

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

**EFEITO DA AMÔNIA SOBRE A ATIVIDADE ASTROGLIAL NO
HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR**

FABIANA BARRERA GALLAND

ORIENTADORA

MARINA CONCLI LEITE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2013

Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.
E para se chegar, onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.
É preciso, antes de mais nada, querer.

Amyr Klink

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, Griselda e Andrés, por me incentivar e aconselhar a todo momento, se orgulhar e torcer por mim em todas as minhas conquistas. Devo tudo isso a vocês!

Às minhas irmãs, Eliana e Letícia, por serem sempre o meu exemplo e orgulho. Obrigada pela amizade! Amo vocês!

Ao Maicon, por contribuir para minha felicidade com muito amor e alegria! Obrigada pelo companheirismo e compreensão durante esses dois anos de mestrado! Te amo!

A toda minha família Uruguaia, principalmente às minhas avós Lili e Ligia por sempre torcerem muito por mim, mesmo não entendendo direito o que eu faço!

Aos meus cunhados, Ednaldo e Ricardo, por integrarem esta família cada vez maior e mais divertida!

À Mara, pelo cuidado e dedicação à nossa família. A tua ajuda em casa durante todo esse tempo foi essencial para que eu pudesse conquistar este título! Obrigada!

Aos meus cachorros, Dara e Baco, pelo companheirismo nos intervalos de estudo e pela alegria demonstrada cada vez que chego a casa!

À minha querida amiga Maíra, pela amizade incondicional. Por estar sempre me perguntando e querendo entender o meu trabalho! Obrigada por sempre torcer por mim! Te amo muito!

Às minhas amigas: Tina, Maína, Lisi, Paula, Nati, Pri, Pati, pela amizade incansável e pelos momentos de muita conversa e risada!

Às minha amigas Camila e Pati, pelo companheirismo durante toda a graduação, que perdurou no mestrado e com certeza continuará pela vida! Adoro vocês!

Ao meu querido grupo de ajuda do laboratório: Carol, Elisa, Fezinha, Fê Nery e Lili por sempre se disponibilizar a ajudar. Com certeza este trabalho teria sido muito mais penoso sem a ajuda de vocês! Muito obrigada por tudo!

A Maria Cristina, por estar sempre me acompanhando, ajudando e aconselhando no laboratório! Te adoro!

À todo o pessoal do laboratório 33, pela amizade e ajuda quando preciso! Obrigada por me aceitar neste laboratório, apesar de “oficialmente” não pertencer mais a ele!

Ao laboratório 31, da professora Regina, pela recepção desde o início do meu mestrado, pela compreensão da “invasão” e pelas tardes de muita risada!

Ao CA pela orientação durante a iniciação e por toda ajuda durante o mestrado. Os teus conselhos sempre ajudam muito! Obrigada!

A minha querida orientadora Marina, desde os tempos da iniciação científica (não oficial) até agora no mestrado (oficial)! Obrigada pela paciência, infinitos ensinamentos, disponibilidade e dedicação! És além de uma ótima orientadora, uma grande amiga! Serei sempre grata!!

Aos órgãos de financiamento CNPq e FAPERGS por fazer possível a pesquisa e a formação de cientistas neste país!

Índice

PARTE I.....	1
Resumo.....	2
Abstract.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4
1. Introdução.....	6
1.1. Hiperamonemia.....	6
1.2. Modelos animais para o estudo de hiperamonemia ou HE.....	8
1.3. Amônia e sua detoxificação no SNC.....	9
1.4. Principal tipo celular afetado pela toxicidade da amônia no SNC.....	13
1.5. O efeito da amônia sobre a proteína S100B.....	15
1.6. Amônia e metabolismo glutamatérgico.....	18
1.7. Envolvimento da amônia no estresse oxidativo.....	21
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivos Gerais.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
PARTE II.....	27
PARTE III.....	68
3. Discussão.....	69
3.1. Efeito da amônia sobre a S100B.....	69
3.2. Efeito da amônia sobre as funções astrocíticas.....	75
4. Conclusões.....	84
5. Referências.....	86

PARTE I

Resumo

A hiperamonemia é observada tanto em doenças hepáticas quanto em erros inatos do metabolismo. A amônia em altas concentrações atravessa a barreira hematoencefálica e é tida como uma das principais causas para o desenvolvimento das alterações neuropsiquiátricas observadas na Encefalopatia Hepática (HE). Os prejuízos moleculares e fisiológicos causados por este íon são observados principalmente nas células astrocíticas às quais apresentam alterações na atividade de uma série de proteínas e enzimas clássicas de sua função. Entre elas destaca-se a proteína S100B, principalmente expressa e secretada por estas células e muito usada como marcadora de dano cerebral. Um aumento nas concentrações de S100B no soro tem sido observado em pacientes e modelos animais com HE, porém pouco foi visto sobre a indução na secreção da S100B provocado por altas concentrações de amônia no cérebro. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a secreção desta proteína em uma situação de hiperamonemia *ex vivo*, em fatias hipocampais e corticais, assim como *in vivo* em ratos hiperamonêmicos por indução com urease. Além disso, foi realizado a análise de outras funções astrocíticas, ainda controversas na literatura, e pouco analisadas na região hipocampal. A exposição à amônia induziu uma redução no conteúdo extracelular de S100B em fatias de hipocampo, porém não induziu alteração nas fatias de córtex cerebral. No entanto, um aumento na concentração de S100B foi observado no líquido, sem alteração no soro dos ratos com hiperamonemia. O hipocampo se mostrou uma região altamente susceptível aos efeitos da amônia, com redução na captação de glutamato, no conteúdo de GSH e sem alteração na atividade da glutamina sintetase. Além disso, o conteúdo de GFAP está aumentado nos ratos hiperamonêmicos evidenciando uma astrogliose na região hipocampal, o que pode estar contribuindo para patogênese de HE.

Abstract

Ammonia serum concentration is commonly raised in liver diseases and in inborn errors of urea cycle. High ammonia levels cross the blood brain barrier and is considered one of the main causes for the development of Hepatic Encephalopathy (HE), a neuropsychiatric disease. The molecular and physiological damages are observed mainly in astrocyte cells which present alterations in the activity of a number of proteins and enzymes of their classic function. Among these, stands out the S100B protein, mainly expressed and secreted by these cells and used extensively as a marker of cerebral damage. An increase in S100B serum has been observed in animal models and patients with HE. However, it is not known if ammonia can directly induce S100B secretion in the brain. In this study, we evaluated the secretion of this protein in hyperammonemia condition *ex vivo*, in hippocampal and cortical slices, and *in vivo*, in urease treated rats. We also analyzed other astrocyte functions, which are still controversial in the literature and little examined in the hippocampus. We found a reduction in the extracellular S100B content in hippocampal slices exposed to ammonia, but no change was observed in cortical slices. However, an increase in cerebrospinal fluid (CSF) S100B level was found, with no change in serum level of this protein in hyperammonemic rats. The hippocampus revealed a very susceptible area to the ammonia effects, with a reduction in glutamate uptake as in glutathione (GSH) content and no change in glutamine synthetase activity. Moreover, GFAP content was increased in hippocampus of hyperammonemic rats indicating an astrogliosis, which may contribute to pathogenesis of HE.

Lista de Abreviaturas

AQ-4	Aquaporina-4
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
EAAT (1-3)	Transportador de Aminoácido Excitatórios
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GLT-1	Transportador de Glutamato
GLUT-1	Transportador de glicose
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
HE	Encefalopatia Hepática
I.P	Intraperiotoneal
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MSO	Metionina sulfoxamina
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato

NMDA-R	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PTM	Permeabilidade Transitória Mitocondrial
RAGE	Receptor de Produto de Glicação Avançada
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TGO	Transaminase Glutâmica Oxaloacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa

1. Introdução

1.1. Hiperamonemia

A elevação da amônia na circulação periférica deve-se principalmente a uma disfunção hepática, a qual pode ser causada por uma intoxicação aguda do fígado com drogas tóxicas, como o acetaminofeno, ou mesmo por disfunções crônicas, como cirrose, hepatite e também por erros inatos do ciclo da ureia (Felipo and Butterworth, 2002). Sabe-se que 90% das disfunções hepáticas são acompanhadas de uma elevação da amônia e que estes pacientes hiperamonêmicos apresentam problemas clínicos, bioquímicos e fisiológicos muito similares, como alcalose respiratória, aumento da concentração de glutamina cerebral, inchaço dos astrócitos, edema cerebral e, em alguns casos, estes sintomas resultam na Encefalopatia Hepática (HE) (Brusilow et al., 2010).

A HE refere-se a anormalidades neuropsiquiátricas, caracterizada por memória prejudicada, redução do tempo de atenção, desordens de personalidade, alteração de humor, sonolência, tonificação anormal muscular, convulsões, coma, podendo chegar até a morte do indivíduo (Seyan et al., 2010). O envolvimento da amônia na patologia de HE é incontestável, porém é importante ressaltar que o aumento na sua concentração arterial nem sempre é acompanhado dos sintomas de HE. Da mesma forma a correlação entre amônia e a gravidade de HE nem sempre é verdadeira (Seyan et al., 2010). É pertinente lembrar que o comprometimento do fígado irá causar o aumento não só da amônia na circulação, mas também de outras toxinas, como manganês, mercaptanos e ácidos graxos de cadeia curta que poderão causar um efeito adicional na toxicidade da amônia (Felipo and Butterworth, 2002). Além dos danos provocados pela amônia outros

fatores chaves vêm sendo relacionados, como inflamação, infecção, dano oxidativo e nitrosativo, os quais podem modular aspectos patofisiológicos da doença (Rodrigo et al., 2010; Seyan et al., 2010).

A amônia provém principalmente do intestino durante a digestão proteica e de processos de desaminação, ou mesmo pela metabolização de proteínas pelos tecidos. A produção de ureia (composto inócuo), realizada nas células hepáticas, serve como uma forma de eliminar a amônia, a qual é tóxica, particularmente ao cérebro e ao sistema nervoso central (SNC). O ciclo da ureia no fígado mantém as concentrações de amônia na circulação baixas, ao redor de 50-100 μM . Porém, com o comprometimento do fígado, esses níveis aumentam na circulação atravessando a barreira hematoencefálica (BHE), podendo chegar a concentrações de amônia cerebral entre 1-5 mM (Bosoi and Rose, 2009). Estima-se que, em situação de hiperamonemia, a concentração de amônia no cérebro é três vezes mais alta quando comparada com as concentrações do soro (Ott and Larsen, 2004). Isso pode ser explicado pelo fato que, uma vez dentro do SNC, a amônia é rapidamente utilizada como substrato para produção de glutamina. Além disso, em situação de hiperamonemia, o pH cerebral pode diminuir ainda mais, devido a uma maior produção de lactato, favorecendo a formação de NH_4^+ ($\text{NH}_3 + \text{H}^+ = \text{NH}_4^+$), o qual é menos difusível. Ainda nesta situação, existe um aumento no fluxo sanguíneo cerebral, favorecendo a maior captação de amônia, sendo a taxa de entrada maior que a de saída (Ott and Larsen, 2004).

A amônia pode estar na sua forma não iônica (NH_3), e em maior parte na forma iônica (NH_4^+), sendo essas duas formas capazes de passar pela BHE. Acredita-se que a maior parte entra no cérebro por difusão do gás lipossolúvel NH_3 . Já a forma como o íon NH_4^+ passa pela barreira ainda é discutida. Este pode competir com os canais iônicos de K^+ , já que possui propriedades iônicas muito similares (Bosoi and Rose,

2009). Porém, já foram sugeridos transportadores específicos para o íon amônio, já que este é encontrado em alguns tecidos como o tecido renal, hepático, e até mesmo no cérebro. No entanto, ainda não se sabe se estes transportadores são ativos nas células endoteliais cerebrais (Ott and Larsen, 2004).

1.2. Modelos animais para o estudo de hiperamonemia ou HE

Para o estudo da hiperamonemia e das alterações no SNC causadas por ela existem vários modelos animais que mimetizam alguns de seus efeitos. Em modelos *in vitro* normalmente é usado o cloreto de amônio (NH_4Cl) em altas concentrações, mimetizando um ambiente hiperamonêmico cerebral, possibilitando o estudo deste estímulo tanto em cultura de células (Leite et al., 2006) quanto em fatias cerebrais (Mehrotra and Trigun, 2012). O modelo de fatias agudas cerebrais suprime as limitações do estudo nas células isoladas, possibilitando a análise de uma resposta integrada entre as células cerebrais, uma vez que preserva a arquitetura celular parecidas com as condições *in vivo*. Já foi demonstrado que o modelo de fatias preserva a comunicação por junções gap (Nagy and Li, 2000), a circuitaria neuronal (Sajikumar et al., 2005), sendo também muito usada para estudos de eletrofisiologia (Li and Mc, 1957).

Já, em modelos *in vivo* a hiperamonemia pode ser causada por uma dieta hiperamonêmica (Rodrigo et al., 2010), pela administração de cloreto de amônio na circulação (Kosenko et al., 2000), ou ainda por uma injeção de urease, enzima que quebra a ureia liberando o íon amônio (Diemer and Laursen, 1977). Com relação a este último modelo, permite analisar o efeito exclusivo da elevação de amônia na circulação, sem que haja a interferência de outras toxinas, como seria o caso de um dano hepático. Além disso, propicia o estudo da hiperamonemia durante um período curto (4 dias)

porém constante, uma vez que a amônia permanece elevada até 72h após a última injeção de urease (Diemer and Laursen, 1977).

Além disso, modelos nocaute com disfunção no ciclo da ureia já foram desenvolvidos (Deignan et al., 2008). Para um estudo de doenças mais relacionadas à disfunção do fígado, e não somente a hiperamonemia, usa-se o desvio da veia porta, ou a indução da disfunção por hepatotoxinas. (Braissant et al., 2012; Desjardins et al., 2001).

1.3. Amônia e sua detoxificação no SNC

A detoxificação da amônia no cérebro se dá pela ação de duas enzimas principais: a glutamato desidrogenase, presente tanto nos astrócitos quanto nos neurônios, e a enzima glutamina sintetase (GS), presente principalmente nos astrócitos. A glutamato desidrogenase converte o α -cetoglutarato em glutamato, adicionando uma molécula de amônia. Por sua vez, o glutamato produzido será convertido à glutamina pela enzima GS, adicionando mais uma amônia. Estudos mostram que a maior parte da amônia captada pelo SNC é incorporada à molécula de glutamina (Desjardins et al., 2012). No entanto, trabalhos recentes indicam que sob uma inibição da atividade da GS, com metionina sulfoxamina (MSO), a enzima alanina aminotransferase, também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP), a qual catalisa a reação de transaminação da alanina/piruvato e α -cetoglutarato/piruvato, tem um importante papel na incorporação da amônia no aminoácido alanina em co-cultura de neurônios e astrócitos. Isso evidencia a participação da TGP como uma enzima relevante na detoxificação da amônia.

Publicações recentes questionam o papel da GS como enzima sendo benéfica para a detoxificação da amônia (Albrecht et al., 2010b). É sabido que em uma série de modelos animais que simulam a hiperamonemia existe um aumento de glutamina cerebral (Albrecht et al., 2010b; Suarez et al., 2002). No entanto, o excesso de glutamina pode se tornar tóxica, assim como a amônia, causando um efeito hiperosmótico e provocando o inchaço das células (Jayakumar et al., 2006). Albrecht e Norenberg propõem a hipótese do “Cavalo de Tróia”, que se baseia em que os altos níveis de glutamina citoplasmáticos, produzidos pela enzima GS, atravessam a membrana mitocondrial, ativando a enzima glutaminase que, por sua vez, descarrega o excesso de amônia dentro da mitocôndria (Albrecht and Norenberg, 2006). Isso gera prejuízos nesta organela, como um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), indução da permeabilidade transitória mitocondrial (PTM), além de causar inchaço e edema cerebral (Albrecht et al., 2010b; Jayakumar et al., 2006) (Figura 1).

Apesar do aumento de glutamina observado em condições de hiperamonemia os resultados em relação à atividade da enzima que a produz, a GS, são controversos na literatura. Alguns estudos mostram não haver alteração na atividade da glutamina sintetase no cérebro de ratos hiperamonêmicos (Cooper et al., 1985; Lavoie et al., 1987b), outros estudos mostram um aumento da imunoreatividade da GS em condições de hiperamonemia crônica em cultura de astrócitos (Yamamoto et al., 1989). No entanto, a grande maioria dos trabalhos mostra uma redução da atividade desta enzima em cultura de astrócitos (Bobermin et al., 2012; Leite et al., 2006), no córtex cerebral de ratos submetidos à cirurgia de anastomiasia porta cava (Suarez et al., 2002) e no cérebro de pacientes cirróticos (Lavoie et al., 1987a). A grande variação nos resultados pode ser devido a diferenças metodológica, ou até mesmo devido a uma variação região

específica do encéfalo (Girard et al., 1993). Suárez et al, (2002) destaca que o aumento da atividade da GS parece estar associado a regiões de áreas glutamatérgicas, enfatizando que a enzima tem um papel importante da redução das concentrações locais de glutamato e amônia em regiões sinápticas. Por outro lado, a diminuição da imunoreatividade da GS em regiões não glutamatérgicas pode favorecer o acúmulo de amônia e glutamato, contribuindo para toxicidade neural (Suarez et al., 2002). Ainda, a redução da atividade da GS, pode ser explicada pelo fato que esta enzima parece atuar na sua capacidade máxima já em condições fisiológicas. Logo, em situação de hiperamonemia, o cérebro rapidamente excederia sua capacidade de metabolizar a amônia (Felipo and Butterworth, 2002). Além disso, já foi sugerido que a atividade da GS estaria inibida por um processo de nitratação, provocado por um aumento de oxido nítrico em situação de hiperamonemia, visto em cultura de células expostas a concentrações milimolares de amônia (Schliess et al., 2002). Surpreendentemente, diversos trabalhos, tanto em cultura quanto *in vivo*, mostram que inibindo a atividade da GS, principalmente por MSO, ocorre uma diminuição do inchaço dos astrócitos (Willard-Mack et al., 1996), um aumento da sobrevivência em ratos submetidos a um modelo de disfunção do fígado com a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) (Jambekar et al., 2011), uma diminuição da imunoreatividade do glutamato neuronal em fatias cerebrais, assim como a diminuição da glutamina no cérebro de ratos submetidos à exposição aguda de amônia (Albrecht et al., 2010a). Isso demonstra que muitas das alterações fisiológicas e moleculares provocadas pela amônia são agravadas pela consequente produção de glutamina, corroborando com a Hipótese do Cavalo de Tróia (Albrecht et al., 2010b).

