uma preparação de cultura celular, neuroblastos e neurônios indiferenciados são transferidos do ambiente natural para um sistema bi-dimensional com condições controladas. Vários tipos neuronais em cultura, demonstraram as mesmas características morfológicas observadas *in vivo* (Scott et al., 1969; Fischbach, 1970; Dichter, 1978).

Entretanto, a dissociação da estrutura altamente organizada do córtex cerebral torna difícil a identificação dos diferentes tipos morfológicos de neurônios em cultura (Huettner & Baughman, 1986). Neste sentido, Kriegstein & Dichter (1983) propõem uma classificação para comparar a descrição dos neurônios do neocórtex *in situ*, baseados em estudos com a técnica de Golgi. Segundo estes autores, os tipos celulares principais (piramidal, fusiforme e multipolar) podem ser encontrados tanto *in vitro* quanto *in situ*. Sugerem que os três padrões representam tipos celulares distintos, diferenciados dentre diferentes linhas, ainda que no ambiente relativamente desestruturado da cultura (Fig. 1). Estas características morfológicas principais, seriam intrínsecas do desenvolvimento das células, dispensando um meio organizado para a sua expressão. A morfologia dos neurônios do neocórtex que cresceram em cultura

demonstrou que estes desenvolvem dois tipos de prolongamentos, um dendrítico e um axônico (Kriegstein & Dichter, 1983).

Figura 1. *Relação de padrões de ramificação axonal com o tipo neuronal*

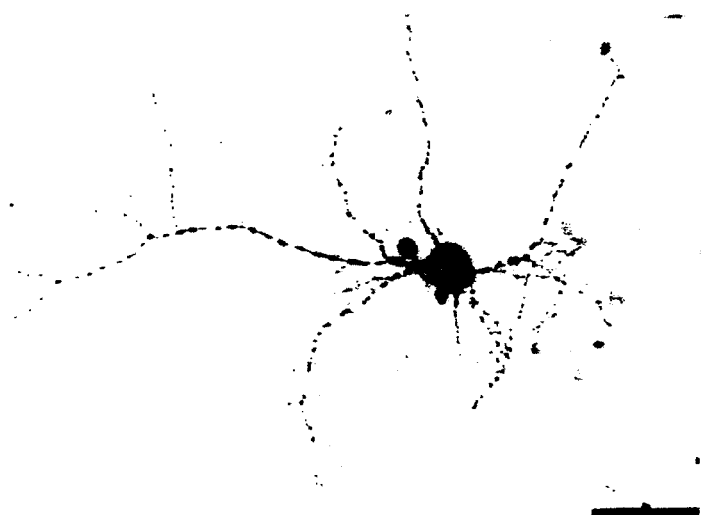


À esquerda são demonstrados esquemas obtidos a partir de fotografias de neurônios corticais preenchidos com *Lúcifer-yellow*; à direita somente os axônios e o soma representados com desenhos de câmara lúcida. **A** e **B** são exemplos de neurônios tipo piramidal com axônios que têm colaterais em arco. **C** e **D**, são grandes neurônios multipolares com prolongamentos axônicos ramificando no campo dendrítico. **E**, exemplo de um grande neurônio fusiforme com um longo axônio, relativamente desprovido de ramificações. Barra 100 μm . Segundo Kriegstein & Dichter, 1983.

Vários trabalhos descrevem que os neurônios corticais em cultura são principalmente GABAérgicos (Dichter, 1980; Nowak et al., 1982; Yu et al., 1984). Nestes tipos de culturas, obtidas de embriões com 14 a 17 dias de gestação, os neurônios passam a demonstrar sensibilidade a injúria mediada por glutamato a partir do 7º dia *in vitro* (Choi et al., 1987; Keilhoff & Erdö, 1991).

Alterações morfológicas que acompanham a morte de neurônios corticais em cultura foram monitoradas eletrofisiológica e visualmente durante a injeção de corante (Kriegstein & Dichter, 1983). Os processos celulares rapidamente desenvolvem varicosidades coincidentemente com a perda do potencial de repouso. Os dendritos finos são mais freqüentemente afetados, mas em uma injúria mais severa, tal como a ruptura da membrana somática, a totalidade dos neuritos desenvolve varicosidades em poucos segundos (Fig. 2).

Figura 2. *Mudança morfológica associada à injúria neuronal*



Um neurônio cortical apresentando processos com aspecto de rosário, segundos após ter sido injetado com corante e lesado com um microeletrodo. Barra 100 μm . Segundo Kriegstein & Dichter, 1983.

Possivelmente os neuritos com aspecto de rosário, observados em alguns neurônios corados com os métodos de Golgi-rápido e Golgi-Kopsch também representem uma resposta similar a injúria (Garey, 1971; Valverde, 1971; LeVay, 1973; Lund, 1973).

4. Injúria neuronal *in vitro*

Estudos de neuroproteção, degeneração e regeneração de neurônios centrais partem de uma descrição dicotômica da situação neuronal, assumindo um estado de vida ou morte. Entretanto, dentro de certos limites pode haver uma oscilação entre estes dois extremos fruto do balanço de determinantes internos e externos. Segundo Isacson (1993), os neurônios subsistem em um equilíbrio dinâmico constantemente influenciado por mudanças fisiológicas extracelulares e mecanismos intracelulares, determinados a responder a estímulos externos enquanto mantém a integridade estrutural.

Insulto, choque e *estresse* são termos utilizados para descrever um dano neuronal reversível, induzido por diferentes fatores e condições, nem sempre associado com alterações morfológicas. Os insultos neuronais reversíveis não são fáceis de ser estudados já que a injúria abaixo de um limite neurotóxico freqüentemente não gera neurodegeneração ou morte. Por outro lado, alterações neuronais devidas a perturbações genéticas ou fisiológicas podem predispor os neurônios a morrer por insultos que normalmente não desencadeariam a morte (Isacson, 1993).

Além dos insultos reversíveis, os neurônios podem ser alvos de diferentes agentes promotores de injúria que conduzem a morte neuronal, tais como excitotoxinas

(Choi et al., 1987), radicais livres (Ikeda et al., 1994), citocinas inflamatórias (McGeer & McGeer, 1995), deprivação de fatores tróficos (Deckwerth & Johnson, 1993), entre outros (Fig. 3). Entretanto, é importante salientar que nem sempre a ação neurotóxica desencadeada por estes ou outros agentes se dá diretamente sobre as células nervosas. Nestes casos, a participação de astrócitos pode desempenhar função significativa.

No contexto neuronal *in situ*, os astrócitos ocupam um papel morfo-funcional essencial. Estas células respondem a uma grande variedade de estímulos causadores de injúria no SNC. Ainda que a maioria das respostas tendam a restabelecer uma condição fisiológica, algumas vezes podem exacerbar ou mesmo provocar novos estímulos promotores de injúria neuronal (Wilkin et al., 1990).

Nos últimos anos, aumentaram os relatos da participação de astrócitos na neurotoxicidade, metabolizando compostos para formas mais tóxicas (por exemplo MPTP a MPP⁺, Di Monte et al., 1992) ou diretamente secretando agentes neurotóxicos (por exemplo radicais livres, Skaper et al., 1995, e aminoácidos excitatórios, Longuemare & Swanson, 1995).

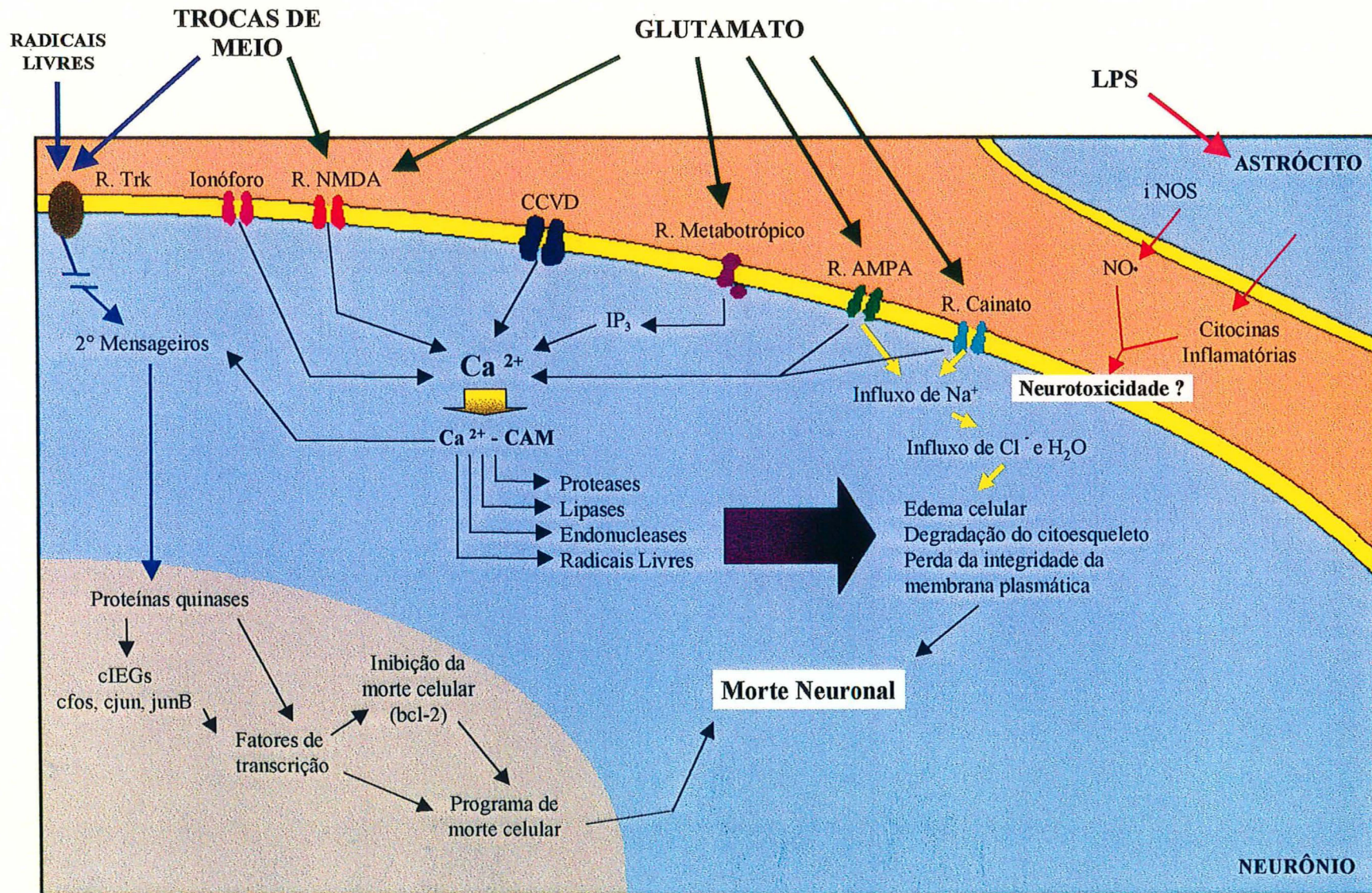
Junto com a micróglia, os astrócitos constituem a chamada glia reativa, que responde a diferentes estímulos liberando citocinas. O papel das citocinas pró-inflamatórias no sistema nervoso relaciona-se com importantes neuropatologias tais como Doença de Parkinson (Bronstein et al., 1995), Doença de Alzheimer (McGeer & McGeer, 1995), esclerose múltipla (Scolding & Lassmann, 1996) e epilepsia (Bock et al., 1996).

Figura 3. *Possíveis mecanismos neurotóxicos em culturas neuronais mistas*

A injúria excitotóxica está diretamente relacionada a ativação dos receptores glutamatérgicos (N-metil-D-aspartato, **NMDA**; Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico, **AMPA**; Cainato e Metabotrópico). A despolarização prolongada pode levar a um influxo de Na^+ , seguido pela entrada passiva de Cl^- e água, provocando edema celular com possível ruptura da célula. Outro componente está essencialmente vinculado a ativação de receptores **NMDA** e a um aumento pronunciado dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Por outro lado, a citotoxicidade também pode ser mediada pela exposição das culturas a um ionóforo de Ca^{2+} que permeia este cátion aumentando seus níveis citosólicos. A estimulação do receptor metabotrópico ativa a enzima fosfolipase C a clivar o fosfatidil-inositol da membrana em trifosfato de inositol (**IP₃**) que mobiliza o Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Outra forma de aumentar os níveis citosólicos deste cátion é através da abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (**CCVD**). O aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} ativa o complexo Ca^{2+} -calmodulina (**Ca²⁺-CAM**) desencadeando a ação de diferentes enzimas que provocam alterações celulares e conduzem à morte neuronal.

Outro agente promotor de injúria neuronal são as trocas de meio de cultura, relacionadas com a ativação de receptores **NMDA** e/ou com a remoção de fatores tróficos que atuam sobre receptores do tipo tirosina quinase (**Tkr**). A nitrificação de resíduos tirosina destes receptores por radicais livres, a remoção de fatores tróficos ou a perda da homeostase do Ca^{2+} , são eventos que podem comprometer vias de transdução de sinal mediadas por fatores tróficos. Estes resultados alteram os níveis e padrões de produtos fosforilados influenciando a expressão de genes precoces imediatos celulares (**cIEGs**) que acionam o programa de morte celular. Este processo pode ser interrompido pelo gene *bcl-2* que suprime a apoptose em vários tipos celulares.

A estimulação de astrócitos com lipopolissacarídeo (**LPS**) promove a expressão da enzima sintetase do óxido nítrico induzível (**iNOS**) acarretando a liberação do radical óxido nítrico (**NO \cdot**) e de citocinas inflamatórias. A partir da ativação de uma via nitridérgica e/ou inflamatória também pode ser desencadeada a neurotoxicidade. Baseado em Vendrell et al., 1993.



Desta forma, hoje sabemos que os astrócitos são células que podem responder de distintas formas, dependendo do estímulo apresentado. E que, direta ou indiretamente, podem estar relacionadas com insultos e injúrias desencadeantes da morte neuronal. Em concordância, vários estudos em co-culturas, demonstram que a estimulação de monocamadas astrocitárias desencadeia injúria e neurotoxicidade (Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Skaper et al., 1995; Kim & Täuber, 1996).

4.1. Estimulação de astrócitos com endotoxina

Há diferentes maneiras de evocar reações em astrócitos. Uma delas é a adição de um componente da parede de bactérias Gram negativas chamado lipopolissacarídeo (LPS). Diferentes modelos utilizam esta endotoxina como um agente estimulador de astrócitos (Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Skaper et al., 1995; Kim & Täuber, 1996).

A LPS parece induzir a expressão da enzima sintetase do óxido nítrico (NOS) em astrócitos e micróglia. Esta enzima converte a L-arginina em citrulina, produzindo o radical livre óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o qual gera nitritos (NO_2^-) como produto final de reações de óxido-redução (Galea et al., 1992; Skaper et al., 1995). Outro mecanismo acionado pela LPS é a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator da necrose tumoral- α ($\text{TNF}\alpha$) e interleucinas 6 e 15 (IL-6, IL15), entre outras (Bronstein et al., 1995; Bock et al., 1996; Lee et al., 1996) (Fig. 3).

4.1.1. Mecanismo nitridérgico

O radical NO \cdot é uma importante molécula envolvida no controle vasomotor, na homeostase vascular e com funções neuronais e imunológicas (Moncada & Higgs, 1993). Trata-se de um mensageiro intracelular com uma ampla variedade de funções, sendo produzido por muitos tipos celulares, incluindo neurônios, astrócitos e micróglia (Moncada et al., 1991; Galea et al., 1992).

Várias isoformas de NOS têm sido purificadas e clonadas molecularmente (Marletta, 1993). A isoforma neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS) são enzimas constitutivas dependentes de cálcio/calmodulina, as quais produzem NO \cdot por curtos períodos de tempo em resposta a ativação de receptor (Garthwaite, 1991; Snyder & Bredt, 1991). No SNC, o NO \cdot produzido pela isoforma nNOS tem vários papéis potenciais, entretanto, quando produzido em excesso, pode desencadear morte neuronal (Dawson & Snyder, 1994). De fato, culturas primárias de neurônios de córtex, hipocampo e caudato-putamen de rato, podem ser protegidas da neurotoxicidade por glutamato através da inibição da NOS (Dawson et al., 1991a; 1993). Neste sentido, há evidências de que o NO \cdot seja um componente da neurotoxicidade mediada pelo glutamato (Dawson et al., 1994).

Outra isoforma desta enzima (iNOS) é induzida por endotoxinas (Simmons & Murphy, 1992) e citocinas (Simmons & Murphy, 1993), em macrófagos e em culturas primárias de astrócitos, sendo também induzida em astrócitos reativos de cérebros lesionados *in vivo* (Wallace & Bisland, 1994), sintetizando NO \cdot por um período mais prolongado de tempo (Murphy et al., 1993). Em adição, culturas primárias de astrócitos

estimuladas com noradrenalina são capazes de liberar NO \cdot (Baltrons et al., 1995), sendo que este efeito não foi observado em culturas de neurônios (Agulló & Garcia, 1992).

Embora tenha sido descrito que os astrócitos apresentam as isoformas constitutiva e induzível, não está definido se ambas coexistem numa mesma célula (Murphy et al., 1993). Além disso, há evidências de que o tipo induzível só é ativado com endotoxina em culturas primárias de astrócitos corticais (Galea et al., 1992). Segundo Galea e colaboradores (1992), culturas secundárias de astrócitos não apresentam NOS induzível devido ao processo de passagem da cultura, no qual estas são purificadas com a depleção de micróglia, sugerindo uma possível participação destas últimas no processo de indução.

Além das culturas de astrócitos corticais, a NOS pode ser induzida em glioma C6 de rato (Galea et al., 1992; Simmons & Murphy, 1992). A estimulação de culturas de astrócitos com LPS induz atividade NOS dose-dependente, determinada pelo acúmulo de NO $_2^-$ no meio (Galea et al., 1992). Por outro lado, a injeção periférica de LPS provoca uma expressão moderada de mRNA da NOS induzível (Lowenstein et al., 1992) ou mesmo nenhuma atividade (Salter et al., 1991). Enquanto há um consenso de que a exposição de astrócitos à LPS induz a NOS em culturas primárias, experimentos com glioma C6 sugerem que só a LPS não é um estímulo suficiente para a indução (Galea et al., 1992).

Uma vez formado, o NO \cdot atravessa facilmente a membrana plasmática, devido a sua natureza lipossolúvel (Beckman, 1991). Em solução aquosa, em baixas

concentrações, é muito menos reativo que o esperado (Beckman et al., 1994), não produzindo lipoperoxidação *per se*. Entretanto, passa a ter efeitos pró-oxidantes após sua reação com o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Rubbo et al., 1994).

O radical ânion $O_2^{\cdot-}$, sub-produto da ação de várias enzimas do sistema nervoso central, é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 . O $NO\cdot$ pode competir com esta enzima pelo radical $O_2^{\cdot-}$ produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual se decompõe nos radicais livres hidroxila e dióxido de nitrogênio, altamente tóxicos e reativos (Beckman et al., 1990; Radi et al., 1991 a, b). Além disso, o ânion $ONOO^-$ também pode ser decomposto em um agente altamente nitrificante com a reatividade do íon nitrônio (NO_2^+), que modifica resíduos de tirosina em nitrotirosina (Beckman et al., 1992; Ischiropoulos et al., 1992). Esta reação de nitração é catalizada por metais de transição, incluindo os metais do sítio ativo da SOD (Ischiropoulos et al., 1992). Uma vez que a nitrotirosina não pode mais ser fosforilada por tirosina quinases (Martin et al., 1990), o ânion $ONOO^-$ pode comprometer vias de transdução de sinais que envolvem a maioria dos fatores tróficos, as quais são mediadas em parte por estas enzimas (Estévez et al., 1995; Fantl et al., 1993).

A endotoxina LPS induz culturas primárias de astrócitos a promover a morte neuronal quando em co-cultura com células granulosas cerebelares (Skaper et al., 1995), neurônios corticais (Dawson et al., 1994) e mesencefálicos (Bronstein et al., 1995), através da estimulação da NOS induzível, provavelmente pela produção de $NO\cdot$ e de óxidos de nitrogênio reativos (Fig. 3). Esta neurotoxicidade é prevenida por inibidores da NOS e pela adição de SOD (Skaper et al., 1995). Coerentemente, o $NO\cdot$ pode

provocar apoptose quando adicionado extracelularmente (Albina et al., 1993), bem como o ânion ONOO^- (Estévez et al., 1995). Em adição, células que sofrem apoptose por outros estímulos fisiológicos, podem produzir concentrações tóxicas de NO^\bullet (Albina et al., 1993; Cui et al., 1994). Entretanto, alguns autores não observaram neurotoxicidade induzida pelo NO^\bullet em culturas de neurônios corticais (Lipton et al., 1993; Demerle-Pallardy et al., 1993) e de células granulosas cerebelares (Lafon-Cazal et al., 1993).

Há um consenso de que a LPS não é neurotóxica em culturas neuronais puras (Bronstein et al., 1995; Bock et al., 1996). Entretanto, em co-culturas (neurônios e glia), não existe absoluta coincidência nos resultados (Lipton et al., 1993; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Meda et al., 1995; Skaper et al., 1995).

Além da LPS, obtida da parede de bactérias Gram-negativas, produtos de bactérias Gram-positivas também causam toxicidade em neurônios quando em co-culturas com astrócitos, pela indução da produção de NO^\bullet (Kim & Täuber, 1996).

Citocinas tais como a interleucina- 1β (IL- 1β), interferon- γ (IFN- γ) e TNF- α podem mediar a indução da NOS a partir da estimulação com LPS (Murphy et al., 1993). Esta indução promovida pelo TNF α em astrócitos e micróglia pode ser demonstrada pela atividade NADPH-diaforase (Bock et al., 1996) já que atividade desta enzima demonstrou estar co-localizada com a da NOS no cérebro e tecidos periféricos (Dawson et al., 1991b; Wallace & Bisland, 1994).

4.1.2. Mecanismo inflamatório

Neurônios e glia reativa (astrócitos e micróglia) são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias (Tchelingerian et al., 1994; Sawada et al., 1989). Dentre estas, IL-1 β , IFN- γ , TNF α e IL-6 liberadas por astrócitos e micróglia. Estas parecem estar envolvidas na patogênese de várias doenças neurodegenerativas e inflamatórias (Bock et al., 1996; Dickson et al., 1993; Griffin et al., 1989; Lee et al., 1996; Walker et al., 1995). Em adição, a IL-15, que também é expressa em cultura de astrócitos, poderia iniciar respostas imunes mediadas pelas células T em neuropatologias humanas tais como esclerose múltipla, substituindo a IL-2 no SNC (Lee et al., 1996). As próprias citocinas pró-inflamatórias além do LPS, podem aumentar a expressão de IL-15 em culturas de astrócitos e micróglia (Lee et al., 1996). Da mesma forma, TNF α induz a liberação de IL-6 pelos astrócitos (Sawada et al., 1992).

A produção de TNF α está correlacionada com a morte neuronal resultante de injúria excitotóxica. Este fator pode evocar respostas gliais prejudiciais para os neurônios em co-cultura (Barger et al., 1995), induzindo reatividade em astrócitos (Mallat & Chamak, 1994). O *status epilepticus* induz a liberação de TNF α e IL-6 no hipocampo, e uma alta dose de glutamato (10 mM) provoca uma liberação ainda maior, equivalente à induzida por LPS *in vitro* (Bock, et al., 1996). Nestas condições, o mecanismo de captação de glutamato pelos astrócitos é sobrepujado, sendo citotóxico para estas células gliais (Noble et al., 1992).

Entretanto, não há um consenso sobre a neurotoxicidade mediada pelo TNF α , pois a LPS é capaz de induzir uma liberação massiva de TNF α sem provocar morte

neuronal significativa (Bock et al., 1996). Por outro lado, o TNF α poderia ser benéfico à viabilidade neuronal por aumentar a expressão da mangânês-SOD nestas células (Mokuno et al., 1994).

Vários autores utilizam a endotoxina LPS para desencadear uma resposta de tipo inflamatório, evocando a liberação de citocinas nas culturas (Bock et al., 1996; Chung & Benveniste, 1990; Lee et al., 1996; Lieberman et al., 1989; Skaper et al., 1995) (Fig. 3).

4.2. Uso de excitotoxinas

Os aminoácidos glutamato e aspartato são os neurotransmissores excitatórios mais importantes do SNC de mamíferos, sendo utilizados por todas as eferências do córtex cerebral, pelos principais circuitos hipocâmpais e eferências do córtex cerebelar (Fonnum, 1988). Estes aminoácidos atuam mediante a ativação de diferentes receptores para o glutamato designados pelo nome de seus principais agonistas (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propiónico, AMPA; Cainato, NMDA e ácido trans-1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxílico, trans-ACPD) (Olney, 1994). As vias excitatórias atuam através de receptores ionotrópicos (AMPA, Cainato, NMDA) e de um receptor metabotrópico (trans-ACPD) acoplado a sistemas de segundo mensageiros, intervindo na manutenção da atividade nervosa central e nos automatismos motores, além de fenômenos plásticos vinculados a aprendizagem e memória (Collingridge & Lester, 1989; Honore, 1989).

Outro aspecto de interesse é a participação dos sistemas de aminoácidos excitatórios na gênese de diversos quadros neurológicos tais como epilepsia, encefalopatias isquêmicas, demência de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, etc (Dingledine et al., 1990; Grace, 1991; Olney, 1989). Nestas patologias, pode-se constatar diferentes graus de degeneração neuronal, com um quadro anatômico similar ao produzido em condições experimentais por excitotoxinas. Estas lesões, denominadas de tipo excitotóxico (Olney, 1989; Schwarcz & Meldrum, 1985), caracterizam-se pela degeneração de neurônios em áreas com alta incidência de receptores para aminoácidos excitatórios e pela preservação de axônios de passagem e células gliais (Olney, 1989). Segundo a “teoria das excitotoxinas endógenas”, o dano neuronal observado em casos de anoxia, isquemia, hipoglicemia e outras injúrias do SNC, deve-se (pelo menos em parte) a um excesso de glutamato liberado (Olney, 1989).

A neurotoxicidade mediada pelo aminoácido excitatório glutamato, postulada como participante da patogênese de várias doenças neurodegenerativas, foi demonstrada em culturas de neurônios corticais (Choi et al., 1987). Desde então este neurotransmissor e seus agonistas têm sido utilizados para promover injúria e morte neuronal em estudos de excitotoxicidade (Olney, 1994), já que este dano em cultura de neurônios demonstrou ser mediado por receptores do tipo NMDA e não-NMDA (Frandsen et al., 1989) (Fig. 3).

Nos estudos *in vitro*, os neurônios corticais tornam-se inchados segundos após serem expostos ao glutamato, demonstrando sinais morfológicos de injúria que evolui à morte em poucas horas. Estes sinais de excitotoxicidade são observados a partir do

início da segunda semana da cultura, provavelmente devido a falta de receptores glutamatérgicos na membrana de neurônios imaturos (Choi et al., 1987). De fato, neurônios corticais obtidos de embriões de rato com 16 a 18 dias de gestação, começam a morrer devido a exposição ao glutamato, NMDA, quisqualato ou cainato a partir do 7º DIV. Nestes casos, a sensibilidade as neurotoxinas aumenta rapidamente, de forma similar, durante a segunda semana, permanecendo inalterada acima do 21º DIV (Keilhoff & Erdö, 1991). Outro componente importante para a sensibilidade ao glutamato é a proporção de astrócitos presentes nas culturas. A vulnerabilidade de neurônios corticais a esta excitotoxina aumenta até cem vezes em culturas pobres em astrócitos (Rosenberg & Aizenman, 1989).

São reconhecidos dois tipos de respostas fisiopatológicas diretamente vinculadas à injúria excitotóxica, que podem transcorrer simultaneamente ou não, e que diferem por seus mecanismos moleculares, curso temporal e potencial citotóxico. Por um lado, a despolarização prolongada leva a um acúmulo de Na^+ intracelular, seguido por um influxo passivo de Cl^- e água que conduz ao edema celular, acarretando a ruptura da célula. Este componente da excitotoxicidade denomina-se neurodegeneração precoce (Rothman, 1985; Olney, 1989). O segundo componente denomina-se neurodegeneração tardia (Rothman et al., 1987; Choi et al., 1987) estando essencialmente vinculado a ativação de receptores NMDA (Rothman et al., 1987; Choi et al., 1988), e ao aumento prolongado dos níveis de Ca^{2+} intracitoplasmáticos (Manev et al., 1989; Glaum et al., 1990). A ativação deste receptor ionotrópico abre um canal de Ca^{2+} de alta condutância (MacDermott et al., 1986), cuja excessiva estimulação leva a morte neuronal, sendo que os receptores AMPA/Cainato facilitam a ativação NMDA através da despolarização

inicial da membrana (Fig. 3). Por outro lado, o bloqueio farmacológico de receptores de glutamato e/ou a remoção do Ca^{2+} extracelular, antes ou depois da exposição ao glutamato, resulta na proteção frente ao dano excitotóxico (Choi et al., 1988; Manev et al., 1989; Rothman et al., 1987).

De acordo com estes resultados, a morte neuronal seria a consequência da ativação de proteases, lipases, nucleases e outras enzimas, em decorrência de um “sinal cálcico” anormalmente prolongado (Choi & Rothman, 1990) (Fig. 3). Tem-se demonstrado que a sensibilidade neuronal à excitotoxicidade é inversamente proporcional à capacidade neuronal para tamponar a concentração intracitoplasmática de Ca^{2+} (Marcoux et al., 1988; Choi & Rothman, 1990).

Além disso, sabe-se que a ativação dos receptores ionotrópicos do glutamato é um dos principais efetores de *estresse* oxidativo no cérebro (Coyle & Puttfarcken, 1993). Dawson e colaboradores (1991a; 1993) demonstraram que a inibição da NOS reduz a morte de neurônios corticais em cultura expostos a altas concentrações de NMDA ou glutamato, mas não cainato. A estimulação excessiva da nNOS decorrente do influxo de Ca^{2+} induzido por NMDA é uma explicação atraente para a excitotoxicidade dependente da concentração extracelular deste íon (Choi, 1985).

Entretanto, além do envolvimento da nNOS, outro mecanismo decorrente da estimulação por NMDA pode promover a morte neuronal. Após a ativação da NOS induzível de astrócitos através de $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN-}\gamma$, a toxicidade do NMDA (mas não do cainato), é potenciada em culturas de neurônios corticais. Este aumento seletivo da

neurotoxicidade por NMDA pode ser bloqueada pela inibição da NOS ou por antioxidantes, e mimetizada com o uso de geradores de NO \cdot ou de espécies reativas do oxigênio. Estes resultados sugerem que a produção de NO \cdot pelos astrócitos possa contribuir para a morte neuronal mediada pelo receptor NMDA, talvez através da interação com radicais do oxigênio (Hewett et al., 1994).

4.3. Aumento do cálcio citosólico

Existem evidências convincentes de que o Ca $^{2+}$ tem um papel crítico na morte celular no SNC (Dreyer et al., 1990; Komulainen & Bondy, 1988; Stys et al., 1990). O aumento intracelular deste cátion pode disparar tanto morte necrótica quanto apoptótica, enquanto a prevenção deste aumento com quelantes de Ca $^{2+}$, antagonistas de receptores ou bloqueadores de canal podem resgatar células que de outra forma morreriam. De forma similar, células que expressam altos níveis de proteínas ligantes ao Ca $^{2+}$ (por exemplo a calbindina-D28K) parecem ser mais resistentes à morte causada pelo aumento deste íon (Orrenius & Nicotera, 1994).

A excitotoxicidade mediada pela excessiva estimulação de receptores para glutamato contribui com a injúria em várias condições patológicas (Choi, 1992), através do subsequente aumento intracelular de Ca $^{2+}$ (Manev et al., 1990). Resultados obtidos com culturas de neurônios (Choi, 1987; Mattson et al., 1988) e *in vivo* (Siesjo et al., 1989) indicam que o influxo de Ca $^{2+}$ causado pelo glutamato provoca dano excitotóxico e morte neuronal (Dubinsky & Rothman, 1991) (Fig. 3).

O receptor NMDA é provavelmente o principal meio de entrada deste cátion numa situação isquêmica/excitotóxica (Cheng & Mattson, 1992), embora este influxo também possa ocorrer através de receptores não-NMDA (Gibbons et al., 1993) e de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Mattson et al., 1988). Além disso, a redução na disponibilidade de glicose resulta na depleção de adenosina tri-fosfato, falha nos sistemas de tamponamento/extrusão de Ca^{2+} , despolarização da membrana, liberação excessiva de glutamato e ativação do receptor NMDA, acarretando um aumento neurotóxico na concentração intracitoplasmática de Ca^{2+} (Mattson et al., 1993).

A presença da proteína β amilóide, a qual se acumula na doença de Alzheimer, também relaciona a concentração de Ca^{2+} com a neurotoxicidade. Esta proteína potencia a degeneração excitotóxica ao formar canais para este cátion na bicapa lipídica (Arispe et al., 1993). Da mesma forma, a exposição de culturas de astrócitos ao ionóforo de Ca^{2+} A23187, provoca citotoxicidade nestas células gliais (Choi et al., 1987). Este último efeito não chega a ser surpreendente uma vez que os ionóforos foram purificados a partir de toxinas bacterianas com atividade citolítica (Pressman, 1976).

O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracitoplasmático pode causar neurodegeneração através da ativação de enzimas de degradação (fosfolipases, proteases e endonucleases), da disfunção mitocondrial ou da desorganização do citoesqueleto (Lee et al., 1991; Orrenius & Nicotera, 1994; Saito et al., 1993). Outro mecanismo potencial para a neurotoxicidade mediada pelo Ca^{2+} é através da produção de $\text{NO}\cdot$ pela nNOS (Dawson et al., 1991a). O aumento na concentração intracitoplasmática deste íon

também está relacionada com a produção de radicais livres no SNC (Jesberger & Richardson, 1991) (Fig. 3).

Em alguns casos, as flutuações no níveis de Ca^{2+} podem amplificar um insulto tóxico e resultar na morte celular. Alternativamente, a homeostase pode ser restabelecida e a morte celular desviada (Dubinsky, 1993).

4.4. Trocas de meio de cultura

Neurônios *in vitro* demonstram grande dependência de substrato astrocitário (Fallon, 1985; Noble et al., 1984) ou do meio condicionado por estas células gliais (Banker, 1980; Ferrara et al., 1988; Giulian et al., 1993; Manthorpe et al., 1989), para a expressão de suas características fenotípicas e sobrevivência em cultura.

Vários autores mencionam que a troca de meio de cultura promove injúria e diminuição da viabilidade neuronal (Banker, 1980; Driscoll et al., 1991; Rosenberg & Aizenman, 1989; Yu et al., 1984). Este efeito neurotóxico mediado pela substituição do entorno líquido neuronal parece ser devido a remoção de fatores tróficos (Banker, 1980) ou ativação de receptores NMDA (Driscoll et al., 1991) (Fig. 3).

5. Neuroproteção *in vitro*

Dependendo do seu modo de ação, agentes neuroprotetores não somente diferem com respeito a suas janelas terapêuticas mas também com respeito a qualidade de proteção que conferem. Além de ter uma ampla janela terapêutica, um agente neuroprotetor ideal atuaria prevenindo a morte, bloqueando a progressão das mudanças

degenerativas e, em adição, iniciando eventos tróficos que reparariam as conseqüências dos insultos (Deckwerth & Johnson, 1993).

Para exemplificar esta situação, pode-se considerar o efeito da deprivação de NGF sobre neurônios simpáticos. Estes dependem de NGF para sobreviver, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e morrem caso este fator trófico seja removido. Nesta situação em cultura, estas células apresentam somas redondos e refringentes, com muitos neuritos finos e lisos. Três dias após a deprivação de NGF, a maioria dos corpos neuronais perde a refringência e o aspecto arredondado, ocorrendo a desintegração neurítica. Entretanto, a morte destes neurônios pode ser evitada com a adição de NGF, elevada concentração de K^+ ou 8-(4-clorofenil-tio)-3': 5'- monofosfato de adenosina cíclico (CPT-cAMP) (Edwards et al., 1991). Da mesma forma, Martin e colaboradores (1988) demonstraram que inibidores da síntese proteica, também podem prevenir a morte de neurônios simpáticos deprivados de NGF.

Assim, para os neurônios simpáticos deprivados deste fator trófico, o NGF, a elevada concentração de K^+ e o CPT-cAMP são neuroprotetores ideais *in vitro*, ao contrário dos inibidores da síntese proteica, que apesar de reverterem a degeneração e a morte, não provém um suporte trófico. De fato, a ação neuroprotetora destes últimos é incompatível com uma verdadeira promoção duradoura de sobrevivência, já que inibem a totalidade da síntese protéica celular, imprescindível para a sobrevivência (Deckwerth & Johnson, 1993).

Enquanto a ação do CPT-cAMP atua mimetizando níveis citoplasmáticos elevados de cAMP (Edwards et al., 1991; Rydel & Greene, 1988; Martin et al., 1992), o íon K^+ aumenta moderadamente a concentração intracitoplasmática de Ca^{2+} livre (Koike et al., 1989). Neste sentido, o aumento citosólico deste cátion, antes abordado como promotor de neurotoxicidade, pode também ser um elemento chave na neuroproteção.

Há vários exemplos que relacionam o nível citosólico de Ca^{2+} com a neuroproteção. Um deles demonstra que o aumento intracitoplasmático deste íon, subsequente a ativação do receptor metabotrópico com trans-ACPD, tem um efeito protetor sobre a toxicidade induzida por NMDA (Koh et al., 1991; Rothman et al., 1991; Schoepp et al., 1991). Por outro lado, a redução deste íon pode provocar injúria neuronal. Este é o caso da carbamazepina que induz a morte apoptótica em neurônios cerebelares, ao evitar a entrada de Ca^{2+} por canais NMDA. Nesta situação, a administração de NMDA apresenta ação neuroprotetora, provavelmente ao diminuir a restrição de Ca^{2+} mediada pela carbamazepina (Gao et al., 1995) (Fig. 4).

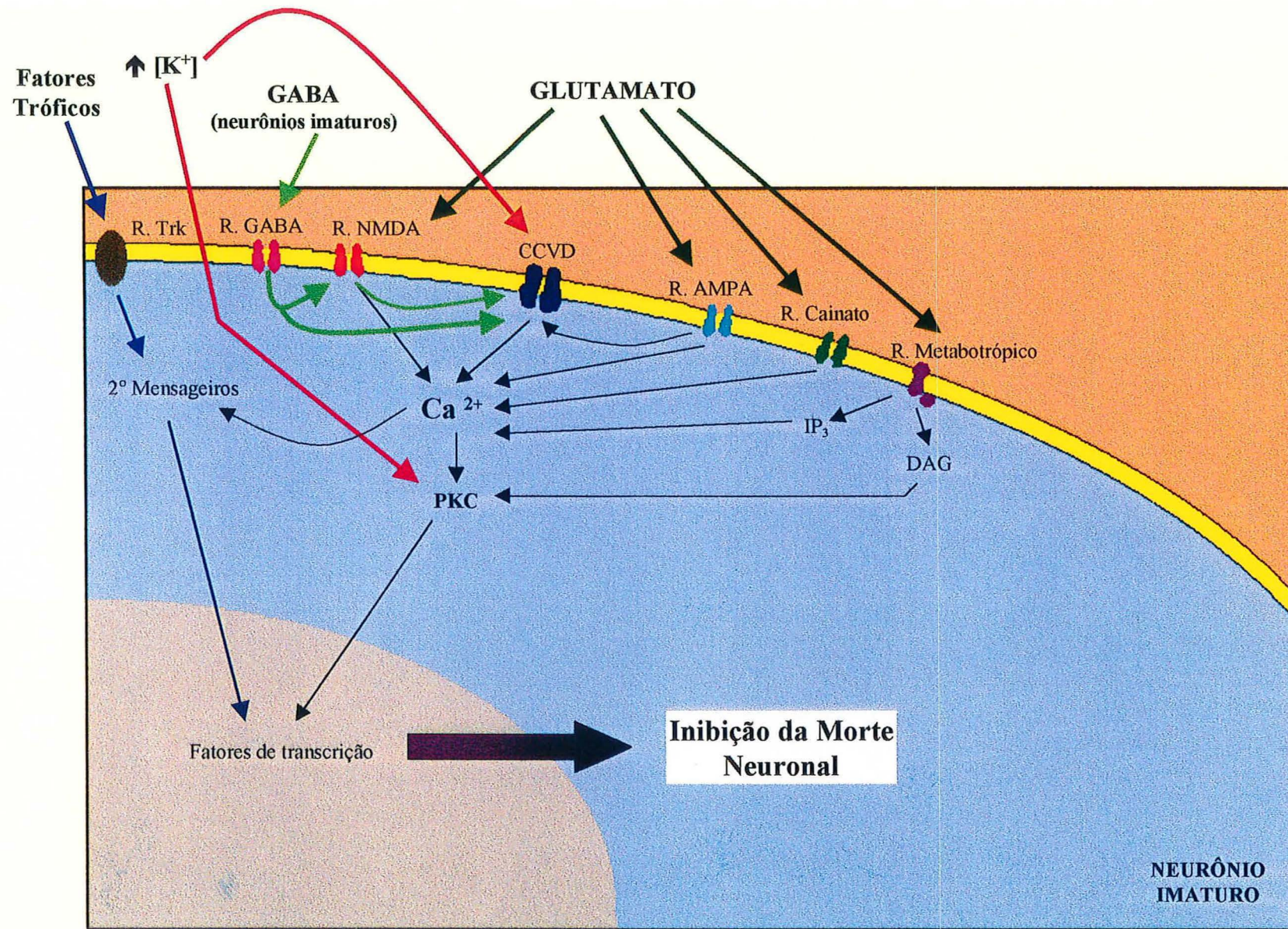
As células cerebelares *in vitro*, desenvolvem exigências para a sobrevivência que incluem a despolarização crônica com elevadas concentrações de K^+ extracelular (Gallo et al., 1987) ou a estimulação de receptores ionotrópicos para o glutamato (NMDA, Balázs et al., 1988; Cainato, Balázs et al., 1990; e AMPA, Hack & Balázs, 1994). Em ambas situações, o consequente aumento da sobrevivência é mediado pelo influxo de Ca^{2+} (Balázs et al., 1988), sendo crítica a ativação da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (Hack et al., 1993) (Fig. 4).

Figura 4. Mecanismo de ação de alguns agentes neuroprotetores in vitro

Neurônios imaturos são altamente dependentes de fatores neurotróficos, os quais mantêm sob controle eventos regressivos que desencadeiam a morte neuronal, atuando em receptores tirosina quinases (**Trk**).

A elevada concentração extracelular de potássio ($\uparrow [K^+]$) mimetiza a ação de fatores tróficos em diferentes tipos neuronais ao aumentar os níveis citosólicos de Ca^{2+} . Este efeito neurotrófico pode advir da abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (**CCVD**), da ativação de receptores ionotrópicos (**N**-metil-D-aspartato, **NMDA**; Cainato e Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico, **AMPA**) ou do receptor metabotrópico. A estimulação deste último receptor mobiliza o Ca^{2+} do retículo endoplasmático através da produção de trifosfato de inositol (**IP₃**). Outra consequência da estimulação deste receptor é a formação do diacilglicerol (**DAG**) que ativa (assim como a $\uparrow [K^+]$) a proteína quinase C (**PKC**) na cascata neurotrófica. A **PKC** também pode ser ativada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina (**Ca²⁺-CAM**), a partir do aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} .

Em culturas de neurônios corticais imaturos, além do influxo de Ca^{2+} mediado pela ativação de receptores glutamatérgicos, o ácido γ -aminobutírico (**GABA**) aumenta os níveis citosólicos deste cátion através da abertura de **CCVD**, exercendo um efeito neurotrófico.



