

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ASTROGLIAIS EM MODELOS
***IN VIVO E IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON**

CRISTIANE BATASSINI

ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ASTROGLIAIS EM MODELOS
***IN VIVO E IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON**

CRISTIANE BATASSINI

ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES

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

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Batassini, Cristiane

Avaliação de parâmetros astrogliais em modelos in vivo e in vitro da doença de Parkinson / Cristiane Batassini. -- 2015.

88 f.

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. doença de Parkinson. 2. astrócitos. 3. S100B. 4. GFAP. I. Gonçalves, Carlos Alberto Saraiva, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, CA, pela oportunidade de fazer meu doutorado no Lab 33. Agradeço pela amizade, por estar sempre presente, mostrando novas possibilidades e enxergando tudo sempre com muito otimismo. Por fazer do laboratório um espaço não apenas de aprendizado e crescimento pessoal, mas também um lugar onde brotam grandes amizades. É um grande exemplo de dedicação e de amor pela ciência. CA, sou muito grata por tudo que aprendi contigo!

Agradeço a todos os colegas de laboratório com os quais tive o prazer de conviver ao longo desses anos. Agradeço pelo companheirismo nos experimentos, pelas discussões sobre ciência e sobre a vida. Obrigada por serem sempre muito prestativos e amigos e por fazerem do laboratório um ambiente muito agradável. Por tornarem os dias de experimento mais produtivos e tranquilos. Por terem sempre uma palavra amiga, uma piada e uma solução para tudo! Tenho ótimas lembranças do convívio com cada um.

Deixo meu agradecimento especial aos colegas que participaram diretamente do meu trabalho. Quero agradecer à Núbia, pela amizade e companheirismo. Ao Lucas, por me ensinar a questionar e enxergar novos pontos de vista. À Milene por ser uma amiga sempre presente, mesmo quando distante. À Caro, pela dedicação e bondade. À Pati, por sentar comigo inúmeras vezes, me ensinar muito e me ajudar a resolver problemas, sempre dando ótimos conselhos. Sou muito grata a vocês, queridos amigos!

Agradeço à professora Marina, por ter me dado a oportunidade de trabalhar e aprender com ela. Por estar sempre disponível. Pela visão crítica e prática, sempre muito dedicada. À Fafá e à Carol, pela ajuda com as culturas. Foi um prazer imenso trabalhar com vocês. Sempre eficientes e comprometidas.

Ao meu pai e minha mãe, por sempre me apoiarem nas minhas decisões. À minha mãe, por sempre ouvir minhas preocupações, incertezas e alegrar-se com cada pequena conquista. À minha irmã, Érica, pelo companheirismo de sempre, pelas conversas e opiniões, que sempre me fizeram refletir. Ao Thales, meu namorado, pela imensa paciência que teve comigo. Obrigada pela companhia maravilhosa e pela tele-entrega de abraços nas horas em que mais precisei. Às minhas amigas, pelo incentivo e por entenderem minhas ausências.

Aos funcionários da Secretaria, em especial à Cléia, por estarem sempre disponíveis e por serem sempre muito eficientes. Aos funcionários do Biotério, por todo apoio, dedicação e disponibilidade.

À UFRGS e ao PPG Bioquímica, por possibilitarem a realização deste trabalho e todo o meu aprendizado durante o Doutorado. Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro através da bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
INTRODUÇÃO	1
1. Doença de Parkinson	1
1.1 Modelos	5
2. Astrócitos	10
2.1 GFAP	12
2.2 S100B	13
OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
CAPÍTULO I	19
CAPÍTULO II	29
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1	76
ANEXO 2	78

RESUMO

Tanto a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) quanto a proteína S100B têm sido utilizadas como marcadores de plasticidade astrogial, particularmente em danos encefálicos; entretanto, elas não necessariamente sofrem alterações ao mesmo tempo ou no mesmo sentido. Neste trabalho, nós induzimos um modelo da doença de Parkinson (DP) através de injeções intraestriatais de 6-OHDA em ratos e investigamos as alterações em GFAP e S100B, por meio de ELISA, na substância negra (SN), estriado e líquido cefalorraquidiano (LCR), um, sete e 21 dias após a cirurgia. O modelo experimental foi validado por meio da medida do comportamento rotacional induzido por metilfenidato e conteúdo da enzima tirosina-hidroxilase (TH) na SN e estriado. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que se mostra a dosagem de S100B e GFAP no LCR no modelo de 6-OHDA. Foi identificada uma gliose no estriado (com base no aumento de GFAP), mas tal alteração não foi identificada na SN. Identificamos um aumento transitório de S100B e GFAP, no 1º e 7º dias após a cirurgia, respectivamente. Esta alteração inicial de S100B no LCR aparentemente está relacionada à lesão mecânica. Entretanto, em culturas de astrócitos, confirmamos a indução da secreção de S100B provocada por 6-OHDA. A toxina dopaminérgica MPTP também foi capaz de aumentar a secreção. Estes dados apontam para um efeito direto das toxinas 6-OHDA e MPTP nas células gliais. Também testamos o efeito destas toxinas em fatias estriatais frescas. Porém, neste tipo de preparação, não foram capazes de induzir a secreção de S100B, em 1h. O conteúdo intracelular de S100B e GFAP não foi alterado. Os dados apresentados reforçam a utilização destas toxinas em modelos da DP, além de indicar a importância da proteína S100B como um marcador útil nesta doença.

ABSTRACT

Both glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B have been used as markers of astroglial plasticity, particularly in brain injury; however, they do not necessarily change in the same time frame or direction. Herein, we induced a Parkinson's disease (PD) model via a 6-OHDA intrastriatal injection in rats and investigated the changes in GFAP and S100B using ELISA in the substantia nigra (SN), striatum, and cerebrospinal fluid on the 1st, 7th, and 21st days following the injection. The model was validated using measurements of rotational behaviour induced by methylphenidate and tyrosine hydroxylase in the dopaminergic pathway. To our knowledge, this is the first measurement of cerebrospinal fluid S100B and GFAP in the 6-OHDA model of PD. Gliosis (based on a GFAP increase) was identified in the striatum, but not in the SN. We identified a transitory increment of cerebrospinal fluid S100B and GFAP on the 1st and 7th days, respectively. This initial change in cerebrospinal fluid S100B was apparently related to the mechanical lesion. However, the 6-OHDA-induced S100B secretion was confirmed in astrocyte cultures. MPTP also increased S100B secretion in astrocyte cultures. These data point to a direct effect of the toxins 6-OHDA and MPTP on glial cells evaluated by S100B secretion. Under these conditions acute striatal slices did not secrete S100B in response to these toxins. No direct changes were observed in the cellular content of S100B or GFAP. In summary, these data reinforce the use of these toxins in PD models, as well as indicate the importance of the glial-derived protein S100B as useful marker in PD

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina

COX-2: ciclooxigenase 2

DA: dopamina

DAT: transportador de dopamina

DP: Doença de Parkinson

ERO: espécies reativas de oxigênio

FPM: feixe prosencefálico medial

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-6: interleucina-6

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

LCR: líquido cefalorraquidiano

LDH: lactato desidrogenase

LPS: lipopolissacarídeo

MAO-B: monoamina oxidase-B

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NSE: enolase específica do neurônio

SN: substância negra

SNC: sistema nervoso central

TH: tirosina-hidroxilase

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

INTRODUÇÃO

1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando mais de 1% da população mundial acima de 65 anos (Ozansoy & Başak 2012). No Brasil, foi relatada uma prevalência de 3% na população acima de 65 anos (Barbosa et al. 2006). Com o aumento da expectativa de vida, há uma tendência de aumento na prevalência desta doença.

É uma doença progressiva cujos principais sinais clínicos são os prejuízos motores, como bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural (Fahn 2003). Embora os sintomas motores sejam os mais proeminentes, os pacientes também apresentam fadiga, depressão, ansiedade, distúrbios do sono e constipação. Alterações comportamentais também são comuns e incluem alterações de humor, redução da motivação e apatia, lentidão no pensamento, além de um declínio de cognição que pode progredir para demência (Lees et al. 2009).

Os sintomas motores decorrem da morte de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SN), com consequente depleção de dopamina no estriado, onde estão os terminais nervosos destes neurônios. Também acontece uma redução de neuromelanina, normalmente presente nos neurônios dopaminérgicos desta estrutura. A marca patológica da doença consiste na presença de inclusões citoplasmáticas chamadas de corpos de Lewy, nos neurônios sobreviventes (Fahn 2003). Os corpos de Lewy contêm muitas proteínas, incluindo a forma fibrilar da α -sinucleína (Dauer & Przedborski 2003).

A DP foi descrita em 1817 por James Parkinson, após a observação dos sinais clínicos em seis indivíduos (Fahn 2003). Porém, o envolvimento da SN só foi descrito em

1919 por Konstantin Tretiakoff. Em 1959 Carlsson sugeriu o envolvimento da dopamina na doença (Carlsson 1959).

A SN, através da via nigroestriatal, libera dopamina no estriado, modulando a atividade dos núcleos da base. A expressão “núcleos da base” refere-se a vários núcleos subcorticais, incluindo o corpo estriado (caudado e putâmen), a parte externa do globo pálido, a parte interna do globo pálido, o núcleo subtalâmico e a SN (Svenningsson et al. 1999), que são importantes para o controle e iniciação dos movimentos (Marsden & Obeso 1994), bem como para o aprendizado de habilidades motoras e o surgimento de hábitos (Graybiel 1995). Os componentes motores dos núcleos da base supervisionam a atividade dos neurônios motores superiores.

A consequência da perda de neurônios nigroestriatais é a alteração da fisiologia no estriado. O estriado contém receptores do tipo D1 e D2. Sabe-se que a dopamina é excitatória nos receptores D1 e inibitória nos receptores D2 (Figura 1). A deficiência de dopamina nestes receptores resulta na alteração da circuitaria dos núcleos da base: atividade excessiva do núcleo subtalâmico e globo pálido interno e aumento da inibição no tálamo e córtex cerebral (Richardson et al. 1997). Como consequência, o comportamento motor passa a apresentar os prejuízos característicos da doença.

A grande maioria dos casos de PD é esporádica. A etiologia da DP ainda é desconhecida, envolve uma interação complexa entre fatores ambientais e genéticos. Sabe-se que o estresse oxidativo tem participação importante, com a formação de dopamina quinona. Também já foram descritos prejuízos na degradação de proteínas, prejuízos na função mitocondrial, alterações inflamatórias, produção de citocinas e aumento de apoptose (Dauer & Przedborski 2003). Algumas evidências apontam o papel da epigenética no desenvolvimento e progressão da DP (Feng et al. 2014).

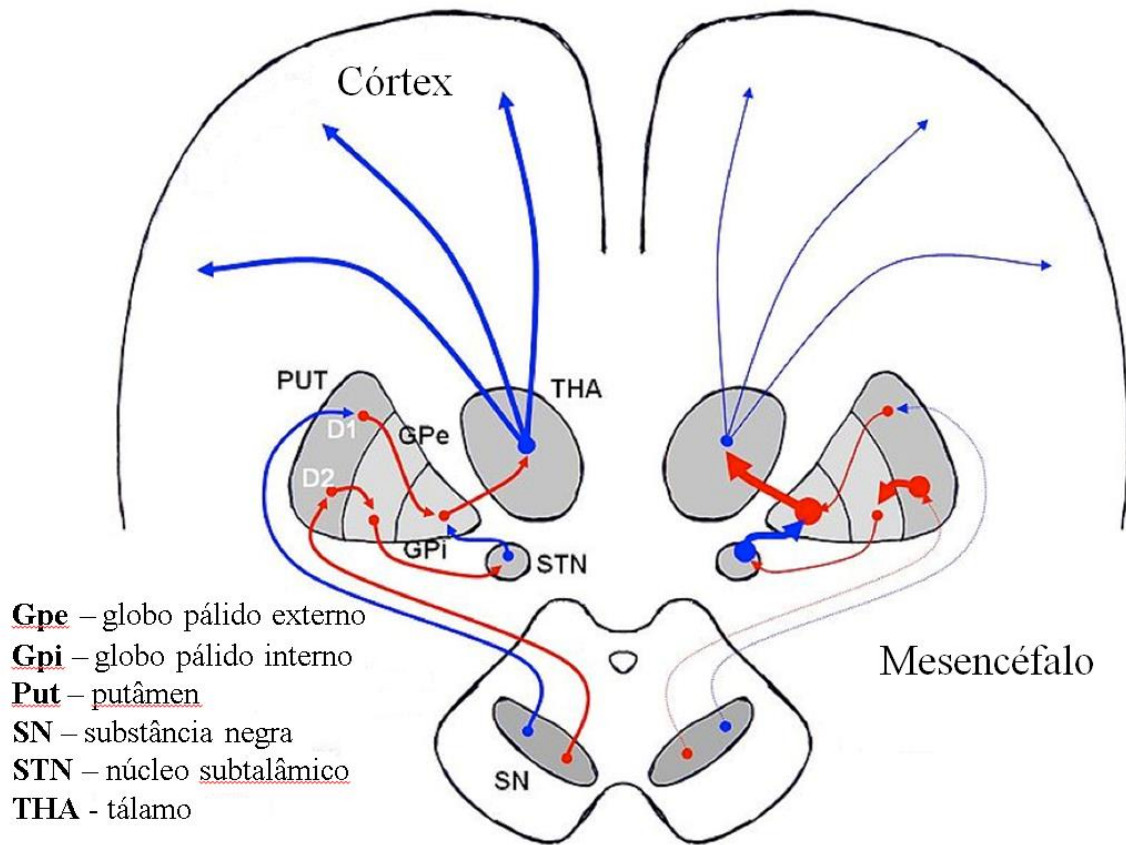


Figura 1. Esquema da circuitaria dos núcleos da base, mostrando funcionamento normal, no lado esquerdo e funcionamento na doença de Parkinson, no lado direito. Em vermelho estão representadas vias inibitórias e em azul, vias excitatórias. Os neurônios dopaminérgicos da substância negra produzem dopamina, a qual é liberada no estriado (putâmen). No estriado, a dopamina liga-se aos receptores D1, na via direta, e aos receptores D2, na via indireta, facilitando o movimento. Figura adaptada de: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DA-loops_in_PD.svg?uselang=fr (acesso em 26/05/2015).