Considerando que a atividade da glutamina sintetase pode não estar alterada ou até mesmo diminuída em condições de hiperamonemia, torna-se difícil explicar o excesso de glutamina cerebral visto tanto em modelos animais quanto em pacientes com

disfunção aguda do fígado (Desjardins et al., 2012). Uma explicação lógica seria a diminuição da atividade da glutaminase, que converte glutamina em glutamato, diminuindo o consumo de glutamina e, portanto, aumentando seus níveis intracelulares. No entanto, os resultados ainda não são muito claros em relação à atividade desta enzima. Em alguns casos a atividade da glutaminase está aumentada, visto em córtex cerebral e gânglio basal de ratos submetidos à cirurgia de veia porta cava, (Romero-Gomez, 2005; Romero-Gomez et al., 2006) e em outros trabalhos mostra-se que a atividade da enzima estaria diminuída após uma hepatectomia (cirurgia para retirada de parte do fígado) em ratos (Tyce et al., 1981). Outra explicação para o aumento no conteúdo de glutamina intracelular foi mostrada por Desjardins, quem mostrou que em ratos com disfunção aguda do fígado existe uma redução da expressão do transportador SNAT-5, que realiza o transporte de glutamina dos astrócitos para o meio extracelular, impedindo, portanto, a sua saída para o espaço extracelular (Desjardins et al., 2012). Nessas condições, além de “sequestrar” a glutamina dentro dos astrócitos, também estaria sendo comprometido o ciclo glutamato-glutamina, uma vez que reduziria a disponibilidade de glutamina no espaço extracelular para captação pelos neurônios. Isso induziria um prejuízo de glutamato no neurônio pré-sináptico e na síntese de seus derivados, como o neurotransmissor GABA (Albrecht et al., 2010a). O desbalanço da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica pode ter como consequência as alterações neurológicas observadas em pacientes HE (Felipo and Butterworth, 2002). No entanto, o resultado de diminuição do transportador SNAT-5 tem sido contestado, uma vez que existe excesso de glutamina no espaço extracelular do cérebro de ratos com disfunção aguda do fígado (Rama Rao et al., 2012).

Portanto, faz-se necessário mais pesquisas em relação à atividade da GS, uma vez que existe grande variação de resultados na literatura. Além disso, a maioria dos estudos

que simulam a hiperamonemia se restringe a região cortical ou homogeneizados de cérebro total (Cooper and Lai, 1987; Lavoie et al., 1987a; Suarez et al., 2002). Poucos estudos avaliam esta enzima em áreas encefálicas específicas, como por exemplo, a área hipocampal. O estudo nesta região possibilitaria um melhor entendimento da regulação da GS no SNC frente a um estímulo hiperamonêmico.

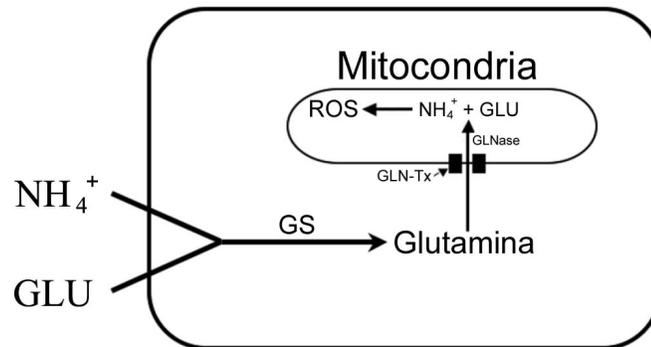


Figura 1: Hipótese Cavalos de Tróia. Adaptado de Albrecht e Norenberg, 2006.

1.4. Principal tipo celular afetado pela toxicidade da amônia no SNC

Pelo fato de que a GS predomina em astrócitos, estas células representam o principal alvo da toxicidade da amônia. Além disso, são os astrócitos que emitem processos recobrando os capilares que chegam ao SNC, garantindo que toda a amônia que entra no cérebro seja metabolizada antes que esta entre em contato com outros tipos celulares. Ainda, são observadas nestas células alterações morfológicas que não são documentadas em neurônios e outras células cerebrais sob estímulo de altas doses de amônia (Norenberg et al., 2009). A amônia causa um efeito osmótico sobre os astrócitos, os quais acabam inchando, provocando um drástico edema cerebral e a consequente herniação cerebral (Felipo and Butterworth, 2002). Além disso, em condições crônicas de hiperamonemia os astrócitos adotam uma morfologia alterada,

chamada de “Alzheimer type II astrocytes”, o qual se caracteriza por uma diminuição na densidade citoplasmática do soma, dos processos, da região perivascular e dos pés terminais; aumento da circunferência da membrana nuclear; aumento do número de mitocôndrias, do retículo endoplasmático rugoso e liso, tanto no soma quanto nos processos; menos bandas compactas dos filamentos intermediários e deposição de glicogênio (Brusilow et al., 2010; Seyan et al., 2010). Interessantemente, a maior parte desses efeitos são evitados com o uso do inibidor da GS, o MSO (Brusilow et al., 2010). Isso aponta a glutamina, o produto da atividade da GS, como causadora das alterações morfológicas e funcionais dos astrócitos.

Além das alterações morfológicas são observadas alterações de expressão de várias proteínas marcadoras astrocíticas, como uma diminuição da expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), aquaporina-4 (AQ-4), transportador de glutamato-1 (GLT-1), transportador de glicina e um aumento na expressão do gene do receptor periférico de benzodiazepina e do transportador de glicose (GLUT-1) no córtex pré-frontal de ratos com disfunção aguda do fígado. A expressão da proteína S100B, característica desse tipo celular, não foi alterada (Desjardins et al., 2001).

É importante salientar que apesar dos astrócitos representarem o alvo principal da toxicidade da amônia, gera-se nesta situação um estado inflamatório que acaba por afetar também outros tipos celulares. Essa neuroinflamação provocada pela amônia vem sendo destacada nos últimos anos como contribuinte para as alterações neurológicas presentes em pacientes com HE. Observa-se um aumento de citocinas inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) no sangue de pacientes cirróticos com altas concentrações de amônia e HE moderada (Montoliu et al., 2009). Além disso, o uso de anti-inflamatórios (ibuprofeno) diminuiu o estado neuro inflamatório e melhorou o aprendizado, restituindo a via NO-GMPc prejudicada em ratos hiperamonêmicos. A

microglia, célula neural que tem como principal função fagocitar restos celulares e patógenos, parece estar ativada tanto em cultura de microglia expostas a altas concentrações de amônia (Zemtsova et al., 2011), como no cérebro de ratos com dieta rica em amônia. A ativação microglial parece ser região específica, sendo mais reativa no estriado e pouco no córtex frontal dos ratos com dieta rica em amônia (Rodrigo et al., 2010). Células endoteliais, normalmente circundadas pelos astrócitos, parecem também mediar a resposta inflamatória mediante um estímulo hiperamonêmico. O meio de cultura de células endoteliais exposta a altas concentrações de amônia (5 mM) provocou o inchaço de cultura de astrócitos. Este efeito parece ser mediado pela ativação de NF- κ B nas células endoteliais o qual pode estimular a produção de citocinas, como por exemplo a interleucina-1 β (IL-1 β) como recentemente observado no cérebro de ratos hiperamonêmicos (Rodrigo et al., 2010). Logo, a sinalização inflamatória entre estas duas células parece ser crítico, regulando o balanço osmótico do SNC (Jayakumar et al., 2012).

1.5. O efeito da amônia sobre a proteína S100B

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, pertencente à família de proteína S100, chamadas desta forma devido à sua solubilidade em solução 100% saturada com sulfato de amônia (Michetti et al., 2012). Esta proteína é expressa em um número restrito de células como astrócitos, oligodendrócitos maduros, células progenitoras neurais, células epiteliais do rim, condrócitos, adipócitos, melanócitos, entre outras. Porém, as únicas células conhecidas que são capazes de secretar esta proteína são os astrócitos no SNC e os adipócitos no sistema periférico (Donato et al., 2009). Esta proteína possui importantes funções intracelulares, interagindo com o citoesqueleto (Donato, 1988);

está envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Donato et al., 2009); participa na homeostase do cálcio (Gentil et al., 2001); regula atividades enzimáticas (Zimmer and Van Eldik, 1986); entre outras funções. No ambiente extracelular exerce efeitos autócrinos e parácrinos na glia, em neurônios e na microglia. Estudos *in vitro* relacionam concentrações baixas desta proteína (pico a nanomolares) como promotora de efeitos tróficos, como o crescimento de neuritos, proteção e sobrevivência neuronal (Businaro et al., 2006; Van Eldik and Wainwright, 2003). Porém em concentrações mais altas (micromolares) provoca efeitos tóxicos, induzindo a liberação de NO em microglia e astrócitos, induz a super-regulação da cicloxigenase-2 em microglia, estimula a liberação e produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF- α) na glia, podendo provocar também a morte neuronal (Bianchi et al., 2010; Hu et al., 1997; Petrova et al., 2000; Van Eldik and Wainwright, 2003) (Figura 2).

Uma vez que esta proteína é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Marchi et al., 2004), ela tem sido extensivamente estudada como marcadora de dano cerebral em diversas patologias cerebrais, como na doença de Alzheimer, Esclerose Amiotrófica Lateral, tumores intracraniais, isquemias, doenças psíquicas, dano traumático cerebral, entre outras (Kleindienst and Ross Bullock, 2006; Michetti et al., 2012; Michetti et al., 1979; Rothermundt et al., 2003). O aumento sérico da proteína S100B em condições de encefalopatia hepática já foi constatado tanto em modelos animais, quanto em pacientes com hepatite fulminante (Isobe-Harima et al., 2008), assim como no soro de pacientes HE com cirrose, não sendo significativo nos pacientes sem HE com cirrose (Saleh et al., 2007; Wiltfang et al., 1999).

Apesar de se saber sobre o aumento na concentração da proteína S100B no soro em condições de hiperamonemia, pouco se conhece ainda sobre a secreção desta proteína

dentro do SNC nesta situação. Referente a isso existem resultados *in vitro* do nosso laboratório mostrando que ocorre um aumento da secreção de S100B em cultura de astrócitos e linhagem C6 expostas a concentrações altas de amônia (Bobermin et al., 2012; Leite et al., 2006). Em contrapartida, um estudo de disfunção aguda do fígado por desvascularização hepática em ratos não observou diferença na expressão da proteína S100B no córtex frontal após 24 h da cirurgia (Belanger et al., 2002; Desjardins et al., 2001). Observa-se, portanto, que existem resultados contrastantes na literatura com relação às variações na concentração dessa proteína em situações de hiperamonemia. Por esta razão deve-se ter cautela na interpretação desta proteína como marcadora de dano cerebral, como na HE, uma vez que o aumento de sua concentração ainda não foi bem elucidado nesta doença. Além disso, esta proteína pode também ter como fonte os adipócitos que podem estar contribuindo para sua elevação no soro de pacientes com HE. Provavelmente, as variações na expressão e conteúdo da S100B possam ser devido à análise e comparação de diferentes estruturas que envolvem regulações diferentes, ou ainda por uma variação metodológica da dosagem desta proteína (Goncalves et al., 2008). Com isso, tornam-se necessárias mais pesquisas em relação a S100B, em situações de hiperamonemia, de forma que seja possível o uso desta em exames clínicos patológicos. É importante destacar que as pesquisas referentes a proteína S100B no SNC se baseiam apenas em resultados no córtex cerebral. Pouco foi estudado em outras regiões cerebrais, como por exemplo, no hipocampo, região esta que possui uma função muito importante na aprendizagem e memória, alterada em pacientes com HE (Seyan et al., 2010).

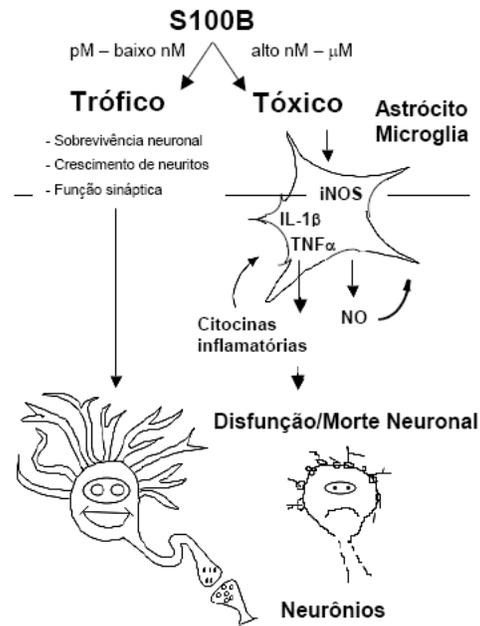


Figura 2: Efeitos extracelulares da S100B são dependentes de concentração.
Adaptado de Van Eldik e Wainwright (2003)

1.6. Amônia e metabolismo glutamatérgico

Uma redução da captação de glutamato se observa em modelos *in vitro* de hiperamonemia aguda, como em cultura de astrócitos (Chan and Butterworth, 1999) e em fatias cerebrais (Butterworth, 2002; Schmidt et al., 1990), assim como em modelos *in vivo* em ratos submetidos à desvascularização hepática (Knecht et al., 1997). Essa redução na captação também é acompanhada de uma diminuição na expressão do transportador de glutamato EAAT-1 (GLAST) em cultura de astrócitos e em ratos com desvascularização hepática (Chan and Butterworth, 1999; Knecht et al., 1997). Da mesma forma, observa-se uma diminuição da expressão de transportador EAAT-2 no cérebro de ratos com disfunção aguda do fígado por insulto com tiocetamida (Norenberg et al., 1997).

Em consequência da redução na captação de glutamato observa-se um acúmulo de glutamato extracelular em uma série de modelos animais de hiperamonemia aguda, bem como em pacientes com HE (Felipo and Butterworth, 2002). Os mecanismos pelos quais ocorre a diminuição do transporte de glutamato ainda não são bem conhecidos. Estudos recentes mostram que a exposição de amônia em cultura de astrócitos provoca uma rápida alcalinização do ambiente intracelular, uma vez que ocorre a difusão rápida de NH_3 , a qual se combina com os prótons citoplasmáticos, formando NH_4^+ . De uma forma mais lenta, através da competição com os transportadores de potássio, ocorre a entrada de NH_4^+ , provocando uma diminuição dos níveis do pH intracelular, uma vez que ocorre a liberação de prótons, de forma a manter o equilíbrio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (Bosoi and Rose, 2009). Essa diminuição da concentração de pH é acompanhado de um aumento de sódio intracelular através da ativação dos co-transportadores de Na^+ K^+ e Cl^- . O aumento na concentração de sódio, por sua vez, acarreta na inibição dos transportadores de glutamato e, conseqüentemente, aumentando os níveis extracelulares deste aminoácido, uma vez que deixa de ser captado da fenda sináptica (Kelly et al., 2009). Em sequencia, esse aumento de glutamato extracelular pode provocar a ativação de receptores NMDA, provocando uma excitotoxicidade, acompanhado de uma deterioração do status neurológico, o que é visto como central na patologia de HE (Butterworth, 2002). Diversos estudos mostram que o uso de antagonista do receptor NMDA promove a melhora no estado neuronal de ratos com disfunção aguda do fígado (Vogels et al., 1997), ou previne os efeitos tóxicos provocados pela amônia (Hermenegildo et al., 1996).

Entretanto, estudos mostram que a ativação dos receptores NMDA pode se dar independente do glutamato extracelular, sendo promovido pela despolarização provocada pela amônia, retirando o íon magnésio bloqueador do receptor NMDA

(Hermenegildo et al., 2000). Como produto da ativação dos receptores de glutamato ocorre a entrada de Na^+ e Ca^{2+} para dentro da célula. De forma a manter a homeostase do Na^+ , os neurônios o expulsam pelas bombas de Na^+/K^+ ATPase, provocando dessa forma o aumento no consumo de ATP (Felipo and Butterworth, 2002). Por outro lado, o aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular promove a ativação do óxido nítrico sintase (NOS), aumentando a produção de NO. Tem sido mostrado que o aumento de NO promove a inibição da atividade da glutamina sintetase, já que quando inibidores de NMDA ou de NOS foram injetados em ratos com hiperamonemia ocorreu um aumento na atividade da enzima e também um aumento no conteúdo de glutamina (Kosenko et al., 1995). Logo, a produção de NO resulta em um déficit de GS e no comprometimento do cérebro em detoxificar a amônia. Da mesma forma, o aumento de NO pode inibir a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, agravando ainda mais a falta de ATP, além de provocar um aumento da produção de radicais livres e formação de PTM (Albrecht et al., 2010b; Braissant et al., 2012) (Figura 3).

Apesar de haver um acúmulo de glutamato no espaço extracelular, existe uma redução de glutamato total no cérebro de ratos submetidos à desvascularização hepática, ou mesmo no cérebro de pacientes cirróticos, encontrado em estudos *post mortem* (Lavoie et al., 1987b; Mans et al., 1994). Os níveis reduzidos de glutamato ocorrem em exposições agudas de hiperamonemia, e se mantém também em condições crônica em ratos submetidos à obstrução da veia portacava. Ao contrário disso, a captação de glutamato não é observada em situações crônicas. (Giguere and Butterworth, 1984). A diminuição de glutamato total pode implicar em uma menor produção de GABA, tendo em vista que o glutamato é um precursor deste neurotransmissor. Além disso, pode prejudicar na detoxificação da amônia, uma vez que a glutamina sintetase não terá substrato para tal (Felipo and Butterworth, 2002).

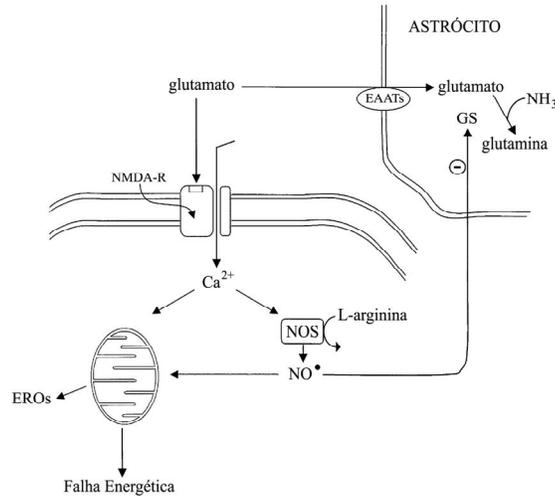


Figura 3: Ação da amônia sobre o metabolismo glutamatérgico e estresse oxidativo. Adaptado de Felipe e Butterworth, 2002.

1.7. Envolvimento da amônia no estresse oxidativo

Apesar de o cérebro representar apenas 2% de todo o peso corporal, ele utiliza 20% de todo o oxigênio consumido pelo corpo, de forma a manter suas necessidades energéticas. Esse elevado consumo de oxigênio faz com que sejam produzidos altos níveis EROS sendo um processo natural de produção de energia. Portanto, a manutenção de um ambiente antioxidante é essencial nesse tecido, de forma a equilibrar a produção e a neutralização das espécies oxidativas. Qualquer alteração nesse equilíbrio pode trazer consequências danosas às células cerebrais.