Nestes casos, o tratamento com K^+ ou aminoácidos excitatórios *in vitro*, parece mimetizar o efeito da inervação das fibras musgosas glutamatérgicas sobre as células granulosas *in vivo* (Balázs et al., 1988).

5.1. Dependência de fatores tróficos

Depois da divisão terminal do neuroblasto, o neurônio pós-mitótico se diferencia e estabelece conexões funcionais com o alvo. A teoria neurotrófica propõe que durante este período crítico do desenvolvimento, a sobrevivência dos neurônios é ativamente regulada por fatores tróficos produzidos em pequenas quantidades pelos tecidos alvos (Levi-Montalcini, 1987; Barde, 1989). O acesso insuficiente aos fatores tróficos causa degeneração e subsequente morte do neurônio dependente. A morte neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso é observada em diferentes regiões, sendo em algumas delas muito pronunciada (Oppenheim, 1991).

Da mesma forma, diferentes tipos de neurônios embrionários ou de neonatos, morrem *in vitro* ainda que o meio de cultura e o substrato permitam a adesão celular e o crescimento neurítico. Presume-se que a morte que sucede a remoção do organismo seja devida a deprivação de fatores tróficos normalmente fornecidos no tecido íntegro. Entretanto, a deprivação de atividade elétrica pode também contribuir para este tipo de morte, uma vez que os neurônios sobrevivem em cultura se a concentração de K^+ no meio é aumentada o suficiente para despolarizá-los (Collins & Lile, 1989).

A ação de diferentes agentes como, hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento sobre receptores de membrana específicos está associada a formação de

trifosfato de inositol e diacilglicerol. Este último, junto com o Ca^{2+} , ativa a PKC (Takai et al., 1979), embora esta enzima também possa ser ativada diretamente por agentes farmacológicos tais como ésters de forbol (Castagna et al., 1982; Niedel et al., 1983), os quais têm efeito sobre o crescimento e desenvolvimento neuronal (Spinelli et al., 1982; Hsu, 1985). Em um meio de cultura sem soro, foi descrito que o éster de forbol e a elevada concentração de K^+ têm ação neurotrófica para neurônios simpáticos, e que esta é mediada provavelmente pela PKC (Wakade et al., 1988) (Fig. 4).

As similaridades com respeito ao curso temporal da degeneração e da morte induzida por privação de fatores neurotróficos, doenças neurodegenerativas e morte neuronal tardia sugere que a idéia de uma cascata de eventos degenerativos que conduzem à morte pode ser um princípio fundamental comum na neurodegeneração. Isto não quer dizer que detalhes moleculares fundamentais da morte induzida por privação de fatores neurotróficos, doenças neurodegenerativas e morte neuronal tardia sejam idênticos. Entretanto, aumentam as evidências que sugerem que fatores neurotróficos atuem como agentes neuroprotetores em todos estes paradigmas de morte neuronal (Deckwerth & Johnson, 1993).

De fato, a regulação diferencial da expressão de sub-unidades específicas de receptores para o glutamato pode ser um importante mecanismo através do qual fatores neurotróficos modulam a plasticidade neuronal dependente de atividade e a vulnerabilidade à excitotoxicidade (Cheng et al., 1995).

5.2. Efeito da alta concentração de potássio

Elevados níveis de K^+ (20-40 mM) aumentam a sobrevivência de diferentes tipos neuronais em cultura. Entre alguns exemplos encontram-se trabalhos que descrevem este efeito com motoneurônios gigantes de moluscos (Kostenko et al., 1982), neurônios dos gânglios da raiz dorsal (Scott, 1977; Collins & Lile, 1989), de gânglios simpáticos (Wakade & Thoenen, 1984; Collins & Lile, 1989) e parasimpáticos (Bennett & White, 1979; Collins & Lile, 1989), além de neurônios centrais do cerebelo (Lasher & Zagon, 1972; Gallo et al., 1987). Em adição, altas concentrações de K^+ mantêm a sobrevivência de neurônios periféricos (Scott & Fisher, 1970), atingindo a mesma subpopulação sobre a qual atua o NGF (Wakade & Thoenen, 1984) (Fig. 4).

Elevados níveis de K^+ causam um aumento de Ca^{2+} intracelular acima dos níveis de repouso em neurônios simpáticos (Thayer et al., 1987). Mais precisamente, a promoção da sobrevivência neuronal mediada pelo K^+ é dependente da abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L numa variedade de diferentes tipos de neurônios (Collins & Lile, 1989).

Segundo Collins & Lile (1989), o K^+ promove a sobrevivência neuronal através da despolarização e do resultante influxo de Ca^{2+} extracelular (Fig. 4). Entretanto, estes autores também mencionam a aparente contradição destes resultados com a neurotoxicidade mediada pela entrada de Ca^{2+} extracelular através de canais NMDA. Assinalam que a ativação de canais dependentes de voltagem com concentrações de K^+ descritas como promotoras de sobrevivência, conduzem a níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} iguais ou superiores aos obtidos através da estimulação de receptores NMDA com doses

tóxicas de glutamato. De fato, a morte de neurônios sensíveis ao glutamato não ocorre mesmo com concentrações de K^+ suficientes para abrir canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, que elevam o Ca^{2+} intracelular a um nível similar ao obtido com concentrações excitotóxicas deste neurotransmissor (Rothman et al., 1987). Assim, a entrada de Ca^{2+} através de canais voltagem dependentes não é suficiente nem necessária, para promover a maior parte da injúria neuronal induzida por glutamato (Choi, 1988).

Existem outros exemplos nos quais os canais para o influxo de Ca^{2+} , parecem determinar seu efeito intracelular. Em um deles, o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo N inibe a liberação de norepinefrina em neurônios simpáticos, enquanto que a intervenção sobre os de tipo L não provoca qualquer resultado sobre a liberação deste transmissor (Hirning et al., 1988). Ainda, em experimentos com elevadas concentrações de K^+ , onde foi utilizado um bloqueador específico para canais de tipo L (di-hidropiridina), um significativo influxo de Ca^{2+} ocorreu através de canais do tipo N. Entretanto, o aumento de Ca^{2+} mediado por estes canais, foi insuficiente para promover a sobrevivência neuronal (Collins & Lile, 1989). Estes autores concluem que a manutenção e a sobrevivência neuronal, podem ser uma das funções especializadas dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L.

5.3. Níveis de cálcio e canais do tipo L

A forma através da qual o influxo de Ca^{2+} promove a sobrevivência neuronal é desconhecida. Uma possibilidade é que provoque a liberação por parte dos neurônios, de um fator autócrino que promova a sobrevivência dos mesmos (Collins & Lile, 1989). Em outros modelos *in vitro*, a sobrevivência neuronal dependente de atividade elétrica tem

sido correlacionada com a liberação de fatores tróficos através de despolarização (Brenneman & Eiden, 1986; Lipton, 1986). Outra possibilidade seria a ativação de sistemas de segundo mensageiros através da associação cálcio-calmodulina (Gallo et al., 1987).

Segundo Koike e colaboradores (1989), a proteção conferida pelo alto K^+ pode ser abolida pela remoção do Ca^{2+} extracelular ou pelo uso de um quelante citoplasmático deste cátion. Estes autores demonstraram que o influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo L, protege neurônios simpáticos em cultura da morte induzida por deprivação de fatores tróficos. Além disso, a relação destes canais com a sobrevivência neuronal também foi verificada em culturas de neurônios cerebelares. Neste caso, o antagonista de canais de Ca^{2+} do tipo L, nifedipina, reverte a influência trófica da estimulação com AMPA/quisqualato (Hack & Balázs, 1994).

O nível citoplasmático de Ca^{2+} , parece determinar o grau de dependência de fatores tróficos nestes neurônios. Para Koike e colaboradores (1989), há três níveis de Ca^{2+} interno relacionados com a sobrevivência neuronal. Um nível baixo, em que o neurônio encontra-se em risco devido a aumentada dependência de fatores tróficos externos, um nível ótimo intermediário no qual a sobrevivência neuronal é independente de fatores tróficos, e um nível elevado que é neurotóxico. Para neurônios imaturos, muito dependentes de trofismo externo (no caso de neurônios simpáticos do NGF), o K^+ pode prevenir a morte neuronal resultante da deprivação trófica, aumentando o nível de Ca^{2+} intracitoplasmático e levando os neurônios a um estado independente de fatores tróficos, suprimindo o mecanismo ativo que pode destruí-los (Martin et al., 1988).

Koike e colaboradores (1989) propuseram uma hipótese que poderia fundamentar a diminuição da dependência de fatores tróficos em função da idade e da inervação neuronal. Segundo estes autores, neurônios imaturos, os quais são agudamente dependentes de fatores tróficos, têm níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} livre mais baixos que neurônios maduros, relativamente menos dependentes. A aferência e a atividade elétrica associada, a qual é um importante fator na determinação da sobrevivência neuronal em alguns sistemas, poderia também, operar *in vitro*, via um mecanismo análogo ao do meio com elevada concentração de K^+ . Assim, estímulos excitatórios poderiam elevar níveis de Ca^{2+} intracelular e reduzir a dependência do neurônio em desenvolvimento de fatores tróficos derivados do alvo.

Collins e colaboradores (1991) demonstraram uma forte correlação quantitativa entre a percentagem de sobrevivência de neurônios do gânglio ciliar em cultura e a concentração intracelular de Ca^{2+} mediada por altas concentrações extracelulares de K^+ . Os autores sugerem que as elevadas concentrações de K^+ abrem canais de Ca^{2+} sensíveis a di-hidropiridinas, causando um aumento prolongado na concentração intracelular de Ca^{2+} que determina quantitativamente o número de neurônios sobreviventes (Fig. 4).

Outra evidência da relação entre o nível de Ca^{2+} intracelular e a dependência de fatores tróficos foi demonstrada por Eichler e colaboradores (1992) em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Estes autores demonstraram que a dependência trófica é inversamente proporcional aos níveis intracelulares deste íon. Em adição, propõem a possibilidade de que a diminuição da concentração citosólica de Ca^{2+} em

neurônios que envelhecem resulte em alterações na dependência trófica, tornando-os mais vulneráveis à morte.

6. Dendrotoxina e 4-aminopiridina

A α -dendrotoxina (α -DTX) e a 4-aminopiridina (4-AP) são bloqueadores de canais de K^+ dependentes de voltagem (Dolly et al., 1987; Tibbs et al., 1989a; Weller et al., 1985). Estes canais são importantes no controle da excitabilidade em voltagens próximas do potencial de membrana de repouso, prevenindo que pequenos estímulos despolarizantes atinjam o limiar e disparem potenciais de ação (Rogawski, 1985; Storm, 1988). Um bloqueio de tal corrente pré-sináptica de K^+ com DTX ou 4-AP, resultaria na remoção deste efeito tampão sobre o potencial de membrana. Isto poderia conduzir a flutuações maiores, abrindo canais de Na^+ dependentes de voltagem com subsequente influxo de Ca^{2+} (Heemskerk et al., 1991; Weller et al., 1985). Além disso, é provável que a estimulação com 4-AP mimetize melhor a atividade elétrica do que a despolarização com elevada concentração de K^+ (Tibbs et al., 1989b).

A DTX é um peptídeo básico formado por 59 aminoácidos obtido do veneno da serpente Mamba Verde, *Dendroaspis angusticeps* (Harvey & Karlsson, 1980), que apresenta ação pré-sináptica específica (Howard & Gundersen, 1980). Este peptídeo bloqueia canais de K^+ dependentes de voltagem (Bagetta et al., 1992; Dolly et al., 1987; Muniz et al., 1990) e conduz a despolarização, facilitando a liberação de neurotransmissores, tanto periféricamente (Harvey & Karlsson, 1982; Harvey et al., 1984) quanto em sinapses centrais (Docherty et al., 1983; Dolly et al., 1984). Assim, a DTX provoca a liberação de GABA (Sihra et al., 1984; Weller et al., 1985) e glutamato

(Tibbs et al., 1989a). Além disso, α -DTX e seus três peptídeos homólogos (β , γ e δ), demonstraram elevar a concentração citosólica de Ca^{2+} livre em terminais nervosos isolados (Muniz et al., 1990).

A 4-AP também evoca a liberação de diferentes neurotransmissores (GABA, Weller et al., 1985; glutamato, Tibbs et al., 1989b, e noradrenalina, Heemskerk et al., 1990) além de aumentar os níveis citosólicos de Ca^{2+} livre (Heemskerk et al., 1991). Sua ação é semelhante à da DTX, sendo 500 vezes menos potente que esta última (Weller et al., 1985). Além disso, o influxo de Ca^{2+} mediado pela 4-AP, promove a ativação da PKC em sinaptosomas corticais, a qual fosforila a proteína B-50 (também chamada de GAP-43 ou neuromodulina). Esta fosfoproteína está relacionada com o crescimento e regeneração axonal (Benowitz & Routtenberg, 1987; Skene, 1989). Outros agentes também podem aumentar a fosforilação da B-50 ativando a PKC, entre eles, ésteres de forbol, despolarização com K^+ e o ionóforo A23187 (Heemskerk et al., 1991).

OBJETIVOS

Temos como objetivo investigar a morte e a neuroproteção de neurônios corticais, com especial enfoque para a interação entre estas células nervosas e os astrócitos. Com esta finalidade propomos:

1. Estudar a sensibilidade de neurônios corticais a diferentes agentes tais como, o ionóforo A23187, a excitotoxina NMDA ou a trocas de meio de cultura. Com respeito a estes procedimentos, vamos caracterizar as possíveis diferenças nos tipos de morte em função dos tratamentos. Caso seja demonstrado que trocas de meio provocam efeitos deletérios em neurônios corticais, trataremos de:

1.1. Definir um modelo experimental que permita o estudo da injúria neuronal mediada pela substituição do meio de cultura.

1.2. Determinar o mecanismo de ação da injúria decorrente de trocas de meio, testando o bloqueio de receptores NMDA, meio condicionado por astrócitos, ou altas concentrações de potássio.

1.3. Testar o efeito de bloqueadores de canais de potássio do tipo I_A , comparando estes resultados com os obtidos com meio condicionado e altas concentrações de potássio.

2. Estudar os efeitos diretos e indiretos da estimulação de astrócitos com a endotoxina LPS, sobre a viabilidade de células PC12 ou neurônios corticais.

2.1. Estabelecer co-culturas de células PC12 e monocamadas secundárias de astrócitos corticais, estimuladas com LPS, na tentativa de buscar um modelo de *estresse* oxidativo endógeno.

2.2. Verificar se astrócitos estimulados com LPS podem promover injúria em neurônios corticais, em três modelos distintos: em culturas mistas (neurônio-glia); em co-culturas de neurônios plaqueados sobre monocamadas secundárias de astrócitos, previamente estimuladas com LPS e em culturas neuronais puras, que receberão meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos, previamente estimuladas com a endotoxina. Ao final, caso sejam observadas alterações que indiquem neurotoxicidade, buscaremos determinar seu possível mecanismo de ação.

MATERIAL E MÉTODO

1. Material

Os meios de cultura (MEM e RPMI 1640), os soros (soro fetal bovino e soro de cavalo inativado por calor), a laminina, a tripsina, a penicilina e a estreptomicina utilizados foram da Gibco-BRL. O material plástico foi adquirido da Corning ou Nunc. O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi provido por Boehringer-Mannheim. O anticorpo monoclonal anti-neurofilamento (200 kDa) foi proveniente de Amersham. O lipopolissacarídeo (LPS), *E. coli* O26:B6, e os demais reativos utilizados para cultura e manipulação das células foram de Sigma, grau *cell culture tested*. α -Dendrotoxina foi gentilmente doada pelo Dr. C. Cerveñansky (isolada do veneno de *Dendroaspis angusticeps* (J. L., Quênia) de acordo com Harvey & Karlsson, 1980). O peptídeo foi primeiro submetido a uma coluna de troca catiônica em HPLC e a pureza foi verificada em HPLC de fase reversa, numa coluna Aquapore RP-300. O Dr. C. Cerveñansky também forneceu os peptídeos β -, γ - e δ -dendrotoxina.

2. Meios de cultura e soluções

Tabela 5. *Solução estoque de RPMI 1640*

Componente	Concentração
Meio RPMI 1640	10,4 g l ⁻¹
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	2 g l ⁻¹
Penicilina	75 mg l ⁻¹
Estreptomicina	50 mg l ⁻¹

O meio de cultura com os antibióticos e o NaHCO₃ foi preparado com água bidestilada, levado a pH 7,4 e esterilizado por filtração, sendo armazenado a 4 °C até 30 dias.

Tabela 6. *Meio RPMI com soro*

Componente	Concentração
Solução <i>estoque</i> de RPMI 1640	85%
Soro fetal bovino (SFB)	5%
Soro de cavalo inativado por calor (SC)	10%

Os soros foram agregados a solução *estoque* de RPMI e o meio foi armazenado a 4 °C durante no máximo 7 dias.

Tabela 7. *Meio RPMI para PC12 diferenciadas*

Componente	Concentração
Solução <i>estoque</i> de RPMI 1640	99%
SC	1%
Fator de crescimento do nervo (NGF)	50 ng ml ⁻¹

A adição de NGF ao meio RPMI com soro foi realizada no momento do uso.

Tabela 8. *Solução estoque de MEM*

Componente	Concentração
Meio MEM	2,2 g l ⁻¹
Glutamina	2 mM (total)
Glicose	21 mM (total)
NaHCO ₃	38 mM (total)
Penicilina	75 mg l ⁻¹
Estreptomicina	50 mg l ⁻¹

O meio de cultura com os antibióticos e o NaHCO₃ foi preparado com água bidestilada, levado a pH 7,4 e esterilizado por filtração, sendo armazenado a 4 °C até 30 dias.

Tabela 9. *Meio de cultura para neurônios corticais*

Componente / Concentração	Solução A	Solução B
Solução <i>estoque</i> de MEM	90%	95%
SC	5%	5%
SFB	5%	

Os soros foram agregados a solução *estoque* de MEM e o meio foi armazenado a 4 °C durante no máximo 7 dias. A solução **A** foi utilizada no momento do plaqueamento e a **B** nas trocas de meio.

Tabela 10. *Meio de cultura para astrócitos corticais*

Componente / Concentração	Solução A	Solução B
Solução <i>estoque</i> de MEM	80%	90%
SFB	10%	5%
SC	10%	5%
EGF	10 ng ml ⁻¹	

Os soros foram agregados a solução *estoque* de MEM e o meio foi armazenado a 4 °C durante no máximo 7 dias. A adição de EGF ao meio com soro foi realizada no momento do uso. A solução **A** foi utilizada no momento do plaqueamento e até ser atingida a confluência, enquanto a **B** foi empregada nas trocas de meio.

Tabela 11. *Solução salina controle (SSC)*

Componente	Concentração
Cloreto de sódio (NaCl)	120 mM
Cloreto de potássio (KCl)	5,4 mM
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	1,8 mM
NaHCO ₃	4,4 mM
Glicina	5 µM
Glicose	15 mM
Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES)	20 mM

A solução salina controle (modificada de Choi et al., 1987) foi preparada com água bidestilada, levada a pH 7,4 e esterilizada por filtração, sendo armazenada a 4 °C por no máximo 30 dias.

Tabela 12. *Solução salina tamponada com fosfato (PBS)*

Componente	Concentração
NaCl	8 g l ⁻¹
KCl	0,2 g l ⁻¹
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	0,92 g l ⁻¹
Fosfato de potássio dibásico (KH ₂ PO ₄)	0,2 g l ⁻¹

A solução PBS foi preparada com água bidestilada e esterilizada por filtração, sendo armazenada a temperatura ambiente.

3. Modelo animal

3.1. Animais utilizados

Foram utilizados ratos *Sprague-Dawley* do biotério do Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideu, Uruguai).

Ratas adultas, a partir de 90 dias (250-300 g), foram separadas em 3 caixas grandes, com 15 animais em cada. Para que não houvessem alterações do ciclo estral, foram observados as seguintes condições: 14 h de luminosidade (das 5 as 19 h), temperatura mantida em 25 °C, ração e água *ad libitum*.

3.2. Marcação das ratas

Após serem anestesiados com éter, os animais receberam cuidadosa marcação do pavilhão auricular com o uso de um saca-bocado, para permitir sua posterior identificação. Nesta marcação, o pavilhão auricular esquerdo foi utilizado para as unidades, e o direito para as dezenas.

3.3. Ciclagem das ratas

A determinação do ciclo estral dos animais foi realizada através de coleta vaginal, com o uso de uma alça de platina em forma circular. Antes de ser introduzida, a platina era mergulhada em um frasco contendo água, para que fosse formada uma membrana no círculo e permitir a coleta do fluxo vaginal sem dano à mucosa. O material contendo as células era transferido para uma lâmina de vidro marcada. Em seguida a alça de platina era aquecida ao vermelho e mergulhada na água para ser usada em outro animal. Sobre o material coletado era acrescentada uma pequena gota de violeta de

cresil. O padrão celular era então analisado ao microscópio para determinação da etapa do ciclo estral.

A coleta de material foi sempre realizada entre as 16 e 17 h. Aproximadamente 95% das ratas apresentavam ciclo estral de 4 dias (Diestro, diestro, proestro e estro) e apenas estas foram utilizadas.

As ratas em proestro eram reunidas para acasalamento (às 18 h) em uma caixa, numa proporção de no máximo 2 fêmeas por macho. Após 15 h, o macho era retirado, coletando-se o material das ratas. A presença de espermatozóides no fluxo vaginal era interpretada como sinal de acasalamento bem sucedido. Considerando-se que, estando a rata em proestro a cópula ocorria poucos minutos após a reunião dos animais, este dia era designado como 1º dia de gestação. Cabe salientar que alguns autores consideram o aparecimento do tampão vaginal como dia zero.

3.4. Obtenção dos embriões

Na preparação de culturas primárias de neurônios corticais, foram utilizados embriões com 16 dias de gestação (E16). Para retirada dos embriões, a rata era anestesiada profundamente com éter, era procedido desnucamento cervical e em seguida realizada uma cesariana para remoção do útero. Este então era imediatamente transferido para um tubo cônico contendo meio essencial mínimo a 4 °C. Em cada experimento, os embriões eram obtidos de uma mesma rata.

3.5. Obtenção dos neonatos

Na preparação de culturas primárias de astrócitos corticais, foram utilizados neonatos com no máximo 24 h de vida. Após serem anestesiados com éter, eram mergulhados um a um em álcool 95° durante 90 segundos e decapitados em seguida no interior de uma capela de fluxo laminar.

4. Culturas celulares

O termo cultura de células refere-se a culturas derivadas de células dispersas, provenientes de um tecido original, de uma cultura primária, ou de uma linhagem celular (Freshney, 1994).

A cultura primária de células pode ser obtida permitindo-se que células migrem a partir de um fragmento de tecido, sobre um substrato adequado, ou pela desagregação tecidual, com a produção de uma suspensão celular onde algumas células poderão aderir-se ao substrato. Na dissociação celular, utiliza-se procedimentos mecânicos ou digestão enzimática. Mais frequentemente, são utilizadas enzimas como tripsina, colagenase, elastase, hialuronidase, DNase, pronase, dispase, ou combinações destas (Freshney, 1994).

Em nossas preparações, obtivemos a suspensão celular com o uso de tripsina seguido da adição de desoxirribonuclease I (DNase I). A tripsina permite uma excelente digestão da matriz extracelular. Entretanto, deve ser utilizada cuidadosamente uma vez que pode danificar as células. Para tanto, realizamos o processo enzimático dentro de limites rígidos de tempo e temperatura, interrompendo a ação da enzima pela adição de

soro fetal bovino. A DNase foi empregada para dispersar o DNA liberado por células eventualmente lesadas, pois este tende a promover a formação de grumos (Schnaar & Schaffner, 1981). Após a adição da DNase, tornamos homogênea a suspensão com uma leve ação mecânica, completando a desagregação celular.

Células assim isoladas de um tecido dependem, em geral, da ancoragem a um substrato para sobreviver. Este processo origina a chamada monocamada celular primária, sendo considerado o dia em que foram dispersas sobre o substrato como 1º dia *in vitro* (1º DIV).

No caso dos astrócitos, a superfície do plástico utilizado como substrato pode tornar-se totalmente recoberta, formando a chamada monocamada confluenta caracterizada por células com ausência de refração. Estas células também podem ser dispersas com tratamento enzimático e transferidas para um novo substrato. Este procedimento constitui uma passagem, e as culturas filhas, agora uma linhagem celular, originam monocamadas secundárias (Freshney, 1994; Saneto & De Vellis, 1987).

Em nossas preparações, estabelecemos monocamadas secundárias de astrócitos corticais (neurônios não suportam uma passagem). Estas células gliais, uma vez aderidas tornam-se extremamente achatadas, ao contrário de outras células corticais que, por esta razão, apresentam refração com contraste de fase.

Ainda é importante salientar que, áreas do cérebro em geral, e tipos celulares em particular, apresentam distintos tempos de desenvolvimento durante a ontogênese.

Por exemplo, o tronco cerebral amadurece muito antes do córtex, e os neurônios se desenvolvem e tornam-se pós-mitóticos antes da proliferação glial (Saneto, 1990). Portanto, a idade do animal e a área do cérebro utilizada são determinantes da maturação e da composição celular da cultura.

Em nossas preparações, utilizamos sempre o córtex parietal como material para a cultura. Entre 0-2 dias pós-natal, esta área é ainda imatura com respeito ao desenvolvimento glial, permitindo ótimas culturas gliais mistas (Saneto, 1990). Nossas monocamadas primárias de astrócitos corticais foram obtidas a partir da purificação destas culturas celulares. Para garantir reprodutibilidade e estabelecer credibilidade na extrapolação dos dados da cultura para eventos *in vivo*, utilizamos a mesma área cerebral na obtenção das culturas neuronais. Entretanto, não empregamos animais neonatos, já que os neurônios desenvolvidos não suportariam os processos de desagregação tecidual e ocorreria morte e seleção de determinadas populações neuronais. Por conseguinte, foram utilizados animais embrionários, diminuindo assim o número de células nervosas danificadas com o processo de preparação, garantindo a heterogeneidade neuronal, característica do córtex cerebral.

Foram realizados também experimentos com o uso da linhagem celular tumoral PC12. Estas células, derivadas de feocromocitoma de rato, têm sido extensivamente utilizadas nos estudos de mecanismos de morte neuronal (Batistatou & Greene, 1993; Pan & Perez-Polo, 1993).

4.1. Citosina arabinosídeo

A preparação de monocamadas de astrócitos e de culturas neuronais puras, implicou na eliminação de outras células presentes no tecido cortical (i. e. micróglia e oligodendrócitos). A capacidade proliferativa e a diferença temporal de diferenciação destas células, foi a base utilizada neste processo. O agente supressor da multiplicação celular, denominado citosina arabinosídeo (Ara-C), foi agregado ao meio das culturas para eliminar as células não neuronais em processo de divisão (Saneto & De Vellis, 1987). A ação da Ara-C parece ser menos eficiente na inibição da proliferação de astrócitos e ser tóxica aos oligodendrócitos (Norton & Farooq, 1990). Verificamos também que trata-se de um excelente elemento para o controle mitótico da micróglia.

A concentração de Ara-C agregada ao meio variou com o tipo de cultura e com o tempo previsto para sua ação. Na purificação de monocamadas primárias de astrócitos corticais, foi utilizado 10 μM durante 48 a 54 h. A mesma concentração foi utilizada na obtenção de culturas corticais mistas. Nestes casos, culturas neuronais receberam Ara-C no 4° DIV durante 48 h. Para obtenção de culturas neuronais puras, foi adicionada no momento do plaqueamento, numa concentração de 3 μM . Esta mesma concentração foi utilizada quando neurônios foram plaqueados sobre monocamadas secundárias de astrócitos, tendo sido adicionada no 6° DIV de co-cultura. Em ambos os casos, o inibidor mitótico foi utilizado durante 72 a 96 h.

5. Preparação de cultura primária de astrócitos corticais

Culturas primárias de astrócitos demonstram grande plasticidade, e pequenas alterações na técnica (idade do animal, procedimento de dissociação, densidade de

plaqueamento, quantidade de soro, composição do meio, etc) podem influir em suas características (Saneto & Vellis, 1987; Sensenbrenner et al., 1986). Foram utilizados neonatos de no máximo 24 h porque as células astrogliais ainda estão se dividindo, enquanto a maioria dos neuroblastos já cessaram a proliferação. O uso de animais mais velhos pode resultar na contaminação da cultura com células não astrocíticas (por ex. fibroblastos). Na preparação das culturas de astrócitos foi empregado o método de Saneto & Vellis (1987) com algumas modificações.

5.1. Material

MEM e MEM suplementado com SFB 10%, SC 10% e EGF 10 ng ml⁻¹

PBS e SFB (ou inibidor de tripsina)

Tripsina Gibco (2,5%) e DNase I, Sigma D4527 (10 mg ml⁻¹)

Um tubo cônico de 45 ml com álcool 95° para submergir os neonatos

Um tubo cônico de 45 ml com álcool 95° para submergir o material cirúrgico

Um tubo cônico de 45 ml para filtração e plaqueamento

Dois tubos cônicos de 15 ml para digestão enzimática

Duas placas de 100 mm e uma de 35 mm

Garrafas de 25 cm² (não há necessidade de adicionar substrato)

Tesoura grande e pequena, uma pinça dente de rato, uma pinça fina com dentes, duas pinças finas, uma pinça em L e bisturi.

Micropipetas (1000 e 100 µl) e pipetas de 10 ml

Peneira 100 (140 µm)

Algodão embebido em álcool 70%

5.2. Preparação do material

Os dois tubos cônicos grandes foram preenchidos com 40 ml de álcool 95°. Foi adicionado 10 ml de PBS a cada placa de 100 mm e 2 ml à placa de 35 mm. Num tubo cônico pequeno foi adicionado 2 ml de PBS.

5.3. Protocolo de preparação de cultura primária de astrócitos corticais

Os procedimentos a seguir foram realizados no interior de uma estação de fluxo laminar horizontal, sendo descritos para um número de 8 neonatos de no máximo 24 h.

Após serem anestesiados com éter, os neonatos eram submergidos um a um, em álcool 95° por 90 segundos e decapitados. Para realização da dissecação, a cabeça era apoiada sobre uma gaze estéril ou sobre algodão embebido em álcool 70%. A caixa craniana era recortada látero-anteriormente, na altura dos forâmens auriculares, e seccionada transversalmente a nível ocular. A calota craniana era então rebatida, pósterio-anteriormente. O encéfalo era retirado e transferido para uma placa de 100 mm com PBS. Imediatamente era realizada a dissecação para obtenção do córtex parietal. Uma pinça fina era utilizada para segurar o tronco cerebral e outra em L para remoção da área cortical dos dois hemisférios. O córtex parietal era então dissecado com a retirada da dura-máter e restos dos plexos coróideos. O tecido cortical, com forma de domo, era então transferido para outra placa de 100 mm contendo PBS, repetindo-se o mesmo procedimento em outro neonato.

Depois de obter os encéfalos necessários (rendimento de aproximadamente 1,5 a $1,8 \times 10^6$ células por neonato), os córtices dissecados foram transferidos para a placa de 35 mm contendo PBS. Este procedimento de transferência do tecido é importante para remoção de restos teciduais, eliminando a contaminação com outros tipos celulares tais como eritrócitos provenientes da ruptura dos vasos sanguíneos.

Com a micropipeta de 1000 μ l, o PBS foi aspirado e descartado, e o tecido extraído mantido com a menor quantidade de líquido possível. Os pequenos pedaços de córtex foram então picados com a ponta de um bisturi. Os 2 ml de PBS previamente separados, foram adicionados sobre o tecido cortical. Com a micropipeta de 1000 μ l, o material foi transferido para um tubo cônico, e o volume foi dividido igualmente nos dois tubos de 15 ml.

Os dois tubos cônicos contendo o tecido cortical foram colocados, durante 25 min, em banho-maria a 37 °C, com tripsina numa concentração final de 0,25%. A cada 5 min os tubos eram agitados levemente. Para inibir a ação da tripsina, foi adicionado SFB (concentração final 10%), passando-se 2 vezes pela ponteira da micropipeta de 1000 μ l para garantir uma boa mistura. Em seguida, foi adicionado 50 μ l de DNase I, agitando-se levemente. Durante 5 min, permitiu-se o depósito do material. Logo após, este foi passado lentamente, 6 vezes, pela ponteira da micropipeta de 1000 μ l. Durante este procedimento, os tubos cônicos eram inclinados evitando-se a formação de bolhas, e a suspensão assumia aspecto homogêneo devido a completa desagregação tecidual.

Os volumes eram então reunidos em um tubo cônico de 15 ml, adicionando-se MEM até a marca de 10 ml. O volume era passado 4 vezes por uma pipeta de 10 ml para garantir uma boa mistura e, após, transferido para a peneira para remoção dos vasos sanguíneos e restos de meninges. Para garantir um bom rendimento, a passagem da suspensão celular pela tela era realizada lentamente. Para tanto, a ponta da pipeta era aproximada da tela, desprendendo-se um pouco do líquido. Quando este começava a passar, permitia-se o lento escoamento do seu conteúdo.

A suspensão recém filtrada era transferida novamente para o tubo cônico de 15 ml, e centrifugada a 40 xG durante 5 min. O sobrenadante era descartado com o uso de uma bomba de vácuo (ou com uma Pasteur com algodão e pera). Agregava-se então 2 ml de MEM, ressuspensando-se o *pelet* com a micropipeta de 1000 μ l.

A suspensão celular era transferida para um tubo cônico contendo 18 ml de MEM suplementado com 10% de SFB, 10% de SC e 10 ng ml⁻¹ de EGF. Logo após, misturava-se passando 4 vezes por uma pipeta de 10 ml. O volume era então dividido igualmente em duas garrafas de 25 cm² e estas colocadas na estufa a 37 °C (5% de CO₂) por 72 h. Durante este período, não eram realizadas trocas de meio, evitando-se o deslocamento das mesmas para não prejudicar a adesão e a extensão dos processos astrocitários.

No 3° DIV, o meio de cultura foi aspirado e descartado, sendo substituído por meio fresco com a mesma composição do meio de plaqueamento. Nesta fase inicial, o meio de cultura não deve permanecer por mais de 72 h sem ser trocado, pois encontramos evidências de que este procedimento reduz a proliferação de astrócitos, enquanto a contaminação com micróglia tende a aumentar. Para as condições descritas acima, entre o 6° e o 7° DIV era atingida a confluência das monocamadas primárias.

6. Purificação de culturas primárias de astrócitos corticais

Ao ser atingida a confluência, ou seja, quando a superfície do plástico estava coberta por astrócitos (células achatadas, poligonais e sem refringência) iniciava-se a purificação por agitação orbital para remoção de células refringentes contaminantes

(progenitoras de oligodendrócitos e micróglia) que aparecem sobre a monocamada (modificado de Saneto & Vellis, 1987). A troca de meio logo ao ser atingida a confluência era crítica para facilitar a purificação da monocamada.

Antes da troca do meio de cultura, as garrafas foram fechadas e agitadas por 60 min a 200 rpm (excêntrico 1,5 pol.), em estufa a 37 °C. Logo após, o meio de cultura foi descartado e as monocamadas lavadas 2 vezes com 5 ml de MEM. Foi adicionado então MEM suplementado com 5% de SFB e 5% de SC. Agregou-se também Ara-C (10 µM) para eliminar células em processo mitótico, macrófagos cerebrais e células progenitoras de oligodendrócitos. Estas últimas, devem ser eliminadas principalmente pela agitação orbital, pois apresentam uma proliferação relativamente mais lenta e tardia, tornando-se por isso menos susceptíveis a ação da Ara-C.

Após troca do meio, as garrafas permaneceram na estufa a 37 °C, sendo agitadas durante 16 a 18 h a 250 rpm (excêntrico 1,5 pol.). Ao final deste tempo, o meio foi aspirado e as monocamadas lavadas 3 vezes com 5 ml de MEM. As condições da monocamada foram avaliadas, considerando-se a presença de células refringentes (contaminantes) e de zonas alteradas (i. e. ruptura, com exposição da superfície do plástico). O aparecimento de áreas descobertas poderia indicar agitação excessiva ou início de purificação em uma etapa precoce (anterior a confluência).

Depois da observação das monocamadas, era adicionado meio fresco com a mesma composição, MEM com 5% de soro (SFB e SC) e Ara-C (10 µM), continuando a agitação por mais 16 a 18 h. As monocamadas eram então lavadas novamente, 3 vezes

com 5 ml de MEM para remoção das células contaminantes flutuantes e detritos celulares (produtos da ação da Ara-C), repondo-se o meio com os mesmos suplementos. Este procedimento de purificação com agitação seguida de lavagem, foi repetido uma vez mais. O tempo de permanência com Ara-C não excedeu 54 h, e a agitação orbital foi de no máximo 72 h. O comprimento destas etapas, proporcionava a obtenção de monocamadas homogêneas, constituídas por células achatadas e sem refringência.

Após o processo de purificação descrito, os campos (aumento de 10 x) escolhidos aleatoriamente, apresentavam no máximo 1 célula refringente (contaminante). Observações ao longo de várias preparações, indicaram que o tempo de contato dos oligodendrócitos com os astrócitos, parece ser diretamente proporcional a capacidade de adesão dos mesmos à monocamada. Assim, o retardo no início da agitação, tornava praticamente impossível a remoção de oligodendrócitos por este método de purificação.

7. Tripsinização

Depois do processo de purificação, a monocamada primária foi tripsinizada (modificado de Saneto & De Vellis, 1987) e as células repicadas para placas multi-poços ou de 35 mm. Neste procedimento, o meio de cultura de cada garrafa de 25 cm² foi substituído por 5 ml de Versene (0,2 g l⁻¹ de EDTA em PBS). Em seguida o líquido foi descartado com a bomba de vácuo, sendo substituído por 4,5 ml de Versene e 0,5 ml de uma solução 2,5% de tripsina (concentração final 0,25%). Logo após, as garrafas foram agitadas levemente a 80 rpm (excêntrico 1,5 pol.), durante 15 min a 37 °C, sendo observadas ao microscópio a cada 5 min. Os astrócitos, a medida que se despegavam do

plástico, assumiam um aspecto esférico e refringente. O processo de agitação facilitava a remoção de grandes grupos celulares, contendo muitas células esféricas ainda unidas.

Para inibir a ação da tripsina, adicionou-se SFB (concentração final 10%) transferindo-se a suspensão celular para um tubo cônico. Após a reunião das células de todas as garrafas em um tubo cônico, este foi centrifugado durante 5 min a 247 xG.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado cuidadosamente ressuspenso em 2 ml de MEM, com auxílio de uma micropipeta de 1000 µl. A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico com MEM suplementado com 5% de SFB e 5% de SC, sendo então plaqueada.

No processo de plaqueamento, foi mantida a relação entre a superfície total de plástico recoberto pela monocamada primária, e a que seria utilizada na cultura secundária. Teve-se o cuidado de não aumentar a superfície total de plástico a ser recoberta, o que poderia acarretar uma demora no estabelecimento da confluência secundária, ou até na impossibilidade desta ocorrer. Agitação excessiva e exposição demasiada a ação da tripsina, são fatores que podem diminuir o número de astrócitos viáveis, capazes de aderir-se, afetando o rendimento.

8. Manutenção de culturas secundárias de astrócitos corticais

Mantendo-se a relação de superfície antes e após a tripsinização, depois de 2 a 3 dias era atingida a confluência. Neste período não foram realizadas trocas de meio e as culturas permaneceram na estufa a 37 °C (5% de CO₂).

No 3º dia após a tripsinização o meio foi substituído por um de igual composição ao utilizado no plaqueamento, realizando-se trocas a cada 3 dias.

9. Preparação de culturas primárias de neurônios corticais

Segundo a literatura, geralmente são utilizados embriões entre 14 e 17 dias de gestação. O rendimento de células corticais (neurônios e glia) é variável segundo o período embrionário. Padronizamos o uso de embriões com 16 dias de gestação, utilizando com algumas alterações, o protocolo descrito por Choi e colaboradores (1987). Estabelecemos para este período, um rendimento médio de $1,5 \times 10^6$ células por embrião.

9.1. Material

MEM e MEM suplementado com SFB 5%, SC 5%

PBS e SFB (ou inibidor de tripsina)

Tripsina Gibco (2,5%) e DNase I Sigma D4527 (10 mg ml^{-1})

Um tubo cônico de 45 ml com MEM para submergir o útero com os embriões

Um tubo cônico de 45 ml com álcool 95° para submergir o material cirúrgico

Um tubo cônico de 45 ml para filtração e plaqueamento

Dois tubos cônicos de 15 ml para dissociação enzimática

Duas placas de 100 mm e uma de 35 mm

Material plástico para plaquear (tratado com substrato ou com monocamada secundária de astrócitos)

Tesoura grande e pequena, uma pinça dente de rato, uma pinça fina com dentes, duas pinças finas e bisturi.

Micropipetas (1000 e 100 μl) e pipetas de 10 ml

Peneira 100 (140 μm)

Algodão embebido em álcool 70%

9.2. Preparação do material

Um tubo cônico de 45 ml foi preenchido com 40 ml de álcool 95° e outro, com 30 ml de MEM a 4 °C; foi adicionado 10 ml de PBS a cada placa de 100 mm, 2 ml à placa de 35 mm e 2 ml de PBS em um tubo cônico pequeno.

9.3. Protocolo de preparação de cultura primária de neurônios corticais

Após a rata ter sido anestesiada profundamente com éter, foi realizado desnucamento cervical. Foi borrifado álcool 70% sobre o abdômen antes de seccioná-lo longitudinalmente. No terço inferior da secção longitudinal foi feito um corte transversal, rebatendo-se lateralmente a parede abdominal.

A vagina era então suspensa, sendo seccionada junto ao útero. A partir da secção, este era elevado para contagem do número de embriões. A seguir, o útero era removido e transferido para o tubo cônico com MEM a 4 °C.

Os procedimentos a seguir foram realizados no interior de uma estação de fluxo laminar horizontal, sendo descritos para 10 embriões E16. Estes foram transferidos dois a dois para uma placa de 100 mm contendo PBS. Após a secção dos envoltórios e de serem separados da placenta, os embriões foram levados para a outra placa de 100 mm. Com uma pinça fina eram decapitados, descartando-se os corpos. A cabeça era apoiada sobre a secção cervical para obtenção do cérebro. Com uma pinça fina era firmada a cabeça, e com a outra, realizada uma secção longitudinal da pele e da caixa craniana. Uma pinça fina era introduzida com as pontas fechadas, lateralmente, a nível da base craniana. Ao ser aberta, rompia os nervos cranianos e o hipotálamo, permitindo a

retirada do cérebro. Este era então seccionado medialmente, com o auxílio das pinças finas. Após a separação dos hemisférios, as meninges eram removidas no sentido têmporo-parietal. Em seguida, plexos coróides, hipocampo e estriado eram removidos, transferindo-se o córtex parietal para a placa de 35 mm contendo PBS. O mesmo procedimento era efetuado para outros dois embriões, e sucessivamente até a obtenção de todo o material.

O PBS da placa de 35 mm era então descartado com o uso de uma micropipeta de 1000 µl. O tecido obtido era picado com bisturi, e depois, agregado sobre o mesmo os 2 ml de PBS previamente separados. O material foi transferido para os tubos cônicos pequenos, sendo dividido igualmente entre eles. Foi agregado tripsina (0,08% final) e os tubos foram incubados a 37 °C durante 40 min, sendo agitados levemente a cada 10 min. Para inibir a ação da enzima, foi adicionado SFB (10% final) e em seguida, para completar a dissociação, 50 µl de DNase por tubo. Após 5 min, a suspensão foi passada lentamente 6 vezes pela ponteira da micropipeta de 1000 µl, sem fazer bolhas. Os volumes foram reunidos em um tubo cônico de 15 ml, adicionando-se MEM até ser completado 10 ml. A suspensão foi filtrada na peneira e depois centrifugada durante 5 min a 110 xG. O sobrenadante foi descartado e o *pelet* ressuspensionado em 2 ml de MEM, com auxílio de uma micropipeta de 1000 µl.