Dados sugerem que a DP seja a expressão do envelhecimento em uma população de células que, em função das suas características, são altamente vulneráveis (Rodriguez et al. 2015). Sabe-se que a SN apresenta grande número de terminais sinápticos e axônios

desmielinizados, níveis elevados de ferro e conteúdo reduzido de glutatona (Sulzer 2007). Tais aspectos fazem com que estes neurônios sejam bastante suscetíveis ao estresse oxidativo.

Além disso, a dopamina possui um grande potencial para produzir neurotoxicidade. Isso porque pode sofrer oxidação dando origem a quinonas, as quais parecem ter um papel na degeneração dos neurônios dopaminérgicos. A formação de quinonas durante a oxidação da dopamina pode resultar na formação de neuromelanina, um processo normal e evidenciado pelo aumento de neuromelanina ao longo dos anos, em todas as pessoas (Zecca et al. 2002). No entanto, as quinonas derivadas da dopamina também podem causar toxicidade, levando à morte neuronal (Segura-Aguilar & Kostrzewa 2015).

Os tratamentos disponíveis não são capazes de impedir ou retardar a progressão da doença. A terapia de reposição de dopamina é o principal tratamento e uma variedade de agentes dopaminérgicos está disponível (Connolly & Lang 2014). Além do tratamento farmacológico, as técnicas de estimulação elétrica têm sido aprimoradas e consistem na estimulação do globo pálido interno ou do núcleo subtalâmico, numa tentativa de melhorar o funcionamento da circuitaria dos núcleos da base (Fahn 2003).

Uma vez que existem mecanismos compensatórios, como a supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos, os sintomas da DP aparecem apenas quando já ocorreu uma redução de aproximadamente 80% na concentração de dopamina no putâmem ou uma perda de 60% de neurônios dopaminérgicos na SN (Fahn 2003).

Além da perda de neurônios dopaminérgicos, a DP também envolve uma disfunção nas células gliais (Halliday et al. 2011), conhecida como gliose. A gliose é uma característica neuropatológica de muitas doenças do encéfalo. Várias linhas de pesquisa

indicam que tal processo pode exercer efeitos diferentes dependendo da situação, podendo ser tanto benéfico quanto prejudicial (Teismann et al. 2003).

O envolvimento das células gliais na DP tem sido cada vez mais estudado nos últimos anos. Busca-se entender os mecanismos envolvidos, ou seja, qual o papel destas células no início e progressão da doença e de que maneira interagem com os neurônios que sofrem degeneração. À medida que novas evidências vão surgindo, as células gliais têm sido apontadas como alvo potencial de estratégias terapêuticas, além de fonte de marcadores biológicos.

1.1 Modelos

Sendo a DP uma doença multifatorial, o desenvolvimento de diferentes abordagens de estudo facilita na busca pelos mecanismos da doença. Existem modelos baseados em alterações genéticas, ou seja, modelos transgênicos baseados na criação de linhagens de animais que tenham a expressão ou deleção de genes relacionados à DP (Meredith et al. 2008). Outros modelos baseiam-se em intervenções farmacológicas e outros ainda são baseados em toxinas, capazes de provocar a morte dos neurônios dopaminérgicos. Eles têm sido desenvolvidos *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*.

Os modelos que utilizam as neurotoxinas 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) são os modelos melhor caracterizados, mais utilizados e que geraram a maior parte dos dados, em comparação aos modelos mais recentes, como os que utilizam rotenona ou paraquat (Bové & Perier 2012). As toxinas 6-OHDA e MPTP são preferencialmente metabolizadas por neurônios dopaminérgicos, nos quais seus efeitos são limitados. Possibilitaram a elucidação de muitos aspectos importantes da patogênese da doença (Elkon et al. 2004; Ferraro et al. 1986), além de possibilitarem a avaliação do potencial protetor de várias substâncias, como a guanosina

(Giuliani et al. 2012), o resveratrol (Khan et al. 2010) e as catequinas do chá verde (Leaver et al. 2009).

Essas toxinas são muito utilizadas em abordagens *in vivo*, tanto em ratos quanto em camundongos e, com menor frequência, em macacos. No entanto, a abordagem *in vitro*, em culturas de células, também tem sido bastante explorada. Os modelos *in vitro* oferecem a vantagem de se estudar o papel de células isoladas em um ambiente que simula a doença, permitindo investigar mecanismos específicos (Schlachetzki et al. 2013). A utilização de fatias encefálicas frescas também é uma alternativa e oferece a vantagem de preservar parcialmente a circuitaria neuronal e a rede ativa de astrócitos (Nagy & Li 2000).

1.1.1 6-OHDA

A toxina 6-OHDA, descoberta na década de 1960, foi a primeira a ser utilizada para modelar a DP (Segura-Aguilar & Kostrzewa 2015). Sua toxicidade é seletiva para neurônios catecolaminérgicos, uma vez que possui alta afinidade para o transportador de noradrenalina e o transportador de dopamina (DAT) (Glinka et al. 1997).

O mecanismo de ação da 6-OHDA baseia-se na indução de estresse oxidativo (Kuruvilla et al. 2013), uma vez que a toxina é bastante instável na presença de oxigênio, sofrendo auto-oxidação, além da formação de 6-OHDA-quinona. A cascata de eventos intracelulares leva então à formação de radical superóxido e geração de peróxido de hidrogênio, culminando na formação de radicais hidroxil (Segura-Aguilar et al. 2014). Importante salientar que a dopamina tem um potencial de auto-oxidação similar ao da 6-OHDA, embora numa taxa mais lenta (Segura-Aguilar & Kostrzewa 2015).

Além disso, a toxina também é capaz de aumentar a expressão de marcadores de neuroinflamação, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina -1 β (IL-1 β) e

interleucina-6 (IL-6) (Yan et al. 2014). Além disso, também é capaz de inibir os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial (Glinka & Youdim 1995).

Uma vez que a 6-OHDA não pode atravessar a barreira hematoencefálica, ela deve ser administrada através de injeção estereotáxica em algum ponto estratégico, onde possa ser captada pelos neurônios dopaminérgicos da SN. Pode ser injetada diretamente na parte compacta da SN, onde estão os corpos celulares; no feixe prosencefálico medial (FPM), onde estão os prolongamentos dos neurônios (via nigroestriatal); ou no estriado, onde estão os terminais nervosos. A lesão geralmente é feita unilateralmente e o lado contralateral pode ser utilizado como controle (Dauer e Przedborski, 2003).

O modelo de injeção unilateral de 6-OHDA é caracterizado por provocar comportamento rotacional nos animais afetados quando os mesmos recebem a administração de drogas dopaminomiméticas como a anfetamina, o metilfenidato e a apomorfina (Silvestrin et al. 2009). Isso acontece porque a lesão unilateral provoca uma assimetria na liberação de dopamina e, conseqüentemente, os animais apresentarão uma assimetria no comportamento motor, o que leva a um comportamento rotacional. A magnitude desse comportamento rotacional, ou seja, o número de giros observados, depende do grau de lesão (Przedborski et al. 1995). Assim, a lesão unilateral pode ser acessada quantitativamente (Jiang et al. 1993).

Quando agonistas dopaminérgicos como a apomorfina ou L-DOPA são administrados, o animal exhibe rotações contralaterais. Esse comportamento deve-se aos mecanismos compensatórios, que promovem um aumento de receptores dopaminérgicos no lado lesionado. Assim, os agonistas terão mais receptores para ligar-se no lado lesionado, o que leva a uma assimetria. Porém, quando são utilizadas drogas que estimulam a liberação da dopamina, como as anfetaminas, os animais apresentam rotações ipsilaterais, ou seja, em direção ao lado lesionado, em função de ocorrer maior liberação de

dopamina no lado não lesionado. O metilfenidato liga-se no transportador de dopamina e inibe a recaptação. Assim, quando administrado em ratos com lesão unilateral promove um perfil comportamental que é comparável ao perfil da anfetamina (Silvestrin et al. 2009).

1.1.2 MPTP

A toxina MPTP foi descoberta na década de 1980, como contaminante em uma substância opioide utilizada como droga de abuso na Califórnia. Dentro de poucos dias, a toxina provocou distúrbios motores permanentes nos usuários, com as mesmas características dos sinais clínicos observados na DP, inclusive responsivos à L-DOPA, tratamento utilizado na doença. A análise *post-mortem* confirmou a ocorrência de perda neural massiva na parte compacta da SN (Ballard et al. 1985). Uma vez feita a descoberta de que o MPTP causa parkinsonismo, esta neurotoxina tem sido bastante utilizada para estudar a DP.

MPTP é uma substância altamente lipofílica que facilmente passa a barreira hematoencefálica, sendo metabolizada nos astrócitos pela enzima monoamina oxidase-B (MAO-B) a MPP^+ (Figura 1), o qual é acumulado com relativa seletividade em neurônios dopaminérgicos, uma vez que é captado pelos transportadores de dopamina (DAT) (Javitch et al. 1985). Dentro dos neurônios dopaminérgicos, MPP^+ acumula-se na mitocôndria onde inibe o complexo I da cadeia respiratória, prejudicando a síntese de ATP e levando à depleção dos estoques energéticos da célula e, conseqüentemente, à morte celular (Chan et al. 1991). A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) também está envolvida nos efeitos neurodegenerativos do MPTP (Segura-Aguilar & Kostrzewa 2015).

O modelo de administração sistêmica de MPTP em camundongos é o mais utilizado. Os neurônios dopaminérgicos de ratos são relativamente resistentes ao MPTP (Bové & Perier 2012). Dessa forma, a administração sistêmica não é muito utilizada, uma

vez que a dose necessária para induzir degeneração acaba provocando alta mortalidade (Giovanni et al., 1994). No entanto, recentemente foi mostrado que a administração intranasal de MPTP promove a neurodegeneração da parte compacta da SN de ratos, além de prejuízos motores (Prediger et al., 2006).