A exposição de amônia no sistema nervoso central gera um desbalanço oxidativo observado tanto *in vitro*, em cultura de astrócitos (Bai et al., 2001; Murthy et al., 2001) e fatias cerebrais (Mehrotra and Trigun, 2012), quanto *in vivo* em ratos hiperamonêmicos com injeção de acetato de amônio (Kosenko et al., 1997). Observa-se nesta situação um aumento de moléculas oxidativas e nitrosativas, como óxido nítrico

sintase, superóxido, NO, proteínas nitrosiladas e lipoperoxidação lipídica em ratos com hiperamonemia (Kosenko et al., 1999; Kosenko et al., 1997; Schliess et al., 2002; Viegas et al., 2012). Com relação às enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e a razão glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG), ainda existe certa discrepância na literatura. Dependendo do modelo, da concentração de amônia utilizada, do tempo de exposição ou da região cerebral, alguns estudos mostram aumento ou redução da atividade dessas enzimas sob efeito da amônia (Mehrotra and Trigun, 2012; Singh et al., 2008). Isso evidencia que a hiperamonemia atua diferentemente sobre as regiões cerebrais, sendo mais sensíveis algumas estruturas que outras. Essa variação pode ser dar justamente pelas diferentes funções que cada região desempenha, apresentando células com diferentes especificidades que sob certos estímulo atuam de forma diferenciada.

O mecanismo pelo qual o dano oxidativo estimulado pela amônia ocorre ainda não é bem entendido. Como já falado anteriormente, sabe-se que a amônia provoca um aumento de cálcio livre intracelular, estimulado pela despolarização celular e a ativação do receptor NMDA (Hermenegildo et al., 2000). Esse aumento transiente de cálcio pode ativar enzimas dependentes de Ca^{2+} , como a óxido NOS e a NADPH oxidase, as quais geram NO e superóxido, respectivamente. (Norenberg et al., 2009). Isso prova que a produção de EROS está intimamente ligada com a ativação do receptor NMDA e que, usando um antagonista deste receptor, os efeitos oxidativos são revertidos, como mostrado em ratos hiperamonêmicos (Kosenko et al., 1999). Um desbalanço na homeostase do cálcio também é observado na mitocôndria de ratos que receberam injeção de cloreto de amônio, prejudicando as funções energéticas mitocondriais (Kosenko et al., 2000). Trabalhos já observaram o comprometimento do ciclo do ácido tricarboxílico, como a disfunção da enzima α -cetoglutarato desidrogenase e a perda da

atividade da succinato desidrogenase no cérebro de ratos com hiperamonemia (Kosenko et al., 1997; Lai and Cooper, 1986; Sheline and Wei, 2006). A inibição da cadeia transportadora de elétrons sob estímulo de altas doses de amônia também foi registrado em camundongos (Qureshi et al., 1998). Da mesma forma, o aumento de cálcio e o dano oxidativo provocado pela amônia promove a formação da PTM em astrócitos, comprometendo o potencial de membrana da mitocôndria, promovendo o inchaço dos astrócitos, prejudicando ainda mais a fosforilação oxidativa e a consequente formação de ATP, assim como causando um aumento de radicais livres (Norenberg and Rao, 2007). Todos esses efeitos comprometem o metabolismo energético da célula, aumentando as concentrações de lactato e a razão mitocondrial NAD^+/NADH , assim como a redução da produção de ATP (Hertz and Kala, 2007; Kosenko et al., 1994).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato e é o antioxidante em maior abundância no SNC, tendo como principal função reduzir moléculas oxidativas, tais como o peróxido, protegendo assim a célula contra danos oxidativos. As enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) atuam de forma a manter a razão GSH/GSSG alta na células e este processo é dependente de NADPH. A GSH está principalmente presente nos astrócitos quando comparada a outras células cerebrais (Dringen, 2000). Interessantemente, a síntese de GSH é estimulada pela amônia em cultura de astrócitos e esse processo estimula a produção de GSH em neurônio visto em co-culturas de neurônios e astrócitos (Gegg et al., 2005). Portanto, os astrócitos tem um papel muito importante não só na produção do sua própria defesa anti-oxidante, mas também atua na proteção dos neurônios, secretando a GSH para o meio extracelular, onde será rapidamente quebrada, através da atividade da γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), gerando os precursores glicina, cisteína e o dipeptídeo cisteína-glicina. Dessa forma, os neurônios conseguem utilizar estes

precursores na síntese do tripeptídeo GSH, protegendo-se contra danos oxidativos (Gegg et al., 2005; Hilgier et al., 2010).

Resultados na literatura com relação ao conteúdo de GSH em situação de hiperamonemia ainda são controversos, sendo que em alguns estudos mostra-se uma não alteração do conteúdo de GSH frente a um estímulo hiperamonêmico no córtex e cerebelo de ratos (Singh et al., 2008; Viegas et al., 2012). Já em cultura de astrócitos, mostra-se um aumento no conteúdo de GSH frente a um estímulo com amônia (Gegg et al., 2003). Em contrapartida, em ratos com injeção de cloreto de amônio observa-se uma redução no conteúdo de glutathiona no cérebro total (Kosenko et al., 1997). Essa variação pode ser devido às diferenças metodológicas, ou mesmo ser dependente da região cerebral analisada. Considerando-se a importância da região hipocampal na formação da memória e o comprometimento desta em paciente com HE, torna-se importante pesquisar o conteúdo deste importante antioxidante em fatias hipocampais de ratos com hiperamonemia, ou mais especificamente em fatias hipocampais expostas a diferentes concentrações de amônia.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o conteúdo extracelular de S100B em um modelo *ex vivo*, de fatias hipocâmpais e corticais, expostas a uma curva de concentração de amônia, bem como avaliar o conteúdo desta proteína em um modelo *in vivo* no hipocampo, córtex cerebral, líquido e soro de ratos Wistar submetidos à injeção i.p. com urease. Além disso, verificar alguns parâmetros de ativação astrogliar, como a captação de glutamato, o conteúdo de GSH e a atividade da GS no hipocampo tanto no modelo *ex vivo*, quanto *in vivo*.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Verificar a ação de diferentes concentrações de amônia (0.1 - 10 mM) sobre o conteúdo extracelular de S100B em fatias hipocâmpais e cortical;
- 2.2.2. Verificar a ação de diferentes concentrações de amônia (0.1 - 10 mM) sobre algumas funções astrocíticas nas fatias hipocâmpais, como:
 - 2.2.2.1. Avaliação da viabilidade e integridade celular: incorporação do vermelho neutro, redução de MTT e liberação de lactato desidrogenase (LDH).
 - 2.2.2.2. Captação de glutamato;
 - 2.2.2.3. Atividade da glutamina sintetase;
 - 2.2.2.4. Conteúdo de glutatona reduzida (GSH);

2.2.3. Verificar a ação da amônia em um modelo agudo de hiperamonemia, com injeção intraperitoneal (IP) de urease na concentração de 33U/Kg sobre os seguintes parâmetros:

2.2.3.1. Concentração de S100B no soro, líquido e o conteúdo desta proteína em tecido adiposo, córtex cerebral e hipocampo;

2.2.3.2. Avaliar a captação de glutamato, atividade da GS e o conteúdo de GSH no hipocampo.

PARTE II

**Hiperammonemic conditions affects astroglial activity in acute
hippocampal slices of Wistar rats.**

Fabiana Galland, Elisa Negri, Carolina Da Ré, Fernanda Fróes, Liliane Strapazzon,
Maria Cristina Guerra, Lucas Tortorelli, Carlos Alberto Gonçalves, Marina Concli Leite

Artigo a ser submetido ao periódico Neurobiology of Disease

Hiperammonemic conditions affects astroglial activity in acute hippocampal slices of Wistar rats.

Fabiana Galland, Elisa Negri, Carolina Da Ré, Fernanda Fróes, Liliâne Strapazzon, Maria Cristina Guerra, Lucas Tortorelli, Carlos Alberto Gonçalves, Marina Concli Leite

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Marina Concli Leite

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax: 55-51-3308 5565

E-mail: marina.leite@ufrgs.br

Abstract

Ammonia serum concentration is commonly raised in liver diseases and in inborn errors of urea cycle. Ammonia is able to cross the blood brain barrier and is considered one of the main causes for the development of Hepatic Encephalopathy (HE), a neuropsychiatric disease. The molecular and physiological damages are observed mainly in astrocyte cells which present alterations in the activity of a number of proteins and enzymes of their classic function. Among these, stand out the S100B protein, mainly expressed and secreted by these cells and used extensively as a marker of cerebral damage. An increase in S100B serum has been observed in animal models and patients with HE. However, it is not known if ammonia can directly induce S100B secretion in the brain. In this study, we evaluated the secretion of this protein in hyperammonemia condition *ex vivo*, in hippocampal and cortical slices, and *in vivo*, in urease treated rats. We also analyzed other astrocyte functions, which are still controversial in the literature and little examined in the hippocampus. We found a reduction in the extracellular S100B content in hippocampal slices exposed to ammonia, but no change was observed in cortical slices. However, an increase in cerebrospinal fluid (CSF) S100B level was found, with no change in serum level of this protein in hyperammonemic rats. The hippocampus revealed a very susceptible area to the ammonia effects, with a reduction in glutamate uptake as in glutathione (GSH) content and no change in glutamine synthetase activity. Moreover, GFAP content was increased in hippocampus of hyperammonemic rats indicating an astrogliosis, which may contribute to pathogenesis of HE.

Keywords: ammonia, hyperammonemia, hippocampal slices, cortical slices, astrocytes, urease.

Introduction

Elevated ammonia in peripheral circulation is mainly due to hepatic dysfunction, which may be caused by acute intoxication of the liver with toxic drugs such as acetaminophen, or even a more chronic disorder such as cirrhosis, hepatitis and also inborn errors of the urea cycle (Felipo and Butterworth, 2002). It is known that 90% of hepatic disorders are accompanied by an elevation of brain ammonia and that these patients have similar clinical, biochemical and physiological problems such as respiratory alkalosis, increase in glutamine, brain swelling of astrocytes, cerebral edema and in some cases these symptoms result in Hepatic Encephalopathy (HE), a neurocognitive disease (Brusilow et al., 2010).

Astrocytes have been shown as the main cells affected in the central nervous system (CNS) in hyperammonemia, by their proximity to the blood vessels that reach the brain, being the first cells to be in contact with peripheral ammonia (Norenberg et al., 2009). Moreover, these cells are the major expressing glutamine synthetase (GS), enzyme responsible for the main detoxification of ammonia (Brusilow et al., 2010). In acute ammonia exposure there are clear morphological changes in these cells, as a large swelling, causing a drastic cerebral edema and subsequent herniation (Seyan et al., 2010).

However, some results regarding the changes in astrocyte parameters are controversial in hyperammonemia conditions. As an example, the activity of glutamine synthetase can be reduced in astrocyte cultures and in cerebral cortex of portacaval anastomosed rats (Lavoie et al., 1987a; Leite et al., 2006; Suarez et al., 2002) or unchanged in cerebral hyperammonemic rats and induced in chronic hyperammonemia astrocytes culture (Cooper and Lai, 1987; Yamamoto et al., 1989). The major CNS

antioxidant compound, glutathione (GSH), mainly produced by astrocytes, has been reported with its synthesis unchanged in cerebral cortex and cerebellum of hyperammonemic rats (Singh et al., 2008; Viegas et al., 2012), stimulated in astrocyte culture exposed to ammonia (Gegg et al., 2003) or reduced in brain rats with hyperammonemia (Kosenko et al., 1997). In addition, the main astrocyte protein marker, the glial fibrillar acid protein (GFAP), decreases in acute liver failure animals and in astrocyte cultures (Desjardins et al., 2001; Leite et al., 2006) but it is unchanged in the cerebellum of cirrhotic patients (Kril et al., 1997).

Furthermore, the S100B protein, also a marker of astrocytes, is increased in serum of patients with fulminant hepatitis and in animal models of HE (Isobe-Harima et al., 2008), in serum from patients with cirrhosis with HE (Saleh et al., 2007; Wiltfang et al., 1999), in the secretion of cultured astrocytes and C6 lineage exposed to high concentrations of ammonia (Bobermin et al., 2012; Leite et al., 2006). In contrast, a study of acute liver dysfunction by hepatic devascularization did not show any difference in S100B expression in frontal cortex of rats (Belanger et al., 2002).

The S100B protein is expressed and mainly secreted by astrocytes in the CNS and exerts physiological and toxic effects in extracellular space, depending on its concentration (Donato et al., 2009). At nanomolar levels S100B can cause neurite outgrowth, proliferation and neuronal survival, but at elevated concentrations (micromolar) it can produce apoptotic effects, inducing the release of oxide nitric and inflammatory cytokine, such as IL-1 β and TNF- α in astrocytes (Bianchi et al., 2010; Petrova et al., 2000; Van Eldik and Wainwright, 2003). Since this protein is capable of crossing the blood brain barrier (Goncalves et al., 2008), it has been extensively studied as a marker of cerebral damage in various brain disorders (Kleindienst and Ross

Bullock, 2006; Rothermundt et al., 2003). However, little is known about the secretion of this protein in the CNS during high ammonia exposure.

It is important to notice that most of the research regarding astrocytic function ignore the variability of these cells in CNS, which are highly heterogeneous in origin, morphology and modulation of gene transcription in the brain (Wang and Bordey, 2008). Besides, most results are observed in total brain extracts, or in the cortical region; however, there is a lack of information about astrocytic function in hippocampus, an area which has a very important role in learning and memory, which is also altered in patients with HE (Seyan et al., 2010).

Therewith, it becomes necessary further research on astrocyte protein markers in hyperammonemia situations in specific brain regions and, particularly, on S100B secretion, in order to analyze the possible role of this protein as a marker of brain damage.

In this work we investigate S100B secretion in acute hippocampal slices, as well as other astrocyte parameters, such as GS activity, GSH content and glutamate uptake. Furthermore, we analyzed S100B and GFAP content in different brain areas, such as hippocampus and cerebral cortex, of rats submitted to intraperitoneal urease injection, a model of hiperammonemia. Also, we analyzed the content of S100B in serum and in cerebrospinal fluid (CSF).

Materials and Methods

Materials

Antibody anti-S100B (SH-B1), methylthiazolyldiphenyl- tetrazolium bromide (MTT), neutral red, glutathione, phthaldialdehyde, and urease were purchased from Sigma [St. Louis, USA]. Polyclonal anti-S100B and anti-rabbit peroxidase linked were purchased

from DAKO [São Paulo, Brazil] and GE [Little Chalfont United Kingdom], respectively. 1-[2,3-³H] glutamate was purchased from Amersham International (UK).

Animals

Wistar female rats thirty days old were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil, were used. The animals were maintained on a 12:12 h light/dark cycle (lights on 07.00–19.00 h) in air conditioned constant temperature (22 °C ± 1 °C) colony room, with free access to water and a 20 % (w/w) protein commercial chow (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and followed the “Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication 85-23, revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Hippocampal and cortical slices

Thirty-days old Wistar rats were killed by decapitation, their hippocampi and cerebral cortices were quickly dissected out and transverse sections (300 µm) were rapidly obtained using a McIlwain tissue chopper. One slice was placed into each well of a 24-well culture plate. Slices were incubated in oxygenated physiological medium containing in mM (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1 mM KH₂PO₄ and 10 mM glucose, pH 7.4) at room temperature and the medium was changed every 15 min with fresh medium. Following a 120 min equilibration period, slices were incubated with or without NH₄Cl in a concentration from 0.1 to 10 mM, for 60 min at 30°C on a warm plate. Afterwards, media or slices were collected for posterior analysis.

Urease treatment

An animal model of hyperammonemia was used based on urease treatment (Diemer and Laursen, 1977). Sustained hyperammonemia was induced by daily intraperitoneal injection of urease (33U/Kg body weight) solution for 4 days from the 30th till the 34th day of postnatal life. The chosen dose of urease did not cause hyperexcitability, convulsions or death (Diemer and Laursen, 1977). Urease were dissolved in saline solution (NaCl 0.9 %) and pH was adjusted at 7.4. and control rats received saline at the same volumes. After 24 h the rats were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/ Kg, respectively, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus for CSF puncture. Blood samples were obtained by intracardiac puncture and were incubated at room temperature (25 °C) for 5 min and then centrifuged at 3200 rpm for 5 min for serum separation. After decapitation, brains were removed and then placed in cold physiological saline medium. The hippocampal (Hc) and cerebral cortices (Cx) were dissected and cut into slices of 0.3 mm using a McIlwain Tissue Chopper for posterior analysis.

Determination of serum ammonia levels

Ammonia levels were measured using a commercial kit (Sigma, St. Louis, MO) immediately after serum was obtained. Ammonia concentration was calculated according to the manufacturer's protocol.

Assay for serum TGO and TGP activities

The serum enzymes were assayed using diagnostic kits provided by BioTécnica – Biotecnologia Avançada (Varginha, Brasil) and the procedure was followed as described by the manufacturer's protocol of the kit.

S100B measurement

S100B was measured by ELISA, as previously described (Leite et al., 2008). Briefly, 50 µl of sample plus 50 µl of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate

previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. Color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm.

GFAP measurement

ELISA for GFAP was carried out as previously described (Tramontina et al., 2007) in homogenate of hippocampal and cortical slices, by coating microtiter plates with 100 μ L samples for 24 h at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. A colorimetric reaction with o phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard human GFAP (from Calbiochem) curve ranged from 0.1 to 5 ng/mL.

MTT reduction assay

Hippocampal slice were treated with 50 μ g/mL Methylthiazolyldiphenyl- tetrazolium bromide (MTT) for 30 min in 5% CO₂/ 95% air at 37°C, after 1 h of treatment with the different concentrations of NH₄Cl. Afterwards, the media was removed and MTT crystals were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650 nm. The reduction of MTT was calculated as (abs at 560 nm) - (abs at 650 nm).

Neutral red uptake

Neutral red incorporation was carried out as previously described (Leite et al., 2009) with modifications. Hippocampal slices were treated with 50 μ g/mL neutral red (NR) for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Afterwards, the slices were rinsed twice with phosphate buffer for 5 min each and NR dye taken up by viable cells was extracted with 500 μ L of acetic acid/ethanol/water (1/50/49). Absorbance values were measured at 560 nm.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

Lactate dehydrogenase assay was carried out in 50 μ L of extracellular medium, using a commercial colorimetric assay from Doles (Goiânia, Brazil).

Glutathione content

Glutathione content was determined as previously described (Browne and Armstrong, 1998). Briefly, hippocampal slices were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% metaphosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthalaldehyde (1 mg/mL of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard glutathione solutions (0-500 μ M).

Glutamate uptake assay

Glutamate uptake was measured, as previously described (Gottfried et al., 2002) with some modifications (Thomazi et al., 2004). Briefly, hippocampal slices were incubated at 35°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7 H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃ and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 m l-glutamate and 0.33 μ Ci/m l-[2,3-³H] glutamate. The incubation was stopped after 5 min by removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Sodium-independent uptake was determined using N-methyl-d-glucamine instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake of the total uptake to obtain the specific uptake. Results (nmol/mg protein/min) were expressed as a percentage of the control.

Glutamine synthetase (GS) activity

The enzymatic activity of glutamine synthetase was determined using the procedures described previously (Minet et al., 1997) with modifications. Briefly, homogenized tissue samples were added to a reaction mixture containing (in mM): (50 imidazole, 50 hydroxylamine, 100 L-glutamine, 25 sodium arsenate dibasic heptahydrate, 0.2 ADP, 2 manganese chloride, pH 6.2) and incubated for 15 min at 37°C. The reactions were terminated with the addition of 0.2 ml of 0.37 M FeCl₃, 50 mM trichloroacetic acid, and 100 mM HCl. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate acid (Sigma) treated with ferric chloride reagent. Glutamine synthetase activity was expressed as $\mu\text{mol/h/mg prot.}$

Protein determination

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951).