Retirava-se então uma alíquota da suspensão celular e realizava-se uma diluição 1:20, contando-se as células no hemocitômetro. Após ter sido estimado o número total de células, o volume necessário para ser obtida a densidade celular desejada era misturado ao meio de plaqueamento. Este consistia de MEM suplementado com 5% de

SFB e 5% de SC. A adição ou não de Ara-C e a densidade de plaqueamento, dependia do tipo de cultura desejada. Após a diluição da alíquota no meio de cultura, a suspensão celular era transferida para os plásticos previamente preparados, os quais permaneciam na estufa a 37 °C (5% de CO₂) por no mínimo 24 h para adesão celular.

10. Preparação de culturas neuronais puras

Na obtenção de culturas puras de neurônios corticais, as células corticais foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm⁻², em MEM suplementado com 5% de SFB, 5% de SC e 3 μM de Ara-C. Os plásticos foram previamente tratados com poli-D-lisina ou poli-D-lisina com laminina.

11. Preparação de culturas corticais mistas

No estabelecimento de culturas corticais mistas, as células corticais foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm⁻², em MEM suplementado com 5% de SFB e 5% de SC. Os plásticos utilizados não foram tratados com substrato químico. Desta forma, a adição de Ara-C (10 μM durante 48 h) foi realizada no 4° DIV, para permitir a multiplicação de astrócitos da mesma preparação, os quais serviam como substrato para a adesão neuronal.

12. Preparação de co-culturas de neurônios e astrócitos corticais

Na elaboração de co-culturas, as células corticais foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm⁻² ou de $12,5 \times 10^3$ céls. cm⁻² sobre monocamadas secundárias confluentes de astrócitos corticais entre o 20° e o 30° DIV. Nestas co-culturas foi utilizado MEM suplementado com 5% de SFB, 5% de SC e 3 μM de Ara-C.

13. Troca do meio de cultura

Na manutenção de culturas neuronais puras, mistas ou co-culturas, a primeira troca era realizada no 3º ou 4º DIV e as subseqüentes a cada 3 dias. Nestes casos, apenas metade do volume era substituído por meio fresco, sendo omitido o SFB. A adição deste soro demonstrou ser neurotóxica, principalmente para culturas neuronais puras. A ação deletéria do SFB sobre as culturas neuronais era mais evidente a partir do 7º DIV. Talvez o fato observado relacione-se com a potenciação da toxicidade aguda do glutamato mediada pela albumina do soro (Eimerl & Schramm, 1991).

As trocas de meio de cultura de monocamadas secundárias de astrócitos também eram realizadas a cada 3 dias. Em cada troca, o volume total do poço (1 ml) ou da placa de 35 mm (2 ml) era substituído, utilizando-se MEM suplementado com 5% de SFB e 5% de SC.

14. Culturas de células PC12

A linhagem celular PC12 de feocromocitoma de rato responde ao NGF expressando propriedades neuronais (Greene & Tischler, 1976; Greene et al., 1987; Peunova & Enikolopov, 1995) e tem sido utilizada no estudo da morte neuronal (Batistatou & Greene, 1991; Batistatou & Greene, 1993; Jackson et al., 1992; Mesner et al., 1992; Pan & Perez-Polo, 1993; Walkinshaw & Waters, 1995).

Células PC12 crescem rotineiramente em placas ou frascos plásticos de culturas de tecido no meio RPMI 1640 ou naqueles descritos para células de neuroblastoma (Skaper et al., 1990). Antes do uso, as monocamadas celulares foram lavadas 3 vezes

com RPMI. As células foram despegadas com vigorosos jatos do próprio meio, pipetando-se para cima e para baixo para romper os agrupamentos celulares e despegá-las da superfície plástica. Estas células, geram agrupamentos rapidamente sobre plástico recoberto com colágeno. Entretanto, sobre uma superfície revestida com poli-ornitina, mais adesiva, aderem-se enquanto ainda estão isoladas. Como resultado, podem ser observadas individualmente por um período maior de tempo (Skaper et al., 1990).

15. Substrato

À exceção de algumas células tumorais e poucas linhagens celulares selecionadas, que são capazes de proliferar em suspensão, a adesão num substrato artificial parece ser essencial para a sobrevivência e proliferação da maioria das células não transformadas (Freshney, 1994).

Em nossas culturas, foram utilizados plásticos de poliestireno e Thermanox, que proporcionam um substrato simples e reproduzível, com boas qualidades ópticas. Inicialmente hidrofóbicos, estes plásticos são tratados, ainda no processo de fabricação, com forte descarga elétrica, quimicamente, ou por irradiação γ , para que sua superfície seja carregada e torne-se hidrofílica (Freshney, 1994).

Uma vez que a qualidade do produto varia em função do fornecedor e do lote utilizado, a eficiência de adesão foi testada para diferentes marcas. Nesta comparação foi utilizado meio com a concentração de soro ótima e com a metade desta, já que altas concentrações de soro podem mascarar imperfeições do plástico. Para placas de multi-

poços (4 e 24), placas de Petri (35 e 100 mm) e garrafas (25 cm²) foram selecionados e utilizados plásticos Nunc.

Os neurônios parecem ser mais exigentes do que outras células na escolha do seu substrato (Freshney, 1994). Nas culturas neuronais, para que ocorra adesão e extensão neurítica, a superfície plástica utilizada como substrato deve ser recoberta com moléculas que mimetizem a matriz extracelular. Nestes casos, onde a carga superficial parece ser insuficiente para reproduzir os complexos sinais de interação de matriz, é necessário utilizar macromoléculas tais como poli-D-lisina ou poli-D-ornitina, para criar uma matriz artificial. Em nossas preparações, verificamos que a combinação do polímero poli-D-lisina com o elemento de matriz extracelular laminina, melhorava significativamente o aspecto de culturas neuronais puras. Esta associação reproduzia o padrão de culturas de neurônios plaqueados sobre monocamadas secundárias de astrócitos, permitindo a migração celular e segregação neurítica. Nos experimentos com células PC12, as superfícies plásticas também foram recobertas com substrato químico, com o fim de aumentar a adesão e evitar a seleção de determinadas células com maior capacidade adesiva.

Entretanto, a necessidade de uma matriz artificial para que ocorra adesão ao plástico, depende do tipo celular. Algumas células como fibroblastos e micróglia, aderem-se sem que este tenha sido previamente tratado (Freshney, 1994). Da mesma forma, a carga elétrica superficial, decorrente da radiação γ utilizada na esterilização dos plásticos, é suficiente para que os astrócitos possam se aderir. Assim, nas culturas destas células, as superfícies plásticas não foram recobertas com substrato químico. Da mesma

forma, nas culturas primárias mistas de neurônios e astrócitos corticais, também não foi utilizada matriz artificial. Nestes casos, os astrócitos presentes entre as células corticais, serviram como substrato vivo para as células neuronais. A divisão mitótica glial, preferencialmente astrocitária, foi inibida com a adição de Ara-C a partir do 4º DIV (modificado de Choi et al., 1987). Durante este período, ocorreu proliferação celular e zonas do plástico foram recobertas por astrócitos de aspecto achatado, originando uma monocamada sobre a qual os neurônios estenderam seus neuritos. Este tipo de substrato glial demonstrou ser, como poderia-se esperar, altamente trófico e permitiu a migração neuronal. Nos casos em que foi utilizado, os neurônios foram menos sensíveis às trocas de meio.

Nos experimentos onde a troca de meio foi o agente mediador de injúria, os neurônios foram plaqueados sobre monocamadas secundárias de astrócitos corticais. Verificamos que, neste modelo experimental, o uso destas células gliais como substrato, era essencial para manter as células neuronais, já que em culturas puras, os neurônios não suportaram trocas totais de meio, demonstrando sinais morfológicos de dano celular inclusive com substituições parciais. Neste modelo, onde foram realizadas trocas em dias alternados, este fenômeno provavelmente seja devido ao trofismo baseado no contato entre neurônios e astrócitos. Entretanto, a interação de superfície não demonstrou ser a única via trófica, pois culturas neuronais puras sobre substrato químico, foram mantidas em melhores condições quando receberam meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos corticais.

16. Substrato para células PC12

Células PC12 têm a tendência a associarem-se fortemente entre si e a aderirem-se fracamente ao substrato de cultura (plástico ou vidro). Entretanto, apresentam grande capacidade de adesão ao substrato recoberto com colágeno, poli-ornitina ou poli-lisina. Para manter as células aderidas por mais de três dias, é recomendado o uso de substrato tratado com colágeno, o qual pode ser extraído da cauda de ratos (Greene et al., 1987).

16.1. Protocolo de extração de colágeno para células PC12

Para obtenção do colágeno foram utilizadas caudas de ratos e o método de Greene e colaboradores (1987), com pequenas adaptações. As caudas foram extraídas dos ratos, esterilizadas por imersão durante 20 min em álcool 70% e lavadas com água bidestilada estéril. A partir desta etapa, todas as demais foram realizadas sob condições de esterilidade. Após dissecação, o material foi novamente lavado com água. Para extração do colágeno, foi mergulhado em ácido acético (0,01%), 75 ml por cauda, durante 2 ou 3 dias em temperatura ambiente. Depois, realizou-se centrifugação a 12.000 xG por 60 min. O sobrenadante foi coletado e fracionado (as alíquotas foram armazenadas a -20 °C). Uma vez descongelada, a alíquota era armazenada a 4 °C, no máximo por 30 dias.

Foram realizadas distintas diluições do colágeno obtido, misturando-se com ácido acético (0,01%): 1 ml em 5 ml (1:5); 1 ml em 10 ml (1:10); 1 ml em 15 ml (1:15); 0,5 ml em 10 ml (1:20) e 0,5 ml em 15 ml (1:30). A cada uma destas diluições foi agregado poli-D-lisina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Em seguida, foram adicionados 5 ml destas diferentes diluições a placas de 100 mm. Após 60 min, as placas foram lavadas três vezes com água

bidestilada estéril, permanecendo abertas no fluxo laminar (sob radiação ultravioleta, UV), até secarem. Depois de secas, receberam as células PC12, sendo guardadas na estufa a 37 °C (5% de CO₂) por 48 h. Ao final deste período, as placas foram observadas com microscópio de contraste de fase. Desta forma, o substrato que nos pareceu mais adequado para manutenção da linhagem celular foi colágeno (1:20) com poli-D-lisina (5 µg ml⁻¹).

16.2. Preparação de substrato para manutenção de células PC12

Placas de 100 mm, utilizadas para crescimento e passagens (repique) das células PC12, receberam 5 ml de colágeno (1:20) e poli-D-lisina (5 µg ml⁻¹). Após 60 min, foram lavadas três vezes com água bidestilada estéril, secando abertas no fluxo laminar (sob radiação UV). Depois de secas, estavam prontas para receber as células.

Considerando que para alguns tipos de experimentos de curta duração pode ser mais vantajoso o uso de poli-lisina ou poli-ornitina (Greene et al., 1987), testamos diferentes substratos e concentrações, com a finalidade de obter uma maior adesão. Nestes casos, foram realizados experimentos com meio definido RPMI 1640 ou com uma mistura deste e soro, determinando-se a viabilidade de células PC12 nas diferentes superfícies tratadas.

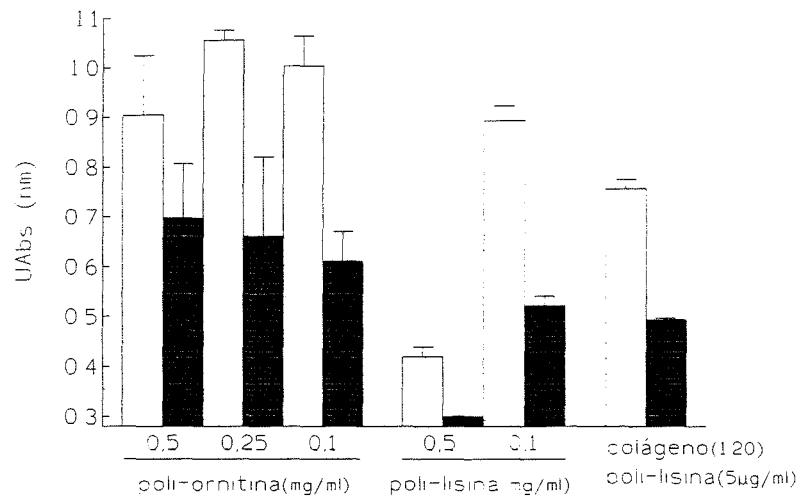
As células foram plaqueadas em RPMI sem soro ou suplementado com 5% de SFB e 10% de SC, numa densidade de $37,5 \times 10^3$ céls. cm⁻², em uma placa de 24 poços Nunc, previamente tratada. Foram testadas diferentes concentrações de poli-D-ornitina (0,1, 0,25 e 0,5 mg ml⁻¹), poli-D-lisina (0,1 e 0,5 mg ml⁻¹) e uma combinação de

colágeno (1:20) com poli-D-lisina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Após 6 h do plaqueamento, as culturas foram lavadas três vezes com PBS, adicionando-se meio definido RPMI com soro em todos os poços.

Para quantificar as células viáveis associadas ao substrato, adicionou-se ao meio de cultura de cada poço, $50 \mu\text{l}$ de uma solução de MTT (5 mg ml^{-1}), por 2 h. Depois da incubação, foi adicionado 1 ml de DMSO e $125 \mu\text{l}$ de tampão glicina-NaCl por poço. Ressuspendeu-se cada cultura com uma micropipeta de $1000 \mu\text{l}$, determinando-se espectrofotometricamente a absorvância em 570 e 630 nm, considerando-se a diferença destes valores como as unidades de absorvância (UAbs) de cada poço (Fig. 5).

Neste caso, uma maior densidade óptica significava um maior número de células viáveis aderidas ao substrato. Desta forma, as duas menores concentrações de poli-ornitina ($0,25$ e $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) foram mais adequadas. Considerando não haver diferença significativa entre estes dois tratamentos, optamos pela menor concentração. Assim, comprovamos também que uma maior concentração do substrato não garantia necessariamente uma maior adesão celular (Fig. 5). Ficou evidente também, a necessidade da presença de soro para a adesão destas células. Em todos os tratamentos, os grupos que não receberam soro no momento do plaqueamento, apresentaram uma significativa diminuição da capacidade adesiva.

Figura 5. Determinação de um substrato de alta aderência para células PC12



Densidade óptica obtida a partir da técnica de MTT, indicando a capacidade de adesão diferenciada de células PC12 a distintos tratamentos de superfície. As barras claras representam as culturas que receberam meio com soro e as escuras indicam culturas deprivadas, que permaneceram em meio definido. Todas determinações foram realizadas por duplicado.

Repetimos a experimentação para lâminulas Thermanox (13 mm), e novamente o melhor tratamento foi com poli-D-ornitina dissolvida ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) em tampão borato (15 mM), pH 8,4 (modificado de Greene et al., 1987).

Para células PC12, deve-se considerar que a partir de um mesmo clone, podem ser selecionadas populações com capacidade de adesão distintas (Greene et al., 1987). Desta forma a preparação do substrato celular deve ser rigorosamente mantida dentro dos limites definidos.

16.3. Preparação de substrato para experimentos com células PC12

Foram utilizadas placas de 24 poços Nunc ou lamínulas Thermanox (13 mm). O plástico foi recoberto com uma solução de poli-D-ornitina ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) em tampão borato 15 mM, pH 8,4 (estéril). Após 4 h, esta foi aspirada e o plástico lavado quatro vezes com água bidestilada. O material secou sob o fluxo laminar, no mínimo por 90 min.

17. Substrato para neurônios corticais

Na obtenção de culturas neuronais puras, células corticais (E16) foram plaqueadas em placas Nunc de 24 poços pré-tratadas com poli-D-lisina ou poli-D-lisina com laminina. Um volume de 300 μl de poli-D-lisina ($0,25 \text{ mg ml}^{-1}$) dissolvida em água bidestilada foi acrescentado a cada poço. Após 60 min, o mesmo foi descartado, lavando-se cada poço com 1 ml de água bidestilada. A placa era então seca sob o fluxo laminar, durante 90 min recebendo uma densidade celular de $110 \times 10^3 \text{ céls cm}^{-2}$. Em outras preparações, após a poli-lisina ter sido adicionada, e os poços terem sido lavados e secos, adicionou-se a cada um, 300 μl de laminina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) dissolvida em MEM suplementado com 5% de SFB e 5% de SC. A placa permaneceu durante a noite na estufa a 37 °C (5% de CO_2). Após aproximadamente 12 h, o meio contendo a laminina foi descartado, plaqueando-se as células corticais numa densidade de $110 \times 10^3 \text{ céls cm}^{-2}$. O substrato com laminina permitia a migração neuronal, possibilitando aos neurônios a segregação dos somas e neuritos.

O crescimento de neurônios sobre monocamadas de astrócitos apresenta três efeitos: **a)** a extensão neurítica é relativamente aumentada quando comparada com o crescimento sobre outros substratos; **b)** os corpos neuronais geralmente permanecem isolados, e **c)** os prolongamentos não demonstram tendência a agruparem-se em fascículos (Noble et al., 1984). Considerando que os neurônios não se reagregam, permanecendo dispersos, a observação dos neuritos e a contagem dos somas é facilitada (Banker, 1980). Além disso, há várias evidências experimentais de que astrócitos são substratos particularmente atrativos para a extensão neurítica (Fallon, 1985). No estabelecimento de co-culturas, monocamadas secundárias de astrócitos (20°-30° DIV) revelaram-se como um substrato ideal para neurônios corticais. Neste caso, células corticais (E16) foram semeadas em placas Nunc de 24 poços, sobre as monocamadas, em duas densidades, 12,5 ou 110×10^3 céls cm^{-2} .

Na preparação de culturas mistas (neurônio e glia) células corticais (E16) foram semeadas em placas Nunc de 24 poços, numa densidade de 110×10^3 céls cm^{-2} . Neste modelo, a interrupção mitótica foi realizada apenas no 4° DIV, garantindo-se assim um substrato astrocitário para adesão e crescimento neuronal. Ao contrário das co-culturas, neste caso, os neurônios e os astrócitos foram provenientes de córtices com uma mesma idade embrionária.

18. Contagem do número de células no hemocitômetro

A concentração da suspensão celular foi determinada colocando-se uma alíquota desta numa câmara de hemocitômetro. O número de células de uma área definida, com

profundidade conhecida, foi quantificado e a concentração celular derivada a partir desta contagem.

A partir de um volume de 2 ml de uma suspensão celular (em meio definido) foi retirada uma alíquota de 5 μ l. Em seguida, esta foi misturada com 95 μ l de PBS em um tubo de *ependorf*. Após um leve turbilhonamento, retirou-se 20 μ l desta suspensão celular diluída, transferindo-se para um hemocitômetro, previamente preparado. Com o uso de uma objetiva 10 x foram contados cinco quadrados de uma câmara.

Cada quadrado do hemocitômetro, com a lamínula colocada, representa um volume total de 0,1 mm³ ou 10⁻⁴ cm³. Uma vez que 1 cm³ é equivalente a aproximadamente 1 ml, a concentração celular subsequente por ml (e o número total de células) foi determinado conforme os seguintes cálculos:

Células por ml = (células contadas em 5 quadrados \div 5) x 20 (fator de diluição) x 10⁴

Total de células = células por ml x volume da suspensão de onde foi retirada a alíquota

19. Determinação da viabilidade celular

Foram utilizados diferentes métodos na determinação da viabilidade celular. Para tanto, culturas com distintas características foram empregadas nestas abordagens.

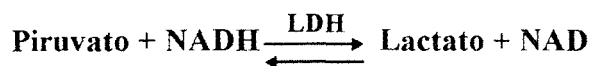
19.1. Quantificação através da contagem do número de neurônios

A utilização da contagem para determinação do número neuronal, requereu uma baixa densidade de células no momento do plaqueamento (12,5 x 10³ céls. cm⁻²), para que as mesmas fossem, posteriormente, observadas individualizadas. Para tanto,

empregaram-se monocamadas secundárias de astrócitos como substrato, para evitar o reagrupamento neuronal (Banker, 1980). Assim, o número neuronal foi estimado através de microscopia de contraste de fase, onde os neurônios viáveis foram reconhecidos pela refringência e pelos processos neuríticos característicos. A contagem foi ratificada pela posterior marcação imunocitoquímica anti-neurofilamento (200 kDa, Fallon, 1985; Giulian et al., 1993; Noble et al., 1984). Em cada poço foram contados quatro campos ($\sim 0,5 \text{ mm}^2$) estabelecidos de forma randômica, sendo marcados para subseqüentes contagens.

19.2. Quantificação através da atividade lactato-desidrogenase

A lactato desidrogenase (LDH) é uma óxido-redutase citoplasmática que converte reversivelmente, conforme a reação abaixo, o piruvato a lactato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH).



O extravasamento da enzima a partir de células lesadas é um marcador clinicamente útil de vários estados patológicos (Hsieh & Blumenthal, 1956; MacDonald et al., 1957), tendo sido utilizado para quantificar a injúria em cultura de hepatócitos em monocamadas (Tolman et al., 1978) e em suspensão (Dujovne et al., 1972). Em adição, Koh & Choi (1987) determinaram quantitativamente a injúria de neurônios corticais em cultura, a partir do efluxo de LDH. Desde então, o método tem sido empregado na determinação da viabilidade neuronal em diferentes modelos de neurotoxicidade (Patel et al., 1990; Lipton et al., 1993; Hewett et al., 1994; Bonfoco et al., 1995; Koh et al., 1995).

A LDH extracelular é química e biologicamente estável e a magnitude do efluxo de LDH nas culturas, correlaciona-se linearmente com o número de neurônios danificados pela exposição ao glutamato (Koh & Choi, 1987). A taxa de diminuição na absorvância, devido a formação de NAD, é diretamente proporcional a atividade LDH. Por outro lado, tratando-se de uma técnica não invasiva, é vantajosa quando comparada com outros métodos de determinação de viabilidade que alteram o ambiente biológico das culturas (Koh & Choi, 1987).

Nos experimentos de excitotoxicidade, o meio de cultura foi substituído por uma solução salina de incubação (modificado de Choi et al., 1987) por 5 min, durante a exposição ao NMDA. Imediatamente após, esta foi removida, repondo-se MEM com 5% de SC. Em outro desenho experimental, o meio de cultura foi substituído por meio fresco com a mesma composição, no qual foi adicionado 100 μ M de NMDA. Em ambos os casos, depois de 24 h a 37 °C (5% de CO₂), foram retiradas as alíquotas para a determinação da LDH liberada. Como controle para descartar a presença de LDH exógena, nas medições da atividade desta enzima foram utilizadas alíquotas de meio de cultura com ou sem soro.

A atividade da LDH foi medida no meio de cultura em temperatura ambiente, através do método espectrofotométrico de Wroblewski & LaDue (1955). Neste procedimento, cada amostra de meio (184 μ l) foi misturada com 612 μ l de tampão fosfato (100 mM, pH 7,5) contendo NADH (0,47 mM). Depois de 20 min, 204 μ l de piruvato de sódio (22,77 mM) foram adicionados a mistura. A diminuição de absorvância para NADH foi analisada a 340 nm, automaticamente em intervalos de 2

segundos durante 10 min, sendo demonstrada graficamente num terminal de vídeo. A concentração de LDH foi calculada a partir da inclinação da reta da curva de absorbância, ajustada por regressão linear, durante a porção linear (inicial) da curva. O valor da inclinação, resultado da atividade LDH em cada poço, foi expresso por unidades de densidade óptica (340 nm) x 10³ min⁻¹. Posteriormente, os valores da inclinação de cada tratamento, foram convertidos em percentagem de morte neuronal.

Em culturas neuronais puras, a conversão dos valores de inclinação em percentagem de morte neuronal, para cada poço, foi realizada segundo a equação:

$$M = \frac{P_A}{P_A + P_E} \times 100$$

Onde **M** é a percentagem de morte neuronal, **P_A** é a inclinação obtida da alíquota do sobrenadante e **P_E** é a inclinação resultante da quantificação da LDH após extração com triton X-100 nas mesmas culturas. Nestes casos, após a retirada de uma alíquota de meio de cada poço, o meio de cultura era removido e substituído por 500 µl de meio com a mesma composição, no qual era adicionado 0,1% do detergente triton X-100 (meio de extração). Depois de 30 min, eram retirados 184 µl, os quais eram misturados com 612 µl de tampão fosfato contendo NADH (0,47 mM) e 204 µl de tampão fosfato com piruvato (22,77 mM), em uma cuba de espectrofotômetro. O valor da inclinação obtido a partir da extração, era considerado como a quantidade de LDH não liberada por meio do NMDA, ou seja, de células não lesadas pela excitotoxina.

O agonista glutamatérgico NMDA foi utilizado na extração da LDH de culturas mistas ou co-culturas para garantir que a enzima liberada fosse exclusiva do efluxo de

neurônios sensíveis esta excitotoxina. Em alíquotas de meio de monocamadas de astrócitos corticais, estimuladas com NMDA (500 μ M) durante 24 h, não foram detectados níveis significativos de LDH. Este resultado é coerente com a ausência de receptores glutamatérgicos para esta excitotoxina nestas células gliais (Backus et al., 1989; Teichberg, 1991).

Desta forma, em culturas mistas ou em co-culturas, a viabilidade neuronal foi determinada conforme a equação abaixo:

$$M = \frac{P_A}{P_A + P_{EM}} \times 100$$

Onde M é percentagem de morte neuronal, P_A é a inclinação obtida da alíquota do sobrenadante e P_{EM} é a inclinação média, resultante da quantificação da LDH de culturas irmãs, após extração com 500 μ M de NMDA e 10 μ M de glicina, durante 24 h. A substituição do detergente pela excitotoxina, deve-se ao fato dos neurônios estarem associados com uma quantidade imprecisa de células gliais, no caso das culturas mistas ou co-culturas, as quais apresentam LDH citoplasmática. Nestes casos, a extração da enzima com NMDA, demonstrou ser mais eficiente para obtenção da quantidade total de LDH, extraindo LDH apenas dos neurônios sensíveis a este agonista glutamatérgico (Hewett et al., 1994; Koh et al., 1995).

Entretanto, a LDH extracelular demonstrou ser biologicamente estável durante 72 h no sistema de culturas de células corticais (Koh & Choi, 1987). Assim, este método não foi empregado nos modelos onde os efeitos da injúria foram estudados por mais de 24 h.

19.3. Quantificação através da atividade redutora mitocondrial

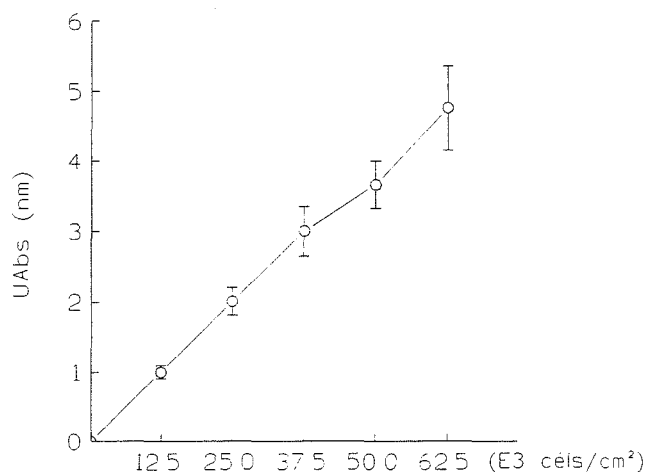
O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) é um sal de tetrazólio solúvel em água. Quando preparado em meios ou soluções salinas sem vermelho fenol, confere uma coloração amarelada ao líquido. O MTT dissolvido é convertido em azul de formazan insolúvel pela clivagem do anel de tetrazólio. Este formazan insolúvel em água pode ser solubilizado com dimetil-sulfóxido (DMSO), e o material dissolvido medido espectrofotometricamente fornecendo absorbância como uma função da concentração do corante formado. Desidrogenases mitocondriais ativas, presentes nas células vivas, são as responsáveis pela redução do MTT. Considerando que células mortas são incapazes de realizar este processo, a conversão do corante amarelo em azul de formazan tem sido usada para quantificar a viabilidade celular (Mossmann, 1983; Skaper et al., 1990).

Um volume de 50 μl da solução *estoque* de MTT (5 mg ml^{-1}) era adicionado em cada poço contendo 500 μl de meio de cultura. O tempo de incubação era de 1 a 2 h a 37 °C (5% de CO_2). Após o período de incubação, era adicionado a cada poço 1 ml de DMSO e 125 μl de tampão glicina-NaCl (100 mM pH 10,5). A leitura espectrofotométrica foi realizada no comprimento de onda de 570 e 630 nm para cada amostra, considerando-se a diferença destes valores como a densidade óptica de cada poço.

O método foi validado para células PC12 ou neurônios, plaqueando-se diferentes quantidades de células. Após um período de 24 h, considerado suficiente para adesão ao substrato, foi adicionada a solução de MTT. As culturas foram incubadas a

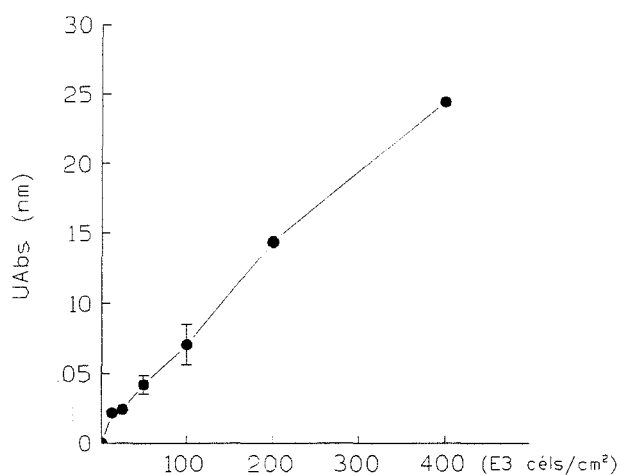
37 °C (5% de CO₂) durante 60 min, determinando-se em seguida a densidade óptica de cada poço.

Figura 6. Curva de calibração de MTT para culturas de células PC12



Valores de absorvância de diferentes densidades de células PC12. Os resultados foram analisados por regressão linear, a inclinação da reta foi significativamente diferente de zero, ($p < 0,0001$); $r = 0,9984$. Foram realizados três experimentos por quadruplicado.

Figura 7. Curva de calibração de MTT para culturas puras de neurônios



Densidade óptica de diferentes densidades de neurônios corticais. Os resultados foram analisados por regressão linear, a inclinação da reta foi significativamente diferente de zero ($p < 0,0001$); $r = 0,9962$. Foram realizados três experimentos por quadruplicado.

20. Fixação do material

Foram testados três tipos de soluções para fixar as culturas de neurônios ou astrócitos corticais: acetona/metanol (1:1) a -20 °C por 10 min (500 $\mu\text{l cm}^{-2}$); ácido acético glacial 5% em etanol absoluto a -20 °C por 10 min (500 $\mu\text{l cm}^{-2}$) e paraformaldeído 4% com glutaraldeído 0,2% a 4 °C por 10 min (500 $\mu\text{l cm}^{-2}$).

Após revelação com diaminobenzidina (DAB), na técnica de imunocitoquímica, a combinação paraformaldeído-glutaraldeído foi a que apresentou menor coloração de fundo (inespecífica). Portanto, esta associação de fixadores foi utilizada nas culturas neuronais puras, mistas, co-culturas e na fixação de monocamadas de astrócitos corticais. As culturas de células PC12, também foram fixadas com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,2% a 4 °C durante 10 min (1 ml por poço ou 2 ml por placa de 35 mm). A solução *estoque* de paraformaldeído (36%) foi armazenada a 4 °C por no máximo uma semana.

21. Citoquímica para NADPH-diaforase

A indução da NOS astrocitária decorrente da estimulação com LPS foi demonstrada através da marcação da atividade NADPH-diaforase (Bock et al., 1996).

Após fixação, o material foi lavado 3 vezes com tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, as culturas foram colocadas sob agitação leve durante 20 min em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) com triton X-100 0,1%. Ao término deste período, esta solução foi substituída pelo meio de incubação constituído por tampão fosfato 0,2 M pH 7,4, triton X-100 0,1%, 0,5 mg ml^{-1} de β -NADPH (Sigma) e 0,2 mg ml^{-1} de NBT (Sigma).

Esta solução de incubação permaneceu durante 2 h, sob agitação leve, a 37 °C (5% de CO₂). Em seguida, o material foi lavado três vezes com tampão fosfato 0,1 M.

As células positivas apresentavam coloração azul violeta. Foram realizados controles negativos, onde a incubação durante as 2 h foi feita na ausência de β-NADPH.

22. Determinação dos níveis de nitrito no meio de cultura

A medida da atividade NOS foi realizada a partir da determinação dos níveis de NO₂⁻ acumulados no meio de cultura, através da técnica de Griess (Chao et al., 1992; Galea et al., 1992; Zielasek et al., 1992).

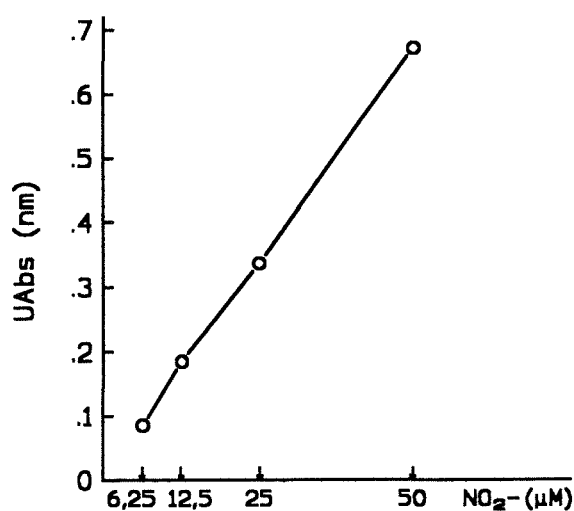
Sob as condições indicadas, as medidas quantitativas de NO₂⁻ foram realizadas utilizando-se alíquotas do sobrenadante de culturas secundárias de astrócitos corticais. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão de NO₂⁻ com um intervalo de 6,25 a 50 μM.

O reagente de Griess consiste de uma mistura (1:1) de 0,1% de Naftil etileno diamina di-hidroclorídrico em água destilada e 1% de sulfanilamida com 5% de ácido fosfórico (H₃PO₄). O padrão *estoque* consiste de uma solução 100 μM de nitrito de sódio (NaNO₂) em água nanopura. Estabelecemos a curva de calibração para NO₂⁻ quantificando a densidade óptica de amostras conforme a Tabela 13.

Tabela 13. Amostras para curva de calibração de NO_2^-

$[\text{NO}_2^-]$ (μM)	6,25	12,5	25	50
NaNO_2 (100 μM)	18,75 μl	37,5 μl	75 μl	150 μl
MEM	281,25 μl	262,5 μl	225 μl	150 μl
Griess	600 μl	600 μl	600 μl	600 μl

Depois de 10 min de reação em temperatura ambiente, a densidade óptica da mistura (1:1) de frações da solução padrão ou alíquotas do sobrenadante com o reagente de Griess foi determinada no espectrofotômetro a 540 nm.

Figura 8. Curva de calibração para quantificação de NO_2^- 

Alíquotas com diferentes volumes de uma solução padrão de NaNO_2 (100 μM) foram misturadas com MEM e o reagente de Griess, originando concentrações crescentes de NO_2^- . A densidade óptica das amostras indicou a quantidade de NO_2^- nas distintas soluções.

23. Imunocitoquímica para neurofilamento 200 kDa

Para identificação das células neuronais foi utilizada a técnica imunocitoquímica anti-neurofilamento (Fallon, 1985; Giulian et al., 1993; Noble et al., 1984).

Após a fixação, cada poço foi lavado uma vez com 1 ml de Tris 50 mM (pH 7,6). Para inibir a peroxidase endógena, foi utilizado Tris 50 mM (pH 7,6) e H₂O₂ (30 vol) 1% durante 5 min (1 ml por poço). O bloqueio foi realizado com Tris 50 mM (pH 7,6), triton X-100 1% e SC 5% por 30 min (até 60 min) em um volume final de 1 ml por poço. Depois, cada poço foi lavado três vezes com 500 µl de Tris 50 mM, pH 7,6 (5 min por vez).

A adição do 1º anticorpo (anti-NF 200 kDa, monoclonal) foi realizada em Tris 50 mM (pH 7,6), 1:300 (200 µl por poço), durante aproximadamente 12 h sob agitação leve. Cada poço foi lavado três vezes com 1 ml de Tris 50 mM pH 7,6 (5 min por vez).

O 2º anticorpo, biotilado (cabra anti-camundongo), foi adicionado em Tris 50 mM pH 7,6 numa concentração de 1:166 (200 µl por poço) durante 60 min sob agitação leve. Depois cada poço foi lavado três vezes com 1 ml de Tris 50 mM pH 7,6 (5 min por vez).

A amplificação foi obtida com a adição de estreptavidina conjugada com peroxidase do rabanete em Tris 50 mM pH 7,6, numa concentração de 1:500 (200 µl por poço) durante 60 min sob agitação leve. Após, cada poço foi lavado três vezes com 1 ml de Tris 50 mM pH 7,6 (5 min por vez). A revelação foi realizada pela redução da DAB (5 mg/10 ml) diluída em Tris 50 mM pH 7,6 (500 µl por poço) com 48 µl/12 ml de H₂O₂ (30 vol). O processo foi detido com água. Foram realizados controles negativos, onde durante a incubação por 12 h, foi omitido o 1º anticorpo.

RESULTADOS

1. Modelos de injúria e neuroproteção

Vários agentes têm sido referidos como promotores de neurotoxicidade para diferentes tipos de neurônios. Segundo estes trabalhos, diferentes tipos de morte neuronal são descritos como consequência de distintos mecanismos de injúria. Um aspecto interessante de estudar diversos meios de provocar danos neuronais, está na possibilidade relacionar os resultados com mecanismos de neuroproteção.

1.1. Aumento do cálcio citosólico: Uso do ionóforo A23187

Devido a diversidade de funções atribuídas ao aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} , inicialmente escolhemos testar o efeito da adição de um ionóforo como modelo de injúria neuronal.

Foi estudado o efeito do influxo de Ca^{2+} sobre a viabilidade neuronal, com o objetivo de verificar a possibilidade de distintos padrões morfológicos de morte, em nossas preparações neuronais.

Neurônios corticais plaqueados na presença de Ara-C ($3 \mu\text{M}$) em placas de 24 poços, sobre poli-D-lisina ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) e laminina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$), numa densidade de $110 \times 10^3 \text{ céls. cm}^{-2}$, foram expostos ao ionóforo de Ca^{2+} A23187 no 5º DIV. Utilizou-se três concentrações do ionóforo (0,1, 1 e $2,5 \mu\text{M}$), adicionadas diretamente ao meio de cultura, em três experimentos realizados por quadruplicado.

Foram detectados evidentes sinais de dano e de morte neuronal, por análise em microscópio de contraste de fase, para as duas maiores concentrações. O perfil

citotóxico variou muito em função da concentração utilizada (Fig. 9). Nos grupos tratados com 2,5 μM , 8 h após a adição já não haviam mais neuritos ou somas neuronais íntegros. No mesmo período, os grupos que receberam 1 μM , também demonstravam grande número de detritos e alguns neurônios com aumento do volume somático, sendo possível entretanto, a observação de alguns poucos prolongamentos ainda intactos. As culturas que receberam esta concentração de ionóforo depois de 10 h, tornaram-se idênticas as que receberam 2,5 μM . A concentração de 0,1 μM não provocou alterações morfológicas que indicassem dano neuronal, mesmo 24 h após a adição da droga, enquanto que neste mesmo período, nas culturas tratadas com 1 ou 2,5 μM só eram visualizados detritos celulares.

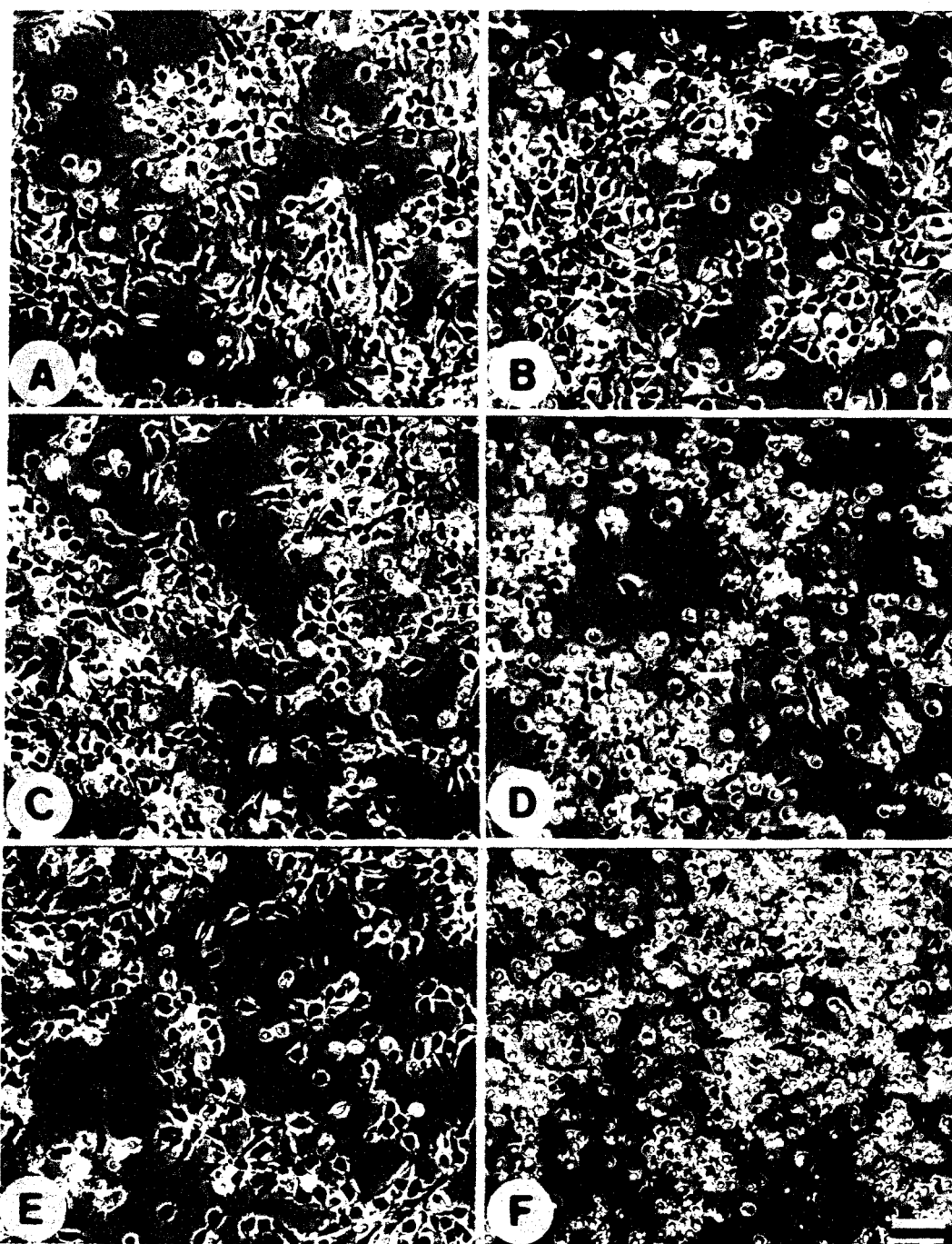
Desta forma, foram observados sinais de injúria crescentes, relacionados com o aumento da concentração do ionóforo. A adição de 0,1 μM não demonstrou sinais de neurotoxicidade, mesmo após 48 h de exposição a droga (Fig. 9).