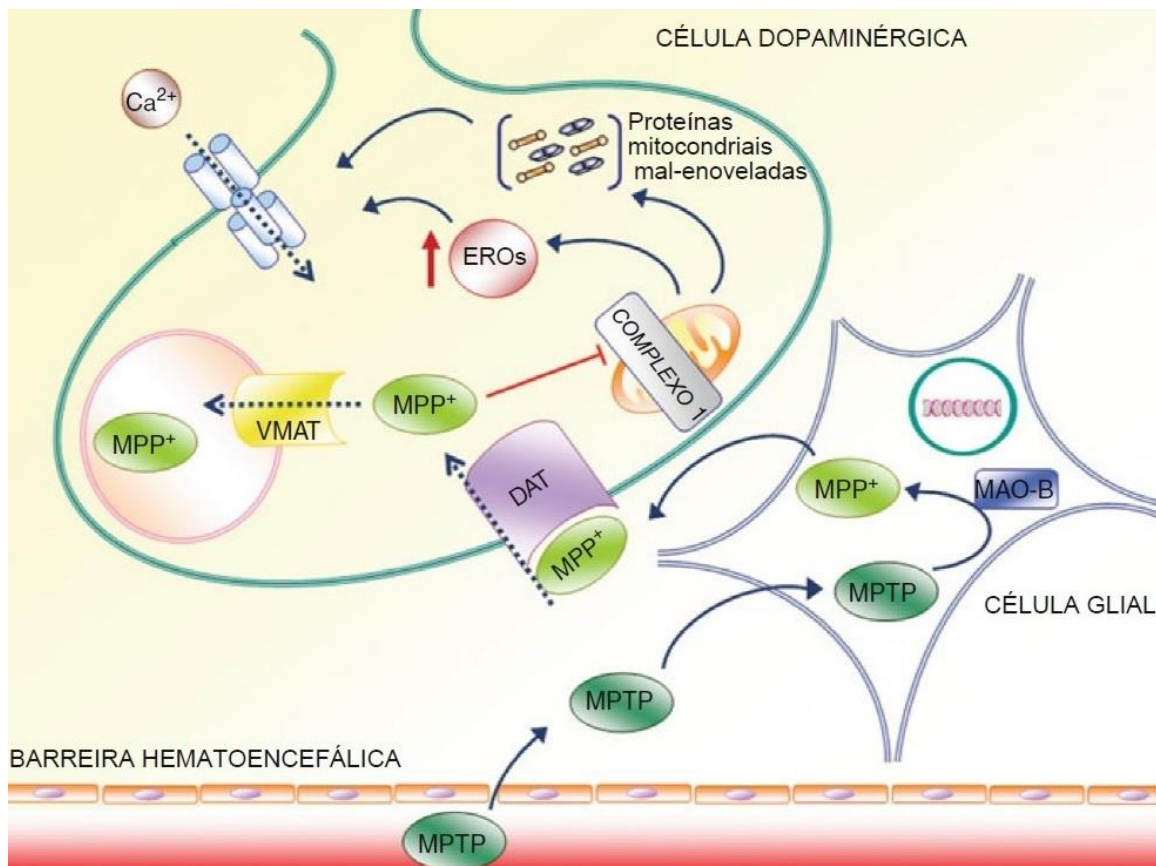


Figura 2. Mecanismo de ação do MPTP. Esta toxina passa facilmente a barreira hematoencefálica e nos astrócitos é metabolizada a MPP⁺, o qual consegue entrar nos neurônios, através do transportador de dopamina (DAT). Dentro do neurônio é capaz de inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Figura adaptada de (Pasquali et al. 2014).

2. Astrócitos

As células gliais compreendem a macroglia, que inclui os astrócitos e oligodendrócitos, e a microglia (Teismann et al. 2003). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC. Existem dois tipos de astrócitos: os astrócitos protoplasmáticos, presentes na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, presentes na substância branca (Sofroniew & Vinters 2010).

Os astrócitos foram considerados por muito tempo apenas como células de suporte para os neurônios, mas hoje se sabe que estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, incluindo controle da homeostase molecular, regulando a concentração de íons e neurotransmissores (Danbolt 2001); manutenção da homeostase metabólica (Tsacopoulos & Magistretti 1996); formação e manutenção da barreira hematoencefálica (Abbott 2005); controle do fluxo sanguíneo (Gordon et al. 2007). Também são essenciais para a transmissão e plasticidade sináptica. A estrutura consistindo de três elementos funcionais: o neurônio pré-sináptico, o neurônio pós-sináptico e o astrócito em contato com a sinapse passou a ser chamada de sinapse tripartite (Perea et al. 2009). Os astrócitos realizam suas funções graças ao posicionamento estratégico, chegando até os vasos sanguíneos, com seus pés terminais, ao mesmo tempo em que também se aproximam das sinapses, por meio de outros prolongamentos.

Os astrócitos também têm um papel importante no SNC durante situações patológicas, quando apresentam alterações morfológicas e funcionais, processo conhecido como astrogliose reativa (Papa et al. 2014). O estímulo patológico pode ser um dano agudo, como uma lesão mecânica, um trauma, isquemia, infecção, ou um dano crônico, como uma doença neurodegenerativa ou o próprio processo de envelhecimento (Escartin & Bonvento 2008). Astrócitos reativos apresentam hipertrofia dos processos celulares e

aumento na expressão de filamentos intermediários, sobretudo a proteína GFAP (Pekny & Nilsson 2005). A reatividade dos astrócitos geralmente está associada com reatividade da microglia (Escartin & Bonvento 2008).

Marcadores mais funcionais da reatividade astrocitária incluem um aumento no nível de certas citocinas, como IL-6, moléculas de adesão/reconhecimento, bem como outras proteínas geralmente associadas com efeitos deletérios, como a proteína S100B, a iNOS, e a COX-2 (Eddleston & Mucke 1993).

Alguns estudos apontam que a ativação seletiva e controlada dos astrócitos torna estas células agentes terapêuticos, promovendo a sobrevivência e recuperação dos neurônios (Escartin & Bonvento 2008). Dessa forma, a ativação dos astrócitos poderia representar uma estratégia terapêutica para muitas doenças do SNC, uma vez que os neurônios podem se beneficiar do aumento do suporte proporcionado por estas células (Escartin & Bonvento 2008). Entre os fatores benéficos da resposta glial que podem atenuar a neurodegeneração está a produção de fatores tróficos. Além disso, as células gliais também podem proteger os neurônios dopaminérgicos através da remoção dos compostos tóxicos liberados pelos neurônios que vão morrendo. Além disso, também são capazes de metabolizar dopamina e de detoxificar espécies reativas de oxigênio através da enzima glutathione peroxidase, protegendo assim os neurônios remanescentes (Teismann et al. 2003).

Porém, outro ponto de vista tem sido enfatizado nas últimas décadas e baseia-se na caracterização das alterações moleculares e estruturais que ocorrem durante a astrogliose e sugerem que estas células estejam envolvidas nas doenças neurológicas, determinando o início, progresso e o desfecho do processo patológico (Colangelo et al. 2012). Estudos apontam que doenças neurodegenerativas ativam as células microgliciais, um

processo que sustenta a ativação dos astrócitos, que por sua vez agem em outras células gliais e em neurônios, facilitando o processo neurodegenerativo (Papa et al. 2014).

Uma vez que os astrócitos podem apresentar efeitos benéficos ou prejudiciais nas células neuronais, o envolvimento da ativação astrogliar na DP é contraditório e precisa de mais estudos para ser elucidado. Sabe-se que a SN apresenta a menor densidade de astrócitos do encéfalo, o que poderia explicar a sua específica vulnerabilidade aos fatores de estresse.

2.1 GFAP

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é o principal filamento intermediário de astrócitos maduros. Tem sido utilizada como um marcador para identificação dos astrócitos em imunistoquímica (Sofroniew & Vinters 2010). Durante o processo de astrogliose ocorre um aumento rápido da síntese desta proteína (Gottfried et al. 1999). Sua expressão aumenta durante degeneração e também durante o envelhecimento (Middeldorp & Hol 2011).

Vários estudos descrevem a relação entre a DP e a expressão de GFAP e existem resultados conflitantes. Alguns autores (Banati et al. 1998; Mirza et al. 1999) não encontraram diferença na marcação para GFAP entre pacientes diagnosticados com DP e controles, em avaliação feita na SN e em outras áreas. Damier et al. (1993), por outro lado, mostrou um aumento na densidade de células positivas para GFAP na SN, aumento este relacionado com a severidade da perda neuronal. Medidas feitas no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes não encontraram alteração em relação aos controles (Abdo et al. 2004; Holmberg et al. 1998).

Em modelos animais com administração de 6-OHDA ou MPTP está claro o aumento de GFAP nas diferentes estruturas encefálicas envolvidas na degeneração - na SN

e no estriado, evidenciando a participação dos astrócitos no processo de degeneração (Tabela 1). No entanto, ainda não está claro em que momento eles tornam-se reativos, se fazem parte do início ou da progressão da doença.

2.2 S100B

S100B é uma proteína ligante de Ca^{2+} , expressa e secretada por astrócitos (Marenholz et al. 2004). Pertence à família de proteínas S100, as quais são caracterizadas pela alta solubilidade (Donato 2001). A sua estrutura é homodimérica e as duas subunidades são unidas por meio de ligações não-covalentes. Cada monômero tem dois sítios de ligação para o Ca^{2+} (Heizmann et al. 2002). Esta proteína tem muitos alvos intracelulares e quando secretada pode ter efeitos autócrinos e parácrinos na glia, nos neurônios e microglia (Gonçalves et al. 2008).

Alguns alvos intracelulares propostos incluem proteínas do citoesqueleto, como GFAP, moduladores do ciclo celular, proteína cinase C e fosfatase 2B (calcineurina). Estes alvos estão envolvidos na plasticidade do citoesqueleto, na regulação da proliferação, da sobrevivência e diferenciação celular (Donato et al. 2009).

É secretada por mecanismos desconhecidos e, em cultura, seus efeitos extracelulares dependem da concentração, sendo neurotrófica em baixas concentrações (doses nM) e apoptótica em altas concentrações (doses μM) (Donato 2003). Sabe-se que, uma vez no meio extracelular, pode se ligar ao receptor RAGE, o qual faz a transdução dos efeitos desta proteína, tanto os benéficos quanto os prejudiciais.

Em concentrações nanomolares, S100B é capaz de proteger os neurônios de estímulos tóxicos através de ligação no receptor RAGE e ativação do fator anti-apoptótico Bcl-2. Dessa forma, acredita-se que a S100B seja capaz de exercer efeitos neurotróficos durante estágios iniciais de danos encefálicos (Donato et al. 2009). A proteína S100B

também pode exercer um efeito protetor indireto em neurônios, por exemplo, estimulando a captação de glutamato pelos astrócitos (Tramontina et al. 2006).

Já em concentrações micromolares, S100B exerce efeitos tóxicos, também por meio de ligação ao receptor RAGE. Nos neurônios, promove aumento da produção de ERO, (Businaro et al. 2006). Nos astrócitos, promove produção e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , além de aumentar a expressão de iNOS (Hu et al. 1996; Hu & Van Eldik 1999; Ponath et al. 2007). Em altas doses, S100B é capaz de ativar a microglia, contribuindo com a resposta inflamatória no encéfalo.

Embora o mecanismo de secreção não seja conhecido, já foram descritos muitos moduladores da secreção, utilizando culturas de astrócitos ou fatias hipocâmpais. A secreção é estimulada por condições de estresse metabólico como elevadas concentrações de glutamato (Büyükuysal 2005), glicose (Nardin et al. 2007) ou amônia (Leite et al. 2006). Também foi mostrado que o LPS, um componente da parede celular de bactérias, utilizado experimentalmente para estimular respostas inflamatórias, estimula a secreção de S100B (Guerra et al. 2011).

O conteúdo extracelular de S100B tem sido proposto como um marcador de ativação astrogliar em doenças do SNC. Alterações no conteúdo de S100B no LCR ou soro têm sido associadas com várias situações de dano encefálico crônico ou agudo ou com condições de neurodegeneração (Eldik & Wainwright 2003). Sabe-se que os níveis de S100B estão elevados em traumas (McKeating et al. 1998), isquemia (Kim et al. 1996) e doenças neurodegenerativas (Griffin et al. 1998; Otto et al. 1997). A droga pentamidina, capaz de bloquear a atividade de S100B, exerce um efeito anti-inflamatório em um modelo de colite aguda em camundongos, mostrando o envolvimento desta proteína no processo inflamatório (Esposito et al. 2012).

Resultados da avaliação do conteúdo de S100B no LCR em pacientes com DP são conflitantes. Em dois estudos não foram encontradas alterações (Abdo et al. 2004; Abdo et al. 2007), porém, um estudo mais recente apontou para um aumento deste marcador (Sathe et al. 2012).

Investigações *post-mortem* apontaram que a proteína S100B está elevada na SN de pacientes com DP, assim como está elevada na SN de camundongos tratados com MPTP. O mesmo trabalho mostra que animais nocautes para esta proteína apresentaram redução do conteúdo de TNF- α e da microgliose, resultando em neuroproteção (Sathe et al. 2012).

A tabela 2 mostra as alterações de S100B em modelos animais da DP. Podemos ver que o aumento no conteúdo de S100B já foi visto em vários trabalhos que fizeram uso de MPTP. No entanto, ainda há poucos e contraditórios dados mostrando a alteração desta proteína no modelo de 6-OHDA. Além disso, até a realização deste trabalho, nada se sabia sobre o efeito destas toxinas na secreção da proteína S100B.

Tabela 1. Alterações de GFAP em modelos animais da doença de Parkinson.

Modelo	Via de administração	Alterações	Tempo em que foi realizada a avaliação (após a lesão)	Referências
Rato Wistar – 6-OHDA	SN	↑GFAP na SN e estriado	48 dias	(Ramírez-García et al. 2015)
Rato Wistar – 6-OHDA	estriado	↑GFAP no estriado	7 dias	(Tripanichkul & Jaroensuppaperch 2013)
Rato Sprague Dawley - 6-OHDA	FPM	↑GFAP no estriado	8	(Carbone et al. 2012)
Rato Wistar – 6-OHDA	FPM	↑GFAP no estriado	32	(Dutra et al. 2012)
Rato Wistar – 6-OHDA	estriado	↑GFAP na SN e estriado	14	(V. Gomide et al. 2005)
Rato Sprague Dawley – 6-OHDA	estriado	↑GFAP na SN	14	(Thornton et al. 2010)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑GFAP na SN	22; 38	(Patil et al. 2014; Selvakumar et al. 2014)

Tabela 2. Alterações de S100B em modelos animais da doença de Parkinson.