Statistical analysis

Parametric data are reported as mean \pm standard error and were analyzed by Student's t test (when two groups were considered) or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test, in the SPSS-16.0. Tests are specified in the legends, with level of significance set at $p < 0.05$.

Results

In order to investigate the effect of direct exposure of ammonia on S100B secretion, we used acute hippocampal and cortical slices preparation, to measure the protein secretion after 1 h of exposure to ammonia at different concentrations (0.1-10 mM) (Fig. 1). A significant reduction of extracellular S100B was observed in hippocampal slices only at low ammonia concentrations (0.1-1 mM) (FIG. 1A). No changes on S100B secretion were observed in cortical slices independent of the

ammonia amount (FIG. 1B). The treatment did not affect the slice viability seen at the highest concentration (10 mM) with MTT reduction or NR incorporation, neither cellular integrity with LDH activity (TABLE 1).

Since ammonia causes a toxic effect mainly in astrocytes cells (Norenberg et al., 2009), we also investigated alterations in other parameters of astrocyte activity in hippocampal slices (FIG 2). The glutamate uptake was significantly reduced and this effect was dose-dependent (FIG. 2A). As glutathione is mainly synthesized by astrocytes in the CNS, we measured the intracellular content of GSH in hippocampal slices and it was found a significantly reduction of this peptide by the exposure to ammonia at concentrations from 0.1 to 5 mM, but, surprisingly, not at 10 mM (FIG. 2B). GS activity was evaluated, for the first time, in hippocampal slices submitted to different doses of ammonia, showing not significant changes (FIG. 2C).

We used a urease treatment to induce hyperammonemia in young rats (30 days old) to see, in this case, the *in vivo* effect of acute elevation of ammonia in the whole animal body. The i.p. injection of urease (33U/Kg) induced a twofold higher elevation of plasma ammonia (0.138 ± 0.022) as compared to the basal level (0.062 ± 0.002) 24 h after the last injection (FIG. 3). No changes were observed in serum TGO and TGP activities (TABLE 2), suggesting that these animals failed to develop hepatic impairment.

As we observed a difference in the secretion of S100B in the hippocampus and cortex in the *ex vivo* results (FIG. 1) we evaluated the content of this protein in the same structures of the animals injected with urease (FIG. 4). Nevertheless, there were not changes in S100B content in any of the regions (FIG. 4 A, B). However, we observed significantly increased S100B levels in CSF (FIG. 5B) but not in serum (FIG. 5B). We

also measured the intracellular S100B content in adipose tissue, an extra cerebral source of this protein, but any change was observed (data not shown).

When we analyzed other parameters of astrocyte activity in the hippocampus of urease treated rats we did not observe significant changes in glutamate uptake (FIG. 6A), neither in GSH content (FIG. 6B), although there was a clear trend ($p < 0.10$) of reduction in both parameters. The GS activity was unchanged (FIG. 6C), in agreement with the *in vitro* experiment on hippocampal slices previously shown (FIG. 2C).

In order to evaluate the activation of astrocytes in different brain regions in urease treated rats, we measure GFAP content. The result shows an increase in GFAP content in hippocampal (FIG. 7A), but any change was observed in cortical region (FIG. 7B).

Discussion

S100B protein has been widely reported as a marker of cerebral damage, it was found elevated in serum, in CSF and even in urine from patients with brain damage and neurodegenerative diseases (Gazzolo et al., 2003; Goncalves et al., 2008; Rothermundt et al., 2003). This protein has been already associated with the neuropsychiatric disease of HE, as it is increased in serum of patients with fulminant hepatitis and cirrhosis, as well as in animal model of HE (Isobe-Harima et al., 2008; Saleh et al., 2007; Wiltfang et al., 1999). Nevertheless, few studies have shown the direct effect of ammonia on S100B secretion in the CNS. In this work, contrary to expectations, we found a decrease on S100B secretion in hippocampal slices exposed to ammonia at concentrations lower than 1 mM, and no changes in cortical slices.

The mechanism by which S100B is secreted has not yet been elucidated. Nevertheless, several regulating molecules of S100B secretion have been identified,

such as IL-1 β (de Souza et al., 2009; Sheng et al., 1996), glutamate (Goncalves et al., 2002; Gursoy and Buyukuysal, 2010) and even ammonia in cultured astrocytes and C6 glioma cells exposed to high concentrations of this ion (Bobermin et al., 2012; Leite et al., 2006). However, in a model of brain slices is found a diversity of cell types that interact with each other in response to a given stimulus. Therefore, elevated ammonia concentrations also affect other cell types which can release factors that regulates and stimulates astrocytes S100B secretion in a different way than isolated astrocytes exposed to ammonia. In fact, similar effect on S100B secretion was seen in astrocytes culture and hippocampal slices submitted to an inflammatory stimulus by LPS (Guerra et al., 2011).

It has been suggested that the increase in extracellular ammonia induces activation of NMDA glutamate receptors, inducing Ca²⁺ entry into the cell (Kosenko et al., 2000). Interestingly, the increase in intracellular Ca²⁺ stimulates the S100B secretion in cell culture (Davey et al., 2001). However, Ca²⁺ entry via NMDA receptor does not seem to regulate the S100B secretion, whereas incubation of hippocampal slices with Mg²⁺ free medium (in order to unlock the NMDA-R) did not altered S100B secretion (Nardin et al., 2009). Accordingly, NMDA (or other glutamate ionotropic agonists) did not affect the S100B secretion in cultured astrocytes (Tramontina et al., 2006). This would explain the absence of increase on extracellular S100B content in hippocampal slices.

The decrease of extracellular S100B content observed in hippocampal slices may be indicative of neurotoxicity caused by ammonia, considering that S100B can act as a neurotrophic compound in the extracellular space. Several studies showed that this protein acts by stimulating the survival of neurons against toxic stimuli such as glutamate and staurosporine (Ahlemeyer et al., 2000), as well as the β -amyloid peptide

(Businaro et al., 2006). This action appears to involve the activation of the receptor RAGE and anti-apoptotic factor Bcl-2 (Donato et al., 2009; Huttunen et al., 2000). Therefore, a decrease in the levels of this protein in the extracellular space can result in a reduction of neuronal protection and the consequent worsening of ammonia toxicity.

The ammonia incubation induced a different effect on extracellular S100B content depending on the brain region. In fact we observed a reduction in extracellular content of S100B only in the hippocampus and, any change in cortex slices, which can be explained by the heterogeneity of astrocytes in different brain regions (Wang and Bordey, 2008). According to this, our group had already observed differences in content and basal secretion of S100B in cultured astrocytes from different brain regions, suggesting that regulation of S100B secretion can be modulated by distinct mechanisms in hippocampal and cortical astrocytes (Pinto et al., 2000).

We found no significant variation in intracellular content of S100B in cortex or hippocampus *in vivo* model of hyperammonemia. We must notice that there is not always a link between expression and secretion of this protein (Goncalves et al., 2008). In agreement with this, an increase of S100B secretion was recorded in astrocytes cultured exposed to high ammonia concentrations, with no change in the intracellular content (Leite et al., 2006).

On the other hand, a significant increase in S100B was observed in CSF of rats injected with urease, which indicates that different brain structures may be involved. The hippocampus and the cortex does not appear to contribute as sources of S100B, since direct exposure of ammonia in brain slices model did not induce an increase in the extracellular medium. This elevation in S100B CSF concentration could be interpreted as a signal of astrocytic activation as it has been proposed in many brain injury (Rothermundt et al., 2003).

It is often assumed that the increases in S100B CSF concentration induces an elevation in serum S100B, interestingly, in our experiments serum S100B was not changed. In fact, this relationship is not always true and a recent study has shown the same pattern in rats submitted to an inflammatory stimulus by LPS (Guerra et al., 2011). Since we did not find any changes in serum S100B with hyperammonemic induction we suggest that the elevation on serum S100B, found in cirrotic patients or in HE animal model, could be the result of other toxins released in these conditions besides ammonia per se. However, other sources of serum S100B, like adipocytes, cannot be rule out (Goncalves et al., 2010). Nevertheless, this does not seem to be the case of our hyperammonemic rats, since we did not find differences in adipose tissue S100B content (data not shown).

Damage in astrocytes function has been linked with HE progression (Norenberg et al., 2009). In our results we show that the astrocyte glutamate up take in synaptic cleft is reduced in a dose dependent manner in hippocampal slices induced by ammonia, as had been reported by Schmidt, et al. (1990) with the glutamate non-metabolizable analogue D-aspartate. The commitment in glutamate up take it has also been reported *in vitro* (Chan and Butterworth, 1999; Schmidt et al., 1990) and *in vivo* hiperamonemic condition (Knecht et al., 1997). In urease treated rats was seen a trend in reduction in glutamate uptake, but it was not statistically significant.

Due to a reduction in glutamate uptake, several studies with animal models of hyperammonemia and liver dysfunction showed an increase of extracellular glutamate. This seems to activate NMDA glutamate receptors causing a neurological disorder, and this effect is blocked by NMDA antagonist (Braissant et al., 2012; Felipe and Butterworth, 2002). Interestingly, glutamate has already been shown as a down modulator of S100B secretion in hippocampal astrocytes (Tramontina et al., 2006).

Therefore, an increase of extracellular glutamate caused by ammonia could also be contributing to reduced S100B secretion observed in this work. However this matters requires further investigation.

We also found a significant GSH content decrease on hippocampal slices in acute exposure to ammonia, at concentrations of 0.1-5 mM and a decrease tendency in hippocampal of urease treated rats, which corroborates with the reduction in GSH / GSSG ratio observed in total brain extract of hyperammonemic rats (Kosenko et al., 1999). In fact, an increase of reactive oxygen species (ROS) was observed in cultured astrocytes exposed to high concentrations of ammonia (Murthy et al., 2001; Norenberg et al., 2007) and in rat brain with acute and chronic liver dysfunction (Bemeur et al., 2010). Nevertheless, some studies shows inconsistent results in GSH content (Gegg et al., 2003; Murthy et al., 2000; Viegas et al., 2012). This variation may be due to variations in cerebral region used in each study (Singh et al., 2008). Thus, we show here that at least the hippocampal region appears to be sensitive to oxidative effects produced by ammonia.

There were not changes in GS activity in ammonia exposure hippocampal slices neither in the hippocampus of urease treated rats. This result had already been observed in hyperammonemics rats, but in total brain extracts (Cooper and Lai, 1987; Lavoie et al., 1987a) and never in isolated hippocampal structure. No change or decrease in GS activity, has already been observed in other studies (Bobermin et al., 2012; Leite et al., 2006; Suarez et al., 2002), maybe because GS in brain works near to its maximal capacity under physiological conditions (Felipo and Butterworth, 2002). Alternatively, ammonia leads to an increase of nitric oxide production and GS nitration/inactivation can occurs (Schliess et al., 2002).

The GFAP content was assessed in urease injected rats, showing a significant increase in the hippocampal region, and no change in cerebral cortex. Again, this variation seems to be a region specific result, since some studies have reported a reduction in cultured astrocytes (Leite et al., 2006) and whole brain (Belanger et al., 2002), however others showed an increase tendency in the content of this protein in cerebellar astrocytes in a model of HE rats (Kril et al., 1997). The increase of GFAP can be interpreted as an astrogliosis, which occurs in a number of conditions involving brain damage (Eng et al., 2000). Furthermore, it may be involved in the process of neuroinflammation as already reported in patients with HE (Montoliu et al., 2009). This work shows for the first time the change of GFAP in the hippocampal region, induced by intraperitoneal urease injection, showing greater susceptibility of this structure under a stimulus with ammonia, contributing to the neuropsychological impairments observed in HE.

Conclusions

This study evaluates for the first time the S100B extracellular content in a *ex vivo* model of brain slices under direct exposure to ammonia. We show here that there is a regulation/secretion of S100B protein differently in hippocampus and cortex regions. There are probably other areas, rather than hippocampus and cerebral cortex, most sensitive to the effects of ammonia, which may contribute to the observed increase in S100B CSF in hyperammonemic rats induced by urease. Furthermore, other parameters of astrocyte activity, such as glutamate uptake and GSH content were altered by *in vitro* ammonia exposure. In addition, hippocampal GFAP was increased in urease treated rats. All these changes were shown in hippocampal region, a structure that appears to be

quite sensitive to the effects of ammonia contributing for the neuropsychiatric disorders seen in HE patients.

Acknowledgements This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00.

Appendices

Table 1. Ammonia does not affect cell viability and integrity of acute hippocampal slices.

	Control	NH ₄ Cl 10mM
LDH (U.I.)	38.2±7.8	32.4±5.0
MTT (absorbance)	0.263±0.01	0.264±0.02
NR (absorbance)	0.224±0.04	0.226±0.05

After a metabolic recovery period, hippocampal and cortical slices from adult Wistar rats were exposed to ammonia at 10 mM and after 30 min of treatment hippocampal slices were incubated with MTT or neutral red (NR). For integrity cell evaluation the medium was collected and extracellular LDH activity was measured after 1 h of treatment with 10 mM ammonium chloride in hippocampal and cortical slices. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis was performed by Test T * indicates $p < 0.05$.

Table 2. Urease i.p. injection did not induce hepatic impairment

	Control	Urease
TGO	164.2±11.1	167.5±12.1
TGP	98.3±4.8	93.4±8.5

Rats were daily intraperitoneal injected with urease (33U/Kg) for 4 days. The blood samples were collected by intracardiac puncture 24 h after the last injection and TGO and TGP activities were measured by a commercial kit. Each value is the mean (\pm standard error) of 5 independent experiments (animals) per group. Statistical analysis was performed by Test T * indicates $p < 0.05$.

References

- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C., Krieglstein, J., 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858, 121-8.
- Belanger, M., Desjardins, P., Chatauret, N., Butterworth, R. F., 2002. Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int.* 41, 155-60.
- Bemeur, C., Desjardins, P., Butterworth, R. F., 2010. Evidence for oxidative/nitrosative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 25, 3-9.
- Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R., 2010. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging.* 31, 665-77.
- Bobermin, L. D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M. C., Leite, M. C., Souza, D. O., Goncalves, C. A., Gottfried, C., 2012. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. *PLoS One.* 7, e52164.
- Braissant, O., McLin, V. A., Cudalbu, C., 2012. Ammonia toxicity to the brain. *J Inherit Metab Dis.*
- Browne, R. W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 108, 347-52.
- Brusilow, S. W., Koehler, R. C., Traystman, R. J., Cooper, A. J., 2010. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics.* 7, 452-70.
- Businaro, R., Leone, S., Fabrizi, C., Sorci, G., Donato, R., Lauro, G. M., Fumagalli, L., 2006. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-

- induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res.* 83, 897-906.
- Chan, H., Butterworth, R. F., 1999. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 24, 1397-401.
- Cooper, A. J., Lai, J. C., 1987. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol.* 6, 67-95.
- Davey, G. E., Murmann, P., Heizmann, C. W., 2001. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem.* 276, 30819-26.
- de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B., Goncalves, C. A., 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol.* 206, 52-7.
- Desjardins, P., Belanger, M., Butterworth, R. F., 2001. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J Neurosci Res.* 66, 967-71.
- Diemer, N. H., Laursen, H., 1977. Glial cell reactions in rats with hyperammonemia induced by urease or porto-caval anastomosis. *Acta Neurol Scand.* 55, 425-42.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 1008-22.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., Lee, Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25, 1439-51.
- Felipo, V., Butterworth, R. F., 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.* 67, 259-79.

- Gazzolo, D., Marinoni, E., Di Iorio, R., Bruschetini, M., Kornacka, M., Lituania, M., Majewska, U., Serra, G., Michetti, F., 2003. Measurement of urinary S100B protein concentrations for the early identification of brain damage in asphyxiated full-term infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 157, 1163-8.
- Gegg, M. E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J. P., Clark, J. B., Moncada, S., Heales, S. J., 2003. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem.* 86, 228-37.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C., Guerra, M. C., 2010. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010, 790431.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 41, 755-63.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., Goncalves, C. A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport.* 13, 1533-5.
- Gottfried, C., Tramontina, F., Goncalves, D., Goncalves, C. A., Moriguchi, E., Dias, R. D., Wofchuk, S. T., Souza, D. O., 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev.* 123, 1333-40.
- Guerra, M. C., Tortorelli, L. S., Galland, F., Da Re, C., Negri, E., Engelke, D. S., Rodrigues, L., Leite, M. C., Goncalves, C. A., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation.* 8, 128.

- Gursoy, M., Buyukuysal, R. L., 2010. Mechanism of S100b release from rat cortical slices determined under basal and stimulated conditions. *Neurochemical research*. 35, 429-36.
- Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R., Rauvala, H., 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*. 275, 40096-105.
- Isobe-Harima, Y., Terai, S., Segawa, M., Uchida, K., Yamasaki, T., Sakaida, I., 2008. Serum S100b (astrocyte-specific protein) is a useful marker of hepatic encephalopathy in patients with fulminant hepatitis. *Liver Int*. 28, 146-7.
- Kleindienst, A., Ross Bullock, M., 2006. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma*. 23, 1185-200.
- Knecht, K., Michalak, A., Rose, C., Rothstein, J. D., Butterworth, R. F., 1997. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett*. 229, 201-3.
- Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Felipo, V., 1999. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med*. 26, 1369-74.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Kaminsky, A., Valencia, M., Lee, L., Hermenegildo, C., Felipo, V., 1997. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res*. 27, 637-44.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Stavroskaya, I. G., Felipo, V., 2000. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Res*. 880, 139-46.

- Kril, J. J., Flowers, D., Butterworth, R. F., 1997. Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Mol Chem Neuropathol.* 31, 279-87.
- Lavoie, J., Giguere, J. F., Layrargues, G. P., Butterworth, R. F., 1987. Activities of neuronal and astrocytic marker enzymes in autopsied brain tissue from patients with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2, 283-90.
- Leite, M. C., Brolese, G., de Almeida, L. M., Pinero, C. C., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2006. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull.* 70, 179-85.
- Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 169, 93-9.
- Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2009. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res.* 87, 2439-46.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M., Felipe, V., 2009. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol.* 43, 272-9.

- Murthy, C. R., Bender, A. S., Dombro, R. S., Bai, G., Norenberg, M. D., 2000. Elevation of glutathione levels by ammonium ions in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int.* 37, 255-68.
- Murthy, C. R., Rama Rao, K. V., Bai, G., Norenberg, M. D., 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66, 282-8.
- Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L. M., Leite, M. C., Thomazi, A. P., Gottfried, C., Wofchuk, S. T., Donato, R., Goncalves, C. A., 2009. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res.* 34, 1603-11.
- Norenberg, M. D., Jayakumar, A. R., Rama Rao, K. V., Panickar, K. S., 2007. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis.* 22, 219-34.
- Norenberg, M. D., Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R., 2009. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis.* 24, 103-17.
- Petrova, T. V., Hu, J., Van Eldik, L. J., 2000. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res.* 853, 74-80.
- Pinto, S. S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C. A., Wofchuk, S., Rodnight, R., 2000. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486, 203-7.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60, 614-32.