1.2. Sensibilidade a excitotoxinas: Adição de NMDA

Neurônios corticais em cultura são sensíveis ao NMDA a partir da primeira semana *in vitro*, devido ao início da expressão de receptores específicos que atinge o máximo no 14^o DIV (Choi et al., 1987).

Considerando a riqueza destes receptores em neurônios corticais, empregamos este agonista glutamatérgico como modelo para estudar a morte neuronal. Tendo em vista a possibilidade da ocorrência de diferentes tipos de injúria, utilizamos distintos modelos para quantificação da viabilidade neuronal.

Figura 9. Efeito da adição do ionóforo A23187 sobre a morfologia de neurônios corticais em cultura



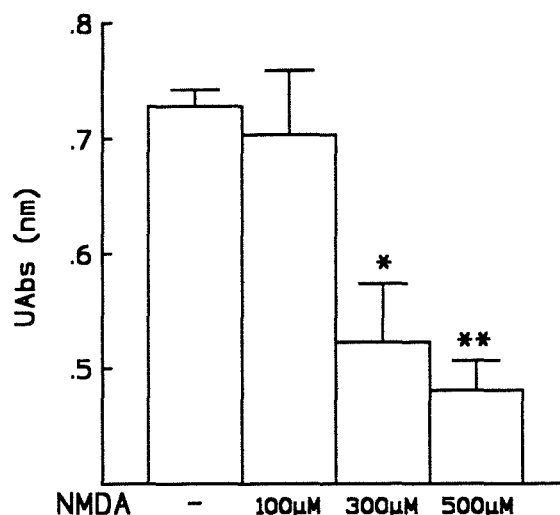
Campos representativos de culturas neuronais puras no 5º DIV, obtidas a partir de células corticais (E16), plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} , sobre poli-D-lisina. A coluna da esquerda apresenta diferentes campos no momento em que foi adicionado o ionóforo de Ca^{2+} ; à direita, os mesmos são demonstrados 8 h após a adição das distintas concentrações da droga (A, 0,1; C, 1 e E, 2,5 μM). Em B, não são observadas alterações morfológicas nos prolongamentos neuríticos e nos volumes somáticos. Em D, a rede de prolongamentos desaparece, sendo visível o aumento do volume de somas e a redução do número de células. Em F, o dano neuronal é massivo, com ruptura neurítica e de somas neuronais. O relativo aumento de restos celulares refringentes deve-se ao movimento e agrupamento dos mesmos no centro do poço. Barra 50 μm .

1.2.1. Determinação da viabilidade neuronal com o uso do MTT

A sensibilidade neuronal a diferentes concentrações deste agonista glutamatérgico foi testada inicialmente em culturas mistas no 21º DIV. Nestes casos, as células corticais foram semeadas em placas de 24 poços numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} e a determinação da viabilidade foi realizada através da técnica de MTT, 24 h após a exposição ao NMDA, durante 5 min (conforme Choi et al., 1987).

Como representado na Figura 10, quando adicionado 300 ou 500 μM de NMDA, a viabilidade neuronal caiu 28 e 34%, respectivamente, em relação aos controles ($p < 0,05$ e $p < 0,01$).

Figura 10. Efeito da adição de NMDA sobre a viabilidade de neurônios corticais em culturas mistas: Determinação através de MTT



A viabilidade foi determinada através da técnica de MTT. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por quadruplicado ($n = 12$). Os grupos foram comparados através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$ * ; $p < 0,01$ **).

Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na densidade óptica entre culturas controles e tratadas com 100 μM , embora fossem visíveis sinais morfológicos de dano neuronal (ruptura de neuritos) nestas últimas. Desta forma, este método de determinação de viabilidade demonstrou ser pouco eficiente na representação da injúria mediada por esta concentração da excitotoxina.

1.2.2. Determinação da viabilidade neuronal com o uso de LDH

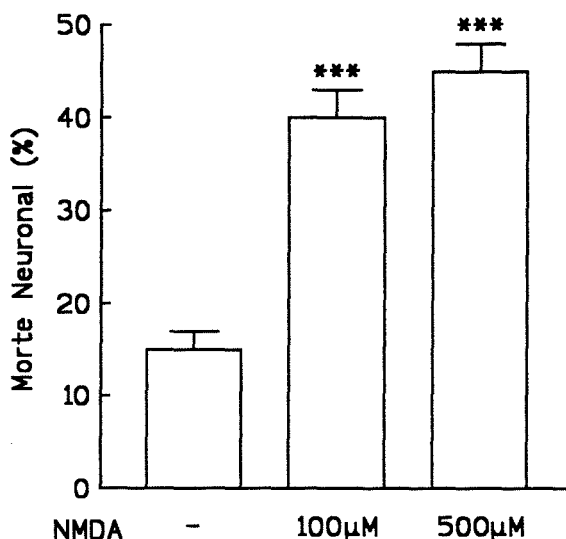
Na tentativa de reproduzir e quantificar as diferenças observadas entre os controles e as culturas tratadas com NMDA, empregamos a técnica baseada na quantificação da enzima citoplasmática LDH (Koh & Choi, 1987). Este método foi usado para determinar a viabilidade neuronal em culturas mistas no 8º DIV, obtidas de células corticais, inicialmente semeadas em placas de 24 poços, numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} . Estas culturas foram expostas ao NMDA (100 e 500 μM), e permaneceram sob ação da droga durante 24 h, sem troca de meio.

O valor da inclinação, obtido a partir da quantificação de LDH de uma alíquota do sobrenadante de cada tratamento, foi relacionado com o valor detectado após a extração com o detergente Triton X-100 para cada cultura. A soma do valor liberado, com o obtido a partir da extração foi considerado como valor total.

De acordo com a Figura 11, os grupos tratados com NMDA apresentaram uma liberação de LDH de 25 a 30% maior que os grupos controles ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações do agonista glutamatérgico.

Este resultado indicou que 100 μM de NMDA foi suficiente para causar a morte de praticamente todos os neurônios sensíveis a excitotoxina.

Figura 11. Efeito da adição de NMDA sobre a viabilidade de neurônios corticais em culturas mistas: Determinação através de LDH



A viabilidade foi determinada através da técnica de LDH. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por quadruplicado ($n = 12$). Os grupos foram comparados através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,001$ ***).

Desta forma, foi demonstrado que as culturas neuronais, após a primeira semana *in vitro*, apresentam sensibilidade ao NMDA, e que a técnica de LDH parece ser mais adequada que a de MTT para determinação da viabilidade neuronal em experimentos de excitotoxicidade.

A percentagem de células mortas nas culturas tratadas com NMDA, em relação as culturas irmãs onde foi realizada a extração da LDH total, com Triton X-100, indicou

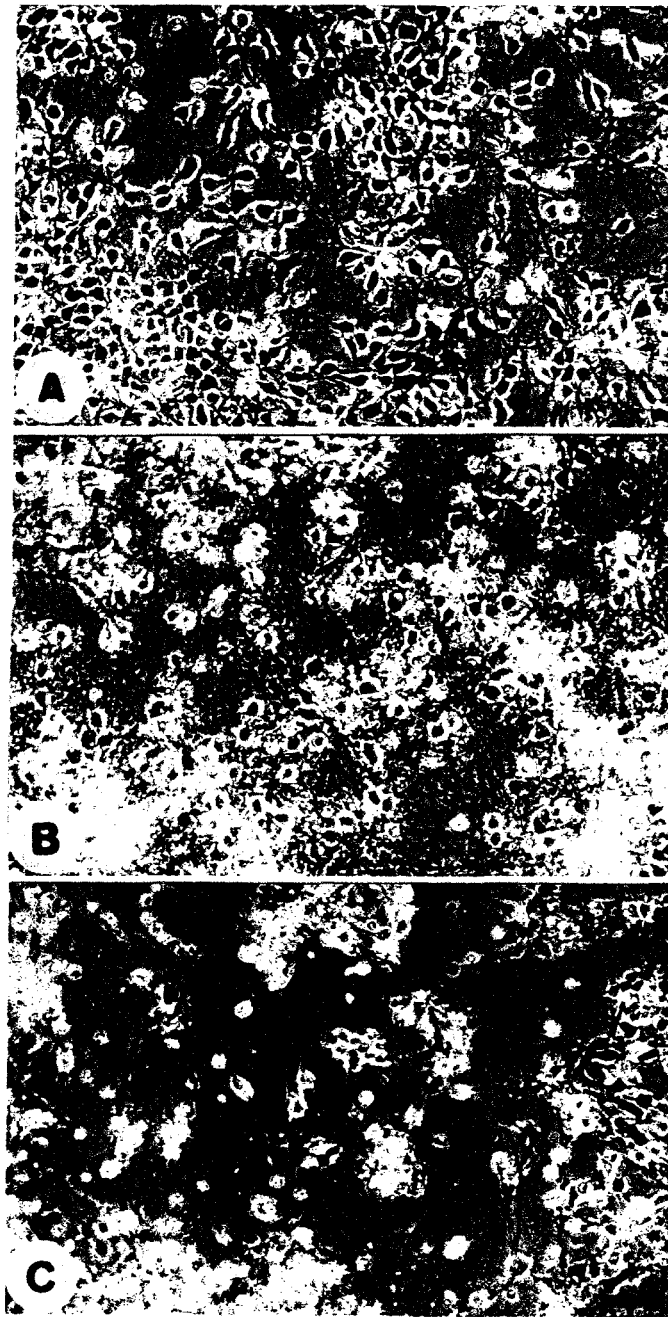
uma população neuronal de aproximadamente 50% de células insensíveis a esta excitotoxina.

Por outro lado, em experimentos de excitotoxicidade, as culturas neuronais são expostas a excitotoxinas por períodos breves de tempo, tornando-se necessária a realização de trocas de meio de cultura. Entretanto, observamos em nossas culturas controles, sinais morfológicos de injúria e morte neuronal, indicando que a simples troca de meio desencadeia dano neuronal (Fig. 12 e Fig. 13).

Para esclarecer se o dano neuronal de nossas culturas, submetidas a trocas de meio, estava associado com mecanismos excitatórios mediados por receptores NMDA, testamos a sensibilidade dos neurônios corticais a este agonista glutamatérgico. Nestes estudos, também utilizamos o antagonista NMDA-seletivo MK801.

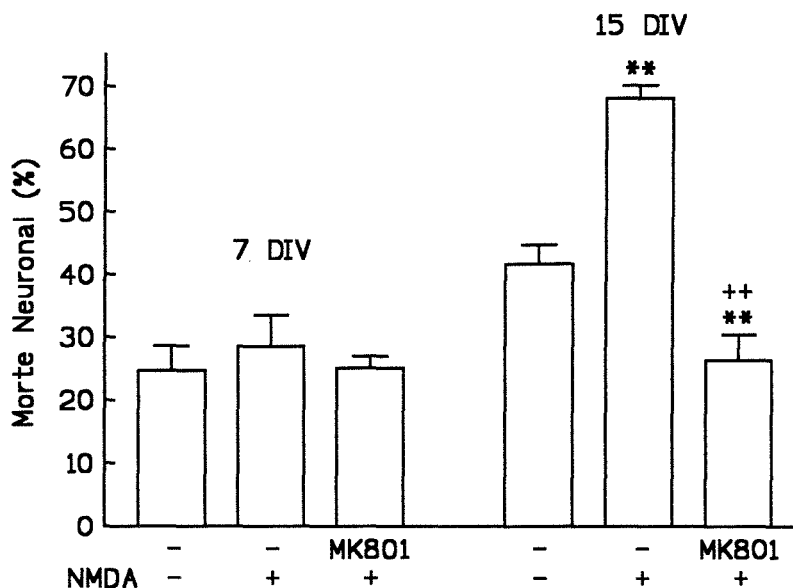
Culturas neuronais mistas no 7º DIV, tiveram o meio substituído por solução salina de incubação (SSC, modificada de Choi et al., 1987), na qual foi adicionado NMDA (100 µM). Após 5 min esta foi removida, sendo repostado novamente meio de cultura. Nestas condições, foram detectadas concentrações de LDH aproximadamente 75% inferiores as obtidas em culturas irmãs onde foi procedida extração total (Fig. 13). Nestes casos, a extração total foi considerada como o valor da inclinação, obtida 24 h após a exposição da cultura a 500 µM de NMDA e 10 µM de glicina (Hewett et al., 1994).

Figura 12. *Dano neuronal causado por trocas de meio*



Culturas neuronais puras no 5º DIV, imediatamente antes da primeira troca do meio de cultura (A). As mesmas culturas no 7º DIV, quando foi realizada uma segunda troca de meio (B) e, no 9º DIV (C). As células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} , sobre poli-D-lisina, adicionando-se Ara-C ($3 \mu\text{M}$). Em B, 48 h após a primeira substituição de meio, observa-se profuso aumento da ramificação neurítica com sinais de vesiculação destes prolongamentos. O aumento de refringência é devido a acúmulos de restos celulares. Nestas culturas, já são claros os sinais de diminuição do número neuronal. Em C, 48 h após a segunda troca de meio, os sinais morfológicos de injúria são restritos a alguns poucos somas ou prolongamentos restantes. Na superfície antes ocupada pela grande ramificação neurítica (B), pode-se observar amplas áreas descobertas. A relativa diminuição dos restos celulares é devida a remoção dos mesmos durante as trocas de meio. Barra 50 μm .

Figura 13. Excitotoxicidade de culturas corticais mistas em função da idade



Viabilidade neuronal de culturas mistas, obtidas de células corticais (E16), plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} , em placas de 24 poços, foi determinada através da técnica de LDH. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por quadruplicado ($n = 12$). Os grupos (7° ou 15° DIV) foram comparados através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. Nas culturas com 15 DIV, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e os controles ($p < 0,01$ **) e entre os grupos tratados com NMDA ($p < 0,01$ ++).

A Figura 13 demonstra que a percentagem de neurônios mortos nos grupos em que foi adicionado o antagonista MK801 (10 μM) no 7° DIV, foi equivalente a dos grupos NMDA e controles, entre 25 e 30%. Entretanto, quando adicionado em culturas neuronais mistas no 15° DIV, este antagonista protegeu significativamente da ação deletéria do NMDA (100 μM), reduzindo em aproximadamente 40% a morte neuronal ($p < 0,001$). Da mesma forma, em relação aos controles, também houve uma proteção de 15% ($p < 0,001$) quando MK801 foi adicionado no 15° DIV. Nos grupos controles, onde simplesmente foi realizada a troca do meio de cultura, a morte neuronal foi de 40%, 15% superior a dos grupos controles de 7 DIV.

Superfícies idênticas, recobertas por monocamadas secundárias de astrócitos corticais (sem neurônios), foram submetidas ao mesmo procedimento de trocas de meio e de exposição a excitotoxina. Para estes casos, considerou-se como 100% de morte, o valor da inclinação obtida com a exposição a 500 μM de NMDA e 10 μM de glicina por 24 h, ou a partir da extração com Triton X-100, em ambos casos, não foram detectados níveis mensuráveis de LDH. Isto significa, que as monocamadas utilizadas não apresentam sensibilidade a excitotoxina empregada nem as trocas de meio realizadas, não liberando LDH ao meio, e portanto, não contribuindo ao valor da inclinação obtida.

1.2.3. Determinação da viabilidade neuronal por contagem de neurônios

No modelo experimental de co-cultura, a contagem do número de neurônios foi empregada na verificação da sensibilidade destes ao NMDA.

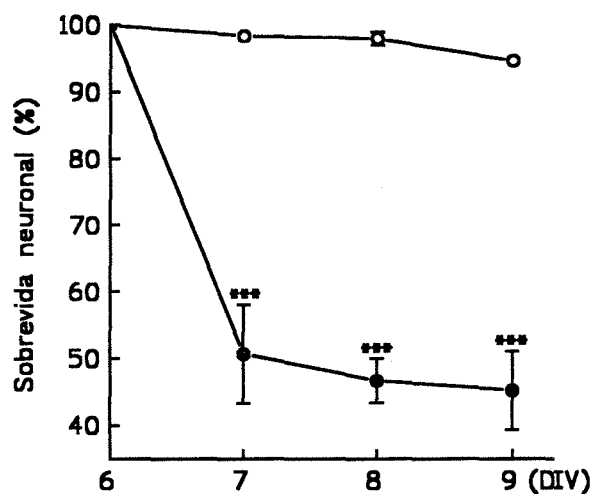
Células corticais dissociadas foram plaqueadas numa densidade de $12,5 \times 10^3$ céls. cm^{-2} sobre monocamadas secundárias purificadas de astrócitos, com 20-30 DIV. No 6º DIV (referente ao estabelecimento da co-cultura), o número de neurônios foi determinado e considerado como 100%. Foi adicionado NMDA (100 μM) ao meio de cultura dos grupos tratados, e igual volume de veículo aos grupos controles. Posteriormente, foram contados os neurônios nas mesmas áreas, no 7º, 8º e 9º DIV, quando a cultura foi fixada e realizado imunocitoquímica para neurofilamentos (200 kDa, monoclonal).

Conforme a Figura 14, o tratamento com 100 μM de NMDA, durante 24 h, provocou uma perda aproximada de 40% do número inicial de neurônios, atingindo

cerca de 55%, 72 h após a adição da droga. Este resultado, indica que a população neuronal sensível a excitotoxina morreu praticamente toda nas primeiras 24 h. Pode-se constatar também, que no grupo controle, a redução do número de neurônios foi inferior a 5%, indicando que a permanência do mesmo meio de cultura, durante 72 h, não representou um fator importante para a redução da população neuronal.

Na co-cultura, a morte neuronal decorrente da exposição ao NMDA, nas primeiras 24 h, é bastante aproximada a verificada na cultura mista, cerca de 40% (conforme demonstrado na Fig. 11).

Figura 14. Efeito da adição de NMDA sobre neurônios corticais em co-cultura com monocamadas secundárias de astrócitos corticais



A viabilidade de neurônios corticais de culturas controle (-O-), e expostas a 100 μ M de NMDA (-●-) foi determinada através da contagem de células marcadas por imunocitoquímica antineurofilamento. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por quadruplicado (n = 12). Os grupos foram comparados com o controle através de ANOVA seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,001$ ***).

1.3. Trocas de meio: Injúria neuronal por deprivação de fatores tróficos

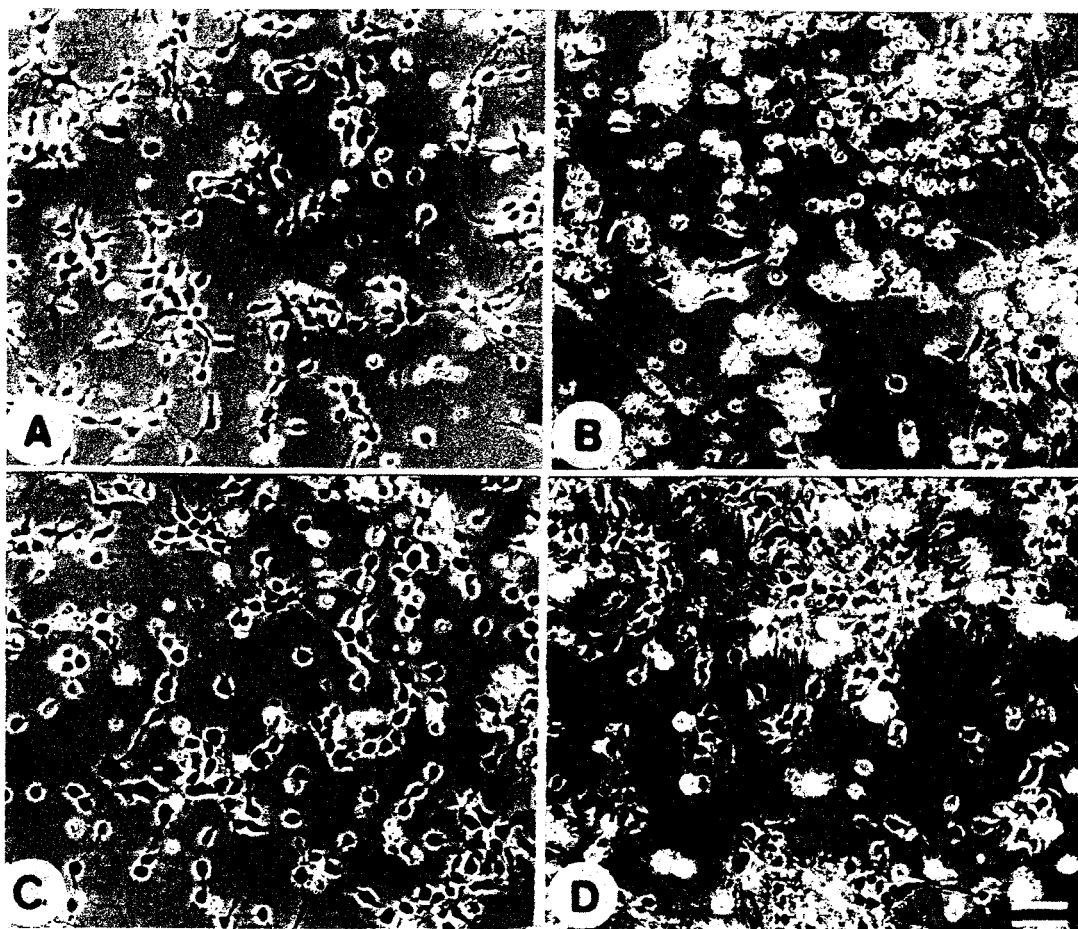
A substituição regular do meio de cultura por meio fresco tem sido relacionada com a diminuição da sobrevivência de diferentes tipos de neurônios (Driscoll et al., 1991; Rosenberg & Aizenman, 1989). Este dano celular foi descrito como sendo mediado por receptores NMDA (Driscoll et al., 1991).

1.3.1. Meio condicionado por astrócitos: Redução do dano mediado por trocas de meio

A Figura 13, apresentada anteriormente, demonstra que aproximadamente 25% dos neurônios, submetidos a troca de meio, morrem independentemente do bloqueio de receptores NMDA. Em adição, considerando que os danos observados, independem da idade da cultura, é provável que estejam relacionados com restrição trófica e não com a ativação destes receptores glutamatérgicos. Desta forma, testamos o efeito da substituição de meio fresco por meio condicionado por astrócitos.

Em nossos experimentos, utilizamos monocamadas secundárias de astrócitos buscando eliminar a possível contribuição de outras células gliais, presentes em culturas primárias, no processo de condicionamento do meio. Para condicionar o meio de cultura, utilizamos 2 ml de MEM, suplementado com 5% de SC, por placa de 35 mm (8 cm²), sobre monocamadas secundárias confluentes (entre o 20° e o 30° DIV), durante 24 h. Após este período, o meio era removido e empregado na substituição do meio de culturas neuronais puras, mistas, ou de co-culturas. A Figura 15 demonstra a neuroproteção mediada pelo meio condicionado por astrócitos, em culturas puras de neurônios corticais.

Figura 15. *Neuroproteção mediada por meio condicionado*



Culturas neuronais puras, obtidas a partir de células corticais (E16) plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} sobre poli-D-lisina, no 2º DIV, imediatamente antes da primeira troca de meio (A e C) e no 8º DIV, após três substituições do meio de cultura (B e D). O inibidor mitótico Ara-C ($10 \mu\text{M}$) foi adicionado apenas na segunda troca de meio (4º DIV). A terceira troca foi realizada no 6º DIV. As fotos superiores (A e B) são campos representativos de culturas que receberam meio fresco nas substituições, enquanto C e D de outras que receberam meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos. Pode-se observar em D, a presença de neuritos (inexistentes em B) e que o número de somas foi mantido semelhante a C, com um leve agrupamento dos mesmos. Em B, devido a massiva morte neuronal, é possível a visualização de alguns astrócitos corticais, alongados e não refringentes. Barra $50 \mu\text{m}$.

A substituição do meio de cultura por meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos corticais, demonstrou reduzir os sinais de injúria ou mesmo a morte neuronal em culturas neuronais puras, mistas ou co-culturas.

1.3.2. Modelo da co-cultura: Neurônios semeados sobre monocamadas secundárias de astrócitos corticais

Para estudar a participação trófica dos astrócitos na neuroproteção da injúria mediada por trocas de meio, propomos um modelo de co-cultura onde a morte neuronal pudesse ser acompanhada ao longo dos dias.

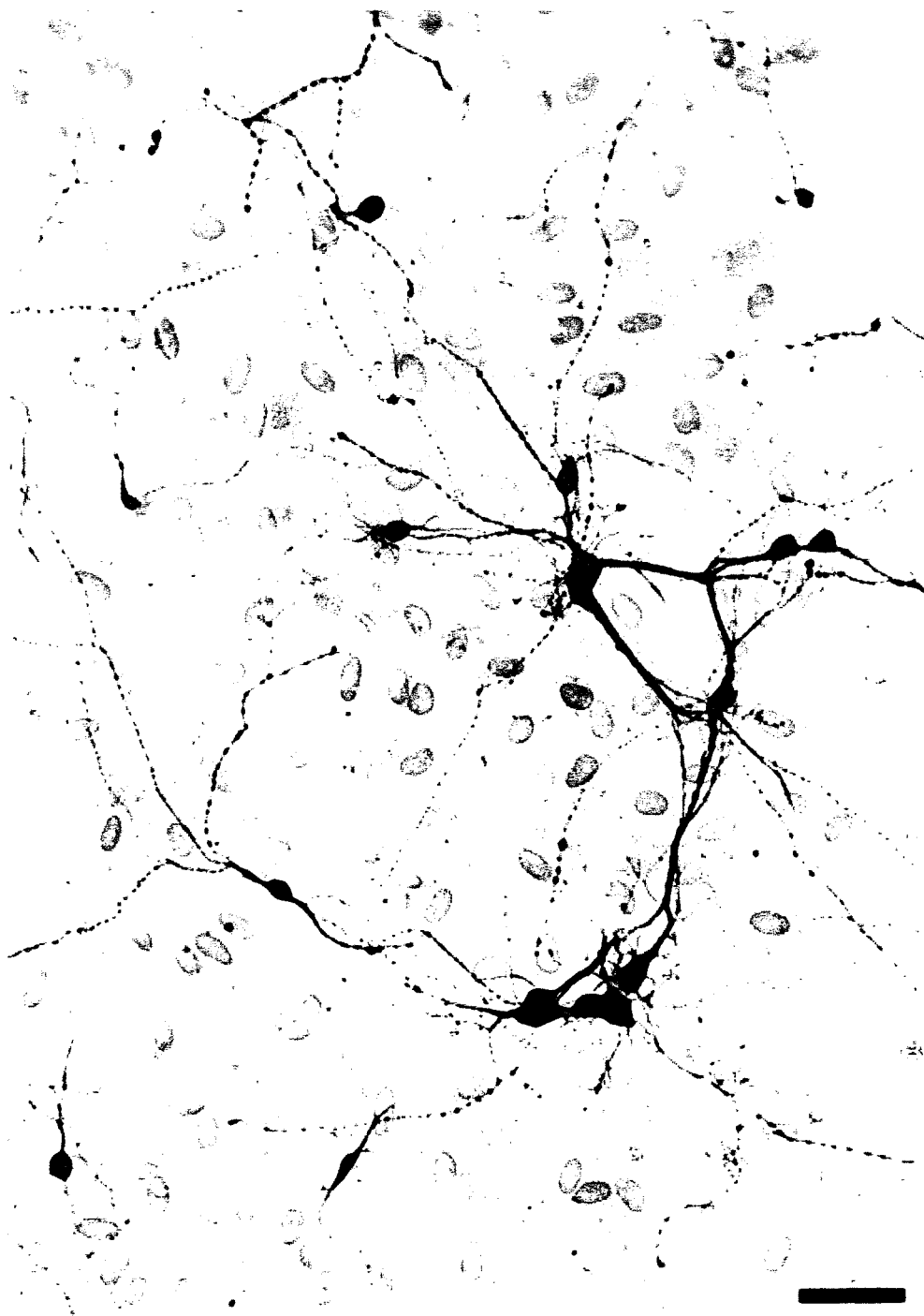
Na concepção deste modelo, definimos a determinação da viabilidade por contagem do número de neurônios como o método mais adequado para acompanhar as conseqüências desta injúria. Entretanto, para permitir a contagem destas células, a densidade neuronal deveria ser baixa ($12,5 \times 10^3$ céls. cm^{-2}). Em experimentos prévios, determinamos que culturas de neurônios corticais, nesta densidade, não suportam trocas sucessivas de meio, quando plaqueadas sobre substrato artificial. Desta forma, utilizamos monocamadas secundárias confluentes de astrócitos como suporte para culturas neuronais de baixa densidade, evitando a inviabilidade do modelo pela morte de todos os neurônios das culturas controles.

Células corticais obtidas de embriões E16, foram plaqueadas sobre monocamadas secundárias confluentes de astrócitos (entre o 20° e o 30° DIV) em MEM suplementado com 5% de SFB e SC e 3 μM de Ara-C. Após 6 dias de co-cultura, durante os quais não foram realizadas trocas de meio, o número neuronal de cada poço

foi estimado por microscopia de contraste de fase em quatro campos previamente marcados aleatoriamente ($\sim 0,5 \text{ mm}^2$), sendo considerado como 100%. Os neurônios viáveis foram reconhecidos como células refringentes com os característicos processos neuríticos. O número médio de neurônios no 6º DIV foi de $79 \pm 15 \text{ mm}^{-2}$. Logo após a contagem, o meio de cultura de cada poço foi substituído por MEM, suplementado com 5% de SC e $3 \mu\text{M}$ de Ara-C. Outro processo idêntico de substituição de meio, foi realizado 48 h após o primeiro, no 8º DIV de co-cultura. O número neuronal foi determinado por contagem dos mesmos campos, inicialmente escolhidos aleatoriamente, no 7º, 8º e 9º DIV de co-cultura. Para ratificar o número de células neuronais obtidas a partir da contagem, as co-culturas foram processadas para imunocitoquímica anti-neurofilamento (200 kDa) em diferentes tempos, 6º a 9º DIV (Fig. 16 e Fig. 20).

Nas culturas controles que tiveram o meio substituído por meio fresco, o número de neurônios diminuiu em 28% 24 h após a primeira troca, e em 43% depois da segunda substituição (Fig. 19). Estes experimentos demonstraram que a troca de meio induziu uma rápida diminuição do número de neurônios e da extensão da rede neurítica, sem afetar o aspecto da monocamada astrocitária (Fig. 20 A). Por outro lado, quando utilizado meio condicionado por astrócitos corticais no lugar de meio fresco, a perda neuronal foi significativamente menor, respectivamente 6% e 15% (Fig. 19).

Assim, demonstramos que trocas de meio de cultura provocam injúria neuronal devido a deprivação de fatores tróficos astrocitários e validamos um modelo para estudar neuroproteção em neurônios submetidos a um suporte trófico insuficiente.

Figura 16. Modelo da co-cultura

Neurônios corticais marcados por imunocitoquímica anti-neurofilamento, no 9º DIV de co-cultura com astrócitos corticais, após duas trocas consecutivas de meio. Células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de $12,5 \times 10^3$ céls. cm^{-2} sobre monocamadas secundárias de astrócitos corticais com 20 DIV. A fixação com metanol-acetona conferiu uma fraca marcação inespecífica nos núcleos dos astrócitos utilizados como substrato para os neurônios corticais. Notar o aspecto de contas de rosário dos prolongamentos neuríticos, indicando injúria neuronal. Este aspecto morfológico evolui rapidamente para ruptura dos mesmos, no sentido do soma. Barra 50 μm .

Elevadas concentrações extracelulares de K^+ (20-40 mM) aumentam a sobrevivência de diferentes tipos de neurônios, do sistema nervoso periférico (Scott, 1977; Collins & Lile, 1989; Wakade & Thoenen, 1984; Bennett & White, 1979), e central (Lasher & Zagon, 1972; Gallo et al., 1987).

Segundo Collins e Lile (1989), o K^+ aumenta a sobrevivência neuronal através da despolarização e do resultante influxo de Ca^{2+} extracelular. A sobrevivência neuronal dependente de atividade elétrica também tem sido correlacionada com a liberação de fatores tróficos devido a despolarização (Brenneman & Eiden, 1986; Lipton, 1986). Outra possibilidade seria a ativação de sistemas de segundos mensageiros através da associação cálcio-calmodulina (Gallo et al., 1987).

Para testar se o efeito de elevadas concentrações de K^+ poderiam mimetizar a neuroproteção mediada pela adição de meio condicionado, utilizamos meio fresco de igual composição aos controles, mas com 21 mM deste cátion.

A tabela 14 demonstra a neuroproteção conferida pela alta concentração de K^+ , que aumentou significativamente a sobrevivência neuronal com respeito aos controles durante todo o período estudado. A análise em microscopia de contraste de fase indicou que o aumento da concentração deste íon não alterou o aspecto morfológico dos neurônios ou dos astrócitos.

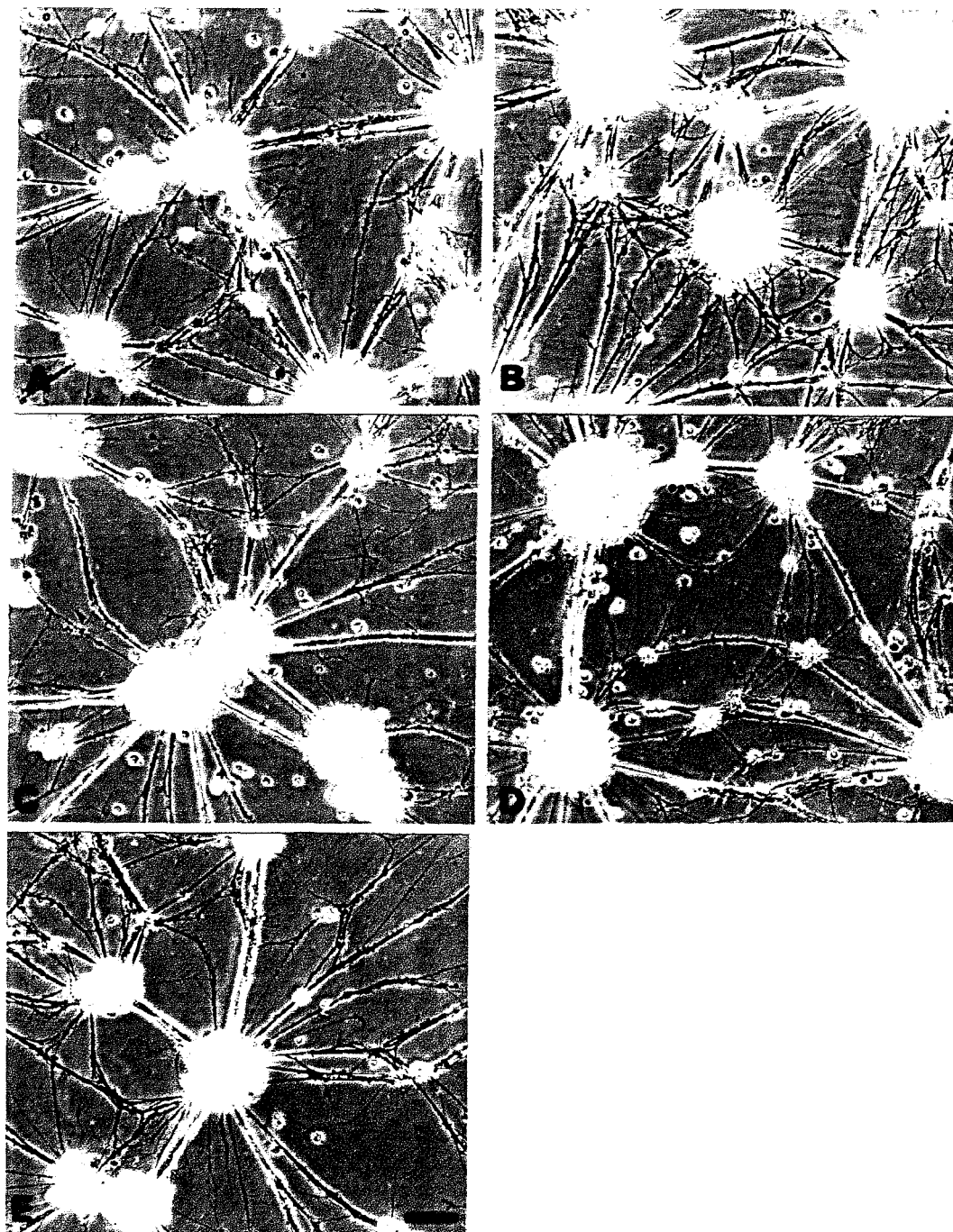
1.3.3. Bloqueadores de canais de potássio do tipo I_A: Ação semelhante a altas concentrações de potássio

Com o objetivo de relacionar o efeito trófico da alta concentração de K⁺ com a despolarização neuronal, testamos a adição de um bloqueador pré-sináptico de canais de K⁺ de tipo I_A (DTX), que também provoca despolarização neuronal (Weller et al., 1985). Inicialmente, testamos o efeito deste bloqueador sobre culturas puras de neurônios corticais, determinando a viabilidade neuronal pela quantificação da enzima LDH e pela técnica de MTT.

Culturas de neurônios corticais (14^o DIV), inicialmente plaqueadas numa densidade de 110 x 10³ céls. cm⁻², foram submetidas a concentrações crescentes de α -DTX (0,1-10 μ M), diretamente adicionada ao meio. Foi realizada também uma comparação do efeito de diferentes polipeptídeos de DTX sobre a viabilidade neuronal (Fig. 17 e Fig. 18). A viabilidade celular foi determinada 24, 48, 72 e 96 h após uma única administração da droga.

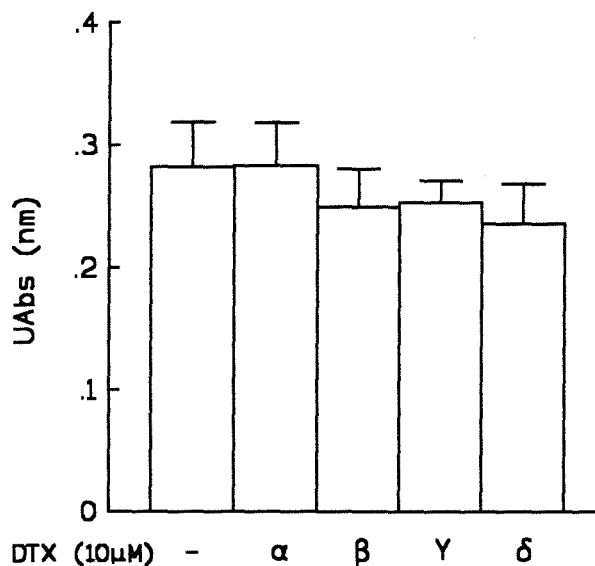
Verificamos que a adição da neurotoxina não induziu a morte ou provocou qualquer efeito deletério sobre a morfologia celular. Ao contrário, as culturas puras, mantidas na presença de α -DTX por vários dias, demonstraram neurônios com melhor aspecto morfológico, contrastando com a progressiva deterioração observada em culturas irmãs não tratadas.

Figura 17. Efeito de diferentes polipeptídeos de DTX sobre neurônios corticais em cultura



Campos representativos de culturas neuronais puras no 5º DIV, 24 h após a adição da droga. As células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} sobre poli-D-lisina e laminina. O substrato utilizado permitiu a migração neuronal, originando acúmulos de somas (zonas de grande refringência) e agrupamentos de neuritos. Cada grupo recebeu $10 \mu\text{M}$ dos diferentes tipos de DTX. Não foram observadas alterações morfológicas que indicassem dano neuronal, nem qualquer diferença com relação aos grupos não tratados. (A, controle; B, α -; C, β -; D, γ - e E, δ -dendrotoxinas). Barra $50 \mu\text{m}$.

Figura 18. Efeito de diferentes polipeptídeos de DTX sobre a viabilidade neuronal

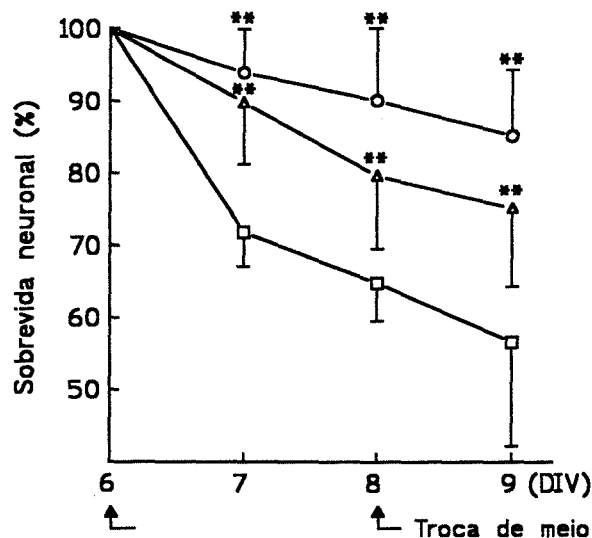


A determinação da viabilidade de culturas neuronais puras (5° DIV) foi realizada através da técnica de MTT, 24 h após a adição da droga. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por quadruplicado ($n = 12$). Os grupos foram comparados através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls*.

Para caracterizar a aparente ação neuroprotetora da α -DTX, foi empregado o modelo da co-cultura, com grupos que receberam diferentes concentrações do polipeptídeo, adicionado ao meio fresco em cada troca no 6° e 8° DIV (Fig. 19).

Conforme demonstrado na Figura 19, o número de neurônios em co-culturas não tratadas diminuiu progressivamente 24 h depois da primeira e da segunda troca completa de meio. Entretanto, a DTX (1 μ M) adicionada ao meio fresco, preveniu significativamente a perda neuronal com respeito as culturas controles, 10% e 25% no 7° e 9° DIV, respectivamente. Outras concentrações de DTX (0,1 e 10 μ M) também exerceram efeitos protetores significativos quando comparados com condições controles (Tab. 14).

Figura 19. Efeito neuroprotetor da DTX na injúria mediada por trocas de meio



Neurônios (6° DIV) sobre monocamadas secundárias de astrócitos corticais (26° a 36° DIV), foram submetidos a duas trocas completas de meio. Receberam meio fresco (□) e contendo 1 μM de DTX (Δ) ou meio condicionado (O). A viabilidade neuronal foi determinada por contagem de células marcadas por imunocitoquímica anti-neurofilamento. Os dados representam a média ± D.P. de três experimentos realizados por quadruplicado (n = 12). Na avaliação estatística, os tratamentos foram comparados com os controles através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,01$ **).

A Figura 20, demonstra características morfológicas típicas de neurônios em culturas controles (A) e tratadas com 1 μM de DTX, no 9° DIV, depois de duas trocas consecutivas de meio. Em contraste ao pequeno número de neurônios e a escassez de processos neuríticos, culturas irmãs expostas a mudanças idênticas com meio fresco contendo DTX (1 μM), demonstraram uma significativa proteção neuronal e preservação da rede neurítica (B).

Para determinar se o efeito protetor da DTX foi devido ao bloqueio de canais de K^+ de tipo I_A , um outro bloqueador de canais de K^+ de tipo I_A , 4-aminopiridina (4-AP), foi testado segundo o mesmo protocolo. A adição de 4-AP (100 ou 500 μM) ao meio

fresco, preveniu significativamente a perda neuronal em uma extensão comparável a DTX (Fig. 21, Tab. 14).