Modelo	Via de administração	Alterações	Tempo em que foi realizada a avaliação (após a lesão)	Referências
Rato Wistar - 6-OHDA	estriado	↑ S100B no estriado e SN	–	(Gomide & Chadi 2005; Chadi & Gomide 2004)
Rato Fischer – 6-OHDA	FPM	Não foram detectadas alterações em S100B. Porém, foi observado aumento de GFAP no estriado.	0, 2, 4, 7 e 14 dias	(Gordon et al. 1997)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑ S100B na SN	8 dias	(E. Esposito et al. 2012)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑ S100B no estriado e SN	Estriado: 0 e 2 dias SN: dia 0	(Teismann et al. 2012)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑ S100B na SN	0	(Sathe et al. 2012)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑ S100B no estriado	5 semanas	(Al-Jarrah & Jamous 2011)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑ S100B no estriado e SN	Estriado: 3 e 7 dias SN: 1, 3 e 7 dias	(Watanabe et al. 2008)
Camundongo - MPTP	i.p.	↑ S100B na SN	3 dias	(Muramatsu et al. 2003)

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a flutuação dos marcadores gliais S100B e GFAP em modelos *in vivo* e *in vitro* da DP, baseados na utilização das toxinas dopaminérgicas 6-OHDA e MPTP.

Objetivos específicos

Em animais com lesão estriatal unilateral provocada por 6-OHDA:

- Realizar a validação do modelo animal através do teste de rotações induzidas por Metilfenidato e de imunistoquímica para a enzima tirosina-hidroxilase (TH) no estriado e SN.
- Medir o conteúdo de S100B e GFAP no estriado e SN.
- Medir os níveis de S100B e GFAP no LCR.

Em culturas primárias de astrócitos, expostas às toxinas 6-OHDA e MPTP:

- avaliar o conteúdo intracelular de S100B e GFAP;
- avaliar a secreção de S100B.

Em fatias de estriado:

- fazer a caracterização e padronização da secreção de S100B;
- avaliar a secreção basal;
- avaliar a secreção e conteúdo intracelular de S100B após exposição das fatias às toxinas 6-OHDA e MPTP.

CAPÍTULO I

Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B

Cristiane Batassini, Núbia Broetto, Lucas Tortorelli, Milene Borsoi, Caroline Zanotto, Fabiana Galland, Tadeu Mello e Souza, Marina Concli Leite, and Carlos-Alberto Gonçalves

Artigo aceito para publicação no periódico *Neural Plasticity*.

Research Article

Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B

Cristiane Batassini,¹ Núbia Broetto,² Lucas Tortorelli,¹ Milene Borsoi,² Caroline Zanotto,¹ Fabiana Galland,¹ Tadeu Mello e Souza,² Marina Concli Leite,¹ and Carlos-Alberto Gonçalves^{1,2}

¹Biochemistry **Postgraduate** Program, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Neuroscience **Postgraduate** Program, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Correspondence should be addressed to Carlos-Alberto Gonçalves; casg@ufrgs.br

Received 9 January 2015; Revised 2 March 2015; Accepted 3 March 2015

Academic Editor: Giovanni Cirillo

Copyright © Cristiane Batassini et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Both glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B have been used as markers of astroglial plasticity, particularly in brain injury; however, they do not necessarily change in the same time frame or direction. Herein, we induced a Parkinson's disease (PD) model via a 6-OHDA intrastriatal injection in rats and investigated the changes in GFAP and S100B using ELISA in the substantia nigra (SN), striatum, and cerebrospinal fluid on the 1st, 7th, and 21st days following the injection. The model was validated using measurements of rotational behaviour induced by methylphenidate and tyrosine hydroxylase in the dopaminergic pathway. To our knowledge, this is the first measurement of cerebrospinal fluid S100B and GFAP in the 6-OHDA model of PD. Gliosis (based on a GFAP increase) was identified in the striatum, but not in the SN. We identified a transitory increment of cerebrospinal fluid S100B and GFAP on the 1st and 7th days, respectively. This initial change in cerebrospinal fluid S100B was apparently related to the mechanical lesion. However, the 6-OHDA-induced S100B secretion was confirmed in astrocyte cultures. Current data reinforce the idea that glial changes precede neuronal damage in PD; however, these findings also indicate that caution is necessary regarding the interpretation of data in this PD model.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a very common, progressive, and socially important neurodegenerative disorder. It is caused by loss of catecholaminergic dopamine-producing neurons in the *substantia nigra* (SN) *pars compacta* and the consequent reduction in striatal dopamine levels [1]. The intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is widely used to investigate PD pathogenesis and mechanisms of neuronal death and to evaluate therapeutic strategies for PD because it induces the loss of the dopaminergic nigrostriatal pathway [2].

In addition to the primary characteristic loss of neurons, PD also involves astrocyte dysfunction [3]. Glial cells are the targets of therapeutic interventions in many neurodegenerative disorders, including PD [4–6]. Protein and mRNA expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), the most

used astrocyte marker for injury, supports astroglial involvement in PD and experimental models induced by 6-OHDA [7, 8]. More recently, it has been proposed that dopaminergic neuronal death could be a result of the production/release of neurotoxins from astrocytes, such as glutamate, S100B, cytokines, and reactive oxygen and nitrogen species (e.g., [9–11]).

Both GFAP and S100B have been used as astrocyte markers of brain injury; however, they do not necessarily change in the same time or direction. A better understanding of the glial involvement in dopaminergic degeneration model will allow us to improve our data interpretation regarding PD. Thus, our aim was to investigate the changes in GFAP and S100B in the SN, striatum, and cerebrospinal fluid (CSF) on the 1st, 7th, and 21st days following the striatal injection of 6-OHDA in rats. We observed that glial changes precede neuronal damage, based on the content of tyrosine-hydroxylase (TH),

a marker for dopaminergic neurons. Moreover, interestingly, the initial change in CSF S100B was apparently more related to the mechanical lesion of the model than 6-OHDA toxicity.

2. Methods

2.1. Animals. Wistar rats were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food and water.

All animal experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications no. 80-23) and followed the regulations of the local animal house authorities (UFRGS, no. 23422).

2.2. Surgery Procedures. To analyse the *in vivo* effect of the toxin 6-OHDA, seventy-two adult male rats (300–380 g, 110 days old) were divided into two groups: sham/vehicle ($n = 36$) and 6-OHDA ($n = 36$) groups. Behaviour and biochemical analyses were performed on day 1 ($n = 12$ per group), day 7 ($n = 12$), or day 21 ($n = 12$) after surgery. Half of the animals of each group, in each time point, was used for behaviour analysis and immunohistochemistry, and the other half was used for biochemical analysis (after CSF collecting and brain dissection) to evaluate the contents of S100B, GFAP, and TH.

The rats were anaesthetised with equithesin (3 mL/kg; i.p.; 2.12 g of chloral hydrate, 0.48 g of pentobarbital, 1.08 g of MgSO_4 , 21.4 mL of propylene glycol, and 5.74 mL ethanol and water, q.s.p. 50 mL) and placed in a stereotaxic apparatus. The animals subsequently received three injections of vehicle (sham-group; 0.2% ascorbic acid/0.9% NaCl saline solution; 6 μL) or 6-OHDA (21 μg , 6 μL ; Sigma, 162957, USA) into the right striatum over 20 min. For each injection, 2 μL was infused, 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, according to the following coordinates: AP: 0 mm, LL: -2.8 mm, and DV: 0 mm from the Bregma; AP: -0.5 mm, LL: -3.9 mm, and DV: -6.0 ; and AP: -1.2 mm, LL: -4.1 mm, and DV: -6 mm; incisor bar: 0 [12]. An injection needle attached to a 10 μL microsyringe (Hamilton, 701N, USA) and an infusion pump (Insight, Brazil) was used. The needle was kept in the brain for 4 min after each infusion to allow drug diffusion. The rats received postoperative care until they were awake and were returned to their home cages.

2.3. Rotational Activity Analysis. One, seven, or 21 days after the surgical procedure, the animals were challenged with 40 mg/kg of methylphenidate i.p. (Ritalina, Novartis, Brazil) [13] and immediately placed in an 80 cm diameter circular arena for 30 min. The numbers of rotations were recorded.

2.4. Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed according to Brolese and coworkers [14]. The rats were anaesthetised as previously described and perfused through the left cardiac ventricle using a peristaltic pump (Milan, Brazil) with 0.9% NaCl solution followed by 4%

paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. The brains were removed and left for postfixation in the same fixative solution at 4°C for 24 h. The material was subsequently cryoprotected by immersing the brain in 15 and 30% sucrose in PBS at 4°C . Then, the brains were frozen by immersion in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored in a freezer (-80°C) for subsequent analyses. The brains were sectioned in coronal plane (45 μm) on a cryostat (Leica). The free-floating sections that contained the striatum (between 0 and -1 mm from Bregma [15]) or SN (between -5 and -6 mm from bregma [15]) were then incubated with polyclonal anti-GFAP from rabbit (Dako, Z0334, Denmark) or anti-TH from rabbit (Millipore, AB152, Germany), respectively, diluted 1:3000 in 0.4% PBS-Triton X-100 and 2% bovine serum albumin (BSA), for 48 h at 4°C . After washing several times with PBS, the tissue sections were incubated with Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit-IgG; green fluorescence; Invitrogen, A11008) at room temperature for 1 h. Alexa Fluor secondary antibody was diluted 1:500 in 0.4% PBS-Triton X-100 and 2% BSA. The sections were then washed several times, mounted on slides with FluorSave (Calbiochem), and covered with coverslips. Images were viewed with a Nikon microscope and transferred to a computer with a digital camera.

2.5. Cerebrospinal Fluid, Blood, and Brain Samples. In the second set after surgery, the animals were anaesthetised as previously described and then positioned in a stereotaxic holder; the CSF was obtained by cisterna magna puncture. The animals were subsequently sacrificed by decapitation. The brains were removed, placed in cold PBS, and the striatum and ventral midbrain area, which contained the SN, were removed by free-hand dissection. SN was dissected as described by Ding and coworkers [16]. Briefly, a 0.8–1.0 mm thick coronal section of the mesencephalon was made using a scalpel and regions containing SN *pars compacta* were isolated. After being removed, striatum was sliced (0.3 mm) using a McIlwain tissue chopper. SN was not sliced, due to the reduced size. The SN, striatum slices, and CSF were frozen (-80°C) until further analysis.

2.6. Western Blotting. The brain samples were homogenised and equal amounts (20 μg) of proteins from each sample were boiled in sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) b-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, and 0.002% (w/v) bromophenol blue) and electrophoresed in 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane [17]. The monoclonal antibody anti-TH (Sigma, T1299, USA) was used at a dilution of 1:1000. Following incubation with the primary antibody overnight at 4°C , the membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin (IgG) at a dilution of 1:2000. The chemiluminescent reactions were developed using luminol as the substrate (ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Brazil) and registered on radiographic film. The immunoccontent of TH was determined as a ratio of the optical density (OD) of the