- Saleh, A., Kamel, L., Ghali, A., Ismail, A., El Khayat, H., 2007. Serum levels of astroglial S100-beta and neuron-specific enolase in hepatic encephalopathy patients. *East Mediterr Health J.* 13, 1114-23.
- Schliess, F., Gorg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H. J., Herrmann, A., Butterworth, R. F., Zilles, K., Haussinger, D., 2002. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J.* 16, 739-41.
- Schmidt, W., Wolf, G., Grungreiff, K., Meier, M., Reum, T., 1990. Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metab Brain Dis.* 5, 19-31.
- Seyan, A. S., Hughes, R. D., Shawcross, D. L., 2010. Changing face of hepatic encephalopathy: role of inflammation and oxidative stress. *World J Gastroenterol.* 16, 3347-57.
- Sheng, J. G., Ito, K., Skinner, R. D., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Van Eldik, L. J., Griffin, W. S., 1996. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 17, 761-6.
- Singh, S., Koiri, R. K., Trigun, S. K., 2008. Acute and chronic hyperammonemia modulate antioxidant enzymes differently in cerebral cortex and cerebellum. *Neurochem Res.* 33, 103-13.
- Suarez, I., Bodega, G., Fernandez, B., 2002. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int.* 41, 123-42.
- Thomazi, A. P., Godinho, G. F., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O., Wofchuk, S. T., 2004. Ontogenetic profile of

glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine.

Mech Ageing Dev. 125, 475-81.

Tramontina, F., Leite, M. C., Cereser, K., de Souza, D. F., Tramontina, A. C., Nardin, P., Andrezza, A. C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C. A., 2007.

Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods.* 162, 282-6.

Tramontina, F., Leite, M. C., Goncalves, D., Tramontina, A. C., Souza, D. F., Frizzo, J. K., Nardin, P., Gottfried, C., Wofchuk, S. T., Goncalves, C. A., 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 31, 815-20.

Van Eldik, L. J., Wainwright, M. S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 21, 97-108.

Viegas, C. M., Tonin, A. M., Zanatta, A., Seminotti, B., Busanello, E. N., Fernandes, C. G., Moura, A. P., Leipnitz, G., Wajner, M., 2012. Impairment of brain redox homeostasis caused by the major metabolites accumulating in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome in vivo. *Metab Brain Dis.* 27, 521-30.

Wang, D. D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 86, 342-67.

Wiltfang, J., Nolte, W., Otto, M., Wildberg, J., Bahn, E., Figulla, H. R., Pralle, L., Hartmann, H., Ruther, E., Ramadori, G., 1999. Elevated serum levels of astroglial S100beta in patients with liver cirrhosis indicate early and subclinical portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 14, 239-51.

Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Sato, Y., Yamamoto, H., Konno, H., 1989. Astrocytic pathology of methionine sulfoximine-induced encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 77, 357-68.

Figure legends

Fig. 1. Effect of ammonia on S100B extracellular content in acute hippocampal and cortical slices. Hippocampal (A) and cortical slices (B) from adult Wistar rats were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, slices were exposed to ammonia (from 0.1- 10 mM) and the extracellular content of S100B was measured by ELISA at 1 h. Each value is the mean (\pm standard error) of at least five independent experiments performed in triplicate and expressed as percentage of control. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$).

Fig. 2. Ammonia compromise astrocyte function in hippocampal slices. Hippocampal slices from adult Wistar rats were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, slices were exposed to ammonia (from 0.1- 10 mM) and the following procedures were done after 1 h of treatment: (A) glutamate uptake was measured during five minutes by radiometric [^3H] glutamate assay; (B) GSH content was measured by a fluorimetric assay and (C) glutamine synthetase activity was measured by colorimetric assay. Each value is the mean (\pm standard error) of at least five independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$).

Fig. 3. Urease injection induced hyperammonemia rats. Rats were daily intraperitoneal injected with urease (33U/Kg) for 4 days. Blood samples were collected by intracardiac puncture 24 h after the last injection and ammonia levels were measured by a commercial kit. Each value is the mean (\pm standard error) of 5 independent rats per group. Statistical analysis was performed by Student t test * indicates $p < 0.05$.

Fig 4. Effect of intraperitoneal injection in rat hippocampal and cortical S100B content. Rats were daily intraperitoneal injected with urease (33U/Kg) for 4 days. After 24 hours of the last injection rats were killed by decapitation and brain was dissected. S100B content was measured by ELISA in hippocampal (A) and cortical (B) region. Each value is the mean (\pm standard error) of 5 independent rats per group. Statistical analysis was performed by Student t test * indicates $p < 0.05$.

Fig. 5. Urease intraperitoneal injection induce increase levels of S100B in cerebrospinal fluid (CSF), but not in serum. Rats were daily intraperitoneal injected with urease (33U/Kg) for 4 days. After 24 h of the last injection, blood was collected by intracardiac puncture (A) and cerebrospinal fluid by magna puncture (B). Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. Statistical analysis was performed by Student t test * indicates $p < 0.05$.

Fig. 6. Effect of hyperammonemia on astrocyte function in hippocampus of urease treated rats. Rats were daily intraperitoneal injected with urease (33U/Kg) for 4 days. After 24 h of the last injection rats were killed by decapitation and hippocampus brain dissected. (A) glutamate uptake was measured during five minutes by radiometric [^3H] glutamate assay; (B) GSH content was measured by a fluorimetric assay and (C) glutamine synthetase activity was measured by colorimetric assay. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. Statistical analysis was performed by Student t test * indicates $p < 0.05$.

Fig. 7. Hippocampal but not cortical GFAP content is increased in urease treated rats.

Rats were daily intraperitoneal injected with urease (33U/Kg) for 4 days. After 24 h of the last injection rats were killed by decapitation and brain was dissected. GFAP was measured in hippocampus (A) and cortex (B) region by ELISA. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. Statistical analysis was performed by Student t test * indicates $p < 0.05$.