Tabela 14. Viabilidade de neurônios semeados sobre monocamadas secundárias de astrócitos e submetidos a trocas de meio de cultura

	7° DIV % 24 h média ± DP (n = 9)	8° DIV % 48 h média ± DP (n = 9)	9° DIV % 72 h média ± DP (n = 9)
Controle	71,8 ± 4,7	64,8 ± 5,3	56,6 ± 14,4
DTX 0,1 µM	85,5 ± 5,3 ***	78,3 ± 7,6 ***	69,5 ± 10,0 *
DTX 10 µM	81,5 ± 10,3 *	74,4 ± 11,3 *	71,1 ± 12,1 *
4-AP 100 µM	86,6 ± 10,6 **	79,6 ± 13,9 **	72,4 ± 12,1 *
4-AP 500 µM	85,1 ± 7,6 ***	76,0 ± 8,9 **	73,9 ± 7,4 **
K⁺ 21 mM	92,0 ± 5,2 **	84,3 ± 3,8 ***	80,4 ± 6,4 **

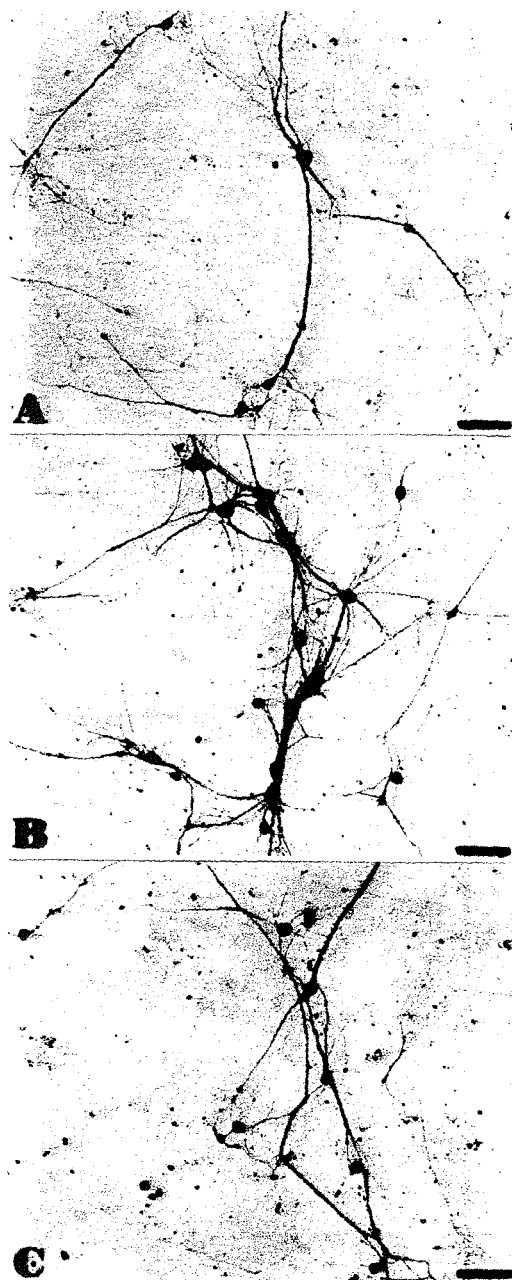
Foram realizadas trocas de meio no 6° e no 8° DIV. Os grupos foram comparados com os controles através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* (* p < 0,5; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

1.3.4. Neuroproteção mediada por α -DTX e 4-AP: Participação de canais de cálcio do tipo L

Foi demonstrado que o efeito promotor de sobrevivência do alto K⁺ está relacionado com canais de Ca²⁺ do tipo L sensíveis a di-hidropiridina (Koike et al., 1989). Para verificar se a sobrevivência neuronal mediada pelo bloqueio de canais de K⁺ estava associada com uma ativação indireta de canais de Ca²⁺ voltagem dependentes, foi testada a ação do antagonista nifedipina, sozinho ou com os bloqueadores de canais de K⁺.

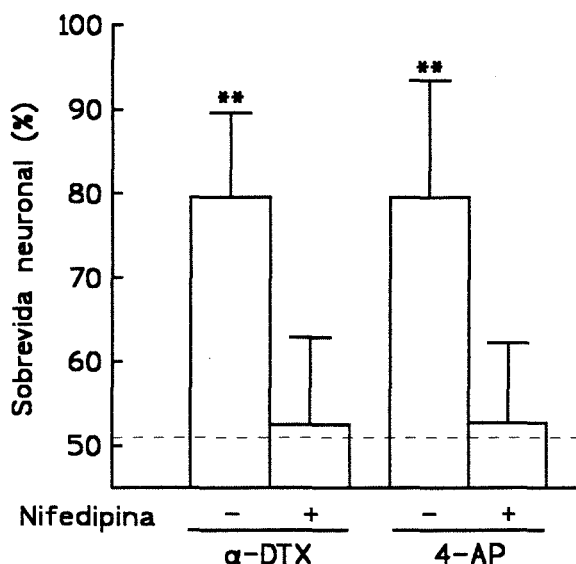
Para tanto, foram repetidos experimentos de co-cultura segundo o protocolo acima, sendo testada a ação deste antagonista de canais do tipo L. Quando aplicada sozinha, a nifedipina (5 µM) não afetou significativamente a viabilidade neuronal. Entretanto, aboliu o efeito protetor da DTX e 4-AP (Fig. 20 C e Fig. 21).

*proteção por DTX: Envolvimento de canais de Ca^{2+} do tipo L
s a nifedipina*



ais (E16) foram plaqueadas numa densidade de $12,5 \times 10^3$ céls. cm^{-2} sobre secundárias de astrócitos (20-30 DIV), e mantidas na presença de Ara-C ($3 \mu M$). As culturas foram submetidas a trocas completas de meio no 6º e 8º DIV, fixadas e coradas com anticorpo anti-neurofilamento no 9º DIV. Em cada troca de meio, os seguintes tratamentos foram adicionados ao meio fresco: (A) veículo; (B) $1 \mu M$ de DTX; (C) $1 \mu M$ de DTX com $1 \mu M$ de nifedipina. As fotomicrografias não representam necessariamente dados quantitativos (demonstrados na Figura 19) mas apenas mudanças qualitativas na morfologia das células. Os resultados do tratamento com DTX (aumento do número e extensão das redes neuríticas) são revertidos pela adição de nifedipina (C). Barra $50 \mu m$.

Figura 21. Nifedipina anula a proteção induzida por DTX ou 4-AP em trocas repetitivas de meio



Neurônios (6° DIV) em co-culturas, foram submetidos a trocas completas de meio por meio fresco contendo DTX (1 μ M) ou 4-AP (100 μ M), com ou sem nifedipina (5 μ M). O número de neurônios foi determinado imediatamente antes e 48 h depois a troca de meio, através de imunocitoquímica anti-neurofilamento. A linha pontilhada representa média de valores controles. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por triplicado (n = 9). Na avaliação estatística os grupos foram comparados com os controles através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,01$ **).

2. Interação neurônio-astrocítico e injúria neuronal

Intimamente relacionados com a fisiologia neuronal (Desagher et al., 1996; Giulian et al., 1993; Rosenberg & Aizenman, 1989), os astrócitos também podem paradoxalmente mediar a injúria das células nervosas (Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Kim & Täuber, 1996; Skaper et al., 1995).

Considerando que os astrócitos podem ser estimulados com LPS (Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Kim & Täuber, 1996; Skaper et al.,

1995), utilizamos esta endotoxina com a finalidade de estudar a participação destas células gliais numa possível via de injúria neuronal.

2.1. Modelo para o estudo do *estresse* oxidativo endógeno: Co-cultura de células PC12 e monocamadas secundárias de astrócitos corticais

Para testar uma possível ação neurotóxica de astrócitos, após a estimulação com LPS, inicialmente utilizamos um modelo de co-cultura destas células com a linhagem celular PC12.

A estimulação dos astrócitos com a endotoxina está relacionada com a liberação de citocinas inflamatórias e a indução da NOS com subsequente aumento da produção de NO \cdot (Bock et al., 1996; Bronstein et al., 1995; Galea et al., 1992; Lee et al., 1996; Skaper et al., 1995). Em adição, radicais livres podem alterar resíduos tirosina dos receptores tirosina quinases (Ischiropoulos et al., 1992) comprometendo vias de transdução de sinais tróficos (Fantl et al., 1993). Considerando que as células PC12 são muito dependentes de fatores tróficos, o aumento da produção de NO \cdot poderia diminuir a viabilidade destas células tumorais.

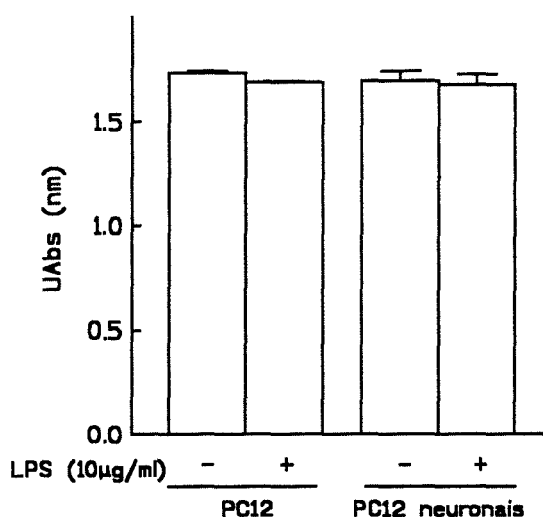
2.1.1. Efeito do LPS sobre a viabilidade de células PC12

Células PC12 foram semeadas em placas de 24 poços, previamente tratados com poli-D-ornitina (0,1 mg ml⁻¹), numa densidade de 75 x 10³ céls. cm⁻². Após 24 h, foram adicionadas três concentrações de LPS (0,1, 1 e 10 µg ml⁻¹), determinando-se a viabilidade celular, através da técnica de MTT, 24, 48 e 72 h depois da exposição à endotoxina. Os experimentos também foram realizados com células PC12 neuronais, previamente diferenciadas com NGF.

Em todas as concentrações, durante o período estudado, não foram observadas alterações morfológicas ou desprendimento das células inicialmente aderidas. O uso do MTT na determinação da viabilidade destas células, demonstrou que as diferentes concentrações de LPS empregadas não foram citotóxicas para esta linhagem celular.

A Figura 22 apresenta a comparação entre grupos controles e tratados, de células diferenciadas ou não, que receberam $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ da endotoxina. Nesta situação, a densidade óptica obtida demonstrou ser a mesma entre culturas controles e aquelas que receberam LPS, indicando não ter ocorrido alteração da viabilidade celular. Da mesma forma, não foram observadas alterações morfológicas que indicassem diminuição do número de células quando as culturas foram analisadas sob microscopia de contraste de fase. Em concentrações mais baixas, também não foi observada diminuição da viabilidade celular.

Figura 22. Efeito da adição de LPS sobre a viabilidade de células PC12



A viabilidade celular foi determinada pela técnica de MTT 72 h após a exposição a LPS. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por triplicado ($n = 9$). Os grupos tratados foram comparados com os respectivos controles através de ANOVA de uma via.

Assim, a ausência de citotoxicidade direta mediada pela LPS, permitiu que o efeito da estimulação de astrócitos com esta endotoxina fosse estudado em um modelo de co-cultura com estas células tumorais.

2.1.2. Monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas por LPS em co-cultura com células PC12

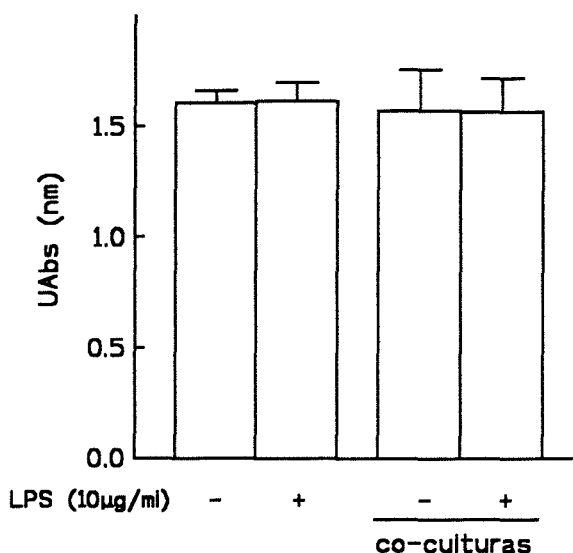
Monocamadas secundárias confluentes de astrócitos corticais, em placas de 35 mm, foram estimuladas com 1 ou 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS, no 20° e 24° DIV. A endotoxina foi adicionada ao meio de cultura e este foi substituído após 48 h por meio fresco. Com 26° DIV, depois da troca de meio, foram colocadas sobre as monocamadas controles ou tratadas, lamínulas Thermanox com células PC12 voltadas para cima ou no sentido da monocamada. Sobre a monocamada de cada placa de 35 mm foram acrescentadas três lamínulas contendo em cada uma 75×10^3 céls. cm^{-2} . Após 48 h de co-cultura, as lamínulas foram transferidas para placas de 24 poços, e a viabilidade das células PC12 foi determinada pela técnica de MTT.

Nas duas concentrações empregadas, não foram obtidas alterações de viabilidade em relação aos controles. Este resultado foi comparado com o obtido de lamínulas que foram transferidas para placas de 24 poços sem monocamadas de astrócitos.

A Figura 23, demonstra a densidade óptica obtida de células PC12, após 48 h de co-cultura com monocamadas de astrócitos estimulados ou não com LPS, indicando que não houve diminuição da viabilidade celular. Também não foram observadas diferenças

morfológicas entre co-culturas controles e aquelas as quais a monocamada foi previamente estimulada com LPS.

Figura 23. *Efeito de monocamadas estimuladas com LPS sobre a viabilidade de células PC12, em co-culturas*



A viabilidade celular foi determinada pela técnica de MTT. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por triplicado ($n = 9$). Os grupos tratados foram comparados com os respectivos controles através de ANOVA de uma via.

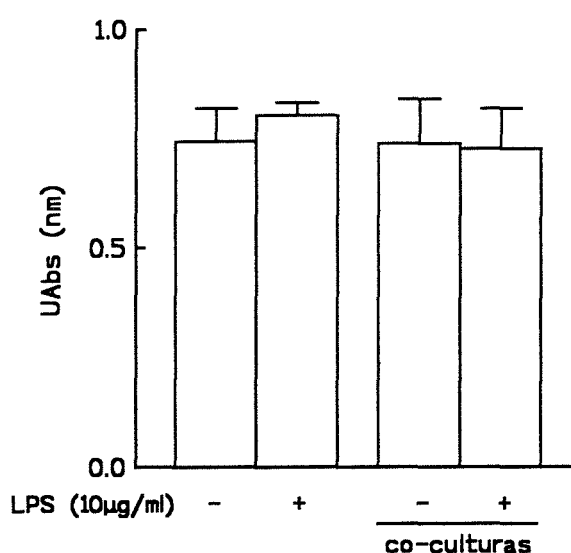
2.1.3. Monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas por LPS em co-cultura com células PC12 neuronais

Conforme relatado acima, foram estabelecidas co-culturas entre monocamadas secundárias de astrócitos, estimuladas por LPS no 20° e 24° DIV, e células PC12 diferenciadas aderidas a lamínulas Thermanox. Os resultados obtidos para células PC12 neuronais, assim como para as não diferenciadas, foram independentes da disposição das lamínulas.

A co-cultura de células PC12 neuronais com monocamadas secundárias de astrócitos corticais, previamente tratadas com LPS, também não provocou alterações morfológicas ou de viabilidade nesta linhagem celular (Fig. 24).

A redução no valor da densidade óptica, obtido de células PC12 neuronais controles ou tratadas, em relação as não diferenciadas (Fig. 23), pode ser explicado pelo próprio processo de diferenciação. Inicialmente, foi plaqueada a mesma densidade de células PC12 (75×10^3 céls. cm^{-2}), entretanto, durante a diferenciação as células desta linhagem perdem a capacidade proliferativa (Peunova & Enikolopov, 1995). A partir disso, fica estabelecida a relativa diminuição do número de células, e do valor da densidade óptica, entre células PC12 não diferenciadas e as neuronais.

Figura 24. Efeito de monocamadas estimuladas com LPS sobre a viabilidade de células PC12 neuronais, em co-culturas



A viabilidade celular foi determinada pela técnica de MTT. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por triplicado ($n = 9$). Os grupos tratados foram comparados com os respectivos controles através de ANOVA de uma via.

2.2. Neurotoxicidade mediada por astrócitos estimulados por LPS: Modelo da co-cultura e do meio condicionado

Em diferentes trabalhos, que empregam a adição de LPS em co-culturas (neurônios e glia), não existe absoluta coincidência nos resultados sobre neurotoxicidade (Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Lipton et al., 1993; Meda et al., 1995; Skaper et al., 1995).

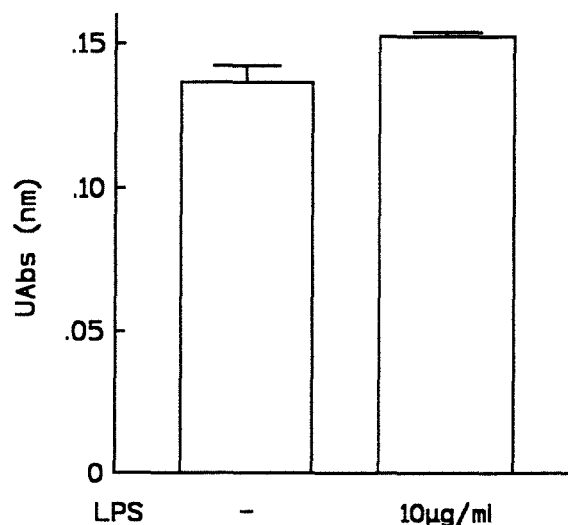
Considerando a possibilidade de que esta divergência seja relacionada com o padrão das culturas estudadas, estabelecemos diferentes condições para testar a ação da LPS. Utilizamos a endotoxina em culturas neuronais puras, mistas, e como agente estimulador para monocamadas secundárias, que posteriormente, serviram como substrato para neurônios (co-culturas) ou condicionaram meio para culturas neuronais puras.

2.2.1. Efeito da adição de LPS sobre culturas neuronais puras

Neurônios corticais plaqueados em placas de 24 poços, numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} , receberam 1 ou $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS. Após 24, 48, 72 ou 96 h, a viabilidade celular foi determinada através do método de MTT. Nos grupos tratados, não foram observados sinais morfológicos que indicassem injúria neuronal.

Foi comparada a densidade óptica de grupos tratados e controles, a partir da técnica de MTT, não tendo sido detectadas diferenças significativas entre estes grupos, até o período de 96 h da adição de LPS (Fig. 25). Estes experimentos demonstraram que a concentração estudada de endotoxina não afetou a viabilidade de neurônios corticais.

Figura 25. Efeito da adição de LPS sobre a viabilidade de culturas neuronais puras



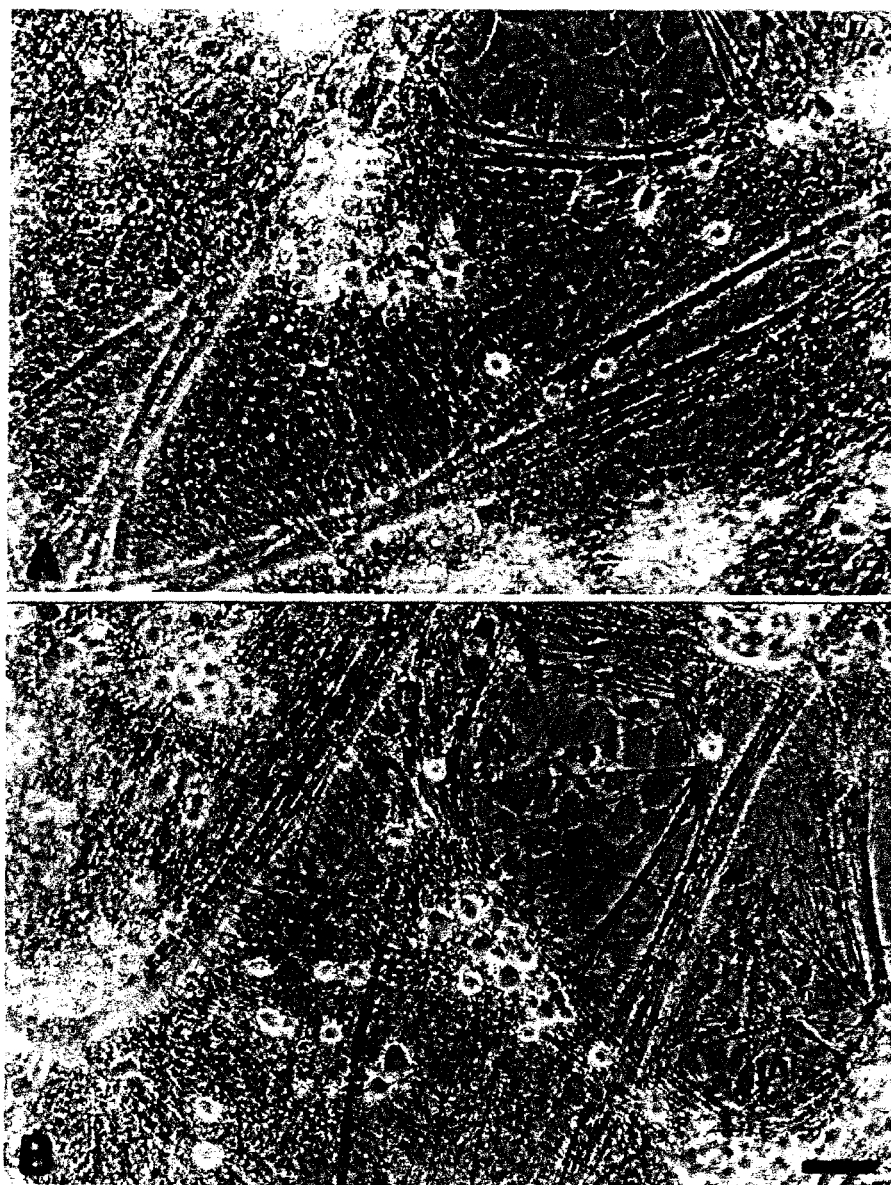
A viabilidade celular foi determinada pela técnica de MTT 96 h após adição da endotoxina. Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos realizados por triplicado ($n = 9$). O grupo tratado foi comparado com o controle através do teste *t* de *Student*.

2.2.2. Efeito da adição de LPS sobre culturas corticais mistas

Culturas mistas, decorrentes do plaqueamento de células corticais em placas de 24 poços, numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} , receberam LPS (1 ou $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) no 14º DIV. Após 96 h da adição da endotoxina, as culturas foram analisadas em microscopia de contraste de fase, não sendo detectável qualquer sinal de dano neuronal.

A Figura 26, demonstra campos representativos de culturas corticais mistas, após adição de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ da endotoxina. Nota-se a ausência de diferenças morfológicas entre culturas controles (A) e tratadas (B). Assim, nestas condições, a adição de LPS não pareceu provocar injúria neuronal em culturas corticais mistas.

Figura 26. Efeito da adição de LPS sobre culturas corticais mistas



Células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} em placas de 24 poços. A adição tardia (6º ou 7º DIV) de Ara-C permitiu a proliferação astrocitária, originando culturas mistas. Campos representativos de culturas corticais no 18º DIV, controles (A) e tratadas com $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS (B), 96 h após a adição da endotoxina. A migração neuronal sobre a monocamada de astrócitos originou agrupamentos de somas e fascículos neuríticos em A e B. Não foram observadas diferenças morfológicas que indicassem injúria nas culturas tratadas. Barra 50 μm .

2.2.3. Monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas com LPS em co-cultura com neurônios corticais

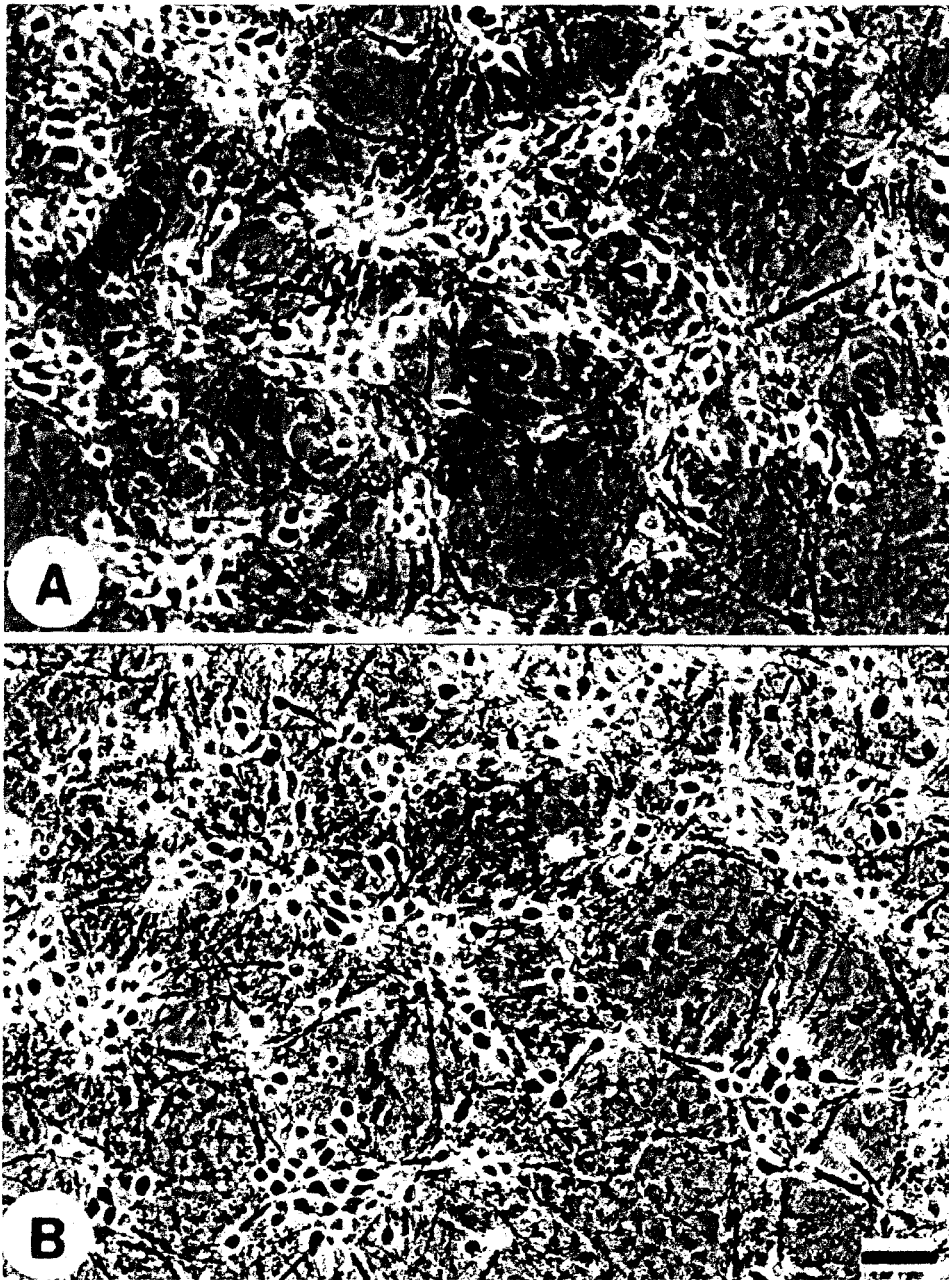
Monocamadas secundárias de astrócitos corticais confluentes (24° DIV), semeadas em placas de 24 poços, foram estimuladas com 1 ou 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS. As culturas permaneceram com o mesmo meio durante 5 dias, então este foi substituído, sendo repostas a mesma concentração da endotoxina. Ao final de 4 dias da segunda estimulação, as monocamadas foram lavadas uma vez com MEM (1 ml por poço), acrescentando-se após MEM com 5% de SC.

Sobre estas monocamadas secundárias (29° DIV) previamente estimuladas, foram plaqueadas células corticais numa densidade de $12,5 \times 10^3$ ou 110×10^3 céls. cm^{-2} em MEM suplementado com 5% de SC. Foi adicionado também, o inibidor mitótico Ara-C (3 μM) para impedir a proliferação de células gliais. Após 96 h, as culturas foram fixadas e a viabilidade neuronal foi estimada por microscopia de contraste de fase ou determinada por contagem do número de neurônios.

A análise microscópica das co-culturas com maior densidade neuronal, não demonstrou sinais morfológicos que indicassem injúria destas células. Quando comparadas com co-culturas controles irmãs, também não houve alteração da distribuição das células nervosas sobre as monocamadas de astrócitos (Fig. 27).

Para as co-culturas de menor densidade neuronal, após a fixação, foi realizada a técnica imunocitoquímica para neurofilamentos (200 kDa) e a viabilidade foi determinada pela contagem do número de células marcadas.

Figura 27. *Substrato astrocitário previamente tratado com LPS não induz alterações morfológicas em neurônios corticais*



Células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} sobre monocamadas secundárias de astrócitos previamente estimuladas com $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS. A análise de campos representativos de culturas controles (A) e tratadas (B), 96 h após o estabelecimento da co-cultura, demonstrou não haver diferenças morfológicas entre os grupos. Foram realizados três experimentos por quadruplicado ($n = 12$). Barra 50 μm .

A Figura 28 compara co-culturas irmãs, onde os neurônios foram plaqueados sobre monocamadas de astrócitos controle (A) ou previamente estimulada com LPS (B), demonstrando não haver diferença do número de células marcadas. Para culturas controles, a média de neurônios contados, no 4º DIV de co-cultura, foi de $75 \pm 10 \text{ mm}^{-2}$, enquanto que nos grupos tratados foi de $80 \pm 7 \text{ mm}^{-2}$.

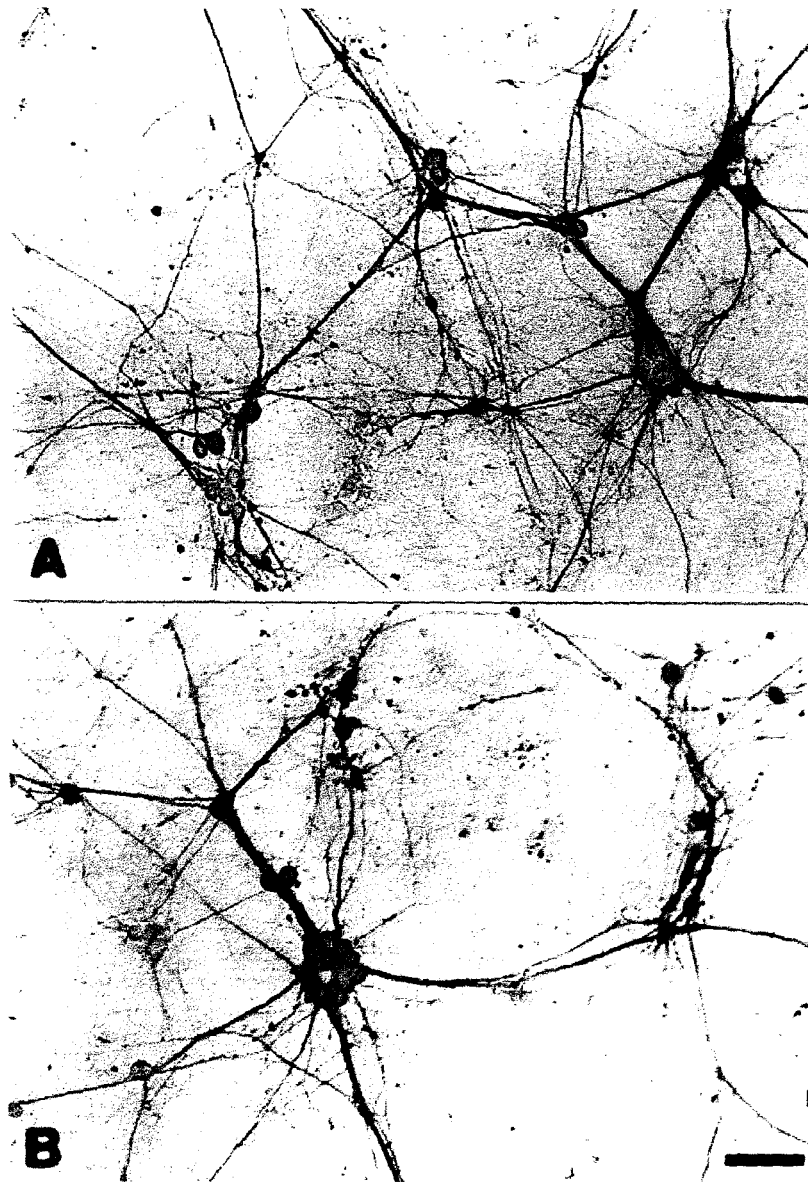
Assim, da mesma forma que em culturas corticais mistas, quando neurônios corticais foram plaqueados sobre monocamadas secundárias estimuladas com LPS, não foram observados sinais de morte ou injúria celular.

2.2.4. Culturas puras de neurônios corticais tratadas com meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos LPS-estimuladas

Em outro modelo, monocamadas secundárias de astrócitos corticais foram estimuladas com a endotoxina e depois, condicionaram meio que foi transferido para culturas neuronais puras.

Nos experimentos realizados segundo este modelo, foram utilizadas monocamadas secundárias confluentes (24º DIV) irmãs, em relação as empregadas no modelo da co-cultura (obtidas a partir da mesma preparação de astrócitos), plaqueadas em placas de 24 poços. Assim como descrito para o modelo da co-cultura, na estimulação destas monocamadas também foi adicionado $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS, por 5 dias, seguido de uma nova estimulação com igual concentração. Após 4 dias, as monocamadas foram lavadas uma vez com MEM (1 ml por poço). Em seguida,

Figura 28. *Substrato astrocitário previamente tratado com LPS não altera a viabilidade neuronal*



Células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de $12,5 \times 10^3$ céls. cm^{-2} sobre monocamadas secundárias de astrócitos, previamente estimuladas com $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de LPS. Encontrando-se sobre astrócitos, os neurônios corticais migraram originando pequenos agrupamentos de somas, interrelacionados por fascículos neuríticos. A viabilidade neuronal foi determinada por contagem de células marcadas pela técnica imunocitoquímica anti-neurofilamento, 96 h após o estabelecimento das co-culturas. A comparação do campo representativo de uma cultura controle (A) e de outra onde os astrócitos foram previamente estimulados com LPS (B), demonstra que a endotoxina não afetou a viabilidade neuronal. Foram realizados três experimentos por quadruplicado ($n = 12$). Barra $50 \mu\text{m}$.

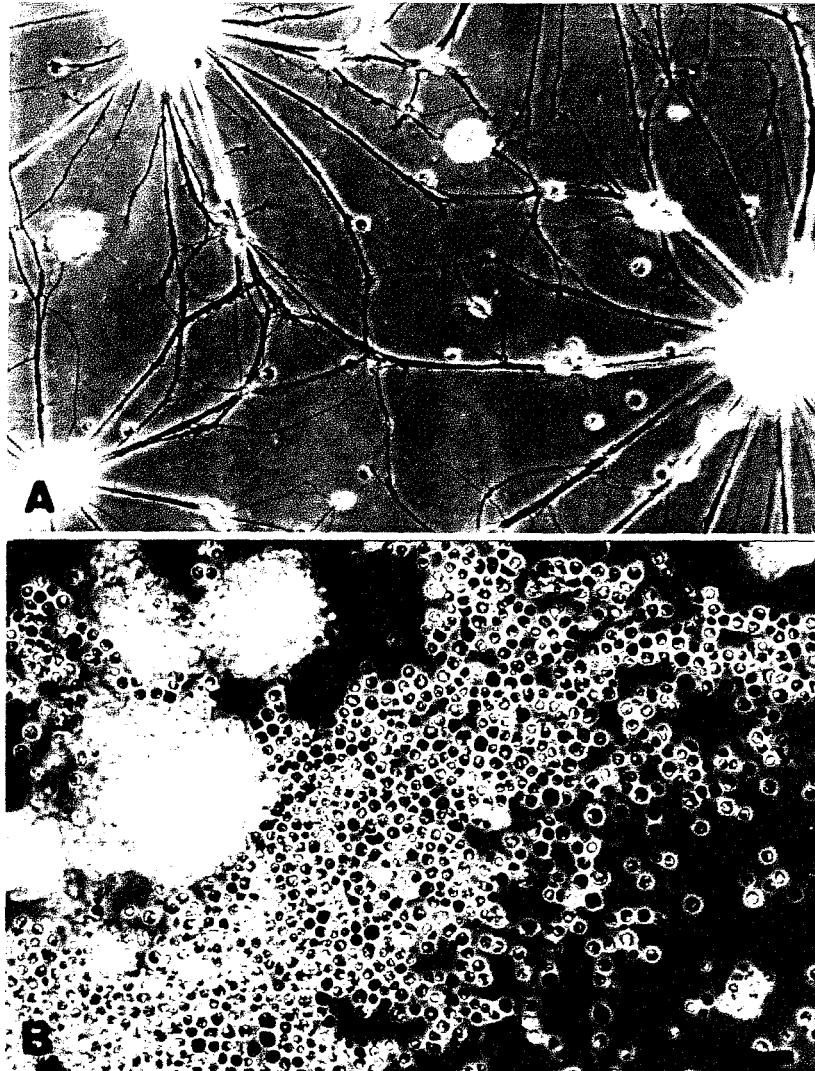
receberam MEM com 5% de SC (1 ml por poço) para ser condicionado por 24 h.

Células corticais foram semeadas em placas de 24 poços, pré-tratadas com poli-D-lisina ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) e laminina ($5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), numa densidade de $110 \times 10^3 \text{ céls. cm}^{-2}$, em MEM suplementado com 5% de SFB e 5% de SC. No momento do plaqueamento foi acrescentado $3 \text{ } \mu\text{M}$ de Ara-C para inibir a proliferação glial. No 2º DIV, $\frac{3}{4}$ do volume de cada poço ($750 \text{ } \mu\text{l}$) foi substituído pelo meio condicionado (durante 24 h) por monocamadas secundárias de astrócitos, estimuladas ou não com LPS.

A partir de 48 h da adição de meio condicionado por astrócitos tratados com LPS, foi possível notar sinais de dano celular estimados por microscopia de contraste de fase. Observou-se progressiva ruptura dos fascículos neuríticos sem que ocorresse aumento do volume dos somas neuronais. Nestes grupos, 96 h após troca do meio, não era possível visualizar qualquer prolongamento neurítico, embora persistissem alguns acúmulos somáticos (Fig. 29).

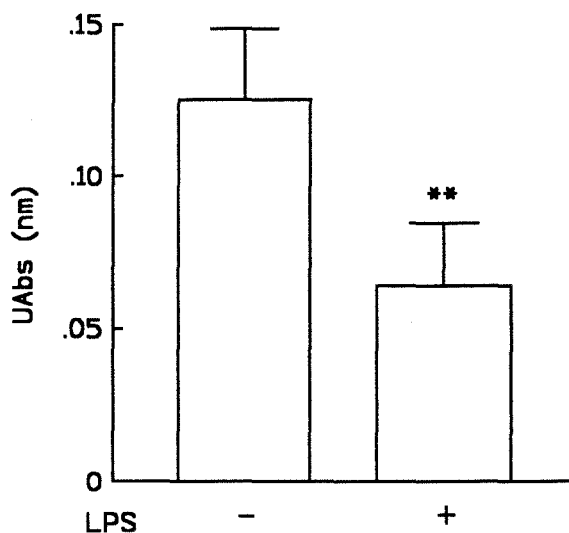
Após 96 h da troca de meio, a viabilidade neuronal foi determinada através do método MTT, indicando a morte de 50% dos neurônios, com respeito aos controles (Fig. 30). Este valor deve-se a atividade mitocondrial de neurônios presentes nos acúmulos somáticos, ainda capazes de reduzir MTT. A quantificação da densidade óptica foi realizada após quatro dias devido ao lento processo neurodegenerativo observado nas culturas tratadas. Sinais morfológicos de injúria (ruptura neurítica e aparecimento de detritos) foram detectados a partir de 48 ou 72 h da troca de meio. Antes deste período não foram detectadas diferenças significativas nos valores de absorbância.

Figura 29. Meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos, tratadas com LPS, promove neurotoxicidade em culturas puras de neurônios corticais



Células corticais (E16) foram plaqueadas numa densidade de 110×10^3 céls. cm^{-2} sobre poli-D-lisina e laminina. Culturas neuronais puras no 6º DIV, 96 h após a substituição do meio de cultura por meio condicionado, demonstram o resultado da migração neuronal, com estabelecimento de agrupamentos somáticos e segregação de neuritos, constituindo fascículos que interrelacionam os acúmulos entre si. Na foto A, cultura controle, na foto (B), uma cultura irmã que recebeu meio condicionado por uma monocamada previamente estimulada com LPS. Nota-se dano neuronal massivo, com a persistência de alguns agrupamentos somáticos, apesar da ruptura total dos feixes neuríticos. Foram realizados três experimentos por quadruplicado ($n = 12$). Barra 50 μm .

Figura 30. Efeito do meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos, estimuladas com LPS, sobre culturas puras de neurônios corticais



Determinação da viabilidade de neurônios corticais (6° DIV), 96 h após receberem meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos pré-estimuladas com LPS. A densidade óptica obtida nas culturas tratadas, foi decorrente da redução do MTT em células com visíveis sinais de danos morfológicos (Fig. 29 B). Os dados representam a média \pm D.P. de três experimentos por quadruplicado ($n = 12$). Na análise estatística foi empregado o teste t de Student ($p < 0,01$ **).

A substituição do meio de culturas neuronais puras por meio condicionado por monocamadas secundárias estimuladas com LPS, promoveu significativamente a morte de neurônios corticais. Estas monocamadas estimuladas liberaram um fator neurotóxico difusível cujo efeito só foi observado em culturas neuronais puras, parecendo depender da interação neurônio-astrócito, pois em co-cultura, não foram observados danos neuronais. Desta forma, parece que a interação por contato, estabelecida nas co-culturas, exerce uma ação neuroprotetora contra este fator neurotóxico difusível.

2.2.5. Determinação da atividade da enzima NADPH-diaforase em monocamadas secundárias de astrócitos

A atividade NOS das culturas secundárias de astrócitos que condicionaram o meio, foi avaliada pela quantificação dos níveis de NO_2^- acumulados no meio, através da técnica de Griess (Galea et al., 1992), e pela demonstração da atividade NADPH-diaforase (Bock et al., 1996).

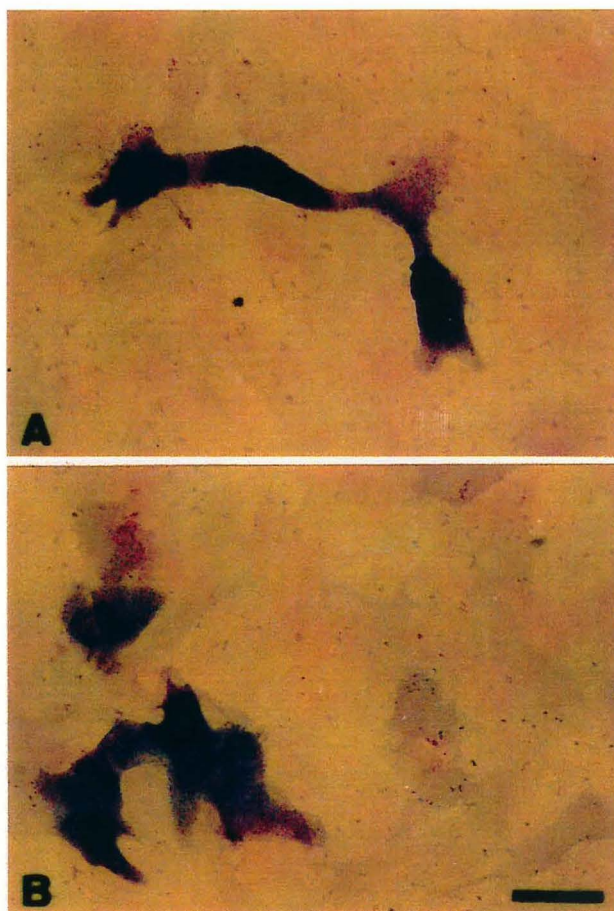
2.2.5.1. Detecção dos níveis de nitritos no meio condicionado

Alíquotas de meio, provenientes de monocamadas secundárias de astrócitos corticais (29° DIV), foram processadas segundo o método de Griess para determinação dos níveis de nitritos. Monocamadas controles apresentaram uma média de $4,1 \pm 1 \mu\text{M}$, enquanto em grupos tratados, foi obtido $4,3 \pm 1 \mu\text{M}$. Desta forma, os valores obtidos foram menores que o limite inferior da curva de calibração ($6,25 \mu\text{M}$), sendo portanto desconsiderados. Assim, não foram verificadas diferenças nos níveis de nitritos acumulados no meio de culturas controles ou tratadas com LPS. Foram realizados três experimentos por quadruplicado ($n = 12$).