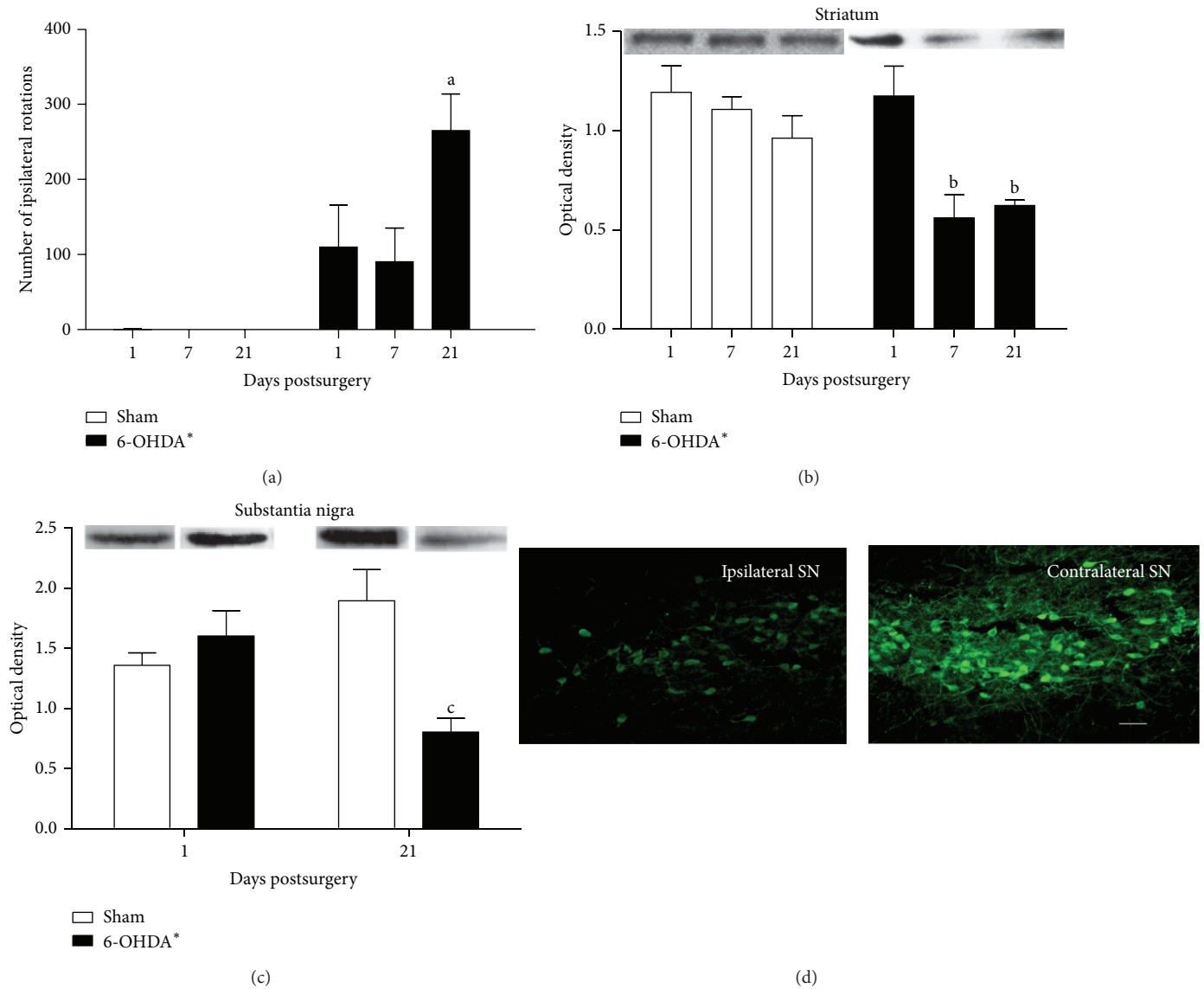


FIGURE 1: Rotational behaviour and tyrosine-hydroxylase immunocontent in rats administered an intrastriatal 6-OHDA injection. (a) the number of ipsilateral rotations after a methylphenidate challenge. Tyrosine-hydroxylase immunocontent in the striatum (b) and substantia nigra (c) at 1st, 7th, or 21st days after 6-OHDA intrastriatal administration. The striatum and substantia nigra were dissected and homogenized for the measurement of the tyrosine-hydroxylase by Western Blotting analysis. Each value represents the mean \pm standard error from at least 4 rats per group. *The 6-OHDA-group is significantly different than the sham/vehicle-group (two-way ANOVA, $P < 0.05$), in (a), (b), and (c). ^aDifferent from 6-OHDA-lesioned rats at days 1 and 7; ^bdifferent from 6-OHDA-group at 1 day; ^cdifferent from 6-OHDA-group 1 day after and different, from sham-group 21 days after surgery (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, $P < 0.05$). Panel (d) shows a representative TH-immunohistochemistry for dopamine-producing cells in the ipsilateral and contralateral sides of the substantia nigra (SN) *pars compacta* in a 6-OHDA-lesioned rat 21 days after surgery. Scale bar = 10 μ m.

protein band (TH)/OD of the β -actin band. The bands were quantified using Scion Image software [14].

2.7. Cell Cultures. Primary astrocyte cultures were prepared from eight Wistar rats (1-2 days old) to evaluate 6-OHDA *in vitro* effect on secretion and intracellular content of S100B.

Astrocyte cultures were prepared as previously described [18]. Fetal calf serum (FCS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and other materials for cell culture were

purchased from Gibco (USA). Briefly, the cerebral cortices of new-born Wistar rats were removed and mechanically dissociated in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free balanced salt solution, pH 7.4, which contained (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.27 Na_2HPO_4 , 1.1 KH_2PO_4 , and 6.1 glucose. The cortices were cleaned of meninges and mechanically dissociated via sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1400 RPM for 5 min, the pellet was resuspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.39 mM HEPES,

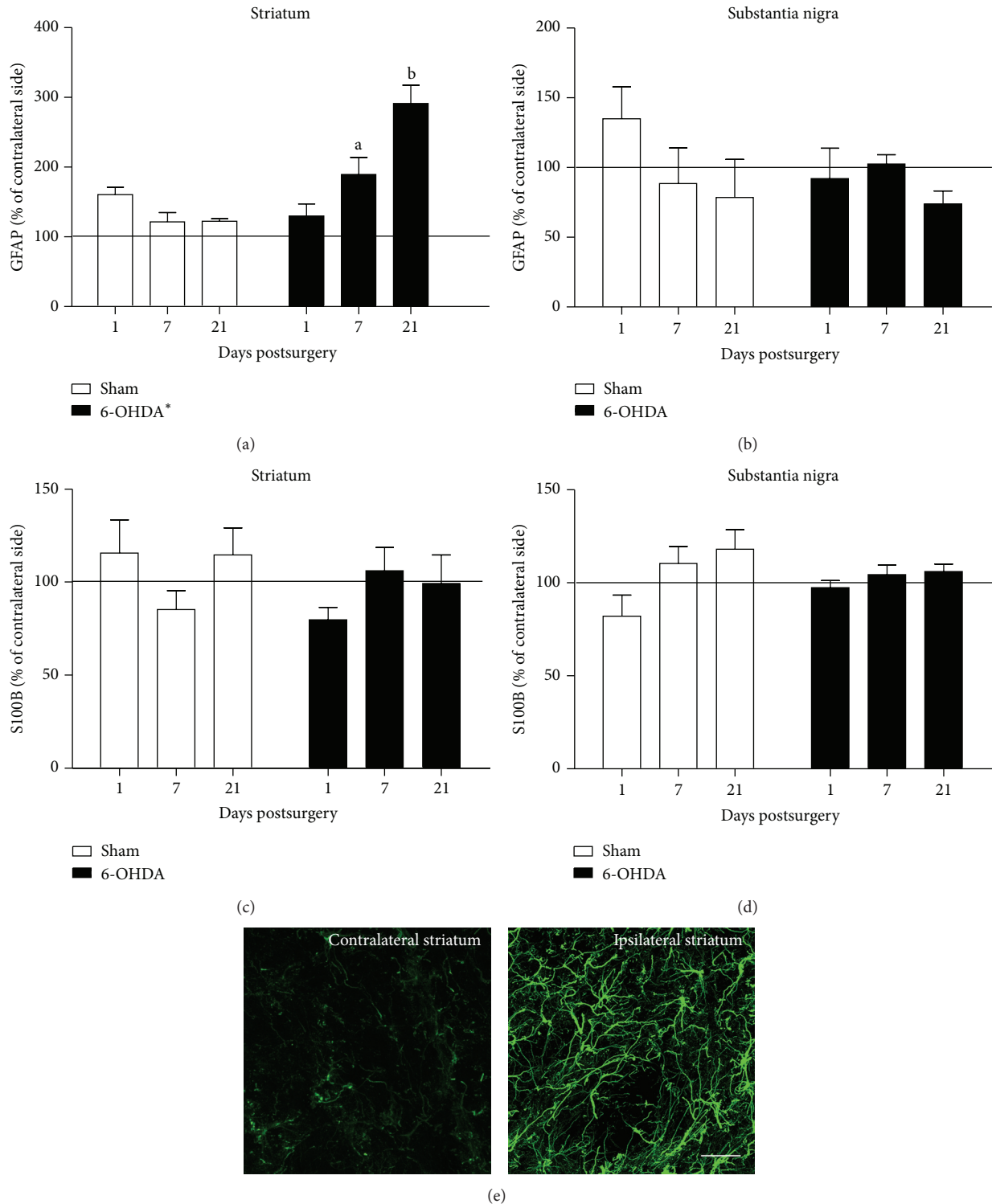


FIGURE 2: GFAP and S100B content in the striatum and substantia nigra of rats administered an intrastriatal 6-OHDA injection. Brain samples were analysed at 1, 7, or 21 days after the infusion of 6-OHDA, and the GFAP ((a), (b)) and S100B ((c), (d)) contents were measured by ELISA. Each value represents the mean \pm standard error, which was expressed as the percentage of the contralateral unlesioned side (assumed to be 100%, indicated by line) from at least 5 rats per group. *Different from sham-group (two-way ANOVA, $P < 0.001$). ^aDifferent from sham at 7 days; ^bdifferent from sham at 21 days, and different from 6-OHDA at 1 and 7 days (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, $P < 0.05$). (e) Immunohistochemistry for GFAP in the striatum at 21 days after surgery. Representative photomicrographs of a 6-OHDA-lesioned rat show the striatum ipsilateral to the 6-OHDA infusion on the right and the striatum contralateral to the infusion on the left. Scale bar = 25 μ m.

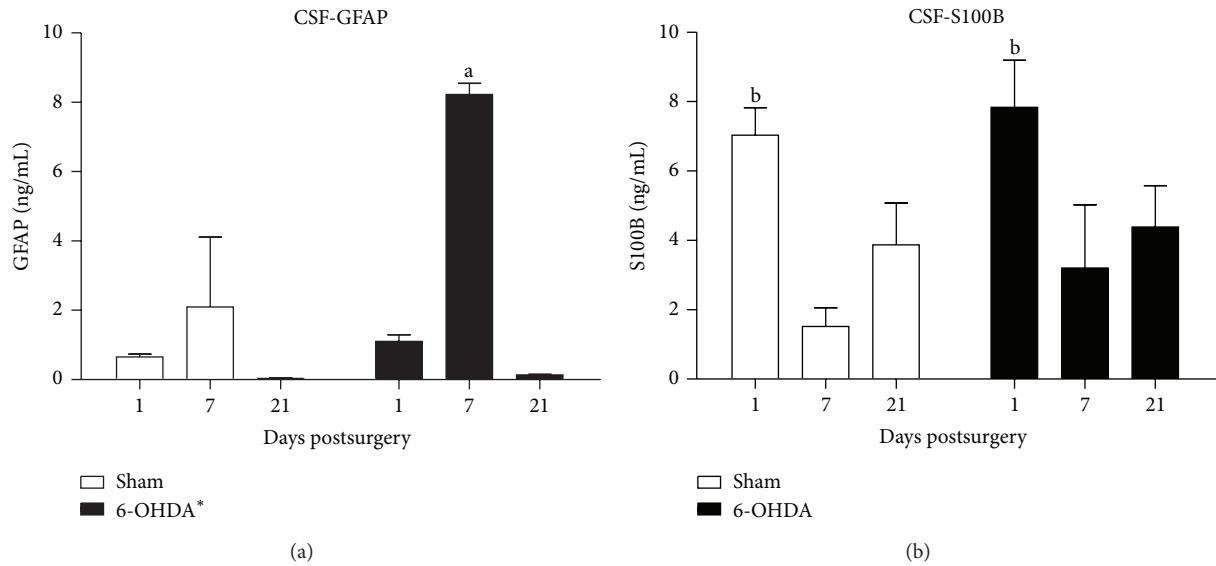


FIGURE 3: GFAP and S100B levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of rats administered a 6-OHDA injection. CSF was obtained by cisterna magna puncture, and GFAP (a) and S100B (b) were measured by ELISA. Each value represents the mean \pm standard error from at least 4 rats per group. *Different from sham-group (two-way ANOVA, $P = 0.002$). ^aDifferent from sham at 7 days and different from 6-OHDA at 1 and 21 days after surgery; ^bdifferent from S100B content at days 7 and 21 (two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, $P < 0.05$).

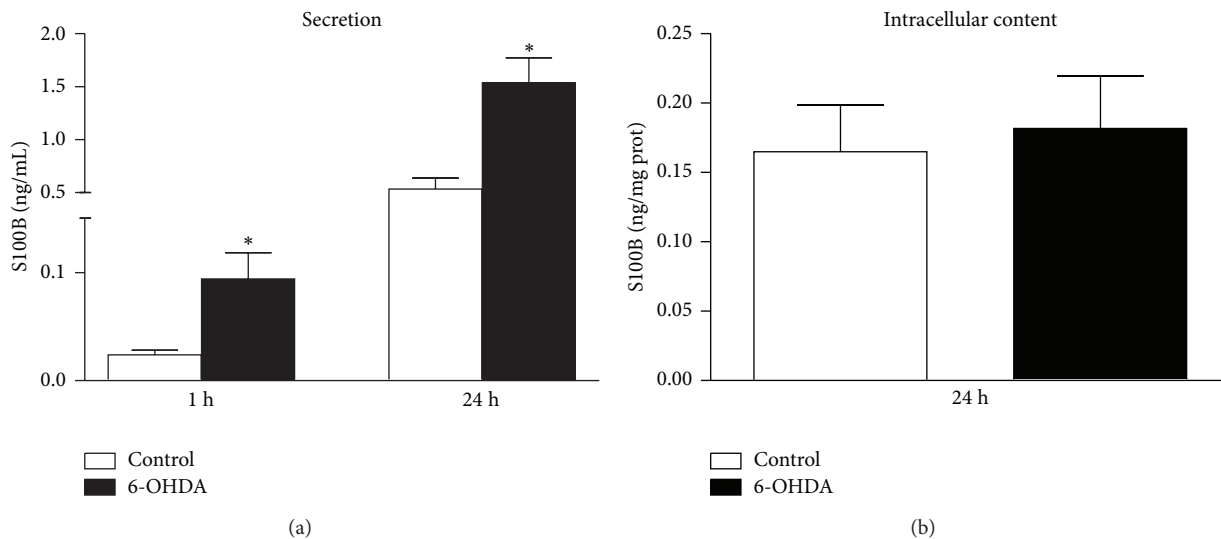


FIGURE 4: S100B secretion and S100B content in astrocyte cultures from rats exposed to 6-OHDA 200 μ M. After confluence, the medium was replaced by DMEM 1% FCS in the presence or absence of 6-OHDA 200 μ M. S100B secretion was measured by ELISA at 1 and 24 h (a). The intracellular content of S100B (b) was measured by ELISA at 24 h. Each value represents the mean \pm standard error of at least 8 independent experiments performed in triplicate. *Different from the control (Student's t -test, $P < 0.05$).