Figure 1

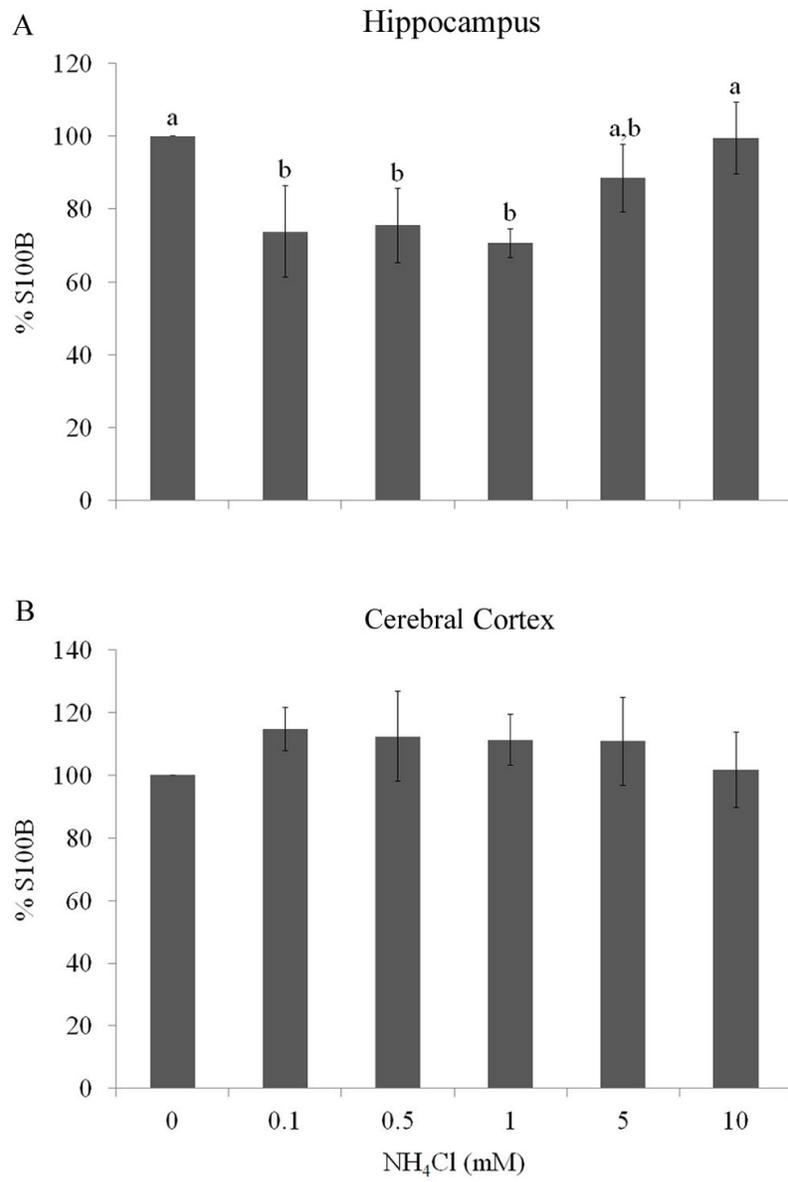


Figure 2

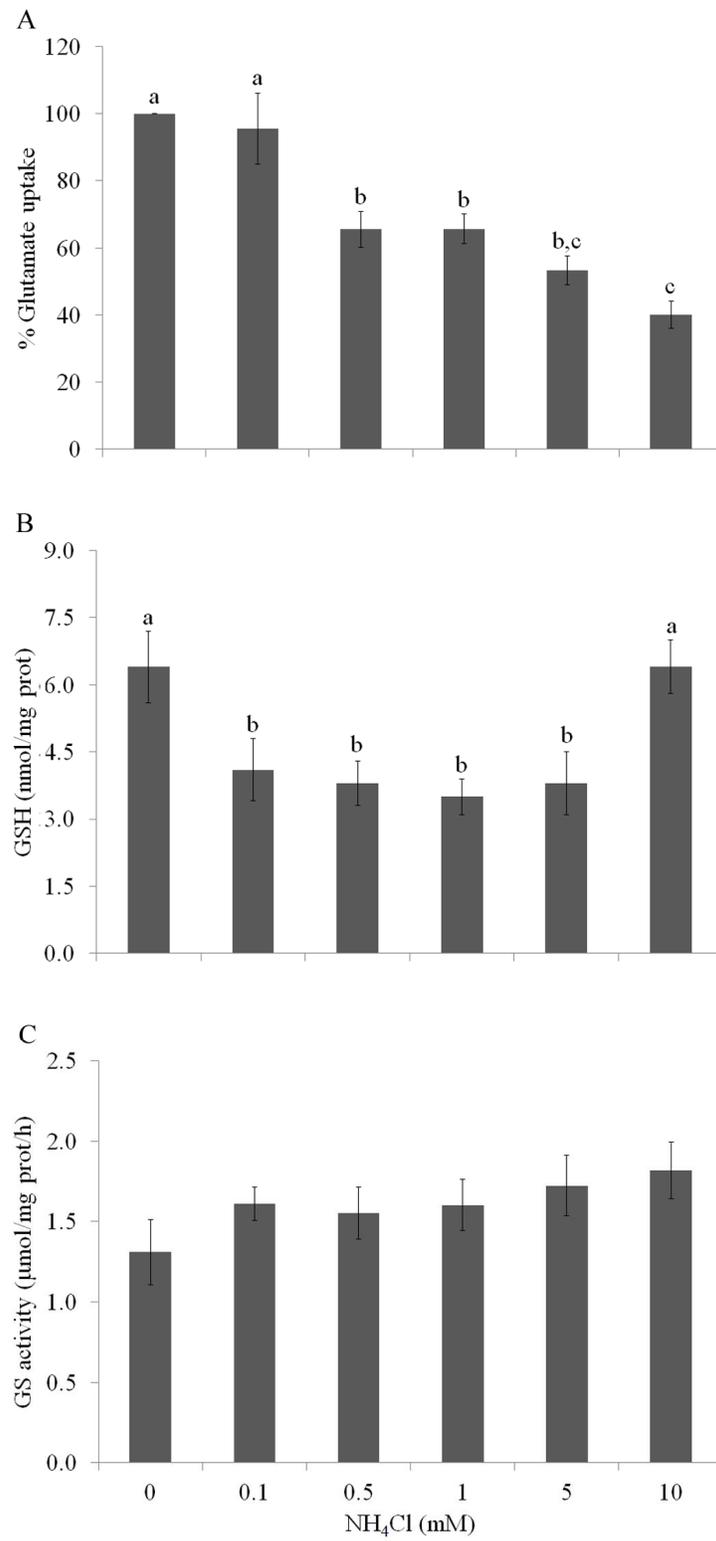


Figure 3

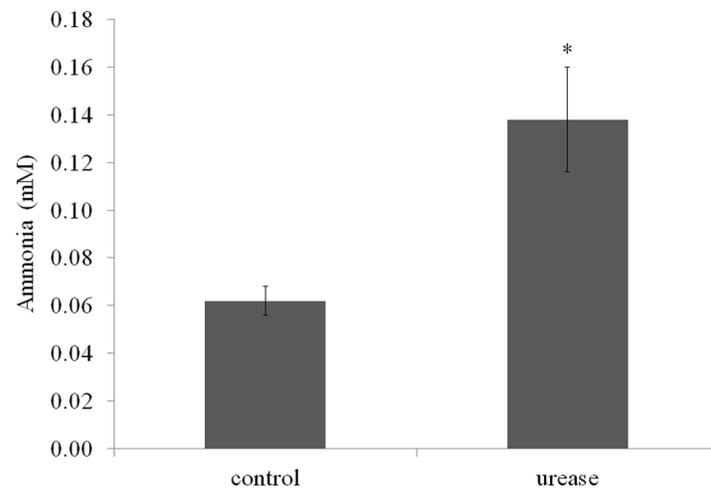


Figure 4

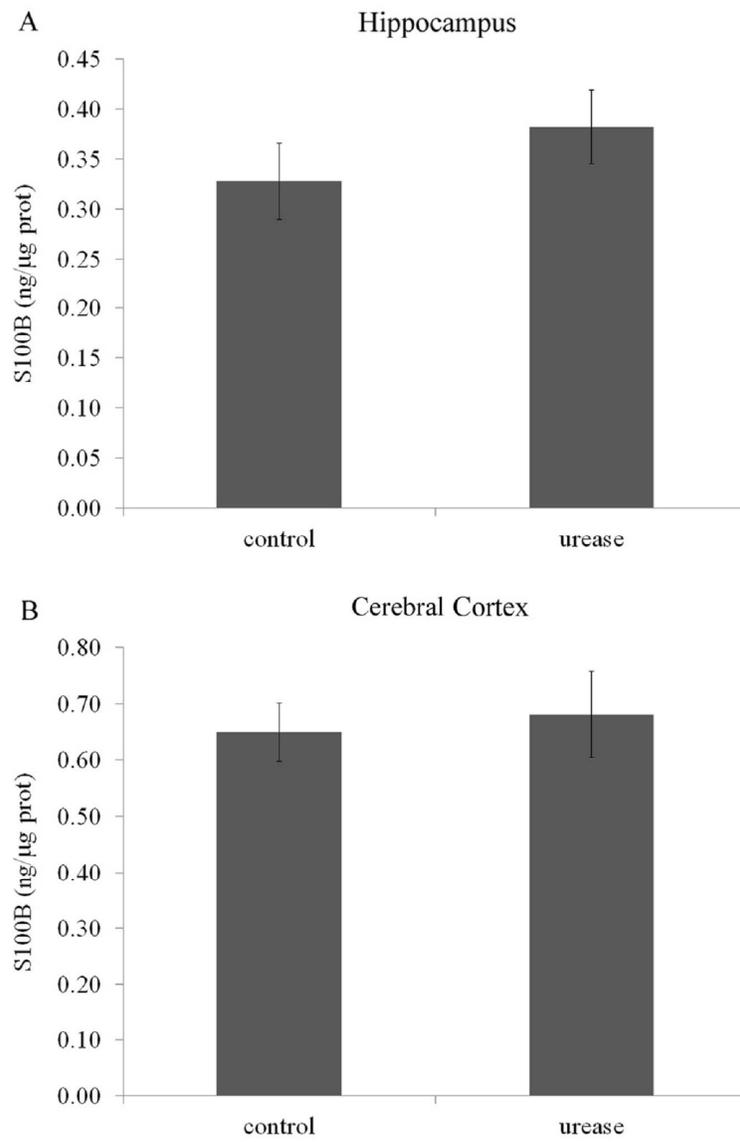


Figure 5

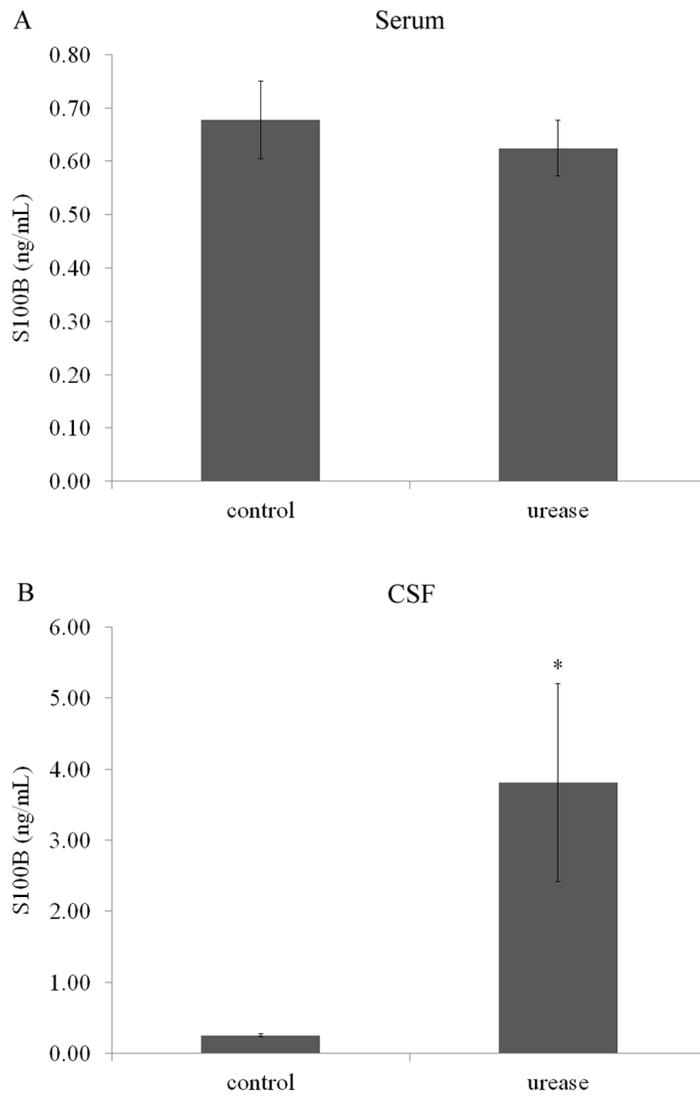


Figure 6

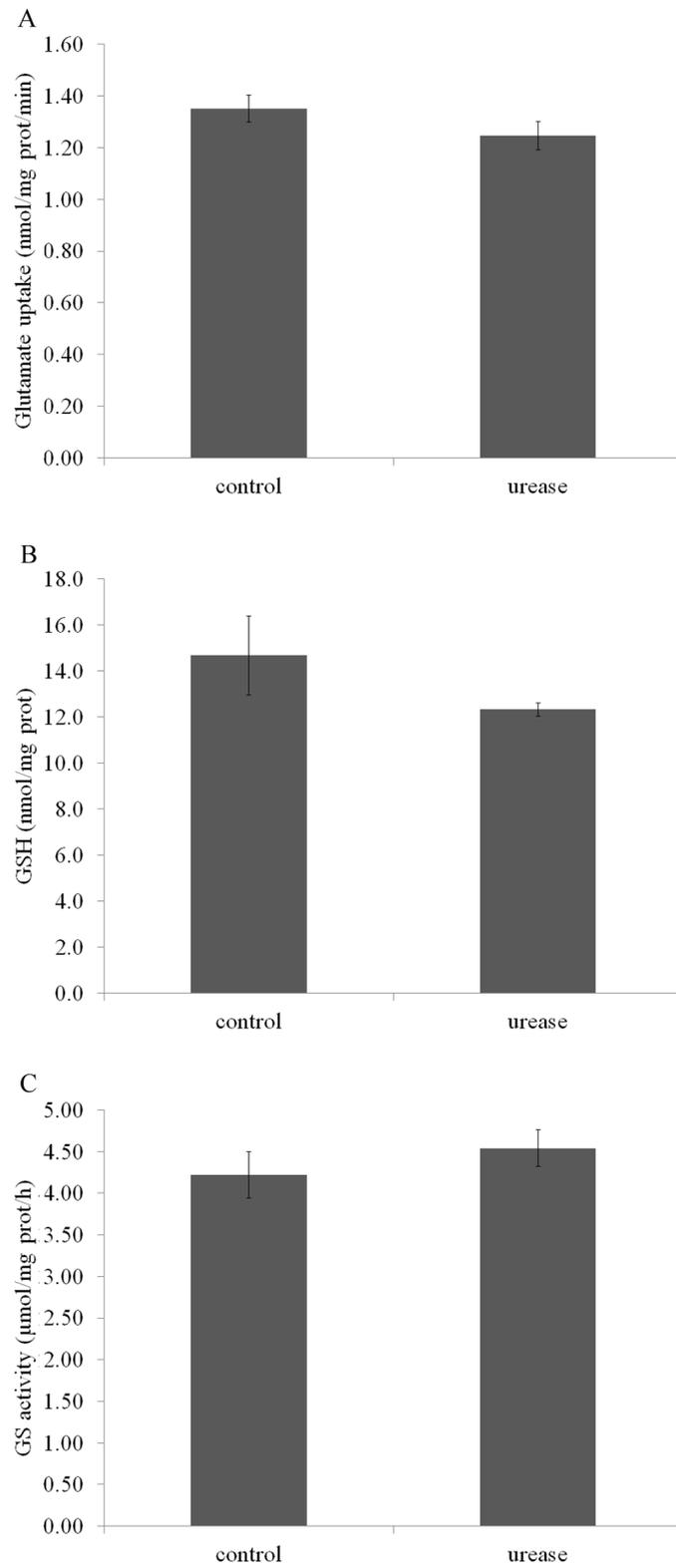
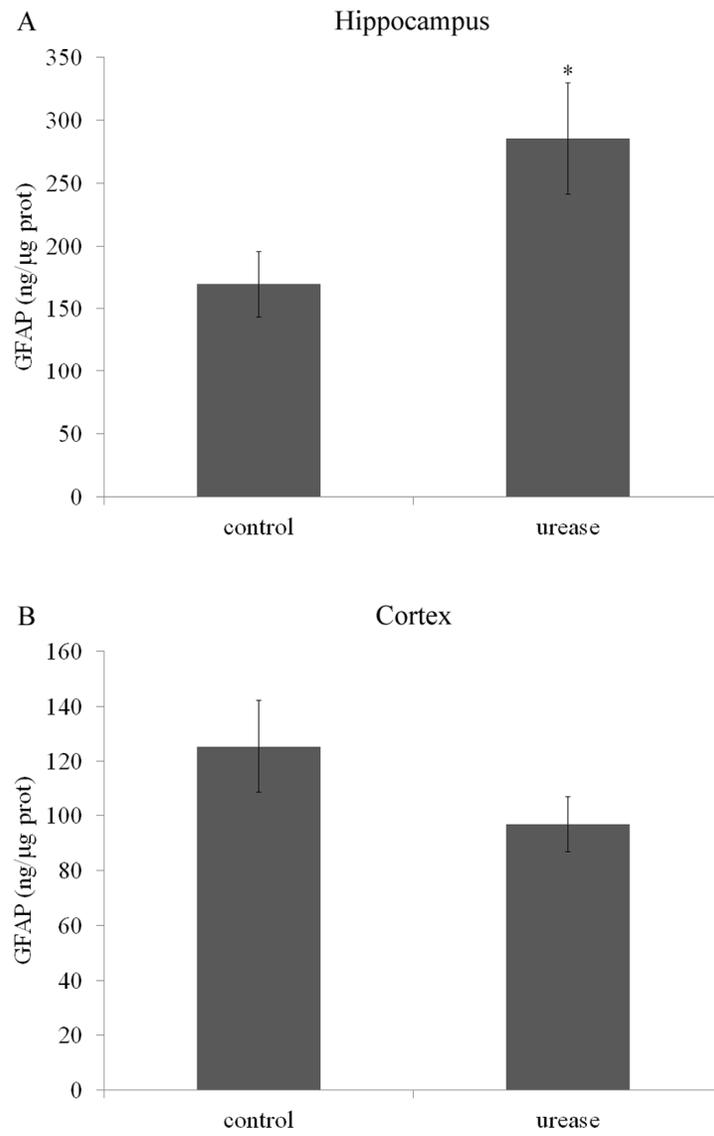


Figure 7



Highlights

- Ammonia exposure induces variation on S100B secretion in a region specific manner.
- Urease treated rats show an increase in S100B CSF content, but not in serum.
- Astrocyte functions are altered in hyperammonemia conditions in hippocampus.

PARTE III

3. Discussão

3.1. Efeito da amônia sobre a S100B

A S100B tem sido muito indicada como uma proteína marcadora de dano cerebral, estando elevada no soro de pacientes com doenças neurodegenerativas e até mesmo na urina de pacientes após um dano cerebral (Gazzolo et al., 2003). Por este motivo vem sendo considerada um potente marcador para o diagnóstico dessas patologias (Rothermundt et al., 2003).

A S100B já foi relacionada com a Encefalopatia Hepática (HE), visto que está aumentada no soro desses pacientes com hepatite fulminante e cirrose, assim como em modelo animal de HE. (Isobe-Harima et al., 2008; Saleh et al., 2007; Wiltfang et al., 1999). Considerando-se que poucos estudos mostraram o efeito direto da amônia sobre a S100B no SNC, avaliou-se neste trabalho se fontes cerebrais poderiam estar contribuindo para o aumento do conteúdo desta proteína visto no soro dos pacientes cirróticos ou em modelo animal de HE. De forma a simular uma hiperamonemia *ex vivo*, fatias hipocâmpais e corticais foram expostas a uma curva de concentração de amônia (em torno das concentrações encontradas fisiologicamente), e foi avaliado o conteúdo extracelular de S100B. Ao contrário do esperado, foi encontrada uma redução nos níveis extracelulares de S100B nas concentrações mais baixas de amônia (0,1-1 mM) em fatias hipocâmpais, sem alteração em fatias corticais.

É importante destacar que no modelo *ex vivo* existe não só astrócitos, mas também neurônios e outras células gliais que poderiam estar captando a S100B liberada pelos astrócitos contribuindo para reduzir as concentrações extracelulares desta proteína. Logo, a diminuição do conteúdo de S100B extracelular, observado nas fatias

hipocampais expostas à amônia, não necessariamente indicaria uma variação na secreção desta proteína pelos astrócitos, mas sim, o resultado da secreção pelos astrócitos e captação da S100B por outros tipos celulares. No entanto, como ainda não se conhece um receptor específico para esta proteína e também o mecanismo pelo qual a S100B é captada, torna-se difícil avaliar esta opção. Sabe-se que a S100B induz vários dos seus efeitos neurotróficos e apoptóticos através do receptor de produto de glicação avançada (RAGE), no entanto a via de sinalização ainda não é bem compreendida (Bianchi et al., 2010; Donato, 2003).

Da mesma forma o mecanismo pelo qual a S100B é secretada ainda não é bem elucidado. Apesar disso, vários moduladores da secreção de S100B têm sido identificados, como a IL-1 β (Sheng et al., 1996), o glutamato (Goncalves et al., 2002) e até mesmo a amônia em cultura de astrócitos e linhagem C6 expostas a altas concentrações deste íon (Bobermin et al., 2012; Leite et al., 2006). Esse último dado se contrapõe aos nossos resultados, se considerarmos que estejamos tendo uma redução na secreção de S100B no nosso modelo frente a um estímulo hiperamonêmico. Essa divergência pode ser explicada devido a uma regulação diferenciada na secreção desta proteína nos astrócitos das fatias hipocampais, quando comparados aos astrócitos isolados em cultura expostos à amônia. Em um modelo de fatias cerebrais é encontrado uma diversidade de tipos celulares, como astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e microglia, que interagem e participam em conjunto na resposta a dado estímulo. Logo, um aumento de amônia também pode afetar outros tipos celulares, além dos astrócitos, secretando fatores que podem regular e estimular de uma forma diferenciada a secreção desta proteína no astrócito das fatias hipocampais. De fato, um resultado similar foi encontrado em relação à secreção de S100B em cultura de astrócitos e fatias hipocampais submetidas a um estímulo inflamatório por LPS (Guerra et al., 2011).

Tem sido sugerido que o aumento de amônia extracelular induz a ativação de receptores de glutamato NMDA, provocando a entrada de Ca^{2+} para dentro da célula (Kosenko et al., 2000). Interessantemente, o aumento de Ca^{2+} intracelular estimula a secreção da proteína S100B em cultura de células (Davey et al., 2001). Porém, o Ca^{2+} que entra via receptor NMDA não parece regular a secreção de S100B, visto que a incubação de fatias hipocâmpais com meio livre de Mg^{2+} (de forma a desbloquear o NMDA-R) não provocou alteração da secreção de S100B (Nardin et al., 2009). Concordando com isso, NMDA (ou outros agonistas ianotrópicos glutamatérgicos) não afetou a secreção de S100B em cultura de astrócitos (Tramontina et al., 2006). Isso justificaria a ausência de aumento na secreção de S100B nas fatias hipocâmpais.

No modelo *ex vivo* observamos uma variação região específica com relação à secreção de S100B, visto que no córtex não ocorre alteração e no hipocampo ocorre uma redução no conteúdo extracelular de S100B sob o estímulo com amônia. Os astrócitos se caracterizam pela sua heterogeneidade apresentando diferentes origens, morfologia e até mesmo diferenças na regulação da expressão de proteínas (Wang and Bordey, 2008). Isso pode contribuir para uma resposta distinta frente alguns estímulos dependendo da região e o microambiente em que esta célula se encontra. Corroborando com isso, um trabalho de nosso grupo observou nítidas diferenças no conteúdo e secreção basal da S100B em cultura de astrócitos de diferentes regiões cerebrais, sugerindo que a regulação da secreção de S100B é modulada por mecanismos distintos nos astrócitos, dependendo da região cerebral (Pinto et al., 2000).

Uma redução no conteúdo de S100B induzida pelas doses iniciais de amônia nas fatias hipocâmpais pode ser um indicativo da neurotoxicidade provocada pela amônia, tendo visto que a S100B pode atuar como um composto neurotrófico no espaço extracelular. Estudos mostram que esta proteína atua estimulando a sobrevivência dos

neurônios contra estímulos tóxicos, como o glutamato e estaurosporina (Ahlemeyer et al., 2000), assim como o peptídeo β -amilóide (Businaro et al., 2006). Esta ação parece envolver a ativação do RAGE e do fator anti-apoptótico Bcl-2 (Donato et al., 2009; Huttunen et al., 2000). Além disso, esta proteína induziu o crescimento de neuritos e regeneração neuronal visto tanto *in vitro* (Winningham-Major et al., 1989), quanto *in vivo* (Haglid et al., 1997), promoveu à sobrevivência de neurônios hipocâmpais após a privação de glicose (Barger et al., 1995) e estimulou a proliferação de uma linhagem de astrócitos (Selinfreund et al., 1991). Logo, uma diminuição da concentração desta proteína no espaço extracelular pode implicar em uma redução da proteção neuronal e o consequente agravamento da toxicidade da amônia.

Uma característica marcante da toxicidade da amônia é o inchaço astrócítico característico no cérebro de pacientes com HE. Alguns trabalhos demonstraram que a expressão de AQ-4, canal que regula a entrada de água na célula, está diminuída em cultura de astrócitos expostas a altas concentrações de amônia (Chastre et al., 2010) e em ratos com disfunção aguda do fígado (Desjardins et al., 2001). Interessantemente, a S100B parece estimular a expressão de AQ-4 (Verkman et al., 2006). Logo, uma diminuição nos níveis extracelulares de S100B, como visto neste trabalho, pode fazer com que a expressão de AQ-4 não seja induzida, auxiliando na regulação do balanço hídrico da célula e, conseqüentemente controlando o inchaço dos astrócitos. Porém, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Ao contrário das concentrações mais baixas de amônia, níveis mais altos (5 e 10 mM) não provocaram alteração no conteúdo extracelular de S100B, igualando-se aos níveis basais nas fatias de hipocampo. Isso pode ser explicado devido a uma mudança na regulação da secreção da S100B induzida por doses mais altas da amônia. Ou ainda, pode estar ocorrendo um menor consumo da S100B pelos diferentes tipos celulares

presentes na fatia. A captação de S100B pode estar reduzida após um estímulo altamente tóxico provocado pelas altas concentrações de amônia.

Tendo visto que uma exposição aguda a amônia induziu diferentemente o conteúdo extracelular de S100B nas fatias de córtex e hipocampo, investigamos o conteúdo desta proteína nas mesmas regiões de ratos submetidos a uma injeção i.p de urease. Este modelo nos permite ver a ação da hiperamonemia em um sistema mais parecido ao que ocorreria fisiologicamente, atuando no corpo como um todo. No entanto, não foi observada nenhuma variação significativa em relação ao conteúdo intracelular da S100B no hipocampo e córtex. É importante ter cuidado na interpretação deste resultado, uma vez que nem sempre existe relação entre expressão e secreção desta proteína (Goncalves et al., 2008). Um aumento na secreção de S100B foi registrado em cultura de astrócitos submetidos a altas concentrações de amônia, sem que haja alteração no conteúdo intracelular (Leite et al., 2006). Da mesma forma, uma diminuição da S100B extracelular foi observada em cultura de astrócitos ou líquido de ratos após a exposição de β -hidroxibutirato ou corpos cetônicos, respectivamente, sem alteração no conteúdo intracelular ou cerebral desta proteína (Leite et al., 2004; Ziegler et al., 2004). Logo, uma ausência de alteração no conteúdo intracelular da S100B, como visto neste trabalho, não está necessariamente associada com variações locais da secreção desta proteína.

Quando avaliado o conteúdo de S100B no soro dos ratos injetados com urease não foi registrado alteração em comparação com os controles. Entretanto, um aumento significativo foi observado no líquido dos animais hiperamonêmicos. Este resultado nos indica que fontes de S100B do encéfalo possam estar contribuindo para o aumento da concentração desta proteína encontrada no líquido. Provavelmente as regiões hipocampais e corticais não estão servindo de fonte para esse aumento de S100B já que

no trabalho *ex vivo* a exposição direta de amônia não provocou um aumento desta proteína no meio extracelular nessas duas regiões. É possível que a amônia esteja causando um aumento da secreção desta proteína em astrócitos de outras regiões cerebrais, ou ainda possa estar induzindo um dano celular em regiões mais sensíveis aos efeitos tóxicos da amônia, que acabam por extravazar o conteúdo interno, contribuindo, então, para o aumento de S100B no líquido. Porém, mais pesquisas são necessárias para confirmar estas especulações.

Um aumento de S100B no líquido tem sido proposto como um marcador de lesão cerebral e tem sido interpretado como um sinal de ativação astrocítica (Rothermundt et al., 2003). Além disso, tem sido assumido que a S100B no líquido atravessa facilmente a BHE, aumentando as concentrações periféricas de S100B no sangue, e que isso seria indicativo de lesão cerebral. No entanto, nem sempre esta relação existe em situações fisiopatológicas, como ocorrido por exemplo neste estudo, onde houve alteração no líquido, porém não no soro. Logo, um intenso debate tem sido desenvolvido, principalmente porque existem outras fontes extra-cerebrais de S100B que podem contribuir para um aumento de S100B no sangue (Goncalves et al., 2008). Portanto, a relação entre um aumento de S100B no líquido e o consequente aumento desta proteína no soro nem sempre é verdadeira. De fato, outras pesquisas avaliaram o mesmo aspecto sob outros estímulos tóxicos, como por exemplo, um aumento de S100B no líquido, sem alteração no soro de ratos submetidos a um estímulo inflamatório por LPS (Guerra et al., 2011).

Ao contrário de resultados da literatura que mostram um aumento de S100B no soro de pacientes cirróticos ou em ratos intoxicados com acetaminofeno, como modelo de HE (Isobe-Harima et al., 2008; Saleh et al., 2007; Wiltfang et al., 1999), não observamos alteração no nosso modelo de hiperamonemia. Isso indica que outros

fatores, além da amônia, podem contribuir para o aumento de S100B registrado no soro, uma vez que os outros modelos dispõem de um dano hepático, o que provoca o aumento de outros compostos tóxicos além da amônia, como por exemplo, o manganês, mercaptanos e ácidos graxos de cadeia curta que podem causar um efeito adicional na toxicidade da amônia (Felipo and Butterworth, 2002).

É importante destacar que o aumento nos níveis séricos de S100B não pode ser considerado de fonte exclusivamente cerebral, visto que a S100B também pode ser produzida por fontes extracerebrais como adipócitos, tecido adiposo marrom, condrócitos e melanócitos (Donato, 2001). No entanto, apenas os adipócitos parecem secretar esta proteína sem depender de morte celular (Anderson et al., 2001; Goncalves et al., 2010). Desta forma, é importante ter cautela na interpretação dos níveis elevados desta proteína no soro, uma vez que outras células periféricas podem contribuir para este aumento. Contudo, isso não parece ser o caso dos ratos injetados com urease neste trabalho, uma vez que não foi observado alteração no soro. Da mesma forma, o conteúdo intracelular de adipócitos não variou nos ratos hiperamonêmicos após a injeção com urease, porém nada se sabe sobre a secreção desta proteína nestas células sob um estímulo de hiperamonemia.

3.2. Efeito da amônia sobre as funções astrocíticas

Os astrócitos são importantes células do SNC que atuam na manutenção do ambiente extracelular para os neurônios, assim como possuem participação ativa nas sinapses liberando neurotransmissores e regulando o fluxo sanguíneo (Wang and Bordey, 2008). Um desbalanço nas funções astrocíticas está relacionado com uma série

de doenças neurodegenerativas, como na doença de Alzheimer, Parkinson, e inclusive, na Encefalopatia Hepática (Khandelwal et al., 2011; Norenberg et al., 2009).