2.2.5.2. Marcação da atividade NADPH-diaforase

Quando comparadas monocamadas secundárias controles com tratadas com endotoxina, não foram detectados aumentos na marcação NADPH-diaforase (Fig. 31). Nestas condições a LPS não induziu a expressão da NOS em astrócitos corticais, evidenciada por ausência de alterações no padrão de marcação NADPH-diaforase. Portanto, o dano neuronal observado não parece ser devido a indução da via nitridérgica, sendo provavelmente desencadeado por citocinas inflamatórias.

Figura 31. *Citoquímica para NADPH-diaforase de monocamadas secundárias de astrócitos corticais*



Monocamadas secundárias de astrócitos corticais, no 29º DIV, utilizadas para condicionar o meio para culturas neuronais puras (Fig. 29). A coloração azul indica marcação específica para NADPH-diaforase em monocamadas controles (A) e tratadas com LPS (B). Barra 50 μm .

DISCUSSÃO

Aumento do cálcio citosólico

O influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática do neurônio tem enorme significância fisiológica já que a concentração intracitoplasmática deste cátion está relacionada com uma variedade de processos, entre eles a liberação de neurotransmissores, controle da excitabilidade neuronal, integração de sinais elétricos, plasticidade sináptica, metabolismo celular e expressão gênica (Gibbons et al., 1993).

Por outro lado, vários estudos apontam o aumento citosólico dos níveis de Ca^{2+} como agente causal de morte neuronal (Dubinsky, 1993). A injúria seguida de morte, devido a uma elevação da concentração citoplasmática deste cátion, pode ocorrer através da excessiva estimulação de receptores para glutamato (Choi, 1987; Choi, 1992; Dubinsky & Rothman, 1991; Manev et al., 1990; Mattson et al., 1988; Siesjo et al., 1989), ou da exposição das culturas a um ionóforo (Choi et al., 1987). Nestes casos, a subsequente neurodegeneração advém da ativação de enzimas de degradação, disfunção mitocondrial, desorganização do citoesqueleto, ou em consequência da produção de radicais livres (Jesberger & Richardson, 1991; Lee et al., 1991; Orrenius & Nicotera, 1994; Saito et al., 1993) (Fig. 3).

Em modelos de excitotoxicidade *in vitro* a aplicação de glutamato ou agonistas do receptor NMDA produzem dois eventos mensuráveis independentes: 1) rápida elevação nos níveis de Ca^{2+} numa escala de tempo de minutos (Dubinsky & Rothman, 1991; Manev et al., 1989; Murphy & Miller, 1989) e, 2) eventual morte neuronal numa escala de tempo de muitas horas (Dubinsky & Rothman, 1991; Ogura et al., 1988; Manev et al., 1989; Michaels & Rothman, 1990). Nestes casos, a morte neuronal pode

ocorrer rapidamente como resultante de um distúrbio osmótico decorrente de um grande influxo iônico (Rothman 1985) ou tardiamente no curso de um dia (Choi, 1987; Rothman et al., 1987). No primeiro caso, os neurônios tornam-se inchados após a exposição ao glutamato, demonstrando sinais morfológicos de injúria, que evolui à morte em poucas horas (Choi et al., 1987) (Fig. 3).

Conforme apresentado na Figura 9, quando utilizamos o ionóforo de Ca^{2+} A23187, foram evidentes os sinais de neurotoxicidade e morte em culturas corticais. Este efeito foi facilmente identificado por análise ao microscópio de contraste de fase, nas concentrações mais elevadas do ionóforo (1 e 2,5 μM). O perfil citotóxico variou em função da concentração utilizada dentro de uma escala de 8 a 10 h após a adição da droga. Nos grupos tratados com 2,5 μM , 8 h após a adição já não haviam mais neuritos ou somas neuronais íntegros, apenas restos celulares. No mesmo período, os grupos que receberam 1 μM demonstraram grande número de detritos e alguns neurônios com edema somático, apresentando reduzido número de prolongamentos em processo de ruptura. As culturas que receberam esta concentração tornaram-se idênticas às que receberam 2,5 μM , 10 h depois da administração do ionóforo. Assim, observamos um mesmo padrão morfológico de degeneração para 1 e 2,5 μM , enquanto que a menor concentração (0,1 μM) não provocou alterações morfológicas que indicassem dano neuronal, mesmo 48 h após a adição da droga.

Desta forma, apesar das grandes diferenças de concentração do ionóforo utilizadas, observamos apenas morte neuronal com aspecto necrótico, com destruição

total dos neurônios em no máximo 10 h, ou por outro lado (no caso de 0,1 μM), ausência de alterações morfológicas que indicassem injúria neuronal.

Segundo Bonfoco e colaboradores (1995), a morte necrótica segue rapidamente um insulto agudo e intenso, enquanto que a morte apoptótica pode advir lentamente em consequência de um estímulo suave, tornando-se evidente num curso de tempo a partir de 18 h. Estes autores obtiveram diferentes tipos de morte neuronal, necrótico ou apoptótico, em função da concentração do agonista NMDA utilizado. Foi demonstrado também que o influxo tóxico de Ca^{2+} é um evento crítico para o desencadeamento da necrose excitotóxica (Choi, 1988; Hartley et al., 1993), e que a entrada deste cátion ocorre através do receptor/canal NMDA (Hartley et al., 1993; Koh et al., 1995).

O aumento do Ca^{2+} citosólico parece ser um importante mecanismo de ação das excitotoxinas (Fig. 3), tendo sido descritos padrões de morte necrótica e apoptótica em função da concentração de NMDA empregada (Bonfoco et al., 1995). No entanto, mesmo variando muito a concentração do ionóforo, e consequentemente aumentando a permeabilidade ao Ca^{2+} , observamos apenas morte necrótica.

Conforme demonstrado na Figura 3, o aumento da concentração de Ca^{2+} pode acarretar diferentes consequências dentre as várias possíveis, antes da expressão do dano neuronal. Assim, é provável que a diversidade de eventos subsequentes a elevação dos níveis deste cátion impliquem uma maior complexidade, onde o curso temporal entre a ação e o efeito deletério (sinais morfológicos da morte neuronal) seria apenas um dos aspectos envolvidos.

Sensibilidade a excitotoxinas

Nos estudos *in vitro*, dois tipos de respostas fisiopatológicas estão diretamente vinculadas à injúria excitotóxica. Um componente rápido, onde os neurônios corticais tornam-se inchados, morrendo poucas horas após a exposição ao glutamato, denominando-se neurodegeneração precoce (Rothman, 1985; Olney, 1989). Neste caso, a despolarização prolongada leva a um acúmulo de Na^+ intracelular, seguido por um influxo de Cl^- e água, provocando edema celular. O outro componente denomina-se neurodegeneração tardia (Choi et al., 1987; Rothman et al., 1987) estando essencialmente vinculado a ativação de receptores NMDA (Choi et al., 1988; Rothman et al., 1987) e ao aumento prolongado dos níveis de Ca^{2+} (Manev et al., 1989; Glaum et al., 1990) que leva a ativação de proteases, lipases e outras enzimas (Choi & Rothman, 1990). A sensibilidade neuronal a excitotoxinas é inversamente proporcional ao controle da concentração intracitoplasmática de Ca^{2+} (Marcoux et al., 1988; Choi & Rothman, 1990) (Fig. 3).

Nossos resultados demonstraram que culturas corticais no 21° DIV apresentavam sinais de injúria (ruptura neurítica e edema somático) e de morte celular (detritos) quando expostas durante 5 min a NMDA (100, 300 ou 500 μM). Entretanto, na determinação de viabilidade pela técnica de MTT, não houve diferenças entre as culturas que receberam a menor concentração da excitotoxina e os grupos controles, apesar dos evidentes sinais de dano neuronal (Fig. 10).

Em culturas corticais expostas a NMDA (durante 5 min), onde a excitotoxina provocou a morte neuronal de maneira dose-dependente, a técnica de MTT foi um meio

eficiente para determinação da citotoxicidade (Patel et al., 1990). Apesar disso, este método de determinação de viabilidade não foi adequado em nosso modelo. Nestes casos, culturas com evidentes sinais morfológicos de injúria e morte neuronal, após a exposição ao NMDA, não apresentavam densidade óptica distinta dos grupos controles não tratados.

Considerando que os neurônios tratados com NMDA apresentavam sinais morfológicos de perda da integridade de membrana (vesiculação e ruptura neurítica), empregamos um método baseado na detecção da atividade de uma enzima citoplasmática (LDH) para quantificar a viabilidade destas células. Este método foi descrito para determinar quantitativamente a injúria de neurônios corticais tratados com glutamato (Koh & Choi, 1987), relacionando o efluxo da enzima LDH com a viabilidade neuronal.

De acordo com a Figura 11, verificamos a ocorrência de um significativo efluxo de LDH em culturas corticais mistas (8º DIV) submetidas durante 24 h a NMDA (100 ou 500 μM). No entanto, a exposição prolongada a excitotoxina demonstrou ser inadequada pois a menor concentração de NMDA já atingiu todos os neurônios sensíveis a este agonista glutamatérgico. Segundo Koh & Choi (1987), a LDH liberada no meio de cultura é estável durante um período de até 72 h, a 37 °C. Desta forma, é provável que a exposição prolongada ao NMDA, durante as 24 h, tenha afetado toda a população sensível a este agonista nas culturas que receberam 100 μM . Por isso, o dano neuronal nas culturas entre o 8º e o 9º DIV, provocado pela adição de 500 μM da excitotoxina, não aumentou significativamente a liberação de LDH.

A percentagem de morte neuronal devido ao NMDA indicou uma população neuronal de aproximadamente 50% de células insensíveis a esta excitotoxina (Fig. 11 e Fig. 14). Este resultado é coerente com o obtido por Koh e colaboradores (1995), em culturas corticais de camundongo, onde a viabilidade neuronal após a exposição a NMDA (100 μ M, durante 5 min) indicou uma morte de 40% através da técnica de LDH. Segundo Hewett e colaboradores (1994), o mesmo procedimento demonstrou 45% e 55% de morte respectivamente em culturas corticais mistas e neuronais puras.

Por outro lado, em experimentos de excitotoxicidade, as culturas neuronais são expostas a excitotoxinas por períodos breves de tempo, em geral entre 5 ou 10 minutos. Para isto, é necessário a realização de trocas de meio, com uma substituição pelo meio de incubação, e após a exposição, a remoção deste para reposição do meio de cultura. Entretanto, observamos sinais morfológicos de injúria neuronal, nas culturas controles, indicando que a simples troca de meio desencadeia dano neuronal (Fig. 12). Este fenômeno foi descrito por autores que apontaram a troca de meio como um agente causador de consequências deletérias para diferentes neurônios (Driscoll et al., 1991; Rosenberg & Aizenman, 1989). Esta injúria, foi relacionada com a ativação de receptores NMDA (Driscoll et al., 1991) e com a remoção de fatores tróficos do entorno neuronal (Banker, 1980) (Fig. 3).

Para esclarecer se o dano neuronal resultante de trocas de meio estava associado com mecanismos excitatórios mediados por receptores NMDA, testamos a sensibilidade das culturas corticais a este agonista glutamatérgico. Neste caso, empregamos culturas neuronais que apresentavam astrócitos (mistas ou co-culturas), uma vez que a

quantidade de astrócitos na cultura determina o perfil de sensibilidade a excitotoxinas (Rosenberg & Aizenman, 1989) e que estas células gliais não têm receptores NMDA (Backus et al., 1989). Além disso, utilizamos culturas corticais mistas no 7º ou 15º DIV, com o objetivo de relacionar a sensibilidade à excitotoxina com a expressão do receptor, já que os sinais de excitotoxicidade são observados a partir do 7º DIV, quando inicia a expressão dos receptores glutamatérgicos (Keilhoff & Erdö, 1991).

Os resultados representados na Figura 13 demonstram aproximadamente 25% de morte nos grupos controle, NMDA e NMDA com MK801, em culturas no 7º DIV através da técnica de LDH. Estes resultados indicaram um percentual de morte aparentemente independente da ação do agonista glutamatérgico. Por outro lado, no 15º DIV, a morte nos grupos controles foi de aproximadamente 40%, subindo a 70% nos grupos tratados com NMDA. Neste caso, o uso do antagonista MK801 protegeu os neurônios, diminuindo o índice de morte para 25%.

Este resultado parece indicar pelo menos dois componentes, relacionados com a morte neuronal decorrente das trocas de meio. Um agente promotor relacionado com a idade da cultura, e que parece ser revertido com MK801, e outro independente da idade e do bloqueio de canais NMDA. Este último, seria o responsável por aproximadamente 25% de morte neuronal em nossas preparações, 24 h após a troca de meio.

A sensibilidade ao NMDA foi testada também com neurônios plaqueados sobre monocamadas secundárias de astrócitos. Neste caso, foi utilizado um reduzido número neuronal nas co-culturas, com o objetivo de permitir a contagem das células nervosas em

outra forma de determinação de viabilidade (Fig. 14). A adição de NMDA (100 μ M), provocou uma redução de 40% do número neuronal nas primeiras 24 h, atingindo cerca de 55% 72 h após a exposição a droga. Durante todo este período, no qual não foram realizadas trocas de meio, a morte neuronal nas culturas controles foi inferior a 5%. Assim, a população neuronal sensível a este agonista glutamatérgico, morreu praticamente toda nas primeiras 24 h de exposição. Além disso, este índice é semelhante ao obtido pela técnica de LDH, em culturas mistas expostas durante o mesmo tempo a mesma concentração de NMDA (Fig. 11), apesar das diferenças de densidade, concepção dos modelos e das técnicas de determinação de viabilidade utilizadas.

Ao contrário do proposto por Rosenberg & Aizenman (1989), a presença relativa de astrócitos não pareceu ser determinante para a sensibilidade ao NMDA. Estes autores descreveram que neurônios corticais em culturas ricas em astrócitos, eram significativamente menos suscetíveis a excitotoxicidade mediada pelo glutamato. Uma justificativa proposta foi a de que em culturas ricas em astrócitos, o acesso do glutamato aos dendritos estaria dificultado por estas células gliais. Estes prolongamentos seriam mais sensíveis devido a um mecanismo específico para um grande e persistente influxo de Ca^{2+} mediado pela ativação dos receptores NMDA. Entretanto, independente do modelo utilizado (culturas mistas ou co-cultura), a estimulação com NMDA demonstrou provocar significativa excitotoxicidade em nossas culturas, sendo por outro lado coerente com a escala temporal proposta por Keilhoff & Erdö (1991) para a expressão destes receptores glutamatérgicos (Fig. 13).

Trocas de meio: Fator promotor de injúria neuronal

Os astrócitos cumprem uma função de substrato na neurogênese do SNC (Schmechel & Rakic, 1979) auxiliando a migração dos somas e processos neuronais (Levitt & Rakic, 1980). Além disso, vários autores atribuíram um papel trófico para estas células gliais na manutenção da sobrevivência de neurônios em cultura (Banker, 1980; Ferrara et al., 1988; Giulian et al., 1993; Manthorpe et al., 1989) (Fig. 4). Nossos resultados confirmaram este efeito, demonstrando inclusive que o uso de meio condicionado protege neurônios corticais da injúria mediada por trocas de meio (Fig. 15 e Fig. 19), o que está associado com a diminuição da sobrevivência de diferentes neurônios (Driscoll et al., 1991; Rosenberg & Aizenman, 1989; Yu et al., 1984). Em nossos experimentos, a substituição utilizando meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos corticais, reduziu os sinais de injúria e a morte neuronal em culturas neuronais puras, mistas ou em co-culturas.

A partir de trabalhos *in vitro*, Noble e colaboradores (1984) propuseram o uso de monocamadas astrocitárias como um substrato padrão para o estudo de populações neuronais em culturas de células dissociadas. Segundo estes autores, o crescimento de células nervosas sobre astrócitos corticais promove uma maior extensão neurítica, e uma tendência a que os somas permaneçam isolados e os neuritos não formem fascículos. Pode-se dizer que há uma preferência neuronal por monocamadas de astrócitos e que este efeito relaciona-se à interação com moléculas de superfície (Fallon, 1985).

Os atributos morfológicos de culturas onde os neurônios cresceram sobre astrócitos também foram verificados em nossos experimentos. Observamos que os

mesmos, nestas condições, não apresentavam tendência a reagrupar nem a segregar os neuritos em fascículos. Em nossas preparações, as células corticais (E16) foram plaqueadas sobre monocamadas secundárias purificadas, entre o 20° e o 30° DIV, estabelecendo-se uma co-cultura com astrócitos corticais (Fig. 16 e Fig. 20). Neste modelo, os neurônios puderam ser estudados em baixa densidade ($12,5 \times 10^3$ céls. cm^{-2}), o que demonstrou ser inviável sobre substrato químico.

Apesar das monocamadas de astrócitos reduzirem significativamente a fragilidade das células nervosas, os nossos resultados demonstraram que o aporte trófico resultante da interação de superfície não era suficiente para impedir a morte neuronal em co-culturas submetidas a trocas repetitivas de meio (Fig. 16 e Fig. 19). Esta observação é consistente com a proposta de Banker (1980), que afirma que o fator promotor de crescimento neurítico, produzido pelos astrócitos, deve estar presente continuamente no meio para que seja efetivo. O autor assinala a possibilidade de que este não se associe ao substrato em quantidade suficiente para desempenhar sua ação, sendo removido quando o meio condicionado é substituído. Em adição, Banker sugere a utilização de meio condicionado por astrócitos para a manutenção de culturas de neurônios centrais desprovidas destas células gliais. Apesar disso, foi descrito que o uso de meio condicionado não mimetiza a presença destas células gliais (Fallon, 1985). As diferenças morfológicas e de trofismo resultantes do emprego de meio condicionado ou de substrato astrocitário poderiam ser estudadas posteriormente em um trabalho comparativo específico.

Com o modelo da co-cultura, freqüentemente foram detectados discretos sinais morfológicos que precediam a degeneração neurítica e a morte neuronal (Fig. 16). Nestes casos, alguns neurônios de uma população, apresentavam prolongamentos com varicosidades, com a diminuição da extensão destes neuritos em poucas horas. A regressão destes prolongamentos ocorria no sentido celúlípeto, parecendo incidir primordialmente sobre os de menor calibre. Desta forma, nas co-culturas submetidas a trocas sucessivas de meio, eram freqüentes os somas neuronais com curtas projeções, que demonstravam quando acompanhados sob microscopia de contraste de fase, pertencer a células em processo de morte. Estas observações talvez coincidam com as descrições de Kriegstein & Dichter (1983) realizadas a partir da análise de culturas de neurônios corticais (Fig. 2). Estes autores descrevem a presença de neuritos com aspecto de rosário, em neurônios que já não apresentam potencial de membrana, logo após terem sido lesados com um microeletrodo. Outros autores também registraram a ocorrência deste padrão neurítico com os métodos de Golgi-rápido e Golgi-Kopsch (Garey, 1971; Valverde, 1971; Levay, 1973; Lund, 1973).

A injúria neuronal mediada por trocas de meio tem sido relacionada com a ativação de receptores NMDA (Driscoll et al., 1991) (Fig. 3). Apesar disso, nossos resultados demonstraram que aproximadamente 25% dos neurônios de culturas mistas, submetidos a troca de meio, morrem independentemente do bloqueio destes receptores (Fig. 13). Em adição, considerando que os danos observados independem da idade da cultura, ocorrendo mesmo no período anterior a expressão destes receptores (Keilhoff & Erdö, 1991), é provável que estejam relacionados com a restrição trófica e não com a ativação destes receptores glutamatérgicos. Além disso, este percentual é semelhante ao

obtido no modelo da co-cultura, onde foi determinado um índice de 28% de morte em neurônios corticais, 24 h após uma troca completa de meio, e onde este efeito foi relacionado com a restrição de fatores tróficos (Fig. 19).

A substituição por meio fresco pareceu provocar a morte neuronal através da diluição de fatores tróficos. Um forte indício é que quando foram realizadas trocas com meio condicionado por uma monocamada irmã aquela utilizada como substrato, não houve diminuição significativa do número neuronal. Neste caso, a redução de 28% do número de neurônios controles, 24 h após uma troca de meio, foi significativamente menor (6%) quando foi utilizado meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos. Este efeito protetor também foi evidente 24 h após a segunda troca de meio, onde o índice de morte diminuiu de 43% nos grupos controles, para 15% nos que receberam meio condicionado (Fig. 19). Assim, em nossas culturas, a morte neuronal devido a trocas repetitivas de meio demonstrou estar relacionada com suporte trófico insuficiente.

Da mesma forma que o meio condicionado, observamos que a elevada concentração de K^+ (21 mM) teve efeito neuroprotetor para os neurônios corticais no modelo da co-cultura (Tab. 14). Este resultado está de acordo com observações que apontam que o aumento da atividade neuronal ou a despolarização com elevada concentração de K^+ tem efeitos tróficos numa variedade de tipos neuronais (Gallo et al., 1987; Edwards et al., 1991) (Fig. 4). O efeito da alta concentração extracelular deste cátion demonstrou ser específico, e não simplesmente devido ao aumento da osmolaridade ou da força iônica do meio (Collins & Lile, 1989). Esta mesma situação

protege da morte neurônios simpáticos deprivados de NGF (Koike et al., 1989; Scott & Fischer, 1970) mesmo com o uso do anestésico lidocaína ou do inibidor de canais de Na^+ dependentes de voltagem tetrodotoxina. Além destas situações inibidoras da atividade elétrica neuronal, a substituição do Na^+ por lítio (Li^+) também não aboliu o efeito neuroprotetor do K^+ , indicando que a troca Na^+/K^+ não é determinante deste fenômeno (Koike et al., 1989), ainda que elevadas concentrações extracelulares de K^+ despolarizem as células neuronais (Collins & Lile, 1989).

Outra consequência do excesso de K^+ é a ativação da PKC, que parece intermediar o efeito neurotrófico deste cátion, sem o envolvimento do cAMP (Wakade et al., 1988). Por outro lado, sabe-se que a ativação de receptores de membrana específicos com hormônios, neurotransmissores e fatores tróficos esta associada a quebra de fosfolípidios, resultando na formação de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Este último, junto com o Ca^{2+} , ativa a PKC que atua como um transdutor de sinal intracelular (Takai et al., 1979) (Fig. 4). Por fim, a despolarização neuronal com altos níveis de K^+ pode suprimir o programa de morte de neurônios simpáticos deprivados de NGF sem o envolvimento de síntese protéica (Edwards et al., 1991), atuando sobre a mesma subpopulação neuronal sensível a este fator trófico (Wakade & Thoenen, 1984) (Fig. 4).

Evidências farmacológicas recentes indicam que concentrações despolarizantes de K^+ podem promover a sobrevida neuronal pela abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes sensíveis a di-hidropiridinas (Collins & Lile 1989; Koike et al., 1989). A di-hidropiridina BAYK8644, a qual permite a abertura de canais voltagem-dependentes do

tipo L em níveis mais baixos de despolarização, reduz significativamente as concentrações de K^+ necessárias para a sobrevivência neuronal (Collins & Lile, 1989). Por outro lado, di-hidropiridinas bloqueadoras destes canais (PN200-110 e nitrendipina) inibem completamente a sobrevivência neuronal mediada por elevadas concentrações extracelulares de K^+ (Collins et al., 1991). Além deste efeito, Koike e colaboradores (1989) demonstraram que a remoção do Ca^{2+} extracelular ou o uso de um quelante citosólico para este cátion também anulam a neuroproteção das elevadas concentrações de K^+ .

A participação dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L (Koike et al., 1989; Collins & Lile, 1989), cuja ativação é induzida por despolarização, tem demonstrado mimetizar e ser sinérgica com ações de fatores tróficos em culturas neuronais (Franklin et al., 1995; Rusanescu et al., 1995). Apesar disso, bloqueadores destes canais não inibem a ação de proteínas neurotróficas (NGF; fator neurotrófico ciliar, CNTF; e fator de crescimento fibroblástico básico, bFGF), o que não exclui que estas moléculas e o K^+ promovam a sobrevivência neuronal por uma via final comum, tal como o aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} . Na verdade, estes fatores neurotróficos parecem não exercer seus efeitos através de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, promovendo o influxo deste cátion de outra forma. Entretanto, a ação destes fatores bem como o do K^+ são abolidos pelo quelante de Ca^{2+} EGTA (Collins & Lile, 1989).

Para estudar a neuroproteção de neurônios submetidos a um suporte trófico insuficiente, utilizamos o modelo da co-cultura, onde a injúria neuronal foi provocada por trocas sucessivas de meio. Nesta condição, testamos se o bloqueio de canais de K^+

do tipo I_A poderia mimetizar o efeito trófico da alta concentração extracelular deste cátion (Fig. 19 e Fig. 20). Para tanto, utilizamos o bloqueador de canais de K^+ dependentes de voltagem α -DTX (Dolly et al., 1987; Tibbs et al., 1989a; Weller et al., 1985) (Tab. 14). Este tratamento farmacológico provoca despolarização ao aumentar as flutuações do potencial de membrana, abrindo canais de Na^+ dependentes de voltagem com subsequente influxo de Ca^{2+} (Weller et al., 1985).

Ao contrário de estudos prévios realizados *in vivo* demonstrando que a administração intracerebral de DTX induz dano cerebral e morte neuronal (Bagetta et al., 1992; Lallement et al., 1995), observamos que o α -DTX e os demais polipeptídeos de DTX carecem de toxicidade direta em condições de cultura (Fig. 17 e Fig. 18). Esta diferença pode ser devida a estimulação *in vivo*, de vias cerebrais de aminoácidos excitatórios que resultam em lesões excitotóxicas indiretas. Embora contatos sinápticos excitatórios funcionais tenham sido descritos em culturas corticais, estas redes neuronais não parecem ser vulneráveis a DTX, um fato que pode estar associado com a predominância de neurônios GABAérgicos em preparações corticais (Yu et al., 1984).

Uma neuroproteção significativa, equivalente àquela obtida com a adição de DTX também foi observada com 4-AP, ainda que com doses mais elevadas (Tab. 14 e Fig. 21). Isto está de acordo com Weller e colaboradores (1985) que relatam que este bloqueador de canais de K^+ é cerca de 500 vezes menos potente que a DTX.

Assim como a DTX, foi descrito que a 4-AP também evoca a liberação de neurotransmissores (GABA, glutamato e noradrenalina), além de promover a

despolarização neuronal e provocar um aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} (Heemskerk et al., 1991; Tibbs et al., 1989b; Weller et al., 1985).

No modelo utilizado, os bloqueadores de canais de K^+ (α -DTX e 4-AP) preveniram a morte neuronal associada com as trocas de meio e tiveram um efeito neuroprotetor significativo. Embora este tratamento farmacológico não tenha atingido o grau de proteção obtido com meio condicionado, ele resgatou entre 40 e 60% dos neurônios que morreriam em condições controles. Estes resultados sugerem que em condições de cultura, o bloqueio de canais de K^+ exerceu uma influência neurotrófica, prevenindo a morte neuronal induzida por privação de fatores tróficos. Assim, a adição dos bloqueadores de canais de K^+ mimetizaram as ações do meio condicionado e da alta concentração de K^+ , preservando de forma significativa o número de neurônios em relação aos controles (Fig. 19, Fig. 21 e Tab. 14).

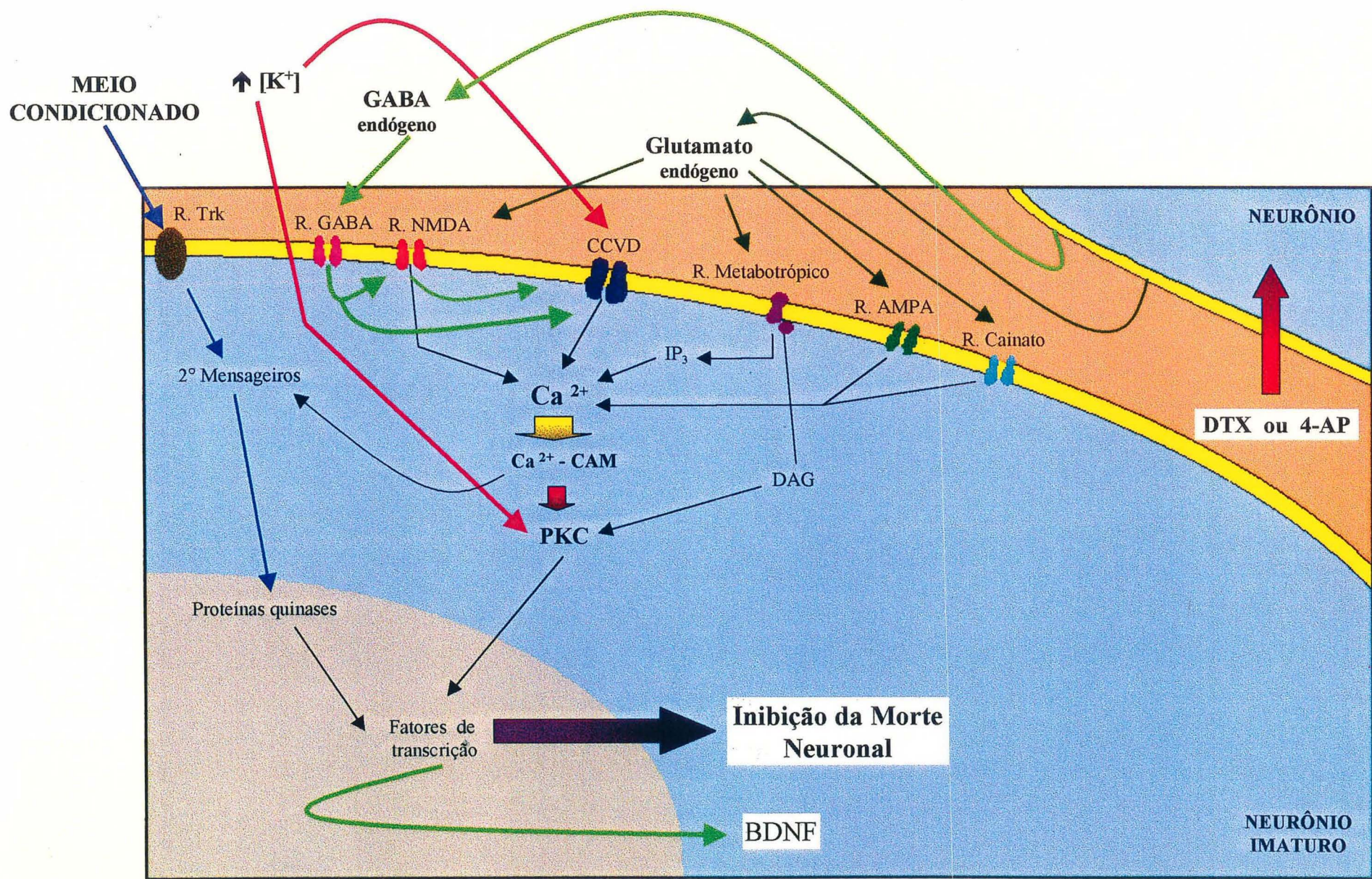
O efeito trófico de altas concentrações de K^+ foi descrito como sendo devido a um aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , mediado pela ativação de canais voltagem-dependentes do tipo L (Koike et al., 1989; Collins & Lile, 1989). Desta forma, testamos se o bloqueio dos mesmos com o antagonista nifedipina poderia eliminar o efeito neuroprotetor dos bloqueadores de canais de K^+ .

A partir de nossos resultados, apresentamos evidências de que este antagonista de canais de Ca^{2+} aboliu o efeito promotor de sobrevivência da α -DTX e da 4-AP (Fig. 20 e Fig. 21). Assim, os canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L parecem estar

envolvidos mediando a ação trófica dos bloqueadores de canais de K^+ , aumentando a sobrevivência neuronal no modelo da co-cultura.

Estes resultados são coerentes com a proposta de Koike e colaboradores (1989) que relacionam os níveis citosólicos de Ca^{2+} com a dependência de fatores tróficos. Além disso, estes autores observaram que o bloqueio de canais voltagem-dependentes do tipo L com nifedipina (e outras di-hidropiridinas) anula o efeito neurotrófico mediado por altos níveis de K^+ . Este mesmo resultado também foi demonstrado por Collins & Lile (1989) em diferentes tipos de culturas neuronais, os quais detectaram que a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes é suficiente para a ação do K^+ .

Uma possibilidade é de que a DTX e a 4-AP atuem sobre o elemento pré-sináptico evocando a liberação dos neurotransmissores GABA e glutamato (Sihra et al., 1984; Weller et al., 1985; Tibbs et al., 1989a e b), os quais despolarizariam a membrana do elemento pós-sináptico, abrindo os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Fig. 32). Esta suposição considera que a liberação endógena de neurotransmissores teria uma ação excitatória aumentando os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , o que desencadearia a cascata neurotrófica, diminuindo significativamente a morte neuronal. Neste sentido, é importante salientar que a maioria dos tipos neuronais destas culturas são GABAérgicos (Yu et al., 1984) e que em neurônios em desenvolvimento a ação do neurotransmissor GABA é excitatória (Wu et al., 1992; Reichling et al., 1994; Connor et al., 1987; Yuste & Katz, 1991; Mueller et al., 1984; Ben-Ari et al., 1989; Cherubini et al., 1990; Hosokawa et al., 1994). Além disso, em culturas imaturas



(correspondentes a neonatos com 7 a 8 dias) a ativação do receptor GABA_A estimula o receptor NMDA e junto com este tem uma ação sinérgica sobre os canais voltagem-dependentes do tipo L, resultando num influxo de Ca²⁺ através dos mesmos. Nesta situação, o bloqueio destes canais com nifedipina demonstrou abolir o aumento dos níveis citosólicos deste cátion (Ohkuma et al., 1994).

Ainda com respeito a ação do GABA, foi descrito que este neurotransmissor e o agonista muscimol aumentam os níveis citosólicos de Ca²⁺ em neurônios corticais correspondentes a neonatos com idade entre 1 a 7 dias de nascimento (Connor et al., 1987; Yuste & Katz, 1991). Em nossos experimentos, a idade dos neurônios corticais no modelo da co-cultura correspondia a de neonatos com 1 dia (6 DIV) até 4 dias (9 DIV) de nascimento (Fig. 16, Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21, Tab. 14).

A morte ontogenética parece ocorrer pela competição entre os neurônios por uma limitada quantidade de fatores neurotróficos derivados do alvo e que são essenciais à sobrevivência (Oppenheim, 1989). Entretanto, a possível influência que a atividade elétrica desempenha na regulação deste tipo de morte é menos conhecida. Porém, é interessante que a inibição de aferências elétricas aumente significativamente a morte neuronal ontogenética (Wright, 1981; Maderdrut et al., 1988; Meriney et al., 1987), enquanto que os neurônios que morreriam nesta condição, podem ser mantidos vivos *in vitro* quando o meio é suplementado com fatores neurotróficos (Berg, 1984) ou com concentrações despolarizantes de K⁺ (Collins & Lile, 1989). Isto suporta a proposta de que a sobrevivência neuronal no embrião pode ser determinada pelo acesso a fatores neurotróficos e pela atividade elétrica mediada por despolarização (Collins et al., 1991).

Esta última, é precisamente a suposta ação dos bloqueadores de canais de K^+ no modelo da co-cultura (Fig. 32). Sustentando esta proposta, é importante salientar que a adição de 4-AP mimetiza a atividade elétrica neuronal melhor do que a despolarização com elevada concentração de K^+ (Tibbs et al., 1989b), e que o influxo de Ca^{2+} subsequente a ação desta droga também promove a ativação da PKC (Heemskerk et al., 1991).

O Ca^{2+} intracelular tem um papel crítico no estabelecimento e manutenção dos circuitos neuronais, além de promover a sobrevida neuronal. Influências ambientais, tais como aferências elétricas, que afetam os níveis deste cátion poderiam contribuir para a decisão de quais neurônios sobreviveriam ao período de morte ontogenética (Collins et al., 1991). Um forte suporte à esta proposta é que o bloqueio de aferências pré-sinápticas *in vivo* aumenta significativamente a incidência deste tipo de morte em vários sistemas (Wright, 1981; Meriney et al., 1987; Maderdrut et al., 1988; Born & Rubel, 1988).

Fatores neurotróficos e a atividade elétrica do elemento pós-sináptico promovem a sobrevida de neurônios, estando intimamente relacionados (Hendry et al., 1988; Meriney et al., 1987; Oppenheim, 1989). Da mesma forma, a atividade elétrica pré-sináptica também contribui para a sobrevida neuronal ao liberar neurotransmissores que presumivelmente causam uma elevação transitória dos níveis de Ca^{2+} citosólico no elemento pós-sináptico (Fig. 32).

Considerando um possível mecanismo de ação comum da atividade elétrica pré e pós-sináptica sobre a sobrevida neuronal, seria importante determinar se os fatores

neurotróficos, assim como a despolarização neuronal, promovem a sobrevivência pela elevação dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} ou, alternativamente, pela redução dos limites de concentrações deste cátion necessárias para a sobrevivência. Além disso, para esclarecer o eventual papel da atividade excitatória na manutenção neuronal no modelo da co-cultura, seria interessante testar o efeito dos bloqueadores de canais de K^+ (DTX e 4-AP) num sistema onde os diferentes receptores pós-sinápticos estivessem farmacologicamente bloqueados.

Além da despolarização e do aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} em neurônios imaturos mediado pelo GABA, Berninger e colaboradores (1995) demonstraram que este neurotransmissor e o agonista Muscimol induzem a expressão de c-fos e aumentam os níveis de mRNA do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em culturas neuronais. Em culturas irmãs com mais de 21 DIV, estes agentes não tiveram mais efeito. Estes autores observaram também que estas respostas mediadas pelo GABA dependem da ativação de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L, sendo bloqueadas pelo antagonista nifedipina.

A partir destes resultados, Berninger e colaboradores (1995) propuseram que o GABA poderia ter efeitos neurotróficos em neurônios embrionários ou perinatais, os quais seriam mediados pelo BDNF. Este fator neurotrófico induzido pelo GABA poderia estabilizar contatos sinápticos, promover a diferenciação e, em conjunção com outros fatores tróficos, promover a sobrevivência neuronal. Neste sentido, foi demonstrado que o bloqueio da atividade GABAérgica endógena com bicuculina provoca uma redução da arborização neurítica de neurônios hipocâmpais em cultura (Barbin et al., 1993).

Por fim, é necessário a discussão de alguns pontos pertinentes as correntes de K^+ , uma vez que estas são especialmente importantes para a regulação da excitabilidade neuronal, repolarizando os neurônios em resposta a eventos despolarizantes e estabilizando o potencial de membrana abaixo do limiar de disparo (Klee et al., 1995). A expressão destas correntes dependentes de voltagem segue uma seqüência específica no desenvolvimento de vários tipos neuronais (Bader et al., 1985; Desarmenien et al., 1993; Nerbonne & Gurney, 1989; Spitzer, 1991). Por exemplo, nas células provenientes das camadas CA1 e CA3 do hipocampo, as propriedades cinéticas e farmacológicas de I_A e da corrente retificadora lenta (I_K) permanecem estáveis durante o período pós-natal. Entretanto, a contribuição de I_A e I_K à totalidade da corrente celular varia com a idade. Nas células piramidais do hipocampo, a expressão de I_A diminui, enquanto I_K aumenta com a idade pós-natal. Estes eventos podem estar relacionados com a translocação de canais para compartimentos dendríticos ou axonais dos neurônios (Sheng et al., 1992), por influências de fatores de crescimento e hormônios (Chalazonitis et al., 1987; Joels & de Kloet, 1992), ou por uma fina adaptação intrínseca induzida pelo aumento da atividade elétrica (Klee et al., 1995). Além disso, o déficit relativo de I_A em neurônios, após um período em cultura, foi atribuído a uma regulação associada com perda do ambiente *in vivo* (Wu & Barish, 1994).

Sabe-se que os astrócitos regulam ativamente o aparecimento temporal de correntes transitórias de K^+ durante a diferenciação neuronal, induzindo o desenvolvimento de I_A . Ao modular a expressão destas correntes e as características da geração do potencial de ação, os astrócitos podem influenciar a entrada e acúmulo de Ca^{2+} , participando na plasticidade sináptica do hipocampo (Wu & Barish, 1994).

A modulação de correntes transitórias de K^+ por células não neuronais, ao longo do desenvolvimento, não é exclusividade de neurônios hipocâmpais. Dourado & Dryer (1992a, b) concluíram que fatores extrínsecos derivados de células alvo são necessários para o aparecimento de I_A em neurônios do gânglio ciliar.

Os resultados acima, sugerem uma precisa interação temporal entre astrócitos e neurônios na determinação do estabelecimento funcional dos circuitos neuronais. Talvez até, na seleção das células nervosas que devem superar a morte ontogenética. Da mesma forma, nossas observações indicaram que correntes de K^+ podem ter um papel relevante na sobrevivência de neurônios corticais embrionários, possivelmente modulando os níveis citosólicos de Ca^{2+} . Entretanto, experimentos piloto com culturas neuronais puras, definiram uma vez mais a interação neurônio-astrócito como elemento fundamental do processo. Nestes casos, todos os agentes neuroprotetores que utilizamos ($\uparrow [K^+]$, DTX e 4-AP) foram ineficazes para proteção da injúria mediada por trocas de meio. Uma possibilidade é que a ausência de astrócitos altere a quantidade (e distribuição) de canais de K^+ de neurônios em culturas puras, definindo um perfil de correntes de K^+ inadequadas para a sobrevivência nestas condições de cultura.

Por outro lado, seria interessante repetir os experimentos realizados com o modelo de co-cultura, utilizando neurônios mais velhos. Neste caso, eventuais alterações de correntes de K^+ ao longo da ontogênese, poderiam vir a alterar o efeito neuroprotetor dos bloqueadores obtidos com os neurônios imaturos.

Interação neurônio-astrocítico e injúria neuronal

A neurotoxicidade nem sempre ocorre a partir da ação direta de um determinado agente sobre o neurônio. Em alguns casos, os astrócitos podem exacerbar ou mesmo provocar novos estímulos promotores de injúria neuronal (Wilkin et al., 1990; Di Monte et al., 1992; Longuemare & Swanson, 1995; Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Kim & Täuber, 1996). Um exemplo disso é o efeito deletério sobre neurônios desencadeado por astrócitos que foram estimulados com LPS (Skaper et al., 1995).

A estimulação de astrócitos com esta endotoxina é utilizada em vários modelos (Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Kim & Täuber, 1996; Skaper et al., 1995) e está relacionada com a liberação de citocinas inflamatórias e a indução da NOS com subsequente ativação da via nitridérgica (Bock et al., 1996; Bronstein et al., 1995; Galea et al., 1992; Lee et al., 1996; Skaper et al., 1995).

Para estudar os efeitos da estimulação de astrócitos com a endotoxina, inicialmente empregamos a linhagem celular PC12 que expressa propriedades neuronais (Greene & Tischler, 1976; Greene et al., 1987; Peunova & Enikolopov, 1995) e tem sido utilizada como paradigma para a morte neuronal (Batistatou & Greene, 1991; Batistatou & Greene, 1993; Jackson et al., 1992; Mesner et al., 1992; Pan & Perez-Polo, 1993; Walkinshaw & Waters, 1995).