23.8 mM NaHCO_3 , 0.1% amphotericin, 0.032% gentamicin, and 10% FCS. The cultures were maintained in DMEM that contained 10% FCS in 5% $\text{CO}_2/95\%$ air at 37°C, allowed to grow to confluence, and used at 15 days *in vitro*. The medium was replaced by DMEM with 1% FCS in the presence of 6-OHDA (200 μ M) or vehicle for 24 h. A GSH saline solution was used as the vehicle [19].

2.8. S100B Measurement. S100B was measured by ELISA as previously described [20]. Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of Tris buffer was incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B antibody (Sigma, S2532, USA). Polyclonal anti-S100 (Dako, Z0311, Denmark) was incubated for 30 min; peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (GE, NA934V, UK) was subsequently added for an additional 30 min. The colour reaction with o-phenylenediamine (Sigma, P8936, USA) was measured at

492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

2.9. GFAP Measurement. ELISA for GFAP was performed as previously described [21] by coating microtiter plates with 100 μ L samples for 24 h at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit (Dako, Z0334, Denmark) for 1 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h at room temperature (GE, NA934V, UK). A colorimetric reaction with o-phenylenediamine (Sigma, P8936, USA) was measured at 492 nm. The standard human GFAP (from Calbiochem) curve ranged from 0.1 to 5 ng/mL.

2.10. Protein Determination. The protein content was measured by Lowry's method using BSA as the standard [22].

2.11. Statistical Analysis. Data are reported as the mean \pm standard error and were analysed by Student's *t*-test (when two groups were considered) or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, which assumed $P < 0.05$ as significant.

3. Results

3.1. Behavioural and Tyrosine-Hydroxylase Content Changes 1, 7, and 21 Days after 6-OHDA Striatal Injection. To validate the 6-OHDA rat model, we performed a classic behavioural test. An intraperitoneal injection of methylphenidate (40 mg/kg; Ritalina) induced ipsilateral rotational behaviour in 6-OHDA-lesioned rats as shown in Figure 1(a) (significant main effect of group, two-way ANOVA, $F(1, 11) = 32.65$, $P < 0.001$). There was also a time effect (two-way ANOVA, $F(2, 11) = 4.86$, $P = 0.031$), which was indicated by the increased number of rotations in the 6-OHDA-lesioned rats at day 21 after the lesion compared with days 1 (Tukey's post hoc test, $P = 0.024$) and 7 (Tukey's post hoc test, $P = 0.006$).

In addition, the striatal slices (Figure 1(b)) and ventral midbrain area that contained the SN (Figure 1(c)) from rats 1, 7, or 21 days post-6-OHDA were analysed by Western Blotting for TH. The TH immunoccontent in the striatum was different between the 6-OHDA-group and the sham-group (two-way ANOVA, $F(1, 17) = 11.19$, $P = 0.004$). There was a time effect (two-way ANOVA, $F(2, 17) = 7.74$, $P = 0.004$) in 6-OHDA-group, in which the 1 day group had more TH immunoccontent than the 7 (Tukey's post hoc test, $P = 0.002$) and 21 (Tukey's post hoc test, $P = 0.006$) day groups.

Similarly, in the SN, the 6-OHDA-group was significantly different from the sham-group (two-way ANOVA, $F(1, 16) = 5.34$, $P = 0.034$); a reduction in the TH immunoccontent in the 6-OHDA-group 21 days after surgery was identified compared with the 6-OHDA-group 1 day after and the sham-group 21 days after surgery (Figure 1(c), Tukey's post hoc test, $P = 0.008$ and $P < 0.001$, resp.). Representative TH-immunohistochemistry of the SN is shown in Figure 1(d). The TH-containing cells were reduced in the ipsilateral SN *pars compacta* in the 6-OHDA-group 21 days after surgery.

3.2. GFAP and S100B Content in the Striatum and SN of Rats Administered a 6-OHDA Striatal Injection. The immunoccontents of GFAP and S100B were analysed using ELISA in the striatum slices and ventral midbrain area that contained the SN. The values are expressed as the percentage of the contralateral side that did not undergo stereotaxic surgery (assumed to be 100%). Figure 2(a) shows the GFAP changes in the striatum. The striatal GFAP content was increased in the 6-OHDA group of rats (two-way ANOVA, $F(1, 38) = 18.80$, $P < 0.001$). There was also an effect of time (two-way ANOVA, $F(2, 38) = 5.61$, $P = 0.007$), in which the 6-OHDA group of rats exhibited increased levels of striatal GFAP content 7 and 21 days after surgery compared with the sham-group at the same times (Tukey's post hoc test, $P = 0.01$ and $P < 0.001$, resp.); furthermore, the GFAP content was higher 21 days after the toxin injection (Tukey's post hoc test, $P < 0.001$ and $P = 0.001$ compared with 1 and 7 days, resp.). To confirm the changes in GFAP identified in the rats injected with 6-OHDA, we conducted a GFAP immunohistochemistry study in striatum tissue on 7 (data not shown) and 21 days (Figure 2(e)). However, no changes in the GFAP content were identified in the SN (Figure 2(b)) (two-way ANOVA, $P > 0.05$).

In contrast to GFAP, no changes were identified in the S100B content in the striatum (Figure 2(c)) (two-way ANOVA, $P > 0.05$) or the SN (Figure 2(d)) (two-way ANOVA, $P > 0.05$).

3.3. GFAP and S100B Levels in the CSF of Rats Administered a 6-OHDA Injection. In addition to the tissue changes of astrocyte markers, we evaluated their content in the CSF. The CSF content of GFAP, which was evaluated by ELISA, was not altered in the sham-group at 1 to 21 days after stereotaxic surgery (Figure 3(a)). However, in the 6-OHDA group, there was a significant increase (two-way ANOVA, $F(1, 9) = 18.33$, $P = 0.002$). There was a time effect (two-way ANOVA, $F(2, 9) = 36.37$, $P < 0.001$); that is, we observed an increase on the 7th day after surgery; however, this change was transient because it was not observed on the 21st day (Tukey's post hoc test, $P < 0.001$).

The CSF S100B content is shown in Figure 3(b). There was a time effect (two-way ANOVA, $F(2, 33) = 10.415$, $P < 0.001$) in the 6-OHDA and sham-groups. We observed a clear increment in both groups on 1 day after stereotaxic surgery (Tukey's post hoc test, $P < 0.001$ and $P = 0.026$, resp., versus 7 and versus 21 days). No significant changes were identified 7 or 21 days after surgery in the 6-OHDA and sham-groups.

3.4. S100B Secretion in Cultured Astrocytes Exposed to 6-OHDA. Considering that the mechanical injury (by the needle) in this model caused an increase in CSF S100B, it was not possible to determine if 6-OHDA *per se* induced S100B secretion. Therefore, we exposed astrocyte cultures to 6-OHDA and evaluated S100B secretion. The 6-OHDA induced an increase in S100B secretion at 1 and 24 h (Figure 4(a)) (Student's *t*-test, $P = 0.009$ and $P = 0.005$, resp.), without affecting the intracellular content of S100B during this time (Figure 4(b)) (Student's *t*-test, $P > 0.05$).

4. Discussion

6-OHDA-induced PD in rats has been a useful model to evaluate potential therapeutic treatment strategies [2]. The protocol used induced, as expected, a slow, progressive, and partial lesion of the nigrostriatal pathway in a retrograde manner over a period of up to 3 weeks [23]. This lesion was confirmed by rotational behaviour induced by methylphenidate, as well as by a decrease in TH immunoreactivity in the striatum and SN 21 days after the striatal lesion.

The hallmark of PD is the loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway, which is accompanied by gliosis [24] and commonly measured by an increment of GFAP immunoreactivity. The astroglial response appears to be essential to understand and propose therapeutic strategies for PD and other neurodegenerative disorders (e.g., [6]) and to potentially understand PD pathogenesis [9].

Gliosis based on GFAP increment occurs following the intrastriatal administration of 6-OHDA [7]. We identified an increment of GFAP in the ipsilateral striatum at 7 and 21 days after 6-OHDA administration, which is consistent with previous findings [8, 25]. Despite the TH decrease in the SN on the 21st day, no significant gliosis was observed in the SN prior to this point.

To our knowledge, this is the first measurement of CSF GFAP (and S100B) in the 6-OHDA model of PD. CSF GFAP increments have been clinically identified in some conditions of acute brain injury, such as stroke, as well as chronic conditions, such as Alzheimer's disease or vascular dementia. However, no changes were identified in PD patients in two previous studies [26, 27]. Here, we identified a transitory increment of CSF GFAP on the 7th day after the lesion induced by 6-OHDA, which may reflect the acute scenario of damage. This finding allows us to speculate that it would be possible to detect the increment of CSF GFAP in the beginning of the disease or during periods of exacerbation.

In two investigations with PD patients did not identify changes in CSF S100B [27, 28]; however, a more recent study identified an increase [29]. In addition, this previous study identified S100B-gliosis in the SN in postmortem patients. S100B has been used as a general marker of brain damage [30, 31]; however, some authors have suggested an active role of this protein in the pathogenesis of PD [9, 29, 32]. Conflicting results are also observed in a PD model with intrastriatal administration of 6-OHDA. For example, an increment of S100B positive astrocytes has been described in the striatum, SN, and contralateral nuclei [33]. However, in a previous study, despite a GFAP increment, no changes were identified in striatal S100B immunoreactivity from 2 to 14 days after 6-OHDA administration [34]. Here, we did not identify changes in S100B in the striatum or SN when the S100B content was measured by ELISA. However, we identified CSF S100B increment (about 7 ng/mL) 1 day after stereotaxic surgery. This increment is clear, based on our previous measurements in basal conditions (<2 ng/mL) [20, 31].

This increase in S100B at 1 day was observed in the 6-OHDA and sham-groups. This increment is likely due to the mechanical lesion induced by the needle. Striatal astroglial

activation (based on GFAP immunoreactivity) induced by a needle lesion has been described [35]. It is possible to observe an increase in the GFAP striatal levels measured by ELISA (in the sham and 6-OHDA groups) compared with the respective contralateral nuclei (unpaired Student's *t*-test, $P < 0.05$). The increment on CSF S100B reflects astrocyte secretion in response to an acute brain lesion. This secretion is not restricted to the striatum, and the secreted amount is frequently small compared with the intracellular content, which explains why extracellular and intracellular changes are not necessarily associated [30]. To determine if 6-OHDA is able to induce astroglial activation (looking at S100B secretion), we evaluated astrocyte cultures exposed to 6-OHDA. At 200 μ M, 6-OHDA was able to induce S100B secretion at 1 and 24 h, without significant changes in the intracellular content.

It is important to note some limitations of this work. First, we chose the 6-OHDA model of PD; however, we are aware that it is necessary to confirm these data regarding glial parameters in other models. Second, a mechanical lesion induced by the needle masked the lesion induced by 6-OHDA. In future studies in this PD model, the measurement of CSF S100B between 2 and 5 days would help to identify a specific increment of CSF S100B induced by 6-OHDA. Third, this study focused on two classical markers of astroglial activation. However, it is important to consider the astroglial heterogeneity and that other astrocyte markers also deserve attention, such as Aquaporin-4 [36] or Glt-1 [37], particularly because astrocyte dysfunction has been demonstrated to be involved in PD initiation and progression.