O modelo *ex vivo* permite o estudo destas células preservando as interações com outros tipos celulares adjacentes, mantendo muitas conexões que ocorrem fisiologicamente, como funções sinápticas (Li and Mc, 1957) e comunicação por junção gap (Nagy and Li, 2000). Esta arquitetura celular permite que as células respondam de uma maneira integrada, descartando as limitações da resposta de células isoladas em cultura.

A função clássica dos astrócitos de captar o glutamato da fenda sináptica está comprometida em astrócitos e fatias cerebrais submetidas a altas concentrações de amônia (Chan and Butterworth, 1999; Schmidt et al., 1990), assim como no córtex frontal de ratos com desvascularização hepática (Knecht et al., 1997). A maioria dos trabalhos avaliou a captação de glutamato na região cortical, no entanto poucos estudos evidenciam este comprometimento na região hipocampal. Neste trabalho ocorreu uma redução dose-dependente na captação de glutamato, como já havia sido relatado por Schmidt, et al. (1990) com o análogo não metabolizável de glutamato, D- aspartato. Nos ratos com injeção i.p de urease houve apenas uma tendência à redução, porém não foi significativo.

Essa diminuição da captação de glutamato observado no experimento *ex vivo* pode ser devida à redução da expressão e conteúdo dos transportadores de glutamato, EAAT-1 já observada em culturas de astrócitos expostas a altas concentrações de amônia (Chan and Butterworth, 1999), e EAAT-2, em ratos com hiperamonemia provocados por uma desvascularização hepática (Knecht et al., 1997). Nas duas situações, a redução dos transportadores foi acompanhada de uma diminuição da capacidade de transportar o análogo não metabolizável D-aspartato (Butterworth, 2002).

Devido a esta diminuição dos transportadores de glutamato, diversos trabalhos com modelos animais de hiperamonemia e disfunção do fígado evidenciam um aumento de glutamato extracelular (Felipo and Butterworth, 2002). Dessa forma, este aumento parece superativar os receptores de glutamato NMDA, provocando disfunções neurológicas. De acordo com esta possibilidade, uma série de trabalhos já relatou efeitos benéficos do antagonista de NMDA prevenindo os efeitos tóxicos da amônia (Butterworth, 2002; Hermenegildo et al., 1996).

Além de uma diminuição de sua expressão, os transportadores de glutamato podem também sofrer inibição por um dano oxidativo, contribuindo ainda mais para o aumento de glutamato extracelular. A elevação de EROs pode ser induzida pela superativação dos receptores NMDA (gerado pelo excesso de glutamato extracelular) provocando um aumento da entrada de Ca^{2+} no espaço intracelular tanto de neurônios quanto de astrócitos. O aumento deste íon, por sua vez, irá ativar enzimas oxidativas, como a NOS, gerando um aumento de EROs intracelular. Deste modo, os transportadores de glutamato podem ser oxidados diminuindo a captação de glutamato, gerando um ciclo vicioso, já que mais glutamato ficará acumulado na fenda sináptica, superativando mais receptores NMDA (Trotti et al., 1998).

Interessantemente, resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que a incubação de astrócitos hipocâmpais com altas concentrações de glutamato provoca uma redução na secreção de S100B em 1 hora de tratamento (Tramontina et al., 2006), mostrando que o glutamato é um importante modulador desta proteína. Logo, um aumento de glutamato extracelular provocado pela amônia poderia também estar contribuindo para a redução da secreção de S100B observada neste trabalho. No entanto, para sustentar esta hipótese seria necessário confirmar se o glutamato extracelular

estaria aumentado por uma inibição na sua captação, como já verificado nas fatias hipocampais.

A redução no conteúdo do principal antioxidante cerebral, a glutatona, ocorre em uma série de doenças neurodegenerativas, resultando no dano celular pelo aumento de EROs (Valko et al., 2007). Neste trabalho encontramos uma diminuição significativa de GSH na exposição aguda de amônia, nas concentrações entre 0.1-5 mM em fatias hipocampais. Apesar de não ter tido significância, foi encontrado também uma tendência à redução no hipocampo dos ratos com hiperamonemia induzida por urease. Estes resultados corroboram com a diminuição na razão GSH/GSSG observada em ratos com injeção i.p. de cloreto de amônio no extrato de cérebro total (Kosenko et al., 1999). Apesar disso, outros trabalhos mostram uma não alteração no conteúdo de GSH no córtex e cerebelo de ratos com indução de hiperamonemia (Singh et al., 2008; Viegas et al., 2012) ou até mesmo um aumento no conteúdo de GSH em cultura de astrócito frente a um estímulo com amônia (Gegg et al., 2003; Murthy et al., 2000).

Esta variação nos resultados no conteúdo de GSH pode ser devido à avaliação deste parâmetro em diferentes modelos e áreas do cérebro. De acordo com isso, Singh e colaboradores (2008) observou uma redução das enzimas antioxidantes, como SOD, catalase, glutatona peroxidase e redutase, em ratos com injeção i.p de cloreto de amônia, porém com uma maior sensibilidade na região cerebelar em comparação com a cortical, uma vez que os níveis de lipoperoxidação foram maiores no cerebelo. Isto evidencia que diferentes áreas cerebrais apresentam variação na susceptibilidade aos efeitos oxidativos da amônia. Uma redução no conteúdo de GSH nunca havia sido avaliada no hipocampo, mostrando que esta região parece ser bastante sensível aos efeitos da amônia, contribuindo para os sintomas neurotóxicos observados na doença de HE.

A diminuição encontrada no conteúdo de GSH pode ocorrer devido a um aumento do seu consumo por uma maior produção de EROs induzida pela alta concentração de amônia. Isso também foi observado em cultura de astrócitos expostas a altas concentrações de amônia (Murthy et al., 2001; Norenberg et al., 2007) e em ratos com disfunção aguda e crônica do fígado (Bemeur et al., 2010).

Evidências suportam que os astrócitos são a principal fonte de EROs sob condições de HE (Schliess et al., 2006). Uma inibição da glutamina sintetase, principalmente abundante em astrócitos, previne a nitração de proteínas em ratos hiperamonêmicos (Schliess et al., 2002). Além disso, análises imunistoquímicas encontraram uma colocalização de 3-nitrotirosina com glutamina sintetase e GFAP em fatias cerebrais de ratos com hiperamonemia induzida (Bemeur et al., 2010; Schliess et al., 2002). Logo, provavelmente a diminuição no conteúdo de GSH observado nas fatias hipocâmpais deva-se principalmente a uma diminuição do seu conteúdo em astrócitos, uma vez que estas parecem ser as células mais afetadas pelos estímulos oxidativos da amônia, além de serem as células gliais em maior abundância no cérebro e, conseqüentemente, nas fatias hipocâmpais.

Uma outra possibilidade para a redução de GSH observada nas fatias de hipocampo seria a sua exportação dos astrócitos, maiores produtores deste antioxidante, para os neurônios, células que dependem de precursores (cisteína e glicina) para a síntese de GSH. Essa cooperação metabólica entre astrócitos e neurônios para manter estável o balanço deste tripeptídeo já foi sugerido por alguns autores (Gegg et al., 2005; Hilgier et al., 2010; Singh et al., 2008). Culturas de neurônios expostas ao LPS ficam mais susceptíveis quando comparadas ao co-cultivo astrócitos-neurônio, mostrando também um aumento no conteúdo de GSH nos neurônios nestas condições (Gegg et al., 2005). Em concordância com isso a enzima γ -glutamil-cisteína sintetase, também responsável

pela síntese de GSH na célula já foi encontrada elevada em astrócitos sob condições de hiperamonemia aguda (Murthy et al., 2000). A enzima que catalisa a quebra deste tripeptídeo, a γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), também está elevada no cérebro de ratos com HE, indicando que a GSH uma vez no espaço extracelular é rapidamente quebrada, gerando os precursores glicina, cisteína e o dipeptídeo cisteína-glicina, que poderão ser captados pelos neurônios para nova síntese de GSH (Hilgier et al., 2010).

Os neurônios parecem captar a cisteína através do transportador de aminoácido exclusivo do neurônio EAAT-3. Uma inibição deste transportador diminui a síntese de GSH nos neurônios e os deixa mais susceptíveis a insultos de estresse oxidativo *in vitro*. (Escartin et al., 2011). Tem sido sugerido que a exportação de GSH para o meio extracelular pode se dar através de hemicanais (canais formados por conexinas ou panexinas que comunicam o citoplasma ao meio extracelular) em fatias hipocâmpais estimuladas pela omissão de cálcio extracelular. Interessantemente, a abertura dos hemicanais pode ser regulada pela acidificação intracelular, variação redox e estado metabólico, situações estas já relacionadas à hiperamonemia (Stridh et al., 2008).

Surpreendentemente, o conteúdo intracelular de GSH permaneceu sem alteração nas fatias hipocâmpais expostas à maior concentração de amônia usada (10 mM). O aumento na concentração de amônia pode induzir uma mudança de comportamento em comparação com as concentrações mais baixas, uma vez que pode ativar ou inibir vias de sinalização diferentes. Como por exemplo, a inibição dos hemicanais por uma acidificação do meio intracelular (Trexler et al., 1999), uma vez que a entrada de NH_4^+ promove a redução do pH intracelular (Bosoi and Rose, 2009). Isso induziria a retenção da GSH intracelular, sem que haja a sua exportação para o meio extracelular e redução no conteúdo intracelular. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar estas possibilidades.

A enzima glutamina sintetase, especialmente abundante nos astrócitos e particularmente importante na detoxificação da amônia no SNC, não apresentou variação na sua atividade em fatias hipocâmpais expostas a curva de amônia nem em fatias hipocâmpais de ratos com hiperamonemia sob uma indução com urease. Esse resultado já havia sido verificado em ratos hiperamonêmicos, porém em extratos totais cerebrais (Cooper et al., 1985; Lavoie et al., 1987b) e nunca apenas na estrutura hipocâmpal isolada. A região onde é medida a atividade desta enzima parece ser particularmente importante, já que existe bastante variação de resultados na literatura referentes a este parâmetro. Diversos trabalhos mostram um aumento ou uma diminuição na atividade desta enzima dependente do modelo e da região cerebral (Lavoie et al., 1987a; Leite et al., 2006; Suarez et al., 2002; Yamamoto et al., 1989). Girard e colaboradores (1993) verificaram uma variação região específica em sete estruturas cerebrais, com alteração apenas na região hipocâmpal, cortical e cerebelar, sem alteração nas outras áreas (Girard et al., 1993). Somando-se a isso, Suarez e colaboradores (2002) ressaltam que pode haver variações em micro-regiões dentro de uma mesma estrutura já que a atividade da GS parece ser induzida em regiões de áreas glutamatérgicas (Suarez et al., 2002). Isso mostra o papel específico e refinado da GS em regiões sinápticas de forma a reduzir as concentrações locais de glutamato e amônia. Logo, tornam-se bastante confusos e difíceis de serem analisados os resultados em relação à atividade desta enzima.

Seria esperado que houvesse um aumento na atividade desta enzima, uma vez que a concentração de amônia está elevada na HE e, portanto, esta enzima atuaria de forma a detoxificar os altos níveis deste íon. Porém, explica-se que a diminuição ou uma não alteração da atividade da GS se daria pela redução do substrato glutamato, uma vez que é menos captado para o espaço intracelular (Chan and Butterworth, 1999; Knecht et al.,

1997; Schmidt et al., 1990). Outro motivo seria a sua inibição por uma nitração, como já observado em cultura de astrócitos e em ratos submetidos à cirurgia de anastomiasia de veia porta cava. O uso do bloqueador do receptor de glutamato, MK-801, previne a nitração e por consequência a inibição da GS, mostrando o envolvimento do receptor de glutamato neste processo (Schliess et al., 2002).

A GFAP constitui o maior componente de filamentos intermediários, diferenciando os astrócitos no SNC. O conteúdo desta proteína foi avaliado nos ratos com injeção i.p de urease, apresentando um aumento significativo na região hipocampal, e uma não alteração no córtex cerebral. Mais uma vez, essa variação parece ser região específica, uma vez que alguns trabalhos mostraram uma redução em cultura de astrócitos (Leite et al., 2006) e cérebro total (Belanger et al., 2002) e outros evidenciam uma tendência a aumento no conteúdo desta proteína em astrócitos cerebelares de ratos com desvascularização hepática (Kril et al., 1997).

Um aumento de GFAP é um forte sinal de astrogliose, o que ocorre em uma série de condições envolvendo dano cerebral (Eng et al., 2000). Além disso, pode estar envolvido no processo de neuroinflamação, como já registrado em pacientes com HE (Montoliu et al., 2009). Este trabalho mostra pela primeira vez a alteração de GFAP na região hipocampal, evidenciando uma maior susceptibilidade desta estrutura sob um estímulo com amônia, podendo representar uma área altamente afetada na hiperamonemia, contribuindo para os prejuízos neuropsicológicos observados na HE.

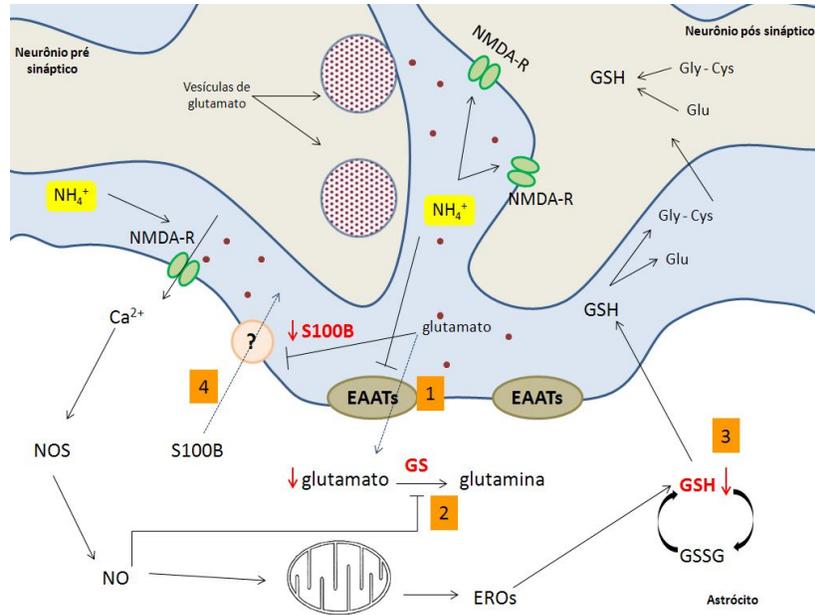


Figura 4: Resumo dos resultados da exposição de amônia em fatias de hipocampo: (1) Altas concentrações de amônia inibem a captação de glutamato que pode provocar a elevação deste aminoácido no meio extracelular. (2) A atividade da GS permanece inalterada, devido a uma menor concentração de glutamato intracelular e/ou uma inibição por nitratação devido ao aumento de NO intracelular. (4) Os níveis de GSH estão reduzidos por um aumento de seu consumo, devido a uma maior produção de EROs. Além disso, pode estar sendo exportado para o meio extracelular de forma a servir de substrato para a produção de GSH em neurônios. (4) O conteúdo de S100B extracelular está reduzido, o que pode ser explicado por uma diminuição da secreção dos astrócitos, ou por um aumento da captação desta proteína por outras células. Abreviações: GS, glutamina sintetase; GSH, glutathione; EROs, espécies reativas de oxigênio; NOS, óxido nítrico sintetase; NO; óxido nítrico; EAATs, transportadores de glutamato; NMDA-R, receptores de glutamato; gly, glicina; cys, cisteína; glu, glutamato.

4. Conclusões

- ✓ Este trabalho avaliou pela primeira vez a secreção da proteína S100B em um modelo *ex vivo* de fatia cerebral sob uma exposição direta de amônia. Em fatias hipocâmpais observou-se uma redução da secreção da S100B nas concentrações mais baixas de amônia (0,1-1 mM). Não houve alteração na secreção desta proteína em fatias corticais independente da concentração de amônia (0,1-10 mM). Com isso concluímos que há uma variação região específica na secreção desta proteína no hipocampo e córtex, mostrando que existe uma ação e regulação da S100B diferenciada em cada região.
- ✓ Não houve comprometimento da viabilidade celular das fatias de hipocampo na concentração mais alta de amônia (10 mM), pelas técnicas de MTT e vermelho neutro, assim como na integridade celular, testado pela atividade da LDH extracelular em fatias hipocâmpais e corticais;
- ✓ Com relação às funções astrocíticas, houve uma diminuição dose-dependente na captação de glutamato nas fatias hipocâmpais, assim como uma redução no conteúdo intracelular de GSH nas concentrações de amônia entre (0,1-5 mM). Surpreendentemente, não houve alteração da GSH na concentração mais alta de amônia. A atividade da glutamina sintetase não foi alterada, independente da concentração de amônia testada. As alterações astrocíticas mostradas no hipocampo evidenciam que esta estrutura parece ser bastante sensível aos efeitos da amônia, podendo contribuir para as alterações neuropsiquiátricas em pacientes com HE.
- ✓ Com relação ao experimento *in vivo* a injeção intraperitoneal de urease induziu um aumento de duas vezes ($0,138 \pm 0,022$) na concentração de amônia em

comparação com os ratos do grupo controle ($0,062 \pm 0,002$). Não houve indicação de comprometimento hepático neste tratamento, uma vez que a atividade das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) não estavam alteradas no soro, apontando que os efeitos nos parâmetros testados eram exclusivos de uma hiperamonemia e não de um dano hepático;

- ✓ Apesar de não ter sido observado alteração no conteúdo intracelular da proteína S100B em hipocampo, córtex e tecido adiposo, assim como na concentração desta proteína do soro dos animais hiperamonêmicos, registrou-se um aumento significativo na concentração de S100B no líquido desses animais. Isso indica que, provavelmente, existem outras áreas mais sensíveis aos efeitos da amônia, não analisadas neste trabalho, que podem contribuir para o aumento de S100B observado no líquido dos ratos hiperamonêmicos por indução de urease.
- ✓ Não houve alteração significativa das funções astrocíticas no hipocampo dos animais hiperamonêmicos, apesar de haver uma nítida tendência à redução nos parâmetros de captação de glutamato e conteúdo de GSH. Assim como no experimento *ex vivo*, a atividade da GS permaneceu inalterada no hipocampo dos ratos tratados;
- ✓ A injeção com urease induziu um aumento significativo no conteúdo de GFAP no hipocampo, evidenciando uma astrogliose induzida pela alta concentração de amônia. O mesmo não foi observado no córtex cerebral destes animais.

5. Referências

- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C., Kriegstein, J., 2000. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858, 121-8.
- Albrecht, J., Norenberg, M. D., 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology.* 44, 788-94.
- Albrecht, J., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Zielinska, M., Aschner, M., 2010a. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol.* 6, 263-76.
- Albrecht, J., Zielinska, M., Norenberg, M. D., 2010b. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol.* 80, 1303-8.
- Anderson, R. E., Hansson, L. O., Nilsson, O., Liska, J., Settergren, G., Vaage, J., 2001. Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources. *Ann Thorac Surg.* 71, 1512-7.
- Bai, G., Rama Rao, K. V., Murthy, C. R., Panickar, K. S., Jayakumar, A. R., Norenberg, M. D., 2001. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66, 981-91.
- Barger, S. W., Van Eldik, L. J., Mattson, M. P., 1995. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res.* 677, 167-70.
- Belanger, M., Desjardins, P., Chatauret, N., Butterworth, R. F., 2002. Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int.* 41, 155-60.
- Bemeur, C., Desjardins, P., Butterworth, R. F., 2010. Evidence for oxidative/nitrosative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 25, 3-9.
- Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R., 2010. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging.* 31, 665-77.