Conforme demonstrado na Figura 22, verificamos que a adição de LPS não afetou a viabilidade das células PC12 indiferenciadas ou neuronais, mesmo quando as culturas foram expostas a altas doses ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante um longo período (72 h).

Uma vez demonstrado que a endotoxina não provocava efeitos citotóxicos sobre esta linhagem celular, passamos a estimular monocamadas de astrócitos, estabelecendo após co-culturas. Este procedimento tinha como objetivo testar uma eventual ação indireta destas células gliais sobre a viabilidade das células PC12. Este paradigma foi baseado em um trabalho de Skaper e colaboradores (1995), os quais verificaram que a prévia estimulação de monocamadas de astrócitos com LPS ativava a via nitridérgica, provocando neurotoxicidade em neurônios posteriormente colocados em contato com estas monocamadas.

Entretanto, não foram detectadas diferenças com os respectivos controles na viabilidade de células PC12 indiferenciadas (Fig. 23) ou neuronais (Fig. 24), que estiveram em co-cultura com monocamadas secundárias de astrócitos corticais, previamente tratadas com LPS. Nestas condições, também não foram observadas alterações morfológicas nas células PC12 quando estas foram analisadas em microscopia de contraste de fase.

A utilização de células PC12 nas co-culturas, tinha como objetivo a realização de uma rápida aproximação, já que a obtenção de culturas neuronais para os experimentos seria comparativamente mais demorada. Desta forma, caso fossem obtidos resultados positivos neste modelo de co-cultura o paradigma seria significativamente

mais simples. De acordo com esta proposta, a produção endógena de radicais livres poderia nitrificar resíduos tirosina dos receptores envolvidos na cascata neurotrófica, diminuindo a viabilidade destas células altamente dependentes de fatores tróficos. Além de buscar um possível modelo de estresse oxidativo endógeno, parecia interessante comparar os efeitos sobre células tumorais indiferenciadas e aquelas com características fenotípicas de neurônios. Entretanto, a ausência de citotoxicidade impôs a necessidade da substituição das células PC12 neuronais, afim de que fossem testados neurônios corticais neste mesmo modelo.

Há um consenso de que a LPS não é neurotóxica em culturas neuronais puras (Bronstein et al., 1995; Bock et al., 1996), fato que também verificamos em nossos experimentos (Fig. 25). Entretanto, em co-culturas (neurônios e glia), não existe absoluta coincidência nos resultados (Lipton et al., 1993; Dawson et al., 1994; Hewett et al., 1994; Meda et al., 1995; Skaper et al., 1995).

Alguns autores consideram que a endotoxina estimula astrócitos corticais a promover a morte neuronal quando em co-cultura com células granulosas cerebelares (Skaper et al., 1995), neurônios corticais (Dawson et al., 1994) e mesencefálicos (Bronstein et al., 1995), através da indução da NOS. Apesar disso, não existe um consenso com respeito a esta ação, uma vez que há demonstrações de que a adição direta de LPS em co-culturas (astrócitos e neurônios corticais) não provoca neurotoxicidade (Lipton et al, 1993; Hewett et al., 1994). Assim, para provar se a adição de LPS poderia causar neurotoxicidade nestas condições, testamos os efeitos da administração da mesma em culturas corticais mistas (Fig. 26). Após exaustivas análises

em microscopia de contraste de fase, não observamos qualquer alteração morfológica que indicasse injúria neuronal.

Baseados no paradigma de Skaper e colaboradores (1995), estimulamos monocamadas de astrócitos com LPS para posteriormente colocar sobre as mesmas neurônios corticais. Da mesma forma que o observado em co-culturas de astrócitos e células PC12 (Fig. 23 e Fig. 24), quando neurônios corticais foram plaqueados sobre monocamadas secundárias previamente estimuladas com LPS, não foram detectados sinais de injúria (Fig. 27) ou diminuição da viabilidade neuronal (Fig. 28) até 96 h após o estabelecimento da co-cultura. Coerentemente com o resultado demonstrado na Figura 26 (cultura primária), quando neurônios foram semeados sobre monocamadas primárias de astrócitos previamente estimuladas com LPS (co-cultura) também não foram observados sinais de neurotoxicidade.

Após caracterizarmos que a LPS não se tratava de um agente promotor de injúria neuronal, direta ou indiretamente, quando neurônios e astrócitos encontravam-se em contato (culturas mistas ou co-culturas), propusemos outro modelo. Neste novo paradigma, monocamadas secundárias irmãs (mesma origem e idade) eram estimuladas rigorosamente da mesma maneira que aquelas que receberiam as células nervosas. Em seguida, condicionavam meio fresco durante 24 h, então este era utilizado na substituição do meio de culturas neuronais puras.

Esta nova condição demonstrou provocar claros sinais de injúria nas culturas que receberam meio condicionado por monocamadas estimuladas com LPS (Fig. 29). Os

sinais morfológicos indicadores de dano neuronal começaram a ser detectados a partir de 48 h da troca de meio, evoluindo lentamente para a ruptura de todos os neuritos aproximadamente 96 h após a substituição.

No mesmo período (96 h), a técnica de MTT indicou uma diminuição de aproximadamente 50% da viabilidade neuronal em relação aos controles (Fig. 30). Assim, observamos um efeito deletério do meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos estimuladas com LPS, já que este promoveu significativamente a morte de neurônios corticais. Aparentemente, estas monocamadas estimuladas liberaram um fator neurotóxico difusível, cujo efeito só foi observado em culturas neuronais puras, parecendo depender da interação neurônio-astrócito, pois em co-cultura não foram observados danos neuronais. Desta forma, parece que a interação por contato nas co-culturas (e culturas mistas), exerce uma ação neuroprotetora contra este fator difusível.

Uma vez detectado este efeito neurotóxico mediado por astrócitos, tratamos de determinar o mecanismo desencadeante do processo. Dentre as reações astrocitárias decorrentes da adição de LPS, é descrita a indução da NOS (Galea et al., 1992; Skaper et al., 1995) e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Bronstein et al., 1995; Bock et al., 1996; Lee et al., 1996). Assim o mencionado fator difusível presente no meio condicionado por monocamadas pré-estimuladas com endotoxina, poderia tratar-se do radical livre $\text{NO}\cdot$ e/ou de citocinas inflamatórias.

Determinamos a atividade NOS das culturas secundárias de astrócitos quantificando os níveis de NO_2^- acumulados no meio (Galea et al., 1992), e demonstrando a marcação da NADPH-diaforase nas monocamadas (Bock et al., 1996; Galea et al., 1992). A atividade desta enzima demonstrou ser co-localizada com a da NOS em todas as regiões do cérebro (Dawson et al., 1991b).

A análise dos níveis médios de NO_2^- acumulados no meio condicionado por monocamadas controles ($4,1 \pm 1 \mu\text{M}$) e tratadas ($4,3 \pm 1 \mu\text{M}$) indicaram a ausência de diferenças significativas. Os valores controles obtidos estão de acordo com os descritos por Kim & Täuber (1996) para monocamadas de astrócitos não estimuladas ($< 5 \mu\text{M}$). Em adição, os níveis de NO_2^- que detectamos estão dentro dos limites descritos por Zielasek e colaboradores (1992) para o meio de cultura fresco com soro ($0-5 \mu\text{M}$).

Quando comparamos monocamadas secundárias de astrócitos utilizadas para condicionar o meio de cultura, não detectamos diferenças na marcação NADPH-diaforase entre controles e tratadas (Fig. 31). A forte marcação de poucos astrócitos nas monocamadas controles está de acordo com os resultados descritos no trabalho de Galea e colaboradores (1992), que demonstram que ocasionalmente um número reduzido destas células podem aparecer coradas. Esta observação talvez possa ser explicada pelas evidências apresentadas por Murphy e colaboradores (1993) que apontam atividade da cNOS em astrócitos.

Desta forma, não foram detectados aumentos na marcação NADPH-diaforase nas monocamadas que condicionaram meio de cultura, nem nos níveis de NO_2^-

acumulados no meio condicionado pelas mesmas. Assim, nas condições empregadas, a LPS parece não ter sido capaz de induzir a expressão da NOS em nossas culturas secundárias de astrócitos. Portanto, o dano neuronal observado não deve ter sido desencadeado pela indução da via nitridérgica, sendo provavelmente provocado por citocinas inflamatórias.

Assim, apesar de ser utilizada amplamente como agente estimulador de astrócitos, a ação da LPS ainda apresenta vários aspectos passíveis de discussão. Um destes é a determinação da população de células alvo que respondem a endotoxina, a definição da participação das mesmas, e as condições em que pode ser neurotóxica.

Considerações finais

A partir dos experimentos realizados, verificamos que os neurônios corticais são sensíveis a diferentes procedimentos tais como adição do ionóforo A23187, de excitotoxinas ou a trocas de meio de cultura. Todas estas situações têm em comum a possibilidade de causar um transtorno na homeostase do Ca^{2+} .

Vários trabalhos relacionam o aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} com conseqüências deletérias para as células nervosas *in vitro*. Seja com o uso de um ionóforo (Choi et al., 1987), através da estimulação com excitotoxinas (Choi, 1987; Manev et al., 1990; Dubinsky & Rothman, 1991) ou decorrente de trocas de meio de cultura (Rosenberg & Aizenman, 1989; Driscoll et al., 1991), a elevação dos níveis citoplasmáticos deste cátion pode promover injúria e morte.

Da seqüência de eventos desencadeados pelo influxo de Ca^{2+} , pode advir a morte neuronal com características necróticas ou apoptóticas (Orrenius & Nicotera, 1994). Nestes processos podem ser ativadas enzimas de degradação e ocorrer comprometimento da função mitocondrial, além da desorganização do citoesqueleto (Lee et al., 1991; Orrenius & Nicotera, 1994; Saito et al., 1993). Ainda, em decorrência da entrada deste cátion, há a possibilidade de produção de $\text{NO}\cdot$ pela ativação da nNOS com conseqüente neurotoxicidade (Dawson et al., 1991a; Jesberger & Richardson, 1991).

Apesar do aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} ser apontado em vários estudos como desencadeante de injúria neuronal (Dubinsky, 1993), o influxo e a concentração citoplasmática deste cátion tem significativa importância fisiológica (Gibbons et al., 1993). Inclusive, existem vários indícios de uma estreita relação entre seus níveis citosólicos e a dependência de fatores tróficos em distintos tipos neuronais (Collins et al., 1991; Collins & Lile, 1989; Koike et al., 1989).

Foram relatados diferentes mecanismos capazes de promover efeitos neuroprotetores e até neurotróficos através da entrada de Ca^{2+} . Entre estes, encontram-se os trabalhos que citam a ativação de receptores glutamatérgicos (Balázs et al., 1988; Hack et al., 1993; Hack & Balázs, 1994) e GABAérgicos (Berninger et al., 1995). Além dos diferentes agonistas destes receptores, concentrações despolarizantes de K^+ também foram apontadas como capazes de promover a sobrevivência neuronal através do aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} (Collins et al., 1991). Relacionados diretamente ao influxo deste cátion, a estimulação de receptores NMDA (Gao et al., 1995) ou a

abertura de canais dependentes de voltagem (Collins et al., 1991; Ohkuma et al., 1994; Koike et al., 1989) foram descritos como essenciais para o aumento da sobrevivência ou inibição da morte neuronal.

A estimulação de receptores glutamatérgicos e GABAérgicos em neurônios imaturos, têm em comum a possibilidade de aumentar a atividade elétrica neuronal. Da mesma forma, bloqueadores de canais de K^+ (DTX e 4-AP) que despolarizam as células nervosas (Heemskerk et al., 1991; Weller et al., 1985) e induzem o influxo de Ca^{2+} (Heemskerk et al., 1991; Muniz et al., 1990), também evocam a liberação destes neurotransmissores (Sihra et al., 1984; Tibbs et al., 1989a, b; Weller et al., 1985) e exerceram um efeito neurotrófico em nossos experimentos, o qual foi revertido pela nifedipina.

Assim, o influxo de Ca^{2+} que ocorre através de canais abertos por neurotransmissor ou por voltagem, pode desencadear efeitos neurotóxicos na excitotoxicidade (Vendrell et al., 1993) ou neuroprotetores, ao participar da cascata neurotrófica (Collins et al., 1991; Collins & Lile, 1989; Koike et al., 1989).

Sob outro enfoque, as conseqüências deletérias apresentadas pelos neurônios, poderiam advir de uma ação indireta, causada pelos astrócitos, em resposta a um agente incapaz de promover injúria diretamente. Em estudos de neurotoxicidade, em geral são utilizadas culturas neuronais pobres em astrócitos (Bronstein et al., 1995) já que estas são tipicamente mais sensíveis a neurotoxinas exógenas que culturas ricas nestas células

gliais (Aschner & Kimelberg, 1991; Otto & Unsicker, 1993; Park & Mytilineou, 1992; Rosenberg & Aizenman, 1989).

Entretanto, ao contrário do conceito de que estas células gliais sempre desempenham um papel neuroprotetor, verificamos que monocamadas de astrócitos parecem liberar um fator neurotóxico quando estimuladas com LPS. Um eventual dano oxidativo decorrente da produção do radical $\text{NO}\cdot$ a partir da iNOS (Bronstein et al., 1995; Dawson et al., 1994; Skaper et al., 1995) foi descartado nos nossos resultados. Resta estudar a via inflamatória, na qual citocinas provavelmente estejam envolvidas, promovendo a injúria e até a morte dos neurônios corticais.

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo de diferentes modelos de injúria e neuroproteção permitiram as seguintes conclusões:

1. Apesar da grande diferença de concentração empregada, a adição do ionóforo de Ca^{2+} A23187 provocou apenas morte necrótica em culturas puras de neurônios corticais ou, por outro lado, não apresentou sinais de efeito deletério.
2. Para determinação da viabilidade neuronal em experimentos agudos de excitotoxicidade, a quantificação dos níveis de LDH demonstraram ser mais adequados. Os resultados obtidos com técnica de MTT não foram representativos para este tipo de injúria.
3. A substituição do meio de cultura demonstrou ser um eficiente promotor de dano neuronal. Sugerimos que este tipo de procedimento desencadeia um mecanismo excitotóxico mediado por receptores NMDA, dependente da idade da cultura, e um outro relacionado com a restrição de fatores tróficos.
4. Para estudar o efeito das trocas de meio sobre a viabilidade neuronal, o modelo da co-cultura (neurônios sobre monocamadas secundárias de astrócitos) apresentou excelentes resultados. Além da determinação da viabilidade pela contagem do número de neurônios, este paradigma permitiu a observação das características morfológicas das células nervosas em processo degenerativo.

5. No modelo da co-cultura, o meio condicionado e as elevadas concentrações de K^+ , apresentaram efeitos neuroprotetores contra a injúria desencadeada por trocas de meio. A adição dos bloqueadores DTX e 4-AP mimetizou esta ação trófica atuando através de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes do tipo L, sensíveis a nifedipina.

6. A LPS não diminuiu a viabilidade das células PC12 no modelo do estresse oxidativo endógeno. Esta endotoxina também não provocou neurotoxicidade em culturas de neurônios corticais puras, mistas ou co-culturas.

7. A utilização do meio condicionado por monocamadas secundárias de astrócitos, previamente estimuladas com a endotoxina, exerceu um efeito neurotóxico em culturas corticais puras. Não obtivemos evidências da participação da via nitridérgica, restando para ser estudada a provável resposta inflamatória mediada por citocinas liberadas pelos astrócitos.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Adler, R.; Manthorpe, M.; Skaper, S. D. and Varon, S. (1981). Polyornithine-attached neurite-promoting factors (PNPFs). Culture sources and responsive neurons. *Brain Res.* **206**: 129-144.
- Agulló, L. and Garcia, A. (1992). Different receptors mediate stimulation of nitric oxide-dependent cyclic GMP formation in neurons and astrocytes in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 1362-1368.
- Albina, J. E.; Cui, S.; Mateo, R. B. and Reichner, J. S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**: 5080.
- Arispe, N.; Rojas, E. and Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membranes. Blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 567-571.
- Aschner, M. and Kimelberg, H. K. (1991). The use of astrocytes in culture as model systems for evaluating neurotoxic-induced-injury. *Neurotoxicology* **12**: 505-517.
- Backus, K. H.; Kettenmann, H. and Schachner, M. (1989). Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **22**: 274-282.
- Bader, C. R.; Bertrand, D. and Dupin, E. (1985). Voltage-dependent potassium currents in developing neurones from quail mesencephalic neural crest. *J. Physiol. (London)* **366**: 129-151.
- Bagetta, G.; Nisticó, G. and Dolly, J. O. (1992). Production of seizures and brain damage in rats by α -dendrotoxin, a selective K^+ channel blocker. *Neurosci. Lett.* **139**: 34-40.
- Balázs, R.; Hack, N. and Jorgensen, O. S. (1990). Selective stimulation of excitatory amino acid receptor subtypes and the survival of cerebellar granule cells in culture: effect of kainic acid. *Neurosci.* **37**: 251-258.
- Balázs, R.; Jorgensen, O. S. and Hack, N. (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neurosci.* **27**: 437-452.
- Baltrons, M. A.; Agulló, L. and García, A. (1995). Dexamethasone up-regulates a constitutive nitric oxide synthase in cerebellar astrocytes but not in granule cells in culture. *J. Neurochem.* **64**: 447-450.

- Banker, G. A. (1980). Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* **209**: 809-810.
- Barbin, G.; Pollard, H.; Gaiarsa, J. L. and Ben-Ari, Y. (1993). Involvement of GABA_A receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **152**: 150-154.
- Barde, Y. -A. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* **2**: 1525-1534.
- Barger, S. W.; Hörster, D.; Furukawa, K.; Goodman, Y.; Kriegstein, J. and Mattson, M. P. (1995). Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid β -peptide toxicity: Evidence for involvement of a kB-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9328-9332.
- Batistatou, A. and Greene, L. A. (1991). Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J. Cell Biol.* **115**: 461-471.
- Batistatou, A. and Greene, L. A. (1993). Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J. Cell Biol.* **122**: 523-532.
- Beckman, J. S. (1991). The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol.* **15**: 53-59.
- Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. M. and Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production from peroxynitrite: implications for endothelial injury by nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1620-1624.
- Beckman, J. S.; Chen, J.; Crow, J. P. and Ye, Y. Z. (1994). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* **103**: 371-380.
- Beckman, J. S.; Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; van der Woerd, M.; Smith, C.; Chen, J.; Harrison, J.; Martin, J. C. and Tsai, M. (1992). Kinetics of superoxide dismutase and iron catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 438-445.
- Ben-Ari, Y.; Cherubini, E.; Corradetti, R. and Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *J. Physiol. (London)* **416**: 303-325.

- Bennett, M. R. and White, W. (1979). The survival and development of cholinergic neurons in potassium -enriched media. *Brain Res.* **173**: 549-553.
- Benowitz, L. I. and Routtenberg, A. (1987). A membrane phospho-protein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **10**: 527-532.
- Berg, D. K. (1984). New neuronal growth factors. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**: 149-170.
- Berninger, B.; Marty, S.; Zafra, F.; Berzaghi, M. P.; Thoenen, H. and Lindholm, D. (1995). GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation *in vitro*. *Development* **121**: 2327-2335.
- Bock, F.; Dornand, J. and Rondouin, G. (1996). Release of TNF α in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *NeuroReport* **7** (6): 1125-1129.
- Bonfoco, E.; Krainc, D.; Ankarcrona, M.; Nicotera, P. and Lipton, S. A. (1995). Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7162-7166.
- Born, D. E. and Rubel, E. W. (1988). Afferent influences on brain stem auditory nuclei of the chicken: presynaptic action potentials regulate protein synthesis in nucleus magnocellularis neurons. *J. Neurosci.* **8**: 901-919.
- Brenneman, D. E. and Eiden, L. E. (1986). Vasoactive intestinal polypeptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Sci. USA* **83**: 1159-1162.
- Bronstein, D. M.; Perez-Otano, Y.; Sun, V.; Mullis Sawin, S. B.; Chan, J.; Wu, G.-C.; Hudson, P. M.; Kong, L.-Y.; Honh, J.-S. and McMillian, M. K. (1995). Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* **704**: 112-116.
- Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* **15** (1): 7-10.
- Castagna, M.; Takai, Y.; Kaibuchi, K.; Sano, K.; Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium activated phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**: 7847-7851.

- Clarke, P. G. H. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* **181**: 195-213.
- Collingridge, G. and Lester, R. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **40**: 143-210.
- Collins, F. and Lile, J. D. (1989). The role of dihydropyridine-sensitive voltage-gated calcium channels in potassium-mediated neuronal survival. *Brain Res.* **502**: 99-108.
- Collins, F.; Schmidt, M. F.; Guthrie, P. B. and Kater, S. B. (1991). Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. *J. Neurosci.* **11** (8): 2582-2587.
- Connor, J. A.; Tseng, H. -Y. and Hockberger, P. E. (1987). Depolarization and transmitter-induced changes in intracellular Ca^{2+} of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J. Neurosci.* **7**: 1384-1400.
- Coyle, J. T. and Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689-695.
- Cuadros, M. A. and Rios, A. (1988). Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat. Embryol. Berl.* **178** (6): 543-551.
- Cui, S.; Reichner, J. S.; Mateo, R. B. and Albina, J. E. (1994). Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* **54**: 2462-2467.
- Chalazonitis, A.; Peterson, E. R. and Crain, S. M. (1987). Nerve growth factor regulates the action potential duration of mature sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 289-293.
- Chao, C. C.; Hu, S.; Molitor, T. W.; Shaskan, E. G. and Peterson, P. K. (1992). Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* **149** (8): 2736-2741.
- Cheng, B. and Mattson, M. P. (1992). IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. *J. Neurosci.* **12**: 1558-1566.
- Cheng, B.; Furukawa, K.; O'Keefe, J. A.; Goodman, Y.; Kihiko, M.; Fabian, T. and Mattson, M. P. (1995). Basic fibroblast growth factor selectively increases AMPA-receptor subunit GluR1 protein level and differentially modulates Ca^{2+}

- responses to AMPA and NMDA in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **65**: 2525-2536.
- Cherubini, E.; Rovira, C.; Gaiarsa, J. L.; Corradetti, R. and Ben-Ari, Y. (1990). GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* **8**: 481-490.
- Choi, D. W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* **58**: 293-298.
- Choi, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* **7**: 369-379.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634.
- Choi, D. W. (1992). Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* **258**: 241-243.
- Choi, D. W. and Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* **13**: 171-182.
- Choi, D. W.; Koh, J. and Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonist. *J. Neurosci.* **8**: 185-196.
- Choi, D. W.; Maulucci-Gedde, M and Kriegstein, A. R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**: 357-368.
- Chung, I. Y. and Benveniste, E. N. (1990). Tumor necrosis factor alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, interferon gamma and interleukin-1 beta. *J. Immunol.* **144**: 2999-3007.
- Dawson, T. M. and Snyder, S. H. (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* **14**: 5147-5159.
- Dawson, V. L.; Brahmabhatt, H. P.; Mong, J. A. and Dawson, T. M. (1994). Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glia cortical cultures. *Neuropharmacology* **33** (11): 1425-1430.
- Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; London, E. D.; Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1991a). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6368-6371.
- Dawson, V. L.; Bredt, D. S.; Fotuhi, M.; Hwang, P. M. and Snyder, S. H. (1991b). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7797-7801.

- Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Bartley, D. A.; Uhl, G. R. and Snyder, S. H. (1993). Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* **13**: 2651-2661.
- Deckwerth, T. L. and Johnson, E. M., Jr. (1993). Neurotrophic factor deprivation-induced death. In: **Markers of Neuronal Injury and Degeneration.** (J. N. Johannessen, Ed.) *Ann. NY Acad. Sci.* **679**: 121-131.
- Demerle-Pallardy, C.; Lonchamp, M. -O.; Chabrier, P. -C. and Braquet, P. (1993). Nitric oxide synthase induction in glial cells: effect on neuronal survival. *Life Sci.* **52**: 1883-1890.
- Desagher, S.; Glowinski, J. and Premont, J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosci.* **16** (8): 2553-2562.
- Desarmenien, M. G.; Clendening, B. and Spitzer, N. C. (1993). *In vivo* development of voltage-dependent ionic currents in embryonic *Xenopus* spinal neurons. *J. Neurosci.* **13**: 2575-2581.
- Di Monte, D. A.; Wu, E. Y. and Langston, J. W. (1992). Role of astrocytes in MPTP metabolism and toxicity. *Ann. NY Acad. Sci.* **648**: 219-228.
- Dickson, D. W.; Lee, S. C.; Mattiace, L. A.; Yen, S.-H. and Brosnan, C. (1993). Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* **7**: 75-83.
- Dichter, M. A. (1978). Rat cortical neurons in cell culture: Culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* **149**: 279-293.
- Dichter, M. A. (1980). Physiological identification of GABA as the inhibitory transmitter for mammalian cortical neurons in cell culture. *Brain Res.* **190**: 111-121.
- Dingledine, R.; McBain, C. J. and McNamara, J. O. (1990). Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends in Pharmacol. Sci.* **11**: 334-338.
- Docherty, R. J.; Dolly, J. O.; Halliwell, J. V. and Othman, Y. B. (1983). Excitatory effects of dendrotoxin on the hippocampus *in vitro*. *J. Physiol.* **336**: 58-59.
- Dolly, J. O.; Halliwell, J. V.; Black, J. D.; Williams, R. S.; Pelchen-Matthews, A.; Breeze, A. L.; Mehraban, F.; Othman, Y. B. and Black, A. R. (1984). Botulinum neurotoxin and dendrotoxin as probes for studies on transmitter release. *J. Physiol.* **79**: 280-303.

- Dolly, J. O.; Stansfeld, C. E.; Breeze, A.; Pelchen-Matthews, A.; Marsh, S. J. and Brown, D. A. (1987). Neuronal acceptor sub-types for dendrotoxin and their relation to K⁺ channels. In: **Neurotoxins and their Pharmacological Implications** (P. Jenner, ed.), Raven Press, New York, 81-96.
- Dourado, M. M. and Dryer, S. E. (1992a). Changes in the electrical properties of chick ciliary ganglion neurones during embryonic development. *J. Physiol. (London)* **449**: 411-428.
- Dourado, M. M. and Dryer, S. E. (1992b). Extrinsic factors influence the expression of K⁺ currents in chick ciliary ganglion neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* **18**: 41.
- Dreyer, E. B.; Kaiser, P. K.; Offerman, J. T. and Lipton, S. A. (1990). HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science* **248**: 364-367.
- Driscoll, B. F.; Law, M. J. and Crane, A. M. (1991). Cell damage associated with changing the medium of mesencephalic cultures in serum-free medium is mediated via N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurochem.* **56**: 1201-1206.
- Dubinsky, J. (1993). Examination of the role of calcium in neuronal death. In: **Markers of Neuronal Injury and Degeneration.** (J. N. Johannessen, Ed.) *Ann. NY Acad. Sci.* **679**: 34-42.
- Dubinsky, J. M. and Rothman, S. M. (1991). Intracellular calcium concentration during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J. Neurosci.* **11**: 2545-2551.
- Dujovne, C. A.; Shoeman, D.; Bianchine, J. and Lasagna, L. (1972). Experimental bases for the different hepatotoxicity of erythromycin preparations in man. *J. Lab. Clin. Med.* **79**: 832-844.
- Edwards, S. N.; Buckmaster, A. E. and Tolkovsky, A. M. (1991). The death programme in cultured sympathetic neurones can be suppressed at the posttranslational level by nerve growth factor, cyclic AMP, and depolarization. *J. Neurochem.* **57**: 2140-2143.
- Eichler, M. E.; Dubinsky, J. M. and Rich, K. M. (1992). Relationship of intracellular calcium to dependence on nerve growth factor in dorsal root ganglion neurons in cell culture. *J. Neurochem.* **58**: 263-269.

- Eimerl, S. and Schramm, M. (1991). Acute glutamate toxicity and its potentiation by serum albumin are determined by the Ca^{2+} concentration. *Neurosci. Lett.* **130**: 125-127.
- Ernsberger, U.; Edgar, D. and Rohrer, H. (1989). The survival of early chick sympathetic neurons *in vitro* is dependent on a suitable substrate but independent of NGF. *Dev. Biol.* **135**: 250-262.
- Estévez, A. G.; Radi, R.; Barbeito, L.; Shin, J. T.; Thompson, J. A. and Beckman, J. S. (1995). Peroxynitrite-induced cytotoxicity in PC12 cells: Evidence for an apoptotic mechanism differentially modulated by neurotrophic factors. *J. Neurochem.* **65**: 1543-1550.
- Fallon, J. R. (1985). Preferential outgrowth of central nervous system neurites on astrocytes and Schwann cells as compared with nonglial cells *in vitro*. *J. Cell Biol.* **100**: 198-207.
- Fantl, W. J.; Johnson, D. E. and Williams, L. T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 453-481.
- Farber, J. L.; Chien, K. R. and Mittnacht, S. (1981). The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol.* **102**: 271.
- Ferrara, N.; Ousley, F. and Gospodarowicz, D. (1988). Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotrophic and angiogenic mitogen. *Brain Res.* **462**: 223-232.
- Finlay, B. L. and Pallas, S. L. (1989). Control of cell number in the developing mammalian visual system. *Prog. Neurobiol.* **32**: 207-234.
- Fischbach, G. (1970). Synaptic potentials recorded in cell cultures of dissociated nerve and muscle cells in low density cultures. *Science* **169**: 1331-1333.
- Fischbach, G. D. and Nelson, P. G. (1977). Cell culture in neurobiology. In: **Handbook of Physiology**, Sect. 1, *The Nervous System* (E. R. Kandel, Ed.), American Physiological Society, Bethesda, M.D., pp. 719-774.
- Fonnum, F. (1988). Excitatory amino acid pathways and the biochemical architecture of the glutamate terminal. In: **Frontiers in excitatory amino acid research.** (E. A. Cavalheiro; J. Lehmann and L. Turski, Eds.) Alan R. Liss, Inc., New York, p. 85.

- Frandsen, A.; Drejer, J. and Schousboe, A. (1989). Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via N-methyl-D-aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors. *J. Neurochem.* **53**: 297-299.
- Franklin, J. L.; Sanz-Rodriguez, C.; Juhasz, A.; Deckwerth, T. L. and Johnson, E. M. (1995). Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons *in vitro* but does not support growth: requirement for Ca^{2+} influx but not α -*1* activation. *J. Neurosci.* **15**: 643-664.
- Freshney, R. I. (1994). **Cultures of animal cells: A manual of basic technique** (3rd ed.) Wiley-Liss, New York, 486 pp.
- Galea E., Feinstein D. L. and Reis D. J. (1992). Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10945-10949.
- Gallo, V.; Kingsbury, A.; Balázs, R. and Jorgensen, O. S. (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* **7**: 2203-2213.
- Gao, X. M.; Margolis, R. L.; Leeds, P.; Hough, C.; Post, R. M. and Chuang, D. M. (1995). Carbamazepine induction of apoptosis in cultured cerebellar neurons: effects of N-methyl-D-aspartate, aurointricarboxylic acid and cycloheximide. *Brain Res.* **703**: 63-71.
- Garey, L. J. (1971). A light and electron microscopic study of the visual cortex of the rat and monkey. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.* **179**: 21-40.
- Garthwaite, J. (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* **14**: 75-82.
- Gibbons, S. J.; Brorson, J. R.; Bleakman, D.; Chard, P. S. and Miller, R. J. (1993). Calcium influx and neurodegeneration. In: **Markers of Neuronal Injury and Degeneration**. (J. N. Johannessen, Ed.) *Ann. NY Acad. Sci.* **679**: 22-33.
- Giulian, D.; Vaca, K. and Corpuz, M. (1993). Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* **13** (1): 29-37.
- Glaum, S. R.; Scholz, W. K. and Miller, R. J. (1990). Acute and long term glutamate-mediated regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in rat hippocampal pyramidal neurons *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**: 1293-1302.
- Glucksman, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**: 59-86.

- Grace, C. (1991). Phasis versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neurosci.* **41**: 1-24.
- Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2424-2428.
- Greene, L. A.; Aletta, J. M.; Rukenstein, A. and Green, S. A. (1987). PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment and experimental exploitation. *Meth. Enzimol.* **147**: 207-216.
- Griffin, W. S. T.; Stanley, L. C.; Ling, C.; White, L.; MacLeod, V.; Perrot, L. J.; White, C. L. 3rd and Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7611-7615.
- Hack, N. and Balázs, R. (1994). Selective stimulation of excitatory aminoacid receptor subtypes and the survival of granule cells in culture: Effect of quisqualate and AMPA. *Neurochem. Int.* **25** (3): 235-241.
- Hack, N.; Hidaka, H.; Wakefield, M. J. and Balázs, R. (1993). Promotion of granule cell survival by high K⁺ or excitatory amino acid treatment and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase activity. *Neurosci.* **57**: 9-20.
- Hammar, S. P. and Mottet, N. K. (1971). Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J. Cell. Sci.* **8** (1): 229-251.
- Hanklin, M. H.; Schneider, B. F. and Silver, J. (1988). Death of the subcallosal glial sling is correlated with formation of the cavum septi pellucidi. *J. Comp. Neurol.* **272**: 191-202.
- Hansson, E. (1990). Regional heterogeneity among astrocytes in the central nervous system. *Neurochem. Int.* **16** (3): 237-245.
- Hartley, D. M.; Kurth, M. C.; Bjerkness, L.; Weiss, J. H. and Choi, D. W. (1993). Glutamate receptor-induced ⁴⁵Ca²⁺ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.* **13** (5): 1993-2000.
- Harvey, A. L. and Karlsson, E. (1980). Dendrotoxin from the venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps*. A neurotoxin that enhances acetylcholine

- release of neuromuscular junctions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **312**: 1-6.
- Harvey, A. L. and Karlsson, E. (1982). Protease inhibitor homologues from mamba venoms: Facilitation of acetylcholine release and interactions with prejunctional blocking toxins. *Br. J. Pharmac.* **77**: 153-161.
- Harvey, A. L.; Anderson, A. J. and Karlsson, E. (1984). Facilitation of transmitter release by neurotoxins from snake venoms. *J. Physiol.* **79**: 222-227.
- Heemskerk, F. M. J.; Schrama, L. H.; Ghijsen, W. E. J. M.; De Graan, P. N. E.; Lopes da Silva, F. H. and Gispen, W. H. (1991). Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca^{2+} concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J. Neurochem.* **56**: 1827-1835.
- Heemskerk, F. M. J.; Schrama, L. H.; Gianotti, C.; Spierenburg, H.; Versteeg, D. H. G.; De Graan, P. N. E. and Gispen, W. H. (1990). 4- Aminopyridine stimulates B-50/GAP-43 phosphorylation and [3H] noradrenaline release in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* **54**: 863-869.
- Hendry, I. A.; Hill, C. E.; Belford, D. and Watters, D. J. (1988). A monoclonal antibody to a parasympathetic neurotrophic factor causes immunoparasympathectomy in mice. *Brain Res.* **475**: 160-163.
- Hewett, S. J.; Csernansky, C. A. and Choi, D. W. (1994). Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* **13**: 487-494.
- Hirning, L. D.; Fox, A. P.; McCleskey, E. W.; Olivera, B. M.; Thayer, S. A.; Miller, R. J. and Tsien, R. W. (1988). Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* **239**: 57-61.
- Honore, T. (1989). Excitatory amino acid receptor subtypes and specific antagonists. *Med. Res. Rev.* **9**: 1-23.
- Hosokawa, Y.; Sciancalepore, M.; Stratta, F.; Martina, M. and Cherubini, E. (1994). Developmental changes in spontaneous GABA_A-mediated synaptic events in rat hippocampal CA3 neurons. *Eur. J. Neurosci.* **6**: 805-813.
- Howard, B. D. and Gundersen, C. B. (1980). Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act presynaptically. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 307-336.

- Hsieh, K. M. and Blumenthal, H. T. (1956). Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**: 626-630.
- Hsu, H. (1985). Neurite-promoting effects of 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate on chick embryo neurons. *Neurosci. Lett.* **62**: 283-289.
- Huettner, J. E. and Baughman, R. W. (1986). Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J. Neurosci.* **6** (10): 3044-3060.
- Ikeda, J.; Ma, L.; Morita, Y. and Murota, S. (1994). Involvement of nitric oxide and free radical (O₂) in neuronal injury induced by deprivation of oxygen and glucose *in vitro*. *Acta Neurochir* **60**: 94-97.
- Isacson, O. (1993). On neuronal health. *TINS* **16** (8) 306-308.
- Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; Chen, J.; Tsai, H. M.; Martin, J. C.; Smith, C. D. and Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**: 431-437.
- Jackson, G. R.; Werrbach-Perez, K.; Ezell, E. L.; Post, J. F. M. and Perez-Polo, J. R. (1992). Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. *Brain Res.* **592**: 239-248.
- Jesberger, J. A. and Richardson, J. S. (1991). Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Intern. J. Neurosci.* **57**: 1-17.
- Joels, M. and de Kloet, R. (1992). Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci.* **15**: 25-30.
- Keilhoff, G. and Erdö, S. L. (1991). Parallel development of excitotoxic vulnerability to N-methyl-D-aspartate and kainate in dispersed cultures of the rat cerebral cortex. *Neurosci.* **43** (1): 35-40.
- Kerr, J. F. R. (1965). A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol.* **90**: 419.
- Kerr, J. F. R. ; Harmon, B. and Searle, J. (1974). An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* **14**: 571-585.
- Kerr, J. F. R. and Harmon, B. V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: **Apoptosis: the molecular basis of cell death.** (L. D. Tomei and F. O. Cope, Eds.), New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5-29.

- Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.
- Kim, Y. S. and Täuber, M. G. (1996). Neurotoxicity of glia activated by Gram-positive bacterial products depends on nitric oxide production. *Infect. Immun.* **64** (8): 3148-3153.
- Kizaki, H.; Tadakuma, T.; Odaka, C.; Muramatsu, J. and Ishimura, Y. (1989). Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters. *J. Immunol.* **143**: 1790.
- Klee, R.; Ficker, E. and Heinemann, U. (1995). Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J. Neurophysiol.* **74** (5): 1982-1995.
- Koh, J. Y. and Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Meth.* **20**: 83-90.
- Koh, J. Y.; Gwag, B. J.; Lobner, D. and Choi, D. W. (1995). Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* **268**: 573-575.
- Koh, J.; Almer, E. and Cotman, C. W. (1991). Activation of the metabotropic glutamate receptor attenuates N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9431-9435.
- Koike, T.; Martin, D. P and Johnson Jr., E. M. (1989). Role of Ca^{2+} channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: Evidence that levels of internal Ca^{2+} determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6421-6425.
- Komulainen, H. and Bondy, S. C. (1988). Increased free intracellular Ca^{2+} by toxic agents: an index of potential neurotoxicity? *Trends Pharmacol. Sci.* **9**: 154-156.
- Kostenko, M.A.; Tretjak, N. N. and Musienko, V. S. (1982). The effect of elevated potassium on the adult mollusc giant neurone survival and neurite formation in culture. *Brain Res.* **236**: 183-192.
- Kriegstein, A. R. and Dichter, M. A. (1983). Morphological classification of rat cortical neurons in cell culture. *J. Neurosci.* **3** (8): 1634-1647.

- Lafon-Cazal, M.; Culcasi, M.; Gaven, F.; Pietri, S. and Bockaert, J. (1993). Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **32**: 1259-1266.
- Lallement, G.; Fosbraey, P.; Baille Le Crom, V.; Tattersall, J. E.; Blanchet, G.; Wetherell, J. R.; Rice, P.; Passingham, S. L. and Sentenac-Roumanou, H. (1995). Compared toxicity of the potassium channel blockers, apamin and dendrotoxin. *Toxicity* **104** (1-3): 47-52.
- Lasher, R. S. and Zagon, I. S. (1972). The effect of potassium on neuronal differentiation in cultures of dissociated newborn rat cerebellum. *Brain Res.* **41**: 482-488.
- Ledda-Columbano, G. M. and Columbano, A. (1991). Apoptosis and hepatocarcinogenesis. In: **Apoptosis: The molecular basis of cell death.** (L. D. Tomei and F. O. Cope, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 101-119.
- Lee, K. S.; Frank, S.; Vanderklish, P.; Arai, A. and Lynch, G. (1991). Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7233-7237.
- Lee, S.; Christakos, S. and Small, M. B. (1993). Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Curr. Op. Cell Biol.* **5**: 286-291.
- Lee, Y. B.; Satoh, J-; Walker, D. G. and Kim, S. U. (1996). Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *NeuroReport* **7** (5): 1062-1066.
- LeVay, S. (1973). Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Microscopy of Golgi preparations. *J. Comp. Neurol.* **150**: 53-86.
- Levi-Montalcini, R. (1950). The origin and development of the visceral system in the spinal cord of the chick embryo. *J. Morphol.* **86**: 253-283.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor - 35 years later. *EMBO J.* **6**: 1145-1154.
- Levitt, P. and Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing Rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* **193** (3): 815-840.

- Lieberman, A. P.; Pitha, P. M.; Shin, H. S. and Shin, M. L. (1989). Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6348-6352.
- Lipton, S. A. (1986). Blockade of electrical activity promotes the death of mammalian retinal ganglion cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9774-9778.
- Lipton, S. A.; Choi, Y. B.; Pan, Z. -H.; Lei, S. Z.; Chen, H. -S. V.; Sucher, N. J.; Loscalzo, J.; Singel, D. J. and Stamler, J. S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**: 626-632.
- Lockshin, R. A. & Beaulaton, J. (1974). Programmed cell death. *Life Sci.* **15** (9): 1549-1565.
- Lockshin, R. A. (1981). Cell death in metamorphosis. In: **Cell death in biology and pathology** . (I. D. Bowen and R. A. Lockshin, Eds.) Chapman and Hall, London, 79-121.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (1991). Programmed cell death and apoptosis. In: **Apoptosis: The molecular basis of cell death**. (L. D. Tomei and F. O. Cope, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 47-60.
- Longuemare, M. C. and Swanson, R. A. (1995). Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *J. Neurosci. Res.* **40**: 379-386.
- Lowenstein, C. J.; Glatt, C. S.; Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (15): 6711-6715.
- Lund, J. S. (1973). Organization of neurons in the visual cortex, area 17, of the monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.* **147**: 455-496.
- MacDermott, A. B.; Mayer, M. L.; Westbrook, G. L.; Smith, S. J. and Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* **321**: 519-522.
- MacDonald, R. P.; Simpson, J. R. and Nossal, E. (1957). Serum lactic dehydrogenase - A diagnostic aid in myocardial infarction. *J. A. M. A.* **165**: 35-40.

- Maderdrut, J. L.; Oppenheim, R. W. and Prevet, D. (1988). Enhancement of naturally-occurring cell death in the sympathetic and parasympathetic ganglia of the chicken embryo following blockade of ganglionic transmission. *Brain Res.* **444**: 189-194.
- Mallat, M. and Chamak, B. (1994). Brain macrophages: neurotoxic or neurotrophic effector cells? *J. Leukoc. Biol.* **56**: 416-422.
- Manev, H.; Costa, E.; Wroblewski, J. T. and Guidotti, A. (1990). Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity. *FASEB J.* **4**: 2789-2797.
- Manev, H.; Favaron, M.; Guidotti, A. and Costa, E. (1989). Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neural death. *Mol. Pharmacol.* **36**: 106-112.
- Manthorpe, M.; Ray, J.; Pettmann, B. and Varon, S. (1989). Ciliary neurotrophic factors. In: **Nerve growth factors** (Rush R. A., Ed.), New York: Wiley, pp 31-56.
- Marcoux, F. W.; Goodrich, J. E.; Probert, A. W. and Dominick, M. A. (1988). Ketamine prevents glutamate-induced calcium influx and ischemic nerve injury. In: **Sigma and phencyclidine-like compounds as molecular probes in biology** (E. F. Domino and J. M. Kamenka, Eds.) Ann Arbor: NPP Books, 735-746.
- Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 12231-12234.
- Martin, B. L.; Wu, D.; Jakes, S. and Graves, D. J. (1990). Chemical influences on the specificity of tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **265**: 7108-7111.
- Martin, D. P.; Ito, A.; Horjome, K.; Lampe, P. A. and Johnson Jr., E. M. (1992). Biochemical characterization of programmed cell death in NGF-deprived sympathetic neurons. *J. Neurobiol.* **23**: 1205-1220.
- Martin, D. P.; Schmidt, R. E.; DiStefano, P. S.; Lowry, O. H.; Carter, J. G. and Johnson, E. M. (1988). Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal cell death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell Biol.* **106**: 829-844.
- Martin, S. J. and Cotter, T. G. (1991). Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* **59** (4): 1001-1016.