5. Conclusions

In summary, we evaluated two markers of astroglial plasticity in a PD model in rats obtained with intrastriatal administration of 6-OHDA. The current data reinforce several ideas regarding PD; however, the findings also indicate several limitations of the model used for this disorder. Glial activation (signalled by GFAP increment in the striatum and CSF) precedes neuronal damage; however, the initial change in CSF S100B in this PD model was related to a mechanical lesion, which masks 6-OHDA glial toxicity. The 6-OHDA glial toxicity was confirmed by increased S100B secretion in astrocyte cultures.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] J. M. Beitz, "Parkinson's disease: a review," *Frontiers in Bioscience*, vol. 6, pp. 65–74, 2014.
- [2] F. Blandini and M.-T. Armentero, "Animal models of Parkinson's disease," *FEBS Journal*, vol. 279, no. 7, pp. 1156–1166, 2012.
- [3] G. M. Halliday and C. H. Stevens, "Glial: Initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol. 26, no. 1, pp. 6–17, 2011.
- [4] F. Cicchetti and R. A. Barker, "The glial response to intracerebrally delivered therapies for neurodegenerative disorders: is this a critical issue?" *Frontiers in Pharmacology*, vol. 5, article 139, 2014.
- [5] H. Yokoyama, H. Uchida, H. Kuroiwa, J. Kasahara, and T. Araki, "Role of glial cells in neurotoxin-induced animal models of Parkinson's disease," *Neurological Sciences*, vol. 32, no. 1, pp. 1–7, 2011.
- [6] A. J. Fenoy, L. Goetz, S. Chabardès, and Y. Xia, "Deep brain stimulation: are astrocytes a key driver behind the scene?" *CNS Neuroscience and Therapeutics*, vol. 20, no. 3, pp. 191–201, 2014.
- [7] T. Nakagawa and J. P. Schwartz, "Gene expression profiles of reactive astrocytes in dopamine-depleted striatum," *Brain Pathology*, vol. 14, no. 3, pp. 275–280, 2004.
- [8] M. Carbone, S. Duty, and M. Rattray, "Riluzole neuroprotection in a Parkinson's disease model involves suppression of reactive astrocytosis but not GLT-1 regulation," *BMC Neuroscience*, vol. 13, article 38, 2012.
- [9] R. Niranjana, "The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes," *Molecular Neurobiology*, vol. 49, no. 1, pp. 28–38, 2014.
- [10] C. Barcia, C. Ros, V. Annese et al., "IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease," *Cell Death & Disease*, vol. 2, article e142, pp. 1–12, 2011.
- [11] M. A. Mena, S. De Bernardo, M. J. Casarejos, S. Canals, and E. Rodríguez-Martín, "The role of astroglia on the survival of dopamine neurons," *Molecular Neurobiology*, vol. 25, no. 3, pp. 245–263, 2002.
- [12] D. Kirik, C. Rosenblad, and A. Björklund, "Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat," *Experimental Neurology*, vol. 152, no. 2, pp. 259–277, 1998.
- [13] R. B. Silvestrin, L. F. de Oliveira, C. Batassini, A. Oliveira, and T. M. e Souza, "The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 177, no. 2, pp. 317–321, 2009.
- [14] G. Brolese, P. Lunardi, N. Broetto et al., "Moderate prenatal alcohol exposure alters behavior and neuroglial parameters in adolescent rats," *Behavioural Brain Research*, vol. 269, pp. 175–184, 2014.
- [15] G. Paxinos and P. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, NY, USA, 1998.
- [16] Y. M. Ding, J. D. Jaumotte, A. P. Signore, and M. J. Zigmond, "Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: Specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor," *Journal of Neurochemistry*, vol. 89, no. 3, pp. 776–787, 2004.
- [17] C. Zanutto, R. T. Abib, C. Batassini et al., "Non-specific inhibitors of aquaporin-4 stimulate S100B secretion in acute hippocampal slices of rats," *Brain Research*, vol. 1491, pp. 14–22, 2013.
- [18] C. Gottfried, L. Valentim, C. Salbego, J. Karl, S. T. Wofchuk, and R. Rodnight, "Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27)," *Brain Research*, vol. 833, no. 2, pp. 142–149, 1999.
- [19] R. Soto-Otero, E. Méndez-Álvarez, Á. Hermida-Ameijeiras, A. M. Muñoz-Patiño, and J. L. Labandeira-García, "Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease," *Journal of Neurochemistry*, vol. 74, no. 4, pp. 1605–1612, 2000.
- [20] M. C. Leite, F. Galland, G. Brolese et al., "A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 169, no. 1, pp. 93–99, 2008.
- [21] F. Tramontina, M. C. Leite, K. Cereser et al., "Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 162, no. 1-2, pp. 282–286, 2007.
- [22] G. L. Peterson, "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable," *Analytical Biochemistry*, vol. 83, no. 2, pp. 346–356, 1977.
- [23] S. Przedbroski, M. Leviver, H. Jiang et al., "Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine," *Neuroscience*, vol. 67, no. 3, pp. 631–647, 1995.
- [24] C. Knott, G. Stern, and G. P. Wilkin, "Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2," *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 16, no. 6, pp. 724–739, 2000.
- [25] P. M. Aponso, R. L. M. Faull, and B. Connor, "Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease," *Neuroscience*, vol. 151, no. 4, pp. 1142–1153, 2008.
- [26] B. Holmberg, L. Rosengren, J.-E. Karlsson, and B. Johnels, "Increased cerebrospinal fluid levels of neurofilament protein in progressive supranuclear palsy and multiple-system atrophy compared with Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol. 13, no. 1, pp. 70–77, 1998.
- [27] W. F. Abdo, D. De Jong, J. C. M. Hendriks, M. W. I. M. Horstink, B. P. H. Kremer, and B. R. Bloem, "Cerebrospinal fluid analysis differentiates multiple system atrophy from Parkinson's disease," *Movement Disorders*, vol. 19, no. 5, pp. 571–579, 2004.
- [28] W. F. Abdo, B. R. Bloem, W. J. Van Geel, R. A. J. Esselink, and M. M. Verbeek, "CSF neurofilament light chain and tau differentiate multiple system atrophy from Parkinson's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 28, no. 5, pp. 742–747, 2007.
- [29] K. Sathe, W. Maetzler, J. D. Lang et al., "S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway," *Brain*, vol. 135, no. 11, pp. 3336–3347, 2012.
- [30] C.-A. Gonçalves, M. Conclite Leite, and P. Nardin, "Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury," *Clinical Biochemistry*, vol. 41, no. 10-11, pp. 755–763, 2008.
- [31] M. C. Guerra, L. S. Tortorelli, F. Galland et al., "Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 8, article 128, 2011.

- [32] Y. Liu, D. C. Buck, and K. A. Neve, "Novel interaction of the dopamine D₂ receptor and the Ca²⁺ binding protein S100B: role in D₂ receptor function," *Molecular Pharmacology*, vol. 74, no. 2, pp. 371–378, 2008.
- [33] V. C. Gomide and G. Chadi, "Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis," *International Journal of Neuroscience*, vol. 115, no. 4, pp. 537–555, 2005.
- [34] M. N. Gordon, W. A. Schreier, X. Ou, L. A. Holcomb, and D. G. Morgan, "Exaggerated astrocyte reactivity after nigrostriatal deafferentation in the aged rat," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 388, no. 1, pp. 106–119, 1997.
- [35] V. C. Gomide, G. A. Silveira, and G. Chadi, "Transient and widespread astroglial activation in the brain after a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system," *International Journal of Neuroscience*, vol. 115, no. 1, pp. 99–117, 2005.
- [36] M. Xiao and G. Hu, "Involvement of aquaporin 4 in astrocyte function and neuropsychiatric disorders," *CNS Neuroscience and Therapeutics*, vol. 20, no. 5, pp. 385–390, 2014.
- [37] A. Massie, S. Goursaud, A. Schallier et al., "Time-dependent changes in GLT-1 functioning in striatum of hemi-Parkinson rats," *Neurochemistry International*, vol. 57, no. 5, pp. 572–578, 2010.

CAPÍTULO II

6-OHDA and MPTP induced in vitro secretion of S100B

Cristiane Batassini, Patrícia Nardin, Fabiana Galland, Caroline Zanotto, Carollina Da Ré, Marina Concli Leite, Carlos Alberto Gonçalves

Manuscrito em preparação.

6-OHDA and MPTP induced in vitro secretion of S100B

Cristiane Batassini, Patrícia Nardin, Fabiana Galland, Caroline Zanotto, Carollina Da Ré,
Marina Concli Leite, Carlos Alberto Gonçalves*

Biochemistry Post-graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS),
Porto Alegre, Brasil

(a ser submetido ao periódico J Parkinson's Disease)

*Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Dept of Biochemistry, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brasil

E-mail: casg@ufrgs.br

Phone: +55 (51) 3308-5567

Fax: +55 (51) 3308-5535

Introduction

With the increase in life-expectancy, the incidence of neurodegenerative diseases is increasing [1]. Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease and age is the main risk factor. It is characterized mainly by motor symptoms, including tremor, rigidity and slowness of movement [2], caused by the progressive loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra and consequent depletion of dopamine in nigrostriatal pathway. The pathology is not completely understood and the treatment is only symptomatic, unable to prevent or delay the progression of the disease [3].

The toxins 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) are widely used to modeling *in vivo*, *in vitro* and *ex vivo* PD once they are able to induce the death of dopaminergic neurons [4]. MPTP is converted into MPP⁺ in glial cells and this toxin enters into neurons by dopamine transporter (DAT), inhibiting the complex I of the mitochondrial respiratory chain [5, 6]. 6-OHDA can enter in dopaminergic cells also by DAT and destroys these cells by the production of reactive oxygen species (ROS) and quinones [7].

In addition to the dopaminergic neural death, alterations in glial cells were also described both in patients [8, 9] and in experimental models [10]. Astrocytes may producing various mediators, which may contribute to the death of neurons, including cytokines, reactive oxygen and nitrogen species, and S100B [11]. In the search for biomarkers, many of these molecules have been evaluated in CSF of patients with PD [12, 13].

S100B is a calcium binding protein, expressed and secreted mainly by astrocytes in vertebrate brain. S100B has many targets inside the cell and when secreted has autocrine and paracrine effects on glia, neurons and microglia [14]. It was described that secreted

S100B has trophic effects at nanomolar concentrations, but toxic effects when at micromolar concentrations [15]. S100B mRNA and protein levels (intra and extracellular) have been used as indicator of astrocyte activation and/or death in several pathological conditions such as brain injury, ischemia and neurodegeneration [16].

There are conflicting results about changes of cerebrospinal fluid (CSF) S100B in PD patients. Recently we have shown that CSF S100B was early and transiently increased in a PD model with intrastriatal injection of 6-OHDA [17]. However, this increment was masked by mechanical-induced lesion in this model. Here we investigated if the neurotoxins 6-OHDA and MPTP are able to induce S100B secretion in primary astrocyte cultures and striatal slices.

Methods

Animals

Wistar rats were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food and water. All animal experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications no. 80-23) and followed the regulations of the local animal house authorities (UFRGS, no. 23422).

Cell cultures

Primary astrocyte cultures were prepared from Wistar rats (1-2 days old) as previously described [18]. Fetal calf serum (FCS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and other materials for cell culture were purchased from Gibco (USA). Briefly,

the cerebral cortices of new-born Wistar rats were removed and mechanically dissociated in Ca^{2+} - and Mg^{2+} - free balanced salt solution, pH 7.4, which contained (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.27 Na_2HPO_4 , 1.1 KH_2PO_4 , and 6.1 glucose. The cortices were cleaned of meninges and mechanically dissociated via sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1400 RPM for 5 min, the pellet was resuspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.39 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO_3 , 0.1% amphotericin, 0.032% gentamicin, and 10% FCS. The cultures were maintained in DMEM that contained 10% FCS in 5% CO_2 /95% air at 37°C, allowed to grow to confluence, and used at 15 days *in vitro*. The medium was replaced by DMEM with 1% FCS in the presence of 6-OHDA (Sigma, 162957, USA) or MPTP (Sigma, M0896, USA) in different concentrations. A GSH saline solution was used as the vehicle for 6-OHDA [19].

Striatal slices

The effect of 6-OHDA and MPTP on S100B secretion was also evaluated in acute striatal slices. Before this, we performed a set of experiments in order to make the characterization of S100B secretion in striatal acute slices. S100B secretion had already been characterized for hippocampal slices, by Nardin and coworkers [20], but not for striatal slices. The assays were performed in the same way in order to assess whether the striatal slices answered as the hippocampal slices.

Animals were sacrificed by decapitation, the brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl, 2 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 ; 25 HEPES; 1 KH_2PO_4 , and 10 glucose, pH 7.4). The striatum were removed by free-hand dissection and sliced (0.3 mm) using a McIlwain tissue chopper. Slices were then transferred immediately into 24-well culture plates, each well containing 0.3 mL of saline medium and only one slice. The medium was changed every 15 min with fresh saline

medium at room temperature (maintained at 25°C). Removed medium was stored (at -20°C) until S100B, LDH and NSE measurements. Following a 120-min equilibration period, the medium was removed and replaced with basal media for 60 min at 30° in a warm plate. Note that measurements in the equilibration stage involve medium replacement, while the measurements in post-equilibration stage do not.

Thus, we obtained the required metabolic recovery time after striatum was sliced, and also ensure the viability of the same during the treatment period. Only then slices were exposed to medium containing 6-OHDA (10, 50 or 200 µM) or MPTP (0.1, 0.5 or 1 mM).