- Bobermin, L. D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M. C., Leite, M. C., Souza, D. O., Goncalves, C. A., Gottfried, C., 2012. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. *PLoS One*. 7, e52164.
- Bosoi, C. R., Rose, C. F., 2009. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis*. 24, 95-102.
- Braissant, O., McLin, V. A., Cudalbu, C., 2012. Ammonia toxicity to the brain. *J Inherit Metab Dis*.
- Browne, R. W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*. 108, 347-52.
- Brusilow, S. W., Koehler, R. C., Traystman, R. J., Cooper, A. J., 2010. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy. *Neurotherapeutics*. 7, 452-70.
- Businaro, R., Leone, S., Fabrizi, C., Sorci, G., Donato, R., Lauro, G. M., Fumagalli, L., 2006. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res*. 83, 897-906.
- Butterworth, R. F., 2002. Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int*. 41, 81-5.
- Chan, H., Butterworth, R. F., 1999. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res*. 24, 1397-401.
- Chastre, A., Jiang, W., Desjardins, P., Butterworth, R. F., 2010. Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis*. 25, 17-21.
- Cooper, A. J., Lai, J. C., 1987. Cerebral ammonia metabolism in normal and hyperammonemic rats. *Neurochem Pathol*. 6, 67-95.

- Cooper, A. J., Mora, S. N., Cruz, N. F., Gelbard, A. S., 1985. Cerebral ammonia metabolism in hyperammonemic rats. *J Neurochem.* 44, 1716-23.
- Davey, G. E., Murmann, P., Heizmann, C. W., 2001. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem.* 276, 30819-26.
- de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B., Goncalves, C. A., 2009. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol.* 206, 52-7.
- Deignan, J. L., Cederbaum, S. D., Grody, W. W., 2008. Contrasting features of urea cycle disorders in human patients and knockout mouse models. *Mol Genet Metab.* 93, 7-14.
- Desjardins, P., Belanger, M., Butterworth, R. F., 2001. Alterations in expression of genes coding for key astrocytic proteins in acute liver failure. *J Neurosci Res.* 66, 967-71.
- Desjardins, P., Du, T., Jiang, W., Peng, L., Butterworth, R. F., 2012. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure: role of glutamine redefined. *Neurochem Int.* 60, 690-6.
- Diemer, N. H., Laursen, H., 1977. Glial cell reactions in rats with hyperammonemia induced by urease or porto-caval anastomosis. *Acta Neurol Scand.* 55, 425-42.
- Donato, R., 1988. Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem.* 263, 106-10.
- Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.
- Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 60, 540-51.

- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 1008-22.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62, 649-71.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., Lee, Y. L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25, 1439-51.
- Escartin, C., Won, S. J., Malgorn, C., Auregan, G., Berman, A. E., Chen, P. C., Deglon, N., Johnson, J. A., Suh, S. W., Swanson, R. A., 2011. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. *J Neurosci.* 31, 7392-401.
- Felipo, V., Butterworth, R. F., 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol.* 67, 259-79.
- Gazzolo, D., Marinoni, E., Di Iorio, R., Bruschetti, M., Kornacka, M., Lituania, M., Majewska, U., Serra, G., Michetti, F., 2003. Measurement of urinary S100B protein concentrations for the early identification of brain damage in asphyxiated full-term infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 157, 1163-8.
- Gegg, M. E., Beltran, B., Salas-Pino, S., Bolanos, J. P., Clark, J. B., Moncada, S., Heales, S. J., 2003. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem.* 86, 228-37.
- Gegg, M. E., Clark, J. B., Heales, S. J., 2005. Co-culture of neurones with glutathione deficient astrocytes leads to increased neuronal susceptibility to nitric oxide and increased glutamate-cysteine ligase activity. *Brain Res.* 1036, 1-6.
- Gentil, B. J., Delphin, C., Mbele, G. O., Deloulme, J. C., Ferro, M., Garin, J., Baudier, J., 2001. The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B

- protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem.* 276, 23253-61.
- Giguere, J. F., Butterworth, R. F., 1984. Amino acid changes in regions of the CNS in relation to function in experimental portal-systemic encephalopathy. *Neurochem Res.* 9, 1309-21.
- Girard, G., Giguere, J. F., Butterworth, R. F., 1993. Region-selective reductions in activities of glutamine synthetase in rat brain following portacaval anastomosis. *Metab Brain Dis.* 8, 207-15.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C., Guerra, M. C., 2010. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010, 790431.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 41, 755-63.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S., Goncalves, C. A., 2002. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport.* 13, 1533-5.
- Gottfried, C., Tramontina, F., Goncalves, D., Goncalves, C. A., Moriguchi, E., Dias, R. D., Wofchuk, S. T., Souza, D. O., 2002. Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev.* 123, 1333-40.
- Guerra, M. C., Tortorelli, L. S., Galland, F., Da Re, C., Negri, E., Engelke, D. S., Rodrigues, L., Leite, M. C., Goncalves, C. A., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation.* 8, 128.
- Gursoy, M., Buyukuysal, R. L., 2010. Mechanism of S100b release from rat cortical slices determined under basal and stimulated conditions. *Neurochemical research.* 35, 429-36.

- Haglid, K. G., Yang, Q., Hamberger, A., Bergman, S., Widerberg, A., Danielsen, N., 1997. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res.* 753, 196-201.
- Hermenegildo, C., Marcaida, G., Montoliu, C., Grisolia, S., Minana, M. D., Felipo, V., 1996. NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res.* 21, 1237-44.
- Hermenegildo, C., Monfort, P., Felipo, V., 2000. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat brain in vivo following acute ammonia intoxication: characterization by in vivo brain microdialysis. *Hepatology.* 31, 709-15.
- Hertz, L., Kala, G., 2007. Energy metabolism in brain cells: effects of elevated ammonia concentrations. *Metab Brain Dis.* 22, 199-218.
- Hilgier, W., Wegrzynowicz, M., Ruszkiewicz, J., Oja, S. S., Saransaari, P., Albrecht, J., 2010. Direct exposure to ammonia and hyperammonemia increase the extracellular accumulation and degradation of astroglia-derived glutathione in the rat prefrontal cortex. *Toxicol Sci.* 117, 163-8.
- Hu, J., Ferreira, A., Van Eldik, L. J., 1997. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem.* 69, 2294-301.
- Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R., Rauvala, H., 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 275, 40096-105.
- Isobe-Harima, Y., Terai, S., Segawa, M., Uchida, K., Yamasaki, T., Sakaida, I., 2008. Serum S100b (astrocyte-specific protein) is a useful marker of hepatic encephalopathy in patients with fulminant hepatitis. *Liver Int.* 28, 146-7.
- Jambekar, A. A., Palma, E., Nicolosi, L., Rasola, A., Petronilli, V., Chiara, F., Bernardi, P., Needleman, R., Brusilow, W. S., 2011. A glutamine synthetase inhibitor increases

- survival and decreases cytokine response in a mouse model of acute liver failure. *Liver Int.* 31, 1209-21.
- Jayakumar, A. R., Rao, K. V., Murthy Ch, R., Norenberg, M. D., 2006. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int.* 48, 623-8.
- Jayakumar, A. R., Tong, X. Y., Ospel, J., Norenberg, M. D., 2012. Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. *Neuroscience.* 218, 305-16.
- Kelly, T., Kafitz, K. W., Roderigo, C., Rose, C. R., 2009. Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. *Glia.* 57, 921-34.
- Khandelwal, P. J., Herman, A. M., Moussa, C. E., 2011. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol.* 238, 1-11.
- Kleindienst, A., Ross Bullock, M., 2006. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma.* 23, 1185-200.
- Knecht, K., Michalak, A., Rose, C., Rothstein, J. D., Butterworth, R. F., 1997. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett.* 229, 201-3.
- Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Felipo, V., 1999. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med.* 26, 1369-74.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Minana, M. D., Grisolia, S., Felipo, V., 1995. Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism. *Neurochem Res.* 20, 451-6.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Minana, M. D., Marcaida, G., Grisolia, S., Felipo, V., 1994. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J Neurochem.* 63, 2172-8.

- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Kaminsky, A., Valencia, M., Lee, L., Hermenegildo, C., Felipo, V., 1997. Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res.* 27, 637-44.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Stavroskaya, I. G., Felipo, V., 2000. Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain in vivo. *Brain Res.* 880, 139-46.
- Kril, J. J., Flowers, D., Butterworth, R. F., 1997. Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Mol Chem Neuropathol.* 31, 279-87.
- Lai, J. C., Cooper, A. J., 1986. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem.* 47, 1376-86.
- Lavoie, J., Giguere, J. F., Layrargues, G. P., Butterworth, R. F., 1987a. Activities of neuronal and astrocytic marker enzymes in autopsied brain tissue from patients with hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2, 283-90.
- Lavoie, J., Giguere, J. F., Layrargues, G. P., Butterworth, R. F., 1987b. Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem.* 49, 692-7.
- Leite, M., Frizzo, J. K., Nardin, P., de Almeida, L. M., Tramontina, F., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2004. Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull.* 64, 139-43.
- Leite, M. C., Brolese, G., de Almeida, L. M., Pinero, C. C., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2006. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull.* 70, 179-85.
- Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 169, 93-9.

- Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C., Goncalves, C. A., 2009. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res.* 87, 2439-46.
- Li, C. L., Mc, I. H., 1957. Maintenance of resting membrane potentials in slices of mammalian cerebral cortex and other tissues in vitro. *J Physiol.* 139, 178-90.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-75.
- Mans, A. M., DeJoseph, M. R., Hawkins, R. A., 1994. Metabolic abnormalities and grade of encephalopathy in acute hepatic failure. *J Neurochem.* 63, 1829-38.
- Marchi, N., Cavaglia, M., Fazio, V., Bhudia, S., Hallene, K., Janigro, D., 2004. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta.* 342, 1-12.
- Mehrotra, A., Trigun, S. K., 2012. Moderate grade hyperammonemia induced concordant activation of antioxidant enzymes is associated with prevention of oxidative stress in the brain slices. *Neurochem Res.* 37, 171-81.
- Michetti, F., Corvino, V., Geloso, M. C., Lattanzi, W., Bernardini, C., Serpero, L., Gazzolo, D., 2012. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem.* 120, 644-59.
- Michetti, F., Massaro, A., Murazio, M., 1979. The nervous system-specific S-100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett.* 11, 171-5.
- Montoliu, C., Piedrafita, B., Serra, M. A., del Olmo, J. A., Urios, A., Rodrigo, J. M., Felipo, V., 2009. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin Gastroenterol.* 43, 272-9.
- Murthy, C. R., Bender, A. S., Dombro, R. S., Bai, G., Norenberg, M. D., 2000. Elevation of glutathione levels by ammonium ions in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int.* 37, 255-68.

- Murthy, C. R., Rama Rao, K. V., Bai, G., Norenberg, M. D., 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66, 282-8.
- Nagy, J. I., Li, W. E., 2000. A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: actions of ischemia, glutamate and elevated potassium. *Eur J Neurosci.* 12, 4567-72.
- Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L. M., Leite, M. C., Thomazi, A. P., Gottfried, C., Wofchuk, S. T., Donato, R., Goncalves, C. A., 2009. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res.* 34, 1603-11.
- Norenberg, M. D., Huo, Z., Neary, J. T., Roig-Cantesano, A., 1997. The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia.* 21, 124-33.
- Norenberg, M. D., Jayakumar, A. R., Rama Rao, K. V., Panickar, K. S., 2007. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis.* 22, 219-34.
- Norenberg, M. D., Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R., 2009. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis.* 24, 103-17.
- Norenberg, M. D., Rao, K. V., 2007. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int.* 50, 983-97.
- Ott, P., Larsen, F. S., 2004. Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int.* 44, 185-98.
- Petrova, T. V., Hu, J., Van Eldik, L. J., 2000. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res.* 853, 74-80.
- Pinto, S. S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C. A., Wofchuk, S., Rodnight, R., 2000. Immunoreactivity and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486, 203-7.

- Qureshi, K., Rao, K. V., Qureshi, I. A., 1998. Differential inhibition by hyperammonemia of the electron transport chain enzymes in synaptosomes and non-synaptic mitochondria in ornithine transcarbamylase-deficient spf-mice: restoration by acetyl-L-carnitine. *Neurochem Res.* 23, 855-61.
- Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R., Norenberg, M. D., 2012. Glutamine in the pathogenesis of acute hepatic encephalopathy. *Neurochem Int.* 61, 575-80.
- Rodrigo, R., Cauli, O., Gomez-Pinedo, U., Agusti, A., Hernandez-Rabaza, V., Garcia-Verdugo, J. M., Felipo, V., 2010. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology.* 139, 675-84.
- Romero-Gomez, M., 2005. Role of phosphate-activated glutaminase in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 20, 319-25.
- Romero-Gomez, M., Jover, M., Diaz-Gomez, D., de Teran, L. C., Rodrigo, R., Camacho, I., Echevarria, M., Felipo, V., Bautista, J. D., 2006. Phosphate-activated glutaminase activity is enhanced in brain, intestine and kidneys of rats following portacaval anastomosis. *World J Gastroenterol.* 12, 2406-11.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60, 614-32.
- Sajikumar, S., Navakkode, S., Frey, J. U., 2005. Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques. *Curr Opin Neurobiol.* 15, 607-13.
- Saleh, A., Kamel, L., Ghali, A., Ismail, A., El Khayat, H., 2007. Serum levels of astroglial S100-beta and neuron-specific enolase in hepatic encephalopathy patients. *East Mediterr Health J.* 13, 1114-23.
- Schliess, F., Gorg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H. J., Herrmann, A., Butterworth, R. F., Zilles, K., Haussinger, D., 2002. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J.* 16, 739-41.

- Schliess, F., Gorg, B., Haussinger, D., 2006. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem.* 387, 1363-70.
- Schmidt, W., Wolf, G., Grungreiff, K., Meier, M., Reum, T., 1990. Hepatic encephalopathy influences high-affinity uptake of transmitter glutamate and aspartate into the hippocampal formation. *Metab Brain Dis.* 5, 19-31.
- Selinfreund, R. H., Barger, S. W., Pledger, W. J., Van Eldik, L. J., 1991. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 3554-8.
- Seyan, A. S., Hughes, R. D., Shawcross, D. L., 2010. Changing face of hepatic encephalopathy: role of inflammation and oxidative stress. *World J Gastroenterol.* 16, 3347-57.
- Sheline, C. T., Wei, L., 2006. Free radical-mediated neurotoxicity may be caused by inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 140, 235-46.
- Sheng, J. G., Ito, K., Skinner, R. D., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Van Eldik, L. J., Griffin, W. S., 1996. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 17, 761-6.
- Singh, S., Koiri, R. K., Trigun, S. K., 2008. Acute and chronic hyperammonemia modulate antioxidant enzymes differently in cerebral cortex and cerebellum. *Neurochem Res.* 33, 103-13.
- Stridh, M. H., Tranberg, M., Weber, S. G., Blomstrand, F., Sandberg, M., 2008. Stimulated efflux of amino acids and glutathione from cultured hippocampal slices by omission of extracellular calcium: likely involvement of connexin hemichannels. *J Biol Chem.* 283, 10347-56.
- Suarez, I., Bodega, G., Fernandez, B., 2002. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int.* 41, 123-42.
- Thomazi, A. P., Godinho, G. F., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O., Wofchuk, S. T., 2004. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev.* 125, 475-81.

- Tramontina, F., Leite, M. C., Cereser, K., de Souza, D. F., Tramontina, A. C., Nardin, P., Andrezza, A. C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C. A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods*. 162, 282-6.
- Tramontina, F., Leite, M. C., Goncalves, D., Tramontina, A. C., Souza, D. F., Frizzo, J. K., Nardin, P., Gottfried, C., Wofchuk, S. T., Goncalves, C. A., 2006. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*. 31, 815-20.
- Trexler, E. B., Bukauskas, F. F., Bennett, M. V., Bargiello, T. A., Verselis, V. K., 1999. Rapid and direct effects of pH on connexins revealed by the connexin46 hemichannel preparation. *J Gen Physiol*. 113, 721-42.
- Trotti, D., Danbolt, N. C., Volterra, A., 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci*. 19, 328-34.
- Tyce, G. M., Ogg, J., Owen, C. A., Jr., 1981. Metabolism of acetate to amino acids in brains of rats after complete hepatectomy. *J Neurochem*. 36, 640-50.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 44-84.
- Van Eldik, L. J., Wainwright, M. S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 21, 97-108.
- Verkman, A. S., Binder, D. K., Bloch, O., Auguste, K., Papadopoulos, M. C., 2006. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. 1758, 1085-93.
- Viegas, C. M., Tonin, A. M., Zanatta, A., Seminotti, B., Busanello, E. N., Fernandes, C. G., Moura, A. P., Leipnitz, G., Wajner, M., 2012. Impairment of brain redox homeostasis caused by

- the major metabolites accumulating in hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome in vivo. *Metab Brain Dis.* 27, 521-30.
- Vogels, B. A., Maas, M. A., Daalhuisen, J., Quack, G., Chamuleau, R. A., 1997. Memantine, a noncompetitive NMDA receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology.* 25, 820-7.
- Wang, D. D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 86, 342-67.
- Willard-Mack, C. L., Koehler, R. C., Hirata, T., Cork, L. C., Takahashi, H., Traystman, R. J., Brusilow, S. W., 1996. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience.* 71, 589-99.
- Wiltfang, J., Nolte, W., Otto, M., Wildberg, J., Bahn, E., Figulla, H. R., Pralle, L., Hartmann, H., Ruther, E., Ramadori, G., 1999. Elevated serum levels of astroglial S100beta in patients with liver cirrhosis indicate early and subclinical portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 14, 239-51.
- Winningham-Major, F., Staecker, J. L., Barger, S. W., Coats, S., Van Eldik, L. J., 1989. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol.* 109, 3063-71.
- Yamamoto, T., Iwasaki, Y., Sato, Y., Yamamoto, H., Konno, H., 1989. Astrocytic pathology of methionine sulfoximine-induced encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 77, 357-68.
- Zemtsova, I., Gorg, B., Keitel, V., Bidmon, H. J., Schror, K., Haussinger, D., 2011. Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology.* 54, 204-15.
- Ziegler, D. R., Oliveira, D. L., Pires, C., Ribeiro, L., Leite, M., Mendez, A., Goncalves, D., Tramontina, F., Portela, L. V., Wofchuk, S. T., Perry, M. L., Goncalves, C. A., 2004. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res.* 50, 375-9.

Zimmer, D. B., Van Eldik, L. J., 1986. Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S100. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem.* 261, 11424-8.