- Martin, S. J.; Green, D. R. and Cotter, T. G. (1994). Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *TIBS* **19**: 26-30.
- Mattson, M. P.; Dou, P. and Kater, S. B. (1988). Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **8**: 2087-2100.
- Mattson, M. P.; Rydel, R. E.; Lieberburg, I. and Smith-Swintosky, V. L. (1993). Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples. In: **Markers of Neuronal Injury and Degeneration.** (J. N. Johannessen, Ed.) *Ann. NY Acad. Sci.* **679**: 1-21.
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* **21**: 195-218.
- Meda, L.; Cassatella, M. A.; Szendrel, G. I.; Otvos, L. Jr.; Baron, P.; Villalba, M.; Ferrari, D. and Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* **374**: 647-650.
- Mena, M. A.; Casarejos, M. J.; Carazo, A.; Paino, C. L. and Yébenes, J. G. (1996). Glia conditioned medium protects fetal rat midbrain neurones in culture from L-DOPA toxicity. *NeuroReport* **7** (2): 441-445.
- Meriney, S. D.; Pilar, G.; Ogawa, M. and Nunez, R. (1987). Differential neuronal survival in the avian ciliary ganglion after chronic acetylcholine receptor blockade. *J. Neurosci.* **7**: 3840-3849.
- Mesner, P. W.; Winters, T. R. and Green, S. H. (1992). Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* **119**: 1669-1680.
- Michaels, R. L. and Rothman, S. M. (1990). Glutamate neurotoxicity *in vitro*: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* **10**: 283-292.
- Mokuno, K.; Ohtani, K.; Suzumura, A.; Kiyosawa, K.; Hirose, Y.; Kawai, K. and Kato, K. (1994). Induction of manganese superoxide dismutase by cytokines and lipopolysaccharide in cultured mouse astrocytes. *J. Neurochem.* **63** (2): 612-616.
- Moncada, S. and Higgs, A. (1993). Mechanisms of disease the L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* **329**: 2002-2012.
- Moncada, S.; Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
- Mueller, A. L.; Taube, J. S. and Schwartzkroin, P. A. (1984). Development of hyperpolarizing response to γ -aminobutyric acid in rabbit hippocampus studied *in vitro*. *J. Neurosci.* **4**: 860-867.
- Muniz, Z. M.; Tibbs, G. R.; Maschot, P.; Bougis, P.; Nicholls, D. G. and Dolly, J. O. (1990). Homologues of a K⁺ channel blocker α -dendrotoxin: Characterization of synaptosomal binding sites and their coupling to elevation of cytosolic free calcium concentration. *Neurochem. Int.* **16** (1): 105-112.
- Murphy, S. N. and Miller, R. J. (1989). Two distinct quisqualate receptors regulate Ca²⁺ homeostasis in hippocampal neurons *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* **35**: 671-680.
- Murphy, S.; Simmons, M. L.; Agullo, L.; Garcia, A.; Feinstein, D. L.; Galea, E.; Reis, D. J.; Minc-Golomb, D. and Schwartz, J. P. (1993). Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *TINS* **16** (8): 323-328.
- Nerbonne, J. M. and Gurney, A. M. (1989). Development of excitable membrane properties in mammalian sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **9**: 3272-3286.
- Niedel, J. E.; Kuhn, L. J. and Vandenberg, G. R. (1983). Phorbol ester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 36-40.
- Nieto, M. A. and Lopez-Rivas, A. (1989). IL-2 protects T lymphocytes from glucocorticoid-induced DNA fragmentation and cell death. *J. Immunol.* **143** (12): 4166-4170.
- Noble, L. J.; Hall, J. J.; Chen, S. and Chan, P. H. (1992). Morphologic changes in cultured astrocytes after exposure to glutamate. *J. Neurotrauma* **9** (3): 255-267.
- Noble, M.; Seang, J. F. and Cohen, J. (1984). Glia are a unique substrate for the *in vitro* growth of central nervous system neurons. *J. Neurosci.* **4** (7): 1892-1903.
- Norton, W. T. and Farooq, M. (1990). Bulk isolation and culture of oligodendroglia from mature brain. In: **Cell Culture: Methods in neurosciences**. (P. M. Conn, Ed.), Academic Press, London, pp 171-178.
- Nowak, L. M.; Young, A. B. and MacDonald, R. L. (1982). GABA and bicuculline actions on mouse spinal cord and cortical neurons in cell culture. *Brain Res.* **244**: 155-164.

- Oberhammer, F.; Wilson, J. W.; Dive, C.; Morris, I. D. and Hicbin, J. A. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kilobase fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **12**: 3679-3684.
- Ogura, A.; Miyamoto, M. and Kudo, Y. (1988). Neuronal death *in vitro*: parallelism between survivability of hippocampal neurones and sustained elevation of cytosolic Ca^{2+} after exposure to glutamate receptor agonist. *Exp. Brain Res.* **73**: 447-458.
- Ohkuma, S.; Chen, D.-Z.; Katsura, M.; Chen, S.-H. and Kuriyama, K. (1994). GABA_A receptor stimulation enhances NMDA-induced Ca^{2+} influx in mouse cerebral cortical neurons in primary culture. *Mol. Brain Res.* **27**: 145-151.
- Olney, J. W. (1989). Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* **26**: 505-525.
- Olney, J. W. (1994). New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J. Neural. Transm.* **43**: 47-51.
- Oppenheim, R. W. (1989). Cell death during the development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 453-501.
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 453-501.
- Orrenius, S. and Nicotera, P. (1994). The calcium ion and cell death. *J. Neural Transm.* **43**: 1-11.
- Orrenius, S.; McConkey, D. J.; Bellomo, G. and Nicotera, P. (1989). Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 281-285.
- Otto, D. and Unsicker, K. (1993). FGF-2-mediated protection of cultured mesencephalic dopaminergic neurons against MPTP and MPP⁺: specificity and impact of culture conditions, non-dopaminergic neurons, and astroglial cells. *J. Neurosci. Res.* **34**: 382-393.
- Pan, Z. and Perez-Polo, R. (1993). Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J. Neurochem.* **61**: 1713-1721.
- Park, T. H. and Mytilineou, C. (1992). Protection from 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺) toxicity and stimulation of regrowth of MPP⁽⁺⁾-damaged dopaminergic

- fibers by treatment of mesencephalic cultures with EGF and basic FGF. *Brain Res.* **599**: 83-97.
- Patel, J.; Zinkand, W. C.; Thompson, C.; Keith, R. and Salama, A. (1990). Role of glycine in the N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cytotoxicity. *J. Neurochem.* **54**: 849-854.
- Peunova, N. and Enikolopov, G. (1995). Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cell. *Nature* **375**: 68-73.
- Pressman, B. C. (1976). Biological applications of ionophores. *Ann Rev. Biochem.* **45**: 501-530.
- Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991a). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 481-487.
- Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M. and Freeman, B. A. (1991b). Peroxynitrite-mediated sulfhydryl oxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244-4250.
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**: 397-400.
- Ratan, R. R. and Baraban, J. M. (1995). Apoptotic death in an *in vitro* model of neuronal oxidative stress. *Clin. Exp. Pharmacol. P.* **22**: 309-310.
- Ratan, R. R.; Murphy, T. H. and Baraban, J. M. (1994). Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.* **62**: 376-379.
- Raynaud, A. (1977). Somites and early morphogenesis of reptile limbs. In: **Vertebrate limb and somite morphogenesis**. (D. Ede; J. Hinchliffe and M. Ball, Eds.), New York; Cambridge Univ. Press, pp. 373-385.
- Reichling, D. B.; Kyrozis, A.; Wang, J. and MacDermott, A. B. (1994). Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J. Physiol. (London)* **476**: 411-421.
- Rodriguez-Tarduchy, G. and Lopez-Rivas, A. (1989). Phorbol esters inhibit apoptosis in IL-2-dependent T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164** (3): 1069-1075.
- Rodriguez-Tarduchy, G.; Collins, M.; Lopez-Rivas, A. (1990). Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cell by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO. J.* **9** (9): 2997-3002.

- Rogawski, M. A. (1985). The A-current how ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends Neurosci.* **5**: 214-219.
- Rosenberg, P. A. and Aizenman, E. (1989). Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **103**: 162-168.
- Rothman, S. M. (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* **5**: 1483-1489.
- Rothman, S. M.; Dubinsky, J. M.; and Michaelis, R. L. (1991). *In vitro* neuronal death: contrasts between excitotoxicity and chemical hypoxia. In: **Glutamate, cell death and memory** (P. Ascher; D. W. Choi and Y. Christen, Eds.) Springer Verlag, Berlin.
- Rothman, S. M.; Thurston, J. H.; Hauhart, R. E. ; Clark, G. D. and Solomon, J. S. (1987). Delayed neurotoxicity of excitatory aminoacids *in vitro*. *Neurosci.* **22**: 471-480.
- Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M. and Freeman, B. A. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipoperoxidation. *J. Biol. Chem.* **269**: 26066-26075.
- Rusanescu, G.; Qi, H.; Thomas, S. M.; Brugge, J. S. and Halegoua, S. (1995). Calcium influx induces neurite growth through a src-ras signaling cassette. *Neuron* **15**: 1415-1425.
- Rydel, R. and Greene, L. A. (1988). cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1257-1261.
- Saito, K. I.; Elce, J. S.; Hamos, J. E. and Nixon, R. A. (1993). Widespread activation of calciumactivated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2628-2632.
- Salter, M.; Knowles, R. G. and Moncada, S. (1991). Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* **291** (1): 145-149.

- Saneto, R. P. (1990). Preparation of highly purified populations of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. In: **Cell Culture: Methods in neurosciences**. (P. M. Conn, Ed.), Academic Press, London, pp 119-133.
- Saneto, R. P. and De Vellis, J. (1987). Neuronal and glial cells: Cell culture of the central nervous system. In: **Neurochemistry a practical approach**. (A. J. Turner and H. S. Brachelard. Eds.), IRL Press, Oxford-Washington DC, pp 27-63.
- Saunders, J. W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**: 604-612.
- Sawada, M.; Kondo, N.; Suzumura, A. and Marunouchi, T. (1989). Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* **491**: 394-397.
- Sawada, M.; Suzumura, A. and Marunouchi, T. (1992). TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res.* **583**: 296-299.
- Scolding, N. and Lassmann, H. (1996). Demyelination and remyelination. *Trends Neurosci.* **19** (1): 1-2.
- Scott, B. S. (1977). The effect of elevated potassium on the time course of neuron survival in cultures of dissociated dorsal root ganglia. *J. Cell Physiol.* **91**:305-316.
- Scott, B. S. and Fisher, K. E. (1970). Potassium concentration and number of neurons in cultures of dissociated ganglia. *Exp. Neurol.* **27**: 16-22.
- Scott, B.; Engelbert, V. and Fisher, K. (1969). Morphological and electrophysiological characteristics of dissociated chick embryonic spinal ganglion cells in culture. *Exp. Neurol.* **23**: 230-248.
- Schmechel, D. E. and Rakic, P. (1979). A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: Morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* **156**: 115-152.
- Schnaar, R. L. and Schaffner, A. E. (1981). Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord: Characterization of motoneuron-enriched fractions. *J. Neurosci.* **1** (2): 204-217.
- Schoepp, D. D.; Johnson, B. G.; Salhoff, C. R.; McDonald, J. W. and Johnston, M. V. (1991). *In vitro* and *in vivo* pharmacology of trans- and cis-1-amino-1,3-

- cyclopentanedicarboxylic acid: dissociation of metabotropic and ionotropic excitatory amino acid receptor effects. *J. Neurochem.* **56**: 1789-1796.
- Schwarcz, R. and Meldrum, B. (1985). Excitatory amino acid antagonist provide a therapeutic approach to neurological disorders. *The Lancet* **85**: 140-143.
- Schweichel, J. U. and Merker, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**: 253-266.
- Sensenbrenner, M.; Labourdette, G.; Pettmann, B. and Weibel, M. (1986). Nutritional requirements of cultured astroglial cells. In: **Astrocytes: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology of Astrocytes**. (S. Fedoroff and A. Vernadakis Eds.) Academic Press INC, pp 279-293.
- Sheng, M.; Tsaur, M. -L.; Jan, Y. N. and Jan, L. Y. (1992). Subcellular segregation of two A-type K⁺ channel proteins in rat central neurons. *Neuron* **9**: 271-284.
- Siesjo, B. K.; Bengtsson, F.; Grampp, W. and Theander, S. (1989). Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann. NY Acad. Sci.* **568**: 234-251.
- Sihra, T. S.; Scott, I. G. and Nicholls, D. G. (1984). Ionophore A23187, verapamil, protonophores and veratridine influence the release of γ -aminobutyric acid from synaptosomes by modulation of plasma membrane potential rather than the cytosolic calcium. *J. Neurochem.* **43**: 1624-1630.
- Silver, J. (1978). Cell death during development of the nervous system. In: **Handbook of sensory physiology**. (M. Jacobson Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 419-457.
- Simmons, M. L. and Murphy, S. (1992). Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J. Neurochem.* **59**: 897-905.
- Simmons, M. L. and Murphy, S. (1993). Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *Eur. J. Neurosci.* **5**: 825-831.
- Skaper, S. D.; Facci, L. and Leon, A. (1995). Inflammatory mediator stimulation of astrocytes and meningeal fibroblasts induces neuronal degeneration via the nitridergic pathway. *J. Neurochem.* **64**: 266-276.
- Skaper, S. D.; Facci, L.; Milani, D.; Leon, A. and Toffano, G. (1990). Culture and use of primary and clonal neural cells. In: **Cell Culture: Methods in neurosciences**. (P. M. Conn, Ed.), Academic Press, London, pp 17-33.

- Skene, J. H. P. (1989). Axonal growth-associated proteins. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**: 127-156.
- Snyder, S. H. and Bredt, D. S. (1991). Nitric oxide as a neuronal second messenger. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 125-128.
- Spinelli, W.; Sonnenfeld, K. H. and Ishii, D. N. (1982). Effects of phorbol ester tumor promoters and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* **42**: 5067-5073.
- Spitzer, N. C. (1991). A developmental handshake: Neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *Journal of Neurobiology* **22**: 659-673.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**: 1445-1449.
- Storm, J. F. (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K^+ current in hippocampal neurons. *Nature* **336**: 379-381.
- Slys, P. K.; Ransom, B. R.; Waxman, S. G. and Davis, P. K. (1990). Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4212-4216.
- Takai, Y.; Kishimoto, A.; Kikkawa, U.; Mori, T. and Nishizuka, Y. (1979). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1218-1224.
- Tchelingerian, J. L.; Vignals, L. and Jacque, C. (1994). TNF alpha gene expression is induced in neurones after a hippocampal lesion. *NeuroReport* **5** (5): 585-588.
- Teichberg, V. I. (1991). Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB Journal* **5**: 3086-3091.
- Thayer, S. A.; Hirning, L. D. and Miller R. J. (1987). Distribution of multiple types of Ca^{2+} channels in rat sympathetic neurons in vitro. *Mol. Pharmacol.* **32**: 579-586.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.
- Tibbs, G. R.; Dolly, J. O. and Nicholls, D. G. (1989a). Dendrotoxin, 4-aminopyridine, and β -bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanisms to induce Ca^{2+} -dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.* **52**: 201-206.

- Tibbs, G. R.; Barrie, A. P.; Van Mieghem, F. J. E.; McMahon, H. T. and Nicholls, D. G. (1989b). Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca^{2+} and glutamate release. *J. Neurochem.* **53**: 1693-1699.
- Tolman, K. G.; Peterson, P.; Gray, P. and Hammar, S. P. (1978). Hepatotoxicity of salicylates in monolayer cell cultures. *Gastroenterology* **74**: 205-208.
- Tomei, L. D. and Cope, F. O. (1991). Introduction. In: **Apoptosis: The molecular basis of cell death**. (L. D. Tomei and F. O. Cope, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 1-3.
- Trump, B. F.; Berezsky, I. K. and Osornio-Vargas, A. R. (1981). Cell death and the disease process. The role of calcium. In: **Cell death in biology and disease**. (I. D. Borven and R. A. Lockshin, Eds.) Chapman and Hall, London. pp. 209-242.
- Trump, B. F.; Berezsky, I. K.; Sato, T.; Laiho, K. U.; Phelps, P. C. and De Claris, N. (1984). Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ. Health Perspect.* **57**: 281.
- Valverde, F. (1971). Short axon neuronal subsystems in the visual cortex of the monkey. *Int. J. Neurosci.* **1**: 181-197.
- Varon, S. and Adler, R. (1981). Trophic and specifying factors directed to neuronal cells. *Adv. Cell. Neurobiol.* **2**: 115-163.
- Vendrell, M.; Curran, T. and Morgan, J. I. (1993). Glutamate, immediate-early genes, and cell death in the nervous system. In: **Markers of Neuronal Injury and Degeneration**. (J. N. Johannessen, Ed.) *Ann. NY Acad. Sci.* **679**: 132-141.
- Wakade, A. R. and Thoenen, H. (1984). Interchangeability of nerve growth factor and high potassium in the long-term survival of chick sympathetic neurons in serum-free medium. *Neurosci. Lett.* **45**: 71-74.
- Wakade, A. R.; Wakade, T. D.; Malhotra, R. K. and Bhave, S. V. (1988). Excess K^+ and phorbol ester activate protein kinase C and support the survival of chick sympathetic neurons in culture. *J. Neurochem.* **51**: 975-983.
- Walker, D. G.; Kim, S. U. and McGeer, P. L. (1995). Complement and cytokine gene expression in cultured microglia derived from post-mortem human brains. *J. Neurosci. Res.* **40**: 478-493.

- Walkinshaw, G. and Waters, C. (1995). Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA: Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* **95**: 2458-2464.
- Wallace, M. N. and Bisland, S. K. (1994). NADPH-diaphorase activity in activated astrocytes represents inducible nitric oxide synthase. *Neurosci.* **59** (4): 905-919.
- Weller, U.; Bernhardt, U.; Siemen, D.; Dreyer, F.; Vogel, W. and Habermann, E. (1985). Electrophysiological and neurobiochemical evidence for the blockade of a potassium channel by dendrotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **330**: 77-83.
- Whyte, M. K.; Hardwick, S. J.; Meagher, L. C.; Savill, J. S. and Haslett, C. (1993). Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* **92** (1): 446-455.
- Wilkin, G. P.; Marriott, D. R. and Cholewinski, A. J. (1990). Astrocyte heterogeneity. *Trends Neurosci.* **13**: 43-46.
- Williams, G. T. (1991). Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell* **65**: 1097-1098.
- Wright, L. (1981). Cell survival in chick embryo ciliary ganglion is reduced by chronic ganglionic blockade. *Dev. Brain Res.* **1**: 283-286.
- Wroblewski, F. and LaDue, J. S. (1955). Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**: 210-213.
- Wu, R. -L. and Barish, M. E. (1994). Astroglial modulation of transient potassium current development in cultured mouse hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **14** (3): 1677-1687.
- Wu, W.; Ziskind-Conhaim, L. and Sweet, M. A. (1992). Early development of glycine- and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *J. Neurosci.* **12**: 3935-3945.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-556.
- Yu, A. C. H.; Hertz, E. and Hertz, L. (1984). Alterations in uptake and release rates for GABA, glutamate, and glutamine during biochemical maturation of highly purified cultures of cerebral cortical neurons, a GABAergic preparation. *J. Neurochem.* **42** (4): 951-960.

- Yuste, R. and Katz, L. C. (1991). Control of postsynaptic Ca^{2+} influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* 6: 333-344.
- Zielasek, J.; Tausch, M.; Toyka, K. V. and Hartung, H.- P. (1992). Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cell. Immunol.* 141: 111-120.

ABSTRACT

Neurotrophic factors produced by astrocytes increase the survival and promote *in vitro* neuronal outgrowth. A similar effect is obtained by depolarization with high K^+ concentrations in many neuronal types. However, astrocytes may also release neurotoxic factors. When stimulated with LPS, NOS is induced in these cells and pro-inflammatory cytokines are released. We decided to investigate death and neuroprotection of cultured cortical neurons, with special interest in the neuron-astrocyte interaction. We studied the effect of LPS-astrocyte stimulation attempting to verify whether this procedure would promote neurotoxicity. In order to assess neuroprotection we used a model of neuronal injury by trophic deprivation, in which we tested the effect of high K^+ concentrations and the blockade of I_A K^+ channels on neuronal survival. Primary astrocyte cultures were prepared from 1-day-old *Sprague-Dawley* rats, and the cortical neurons were obtained from 16-day-old embryos. In order to study the neurotoxicity, we employed Ca^{2+} ionophore A23187 in pure cortical neuron cultures. In such condition, neurotoxic concentrations promote death with necrotic characteristics. In another paradigm, the replacement of culture medium showed to be an efficient promoter of neuronal damage. We observed that this procedure leads both to an excitotoxic mechanism mediated by NMDA receptors, dependent on the age of culture, and to another related to trophic factors restriction that is independent on the culture age. Furthermore, we verified that conditioned medium and high K^+ concentrations exerted neuroprotection against medium changes associated injury. The addition of DTX or 4-AP, acting through L type voltage-dependent Ca^{2+} channels sensitive to nifedipine, mimics the trophic action of conditioned medium. On the other hand, LPS did not diminish the viability of undifferentiated or neuronal PC12 cells when these cells were co-cultured with astrocytes. The endotoxin also lacked neurotoxicity in pure cortical neuronal cultures and co-cultures. However, the conditioned medium from secondary astrocyte monolayers pre-stimulated with LPS had a neurotoxic effect on pure cortical cultures. This suggests that stimulated monolayers release a diffusible factor which affects neurones in culture and that such effect probably depends of neuron-astrocyte interaction. NOS activity in secondary cultures used to condition the medium was determined by quantification of NO_2^- accumulated levels in the medium, through Griess technique and by NADPH-diaphorase activity. We had no evidence of nitridergic pathway participation. Concluding, we reported that cortical astrocytes can release both neurotrophic and neurotoxic factors to the medium, and that I_A type- K^+ currents might have a role on survival of embryonic cortical neurons.

APÊNDICE

Parte dos resultados obtidos durante o desenvolvimento desta Tese foram apresentados em congressos e publicados sob forma de trabalho científico.

Comunicação oral em congresso:

XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 21 a 24 de agosto de 1996, Caxambu - MG.

TOXICIDADE DE ASTRÓCITOS LPS-TRATADOS SOBRE NEURÔNIOS CORTICAIS.
Módulo Temático da *South American Brain Research Organization* (SABRO).

XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 27 a 30 de agosto de 1997, Caxambu - MG.

I_A-TYPE K⁺ CHANNEL BLOCKERS PROMOTE SURVIVAL OF CORTICAL NEURONS IN CULTURE: INVOLVEMENT OF L-TYPE Ca²⁺ CHANNELS.
Módulo Temático de *Interação Neurônio - Glia*.

Trabalho publicado em revista científica:

Frizzo, M. E. S. and Barbeito, L. (1997). I_A-Type K⁺ Blockers Promote Survival of Cortical Neurons in Culture: Involvement of L-Type Ca²⁺ Channels. *NeuroReport* **8**: 1803-1806.

DENDROTOXIN (DTX), a well characterized I_A -type potassium channel blocker, directly added to the culture medium had no effect on survival of cultured cortical neurons at 6 or 14 days *in vitro*. On the contrary, neurons exposed to DTX remained in better condition than untreated ones. In an attempt to demonstrate the mechanisms by which DTX may affect neuronal survival we studied its effect in co-cultures of cortical neurons and astrocytes submitted to successive medium changes. After the second change of medium, at 9 days *in vitro*, the neuronal number in controls decreased by 43%, while in cultures receiving astrocyte-conditioned medium the cell loss was significantly reduced (15%, $p < 0.01$) with respect to control conditions. When DTX was added to the culture medium neuronal loss was also significantly prevented (25% for 1 μ M DTX, $p < 0.01$) with respect to control conditions. 4-Aminopyridine (4-AP) and 21 mM K^+ also preserved neurons. The L-type calcium channel antagonist nifedipine (5 μ M) abolished the protective effect of DTX and 4-AP. These results show that K^+ channel blockade induces protection against damage produced by repetitive medium change and that this effect is mediated by L-type Ca^{2+} channels.

Key words: 4-Aminopyridine; Cortical neuron cultures; α -Dendrotoxin; I_A -type K^+ channel blockers; L-type Ca^{2+} channels; Nifedipine; Neuronal survival

I_A -type K^+ channel blockers promote survival of cortical neurons in culture: involvement of L-type Ca^{2+} channels

Marcos Emílio dos Santos Frizzo^{CA} and Luis Barbeito¹

Laboratório de Histologia, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

¹Laboratório de Neurobiologia Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

^{CA}Corresponding Author

Introduction

Voltage-dependent A-type K^+ channels play a central role in regulating neuronal excitability and the presynaptic release of neurotransmitters. The polypeptide dendrotoxin (DTX) isolated from *Dendroaspis angusticeps* venom¹ is one of the best characterized blockers of A-type K^+ channels in cerebral neurons.^{2,3} In isolated nerve terminals, DTX induces Ca^{2+} entry and neurotransmitter release secondary to toxin-induced repetitive action potentials.^{1,2,4-6} Radioligand binding studies have demonstrated high densities of DTX binding sites in different brain regions such as neocortex⁷ and hippocampal formation.⁸ Intraventricular injection and direct administration of DTX into limbic regions induce epileptiform activity and clonic seizures in rats⁹⁻¹¹ and mice,¹² an effect that may be associated with potentiation of glutamate release.¹¹ In addition, intra-hippocampal or intraventricular administration of DTX induces brain damage and neuronal loss in several ipsilateral and contralateral brain areas.^{11,13} In an attempt to characterize the mechanisms by which DTX may affect neuronal survival, we have studied toxin effects on cultured cortical neurons. Our results show that DTX does not induce neuronal death in

cultures, on the contrary, it promotes neuronal survival in co-cultures of cortical neurons and astrocytes exposed to repetitive medium change. Evidence is provided that such trophic effect is mediated by the voltage-dependent Ca^{2+} channels sensitive to nifedipine.

Materials and Methods

Fetal bovine serum (FBS), heat-inactivated horse serum (HS) and Eagle's minimal essential media (MEM, Earle's salts) were from GIBCO. α -DTX was donated by Dr C. Cerveñansky and isolated from *D. angusticeps* venom (J.L., Kenya) according to Harvey and Karlsson.¹ The peptide was further submitted to a preparative cation exchange HPLC step. Purity was checked by reverse phase HPLC on an Aquapore RP-300 column.

Primary astrocyte cultures were prepared as described previously¹⁴ from the cortices of 1-day-old Sprague-Dawley rats, anesthetized with ether. The medium used was MEM with 10% FBS, 10% HS and 10 ng ml⁻¹ EGF. After confluence was achieved (6 days *in vitro*) 10 μ M cytosine arabinoside (Ara-C) was added for 24 h to eliminate mitotic cells. The monolayer was detached by trypsinization and

plated in 24-well plates (NUNC) in the above medium without EGF and Ara-C and with 5% of both sera.

Cortical neurons were obtained from cortices of 16-day-old embryos using a minor modification of a previously described technique.¹⁵ Cortical cells were plated on to secondary astrocyte monolayers (20–30 days *in vitro*) at a density of 12.5×10^3 cells cm^{-2} , and the experiments were proceeded after 6 days of co-culture. Cultures were maintained in MEM with Earle's salts supplemented with $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ penicillin, L-glutamine (2 mM), glucose (21 mM), bicarbonate (38 mM) and $3 \mu\text{M}$ Ara-C to halt glial division.

In order to increase the rate of neuronal death, complete medium changes with fresh medium were performed at 6 and 8 days *in vitro*. The fresh medium used in the successive changes was the same as described above without FBS. Fresh medium also was conditioned for 24 h by sister secondary astrocyte monolayers of the same age. The drugs DTX, 4-aminopyridine (4-AP) or nifedipine were added to the fresh medium, immediately before changing the medium.

Neuronal number was estimated using phase-contrast microscopy in four pre-established random fields ($\sim 0.5 \text{ mm}^2$) located around the center of the well. Each field was labeled for subsequent identification and the neurons were counted at 6 days *in vitro* (before medium change), and on subsequent days. Viable neurons were recognized as phase-bright cells displaying characteristic neuritic processes. The mean number of neurons at 6 days *in vitro* was $79 \pm 15 \text{ mm}^{-2}$. In some experiments, cultures were fixed with 0.2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde, processed immunocytochemically for monoclonal anti-neurofilament (200 kDa) antibody (Amersham) and counted as described above. Negative controls included deletion of the primary antibody.

Experiments were repeated at least three times, and each experiment was set up in triplicate or quadruplicate. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test for multiple comparisons. Data are reported as the mean \pm s.d., and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

We observed previously that the exposure of pure cortical cultures of neurons (14 days *in vitro*) to increasing concentrations of DTX (0.1 – $10 \mu\text{M}$) directly added to the culture medium did not induce cell death or any apparent deleterious effect on cell morphology. Instead, pure or co-cultures maintained

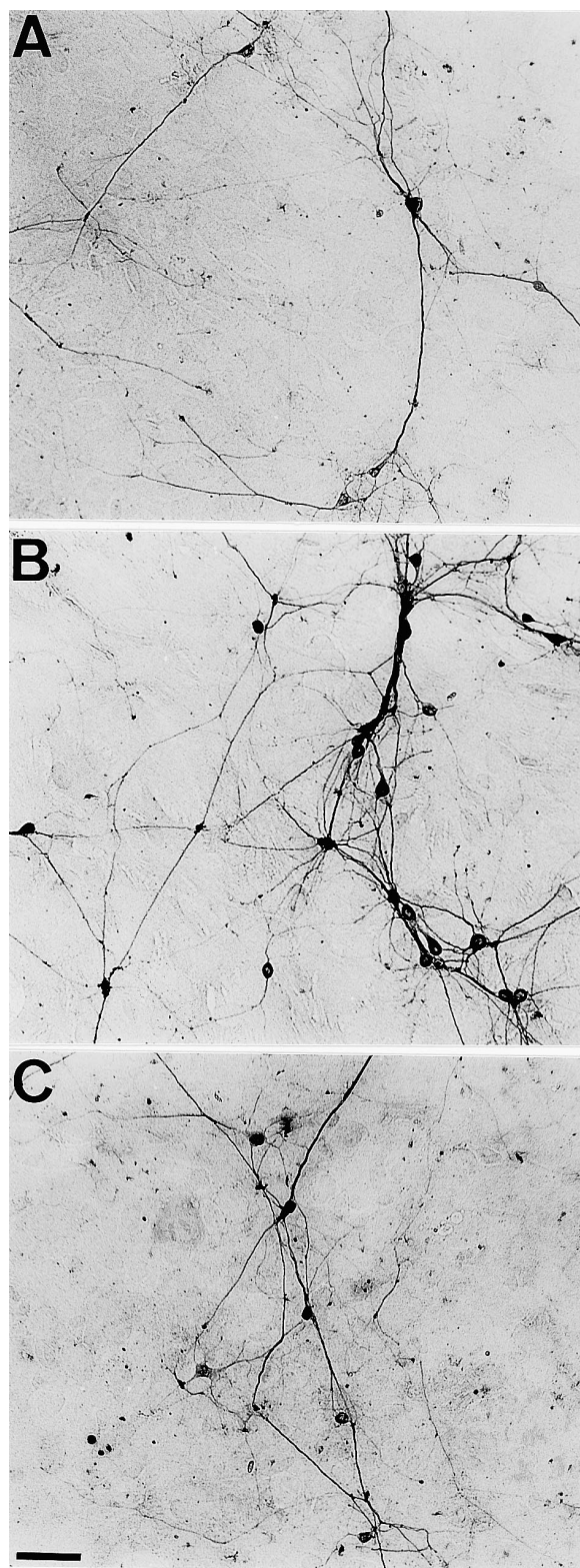


FIG. 1. Effect of DTX on cultures of cortical neurons. Co-cultures were submitted to complete medium changes with fresh medium at 6 and 8 days *in vitro*, fixed and processed for neurofilament immunostaining. In each medium change the following compounds were added to fresh medium: (A) vehicle; (B) $1 \mu\text{M}$ DTX; (C) $1 \mu\text{M}$ DTX plus $5 \mu\text{M}$ nifedipine. Note that microphotographs do not represent necessarily quantitative data (shown in Fig. 2) but rather qualitative changes observed in neuronal morphology after DTX treatment (increased number and extension of neuritic networks). Bar = $50 \mu\text{m}$.

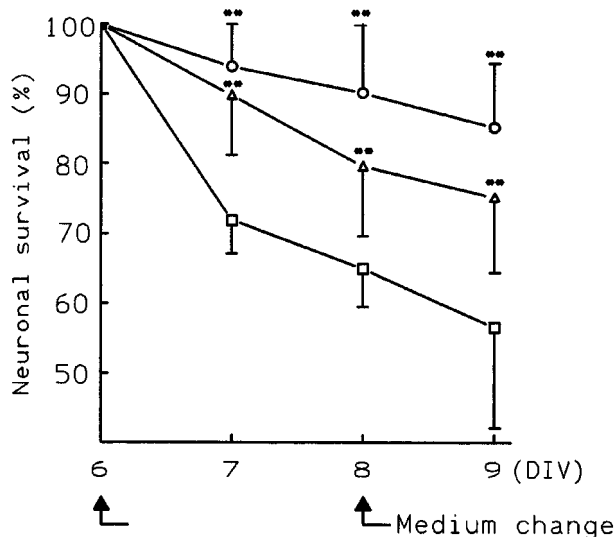


FIG. 2. Effect of successive changes of medium on neuronal survival. □ Control, △ astrocyte conditioned medium, ○ 1 μM DTX. Data represent the mean ± s.d. of four replicates in three different experiments ($n=12$). Statistical evaluation was performed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test; ** $p < 0.01$.

in the presence of DTX for several days displayed a well preserved neuronal morphology that contrasted with the progressive deterioration observed in untreated sister cultures.

In order to characterize such a potential neuroprotective effect of DTX, co-cultures were submitted to complete medium changes with fresh medium at 6 and 8 days *in vitro*. Previous experiments from our laboratory have shown that such regimen induces a rapid decrease in the number of neurons and in the extent of the neuritic networks without affecting the astrocyte monolayer. Figure 1A shows the typical morphological features of neurons in untreated cultures at 9 days *in vitro* after two consecutive medium changes. In contrast to the low number of neurons and the scarcity of neurite processes, sister cultures exposed to identical changes with fresh medium containing 1 μM DTX displayed significant preservation of neurons and neurite network (Fig. 1B).

As shown in Fig. 2, the number of neurons in untreated co-cultures decreased progressively 24 h after the first and second complete medium change, to 72% and 57%, respectively, of the number of neurons counted at 6 days *in vitro* (before medium change). When astrocyte-conditioned medium was used instead of fresh medium, the percentage of neurons was significantly higher than in control conditions (94% and 85% at 7 and 9 days *in vitro*, respectively). DTX (1 μM) added to fresh medium significantly prevented neuronal loss with respect to control cultures, the percentage of neurons being 90% and 75% at 7 and 9 days *in vitro*, respectively (Fig. 2). Other DTX concentrations

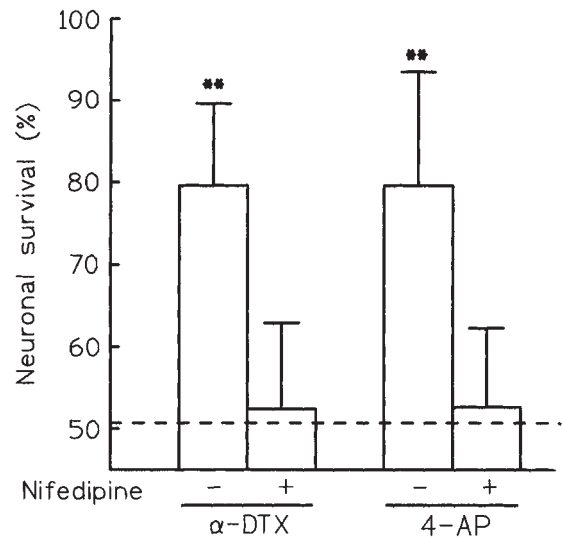


FIG. 3. Nifedipine abolishes DTX- and 4-AP-induced protection against repetitive medium changes. Neurons (6 days *in vitro*) in co-cultures were submitted to a complete medium change with fresh medium containing DTX (1 μM) or 4-AP (100 μM) with or without nifedipine (5 μM). The number of neurons was assessed immediately before and 48 h after medium change. Dotted line refers to control condition. Data represent the mean ± s.d. of three replicates in three different experiments ($n=9$). Statistical evaluation was performed by ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test; ** $p < 0.01$.

(0.1 and 10 μM) also exerted significant protective effects (69% and 71% respectively compared with 57% in control conditions at 9 days *in vitro*, $p < 0.05$).

In order to determine whether the protective effect of DTX was due to K⁺ channel blockade, another I_A K⁺ channel blocker, 4-AP, was tested in the same protocol. Addition of 4-AP (100 μM) to the fresh medium significantly prevented neuronal loss to an extent comparable with DTX (Fig. 3). High K⁺ medium (21 mM) also increased significantly the neuronal survival with respect to controls, the percentage of neurons being 92% and 80% at 7 and 9 days *in vitro*, respectively ($p < 0.01$).

The survival-promoting effect of high K⁺ is related to the presence of dihydropyridine-sensitive L-type Ca²⁺ channels.¹⁶ To assess whether neuronal survival mediated by K⁺ channel blockade is associated with an indirect activation of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels, the action of the antagonist nifedipine alone or together with DTX or 4-AP was studied. When applied alone, nifedipine (5 μM) did not significantly affect neuron viability. However, it abolished protective effects of both DTX and 4-AP (Figs 1C,3).

Discussion

In contrast to previous studies performed *in vivo* showing that intracerebral administration of DTX

induces brain damage and neuronal loss,^{11,13} we report that the toxin is devoid of direct toxicity in culture conditions. Such differences may be due to the fact that DTX *in vivo* stimulates cerebral excitatory aminoacid pathways resulting in indirect excitotoxic lesions. Although functional excitatory synaptic contacts have been described in cortical cultures, these neuronal networks do not seem to be vulnerable to DTX, a fact that may be related to the predominance of GABAergic neurons in such conditions.¹⁷

It is well known that regular change of medium is associated with diminished survival of neurons.¹⁸ Removing the culture medium and replacing it with fresh medium causes severe damage to the cultures:¹⁹ this effect was significantly attenuated by replacement of fresh medium with astrocyte-conditioned medium. Thus, in our cultures, neuronal death due to repetitive medium changes was shown to be related to insufficient trophic support. In addition, I_A-type K⁺ channel blockers also prevented the rate of neuronal loss associated with this type of injury. Although the addition of DTX or 4-AP did not reach the degree of protection obtained with astrocyte conditioned medium, it rescued 40–60% of the neurons that would have died in control conditions. These results suggest that in culture conditions K⁺ channel blockade exerts a neurotrophic influence, preventing the neuronal death induced by trophic factor deprivation.

Increased neuronal activity or depolarization with high K⁺ has been shown to exert trophic effects in a variety of neuronal types,^{20,21} an effect associated with the activation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels.^{16,22} Moreover, in neuronal cultures, depolarization-induced Ca²⁺ entry through voltage-dependent L-type channels has been shown to mimic, and to be synergistic with neuronal growth factor actions, including neuronal survival and the maintenance of neurites after growth factor deprivation.^{23,24} Accordingly, we present evidence that K⁺ channel blockade promotes neuronal survival to an extent comparable with astrocyte-conditioned or high K⁺ media, and that the Ca²⁺ channel antagonist nifedipine prevents this survival-promoting effect.

Thus, L-type voltage-gated Ca²⁺ channels seem to be involved in mediating the trophic action of DTX and 4-AP.

Conclusion

I_A-K⁺ channel blockade with DTX or 4-AP increased neuronal survival in cultures of cortical neurons submitted to insufficient trophic support. We provide evidence that such effect is mediated by a toxin-induced activation of L-type Ca²⁺ channels sensitive to nifedipine. Taken together, these results suggest a role for I_A-K⁺ currents in survival of embryonic cortical neurons.

References

1. Harvey AL and Karlsson E. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **312**, 1–6 (1980).
2. Weller U, Bernhardt U, Siemen D *et al.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **330**, 77–83 (1985).
3. Zoltay G and Cooper JR. *Cell Mol Neurobiol* **13**, 59–68 (1993).
4. Tibbs GR, Dolly JO and Nicholls DG. *J Neurochem* **52**, 201–206 (1989).
5. Barbeito L, Siciliano J and Dajas F. *J Neural Transm* **80**, 167–179 (1990).
6. Muniz ZM, Tibbs GR, Maschot P *et al.* *Neurochem Int* **16**, 105–112 (1989).
7. Awan K A and Dolly JO. *Neuroscience* **40**, 29–39 (1991).
8. Bidard J-N, Mourre C and Lazdunski M. *Biochem Biophys Res Commun* **143**, 383–389 (1987).
9. Silveira R, Siciliano J, Abo V *et al.* *Toxicol* **26**, 1009–1015 (1988).
10. Velluti JC, Caputti A and Macadar O. *Toxicol* **25**, 649–657 (1987).
11. Bagetta G, Nisticó G and Dolly JO. *Neurosci Lett* **139**, 34–40 (1992).
12. Coleman MH, Yamaguchi S and Rogawski MA. *Brain Res* **575**, 138–142 (1992).
13. Lallement G, Fosbraey P, Baille-Le-Crom V *et al.* *Toxicology* **104**, 47–52 (1995).
14. Saneto RP and De Vellis J. Neurochemistry a practical approach. In: Turner AJ and Brachet H, eds. *Neuronal and Glial Cells: Cell Culture of the Central Nervous System*. Oxford: IRL Press, 1987: 27–63.
15. Choi DW, Maulucci-Gedde M and Kriegstein AR. *J Neurosci* **7**, 357–368 (1987).
16. Koike T, Martin DP and Johnson EM Jr. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6421–6425 (1989).
17. Yu ACH, Hertz E and Hertz L. *J Neurochem* **42**, 951–960 (1984).
18. Rosenberg PA and Aizenman E. *Neurosci Lett* **103**, 162–168 (1989).
19. Driscoll BF, Law MJ and Crane AM. *J Neurochem* **56**, 1201–1206 (1991).
20. Gallo V, Kingsbury A, Balazs R and Jorgensen OS. *J Neurosci* **7**, 2203–2213 (1987).
21. Edwards SN, Buckmaster AE and Tolkovsky AM. *J Neurochem* **57**, 2140–2143 (1991).
22. Collins F and Lile JD. *Brain Res* **502**, 99–108 (1989).
23. Franklin JL, Sanz-Rodríguez C, Juhasz A *et al.* *J Neurosci* **15**, 643–664 (1995).
24. Rusanescu G, Qi H, Thomas SM *et al.* *Neuron* **15**, 1415–1425 (1995).

ACKNOWLEDGEMENTS: M.F. is a recipient of a PhD fellowship from CAPES (Brazil). The authors thank Dr C.A. Netto for his critical reading of the manuscript.

Received 14 February 1997;
accepted 19 March 1997