S100B measurement

S100B was measured by ELISA as previously described [21]. Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer was incubated for 2h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B antibody (Sigma, S2532, USA). Polyclonal anti-S100 (Dako, Z0311, Denmark) was incubated for 30 min; peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (GE, NA934, UK) was subsequently added for an additional 30 min. The colour reaction with o-phenylenediamine (Sigma, P8936, USA) was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng / mL.

MTT reduction assay

Slice viability assay was performed by the colorimetric MTT method [22]. Briefly, cell cultures were incubated with 50µg/mL methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide – MTT (Sigma, M2128 USA), for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Slices were incubated with 500 µg/mL MTT for 30 min at 30°C. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide and measured at 560 and 650 nm. The reduction of MTT was calculated as (absorbance at 560 nm) – (absorbance at 650 nm).

Neutral red uptake

Neutral red incorporation was performed as previously described [23, 24]. Cells were treated with 50 µg/mL neutral red (NR) for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Slices also were treated with 50 µg/mL, for 30 min at 30°C. Afterwards, the cells were rinsed twice with PBS for 5 min each and NR dye taken up by viable cells was extracted with 500 µL of acetic acid/ethanol/water (1/50/49). Absorbance values were measured at 560 nm.

Cell integrity assays

Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the incubation medium was determined by a colorimetric commercial kit (Doles, Brazil), according to the manufacturer's instructions. Neuronal integrity also was measured by neuron-specific enolase (NSE) as previously described [24], using an electrochemiluminescent assay purchased from Roche Diagnostics. The reaction and quantification were performed by Elecsys-2010 (Roche).

Statistical Analysis.

Data are reported as the mean \pm standard error and were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test.

Results

Cultured astrocytes were used in order to assess the effect of dopaminergic toxins in S100B secretion. After confluence, cultures were exposed to different concentrations of 6-OHDA (10, 50, 200 µM) or MPTP (0.1, 0.5, 1 mM) for 24h. S100B was measured by ELISA in the culture medium collected and in the intracellular content at 1h and 24h after treatments.

It was observed that 6-OHDA 200 μ M caused an increase of S100B secretion both in one (Fig. 1A; $F(3, 25) = 4.829$, $P = 0.0087$; Duncan's post-hoc test, $p < 0.05$) as in 24h (Fig. 1B, $F(3, 22) = 5.427$, $P = 0.006$; Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$), when compared with control. S100B intracellular content was not affected at 24h (Fig.1C, $F(3, 19) = 0.1537$, $P = 0.9260$).

The toxin 6-OHDA did not alter cell viability in our preparations. When evaluated by capacity for MTT reduction, one-way ANOVA showed no differences at 1h (data not shown) nor at 24h after treatment (Fig. 2A; $F(3, 15) = 2.569$; $P = 0,0932$). In the same way, 6-OHDA did not alter the ability for neutral red uptake by astrocyte cultures at 1h (data not shown) or 24 h (Fig. 2B; $F(3, 21) = 1.146$, $P = 0.35$).

One-way ANOVA shows that MPTP treatment resulted in no change in S100B secretion, when analyzed 1h after (Fig. 3A; $F(3, 20) = 0.292$, $p = 0.831$); however, the doses of 0.5 and 1 mM increased extracellular content of S100B at 24h (Fig. 3B; $F(3, 18) = 4.098$, $P = 0.022$; Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$). Intracellular content was not altered (Fig. 3C; $F(3, 17) = 0.86$, $P = 0.78$).

MPTP did not alter capacity for MTT reduction at 1 h (data not shown) or at 24 h (Fig. 4A; $F(3, 15) = 1.31$; $P = 0.31$). In the same way, did not alter neutral red uptake by astrocytes at 1h (data not shown). However, 0.5 and 1 mM MPTP decreased neutral red uptake at 24h (Fig. 4B; $F(3, 22) = 10.31$; $P < 0.001$).

We also analyzed actin cytoskeleton of astrocytes exposed to 6-OHDA or MPTP (Fig. 5). We can see that both drugs caused similar morphological changes 24 h afterwards, where cells have become more elongated. No changes were observed in 1h (data not shown).

In order to test the effect of dopaminergic toxins on acute striatal slices, a characterization of S100B secretion was previously performed under basal conditions. To

this, S100B secretion and cell integrity were evaluated during 180 minutes. The measures of LDH activity and neuron-specific enolase (NSE) content in the medium were used as cell integrity assays. As we can see in Fig. 6A, the S100B content in the medium decreased significantly in the first 45 minutes ($F(8, 151) = 45.77$; $P < 0.001$; Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$). The extracellular LDH activity (Fig. 6B) decreased during the first 75 min, when reached a plateau ($F(8, 156) = 88.93$, $P < 0.001$; Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$). Moreover, the content of NSE (Fig. 6C) also exhibited a reduction during the first 30 minutes ($F(8, 34) = 4.43$, $P < 0.001$; Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$). MTT reduction was also evaluated during the 180 min and there was no variation during this time (data not shown; $F(3, 48) = 0.07$, $P = 0.98$). Based on cell integrity assays, it would be adequate to consider the initial dosages of S100B as release. Only after 75 min, when the extracellular LDH activity reached a plateau, the presence of S100B in the incubation medium would be due to secretion. We decided to consider secretion only after 120 min of equilibration (after eight changes of medium). The dopaminergic toxins were added after this metabolic recovery period and the analyses were made after an hour of incubation.

Fig. 7A shows that 6-OHDA caused no alteration in S100B secretion by striatal slices ($F(3, 18) = 0.67$, $P = 0.58$). Cell viability was also not altered, when evaluated by MTT reduction (Fig. 7B; $F(3,16)$, $P = 0.76$) and neutral red uptake (Fig. 7C; $F(3, 14) = 0.48$; $P = 0.70$). In the same way, MPTP also did not alter S100B secretion by striatal slices (Fig. 8A; $F(3, 16) = 0.44$; $P = 0.73$). MTT reduction was not altered (Fig. 8B; $F(3, 13) = 0.63$, $p = 0.61$). However, the capacity for neutral red uptake was altered by all concentrations of MPTP (Fig. 8C; $F(3, 12) = 5.86$, $P = 0.01$, Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$), suggesting that cell viability is impaired.

Discussion

PD is a neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, as well as alterations in glial cells [25]. Among the markers used to characterize glial commitment is the S100B protein. S100B is expressed and secreted by astrocytes and the increase in the content of this protein, both intra- and extracellular, has been used as a marker of astrocyte activation [26]. In a recent study, we show that rats that received an intrastriatal infusion of 6-OHDA exhibited a transitory increase of CSF S100B one day after surgery [17]. However, as the sham group (vehicle injected) also showed this increase, it may have been mechanical-induced by the needle. Thus, a possible increase in S100B levels induced by 6-OHDA could be masked under the effect of mechanical injury. There are conflicting data in the literature regarding S100B levels after 6-OHDA injection. It was already described an increase [27], but some authors showed no alteration [28]. With respect to MPTP, it was shown that mice injected with this toxin presented an increase in S100B in the striatum and substantia nigra immediately after surgery [29] and one day after [30]. The mRNA was also immediately increased in substantia nigra of MPTP-treated mice [30]. Furthermore, it was shown that S100B levels are increased in substantia nigra and in CSF of patients with PD [30].

In this study, we test the direct action of the dopaminergic toxins 6-OHDA and MPTP in astrocyte cultures and in striatal acute slices. We detected an increased S100B secretion in astrocyte cultures exposed to 6-OHDA and MPTP, without significant alteration in the intracellular content. Important to note that the secreted amount of S100B is usually small when compared to intracellular content, thus extracellular and intracellular changes are not necessarily associated [14].

6-OHDA apparently causes no change in cell viability, according to the MTT reduction and neutral red uptake assays. MPTP, on the other hand, caused a reduction in neutral red. The uptake of neutral red depends on the cell capacity to maintain pH gradients, through the production of ATP [31]. MPTP affect the ATP production because after been converted to MPP⁺ by glial cells it inhibits complex I of the mitochondrial electron transport chain [32]. It seems that MPTP is reducing the viability of the astrocytes what can cause some kind of damage at membrane. Thus, we should consider the possibility that this extracellular increase in extracellular S100B may be caused by release instead of secretion.

The 6-OHDA and MPTP concentrations that we used are higher than those used in culture of neurons. For example, 200 μ M 6-OHDA can cause a reduction in cell viability when evaluated by MTT [33]. This is possible probably because astrocytes are more resistant than the neurons to oxidative stress [34].

Moreover, we did not observe prominent morphological differences between the treatments and controls, except by stretch caused by toxins 24 h afterwards. It seems that S100B secretion induced by 6-OHDA is not related to morphological changes.

Additionally, we decided to test the effect of 6-OHDA and MPTP in acute striatal slices. These preparations have some advantages when compared with cell cultures assays. The contact between cells remains preserved as well as the interaction between different cell types - neurons, astrocytes and microglia [35]. However, the presence of different cell types makes the data interpretation more complex. A negative point is the fact that these slices do not remain viable for long time, not allowing the assessment of longer treatments.

S100B secretion in hippocampal acute slices had already been characterized [36]. However, we did not know if viability and basal S100B secretion in acute striatal slices are similar to hippocampal slices. Then, we performed a set of experiments to evaluate the

time required for metabolic recovery. The results obtained are similar to those obtained for the hippocampal slices [24].

Differently from primary astrocytes, 6-OHDA and MPTP caused no alteration in S100B release when evaluated in striatal acute slices. This difference maybe involves short incubation, the reduced permeability of the slice preparation and/or a more complex response since other cell types are present. Further experiments using higher concentrations of these drugs and evaluation of neuronal toxicity to them (e.g. measuring neuron-specific enolase) would help to clarify these aspects.

In summary, these data point to a direct effect of the toxins 6-OHDA and MPTP on glial cells evaluated by S100B secretion. No direct changes were observed in the cellular content of S100B or GFAP. Under these conditions acute striatal slices did not secrete S100B in response to these toxins. These data reinforce the use of these toxins in PD models, as well as indicate the importance of the glial-derived protein S100B as useful marker in PD.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We would like to thank Ms. Liz Marina Bueno dos Passos for technical support with NSE measurement and Dr. Rui Daniel Prediger for provide us the MPTP used in these experiments.

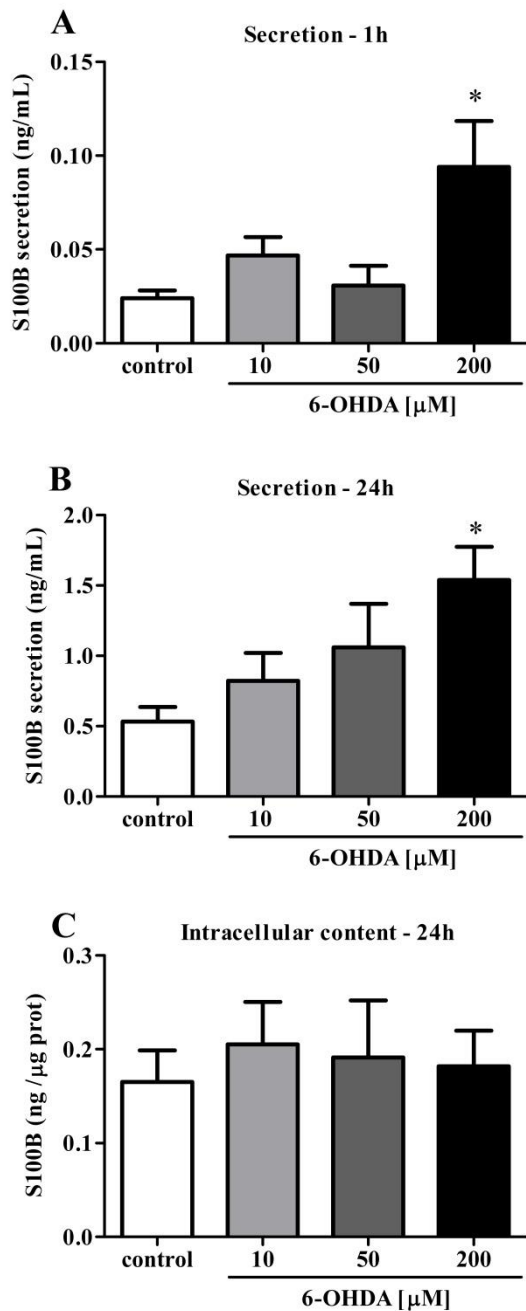


Figure 1. Effect of 6-OHDA on S100B secretion and intracellular content. After confluence, cultures were exposed to 6-OHDA 10, 50 or 200 μ M 24h. Extracellular S100B were measured by ELISA at 1h (**a**) and 24h (**b**). Intracellular S100B content was measured at 24h (**c**) by ELISA. Each value represents the mean \pm standard error of at least 5 independent experiments performed in triplicate. *Significantly different from control (one way ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.05$).

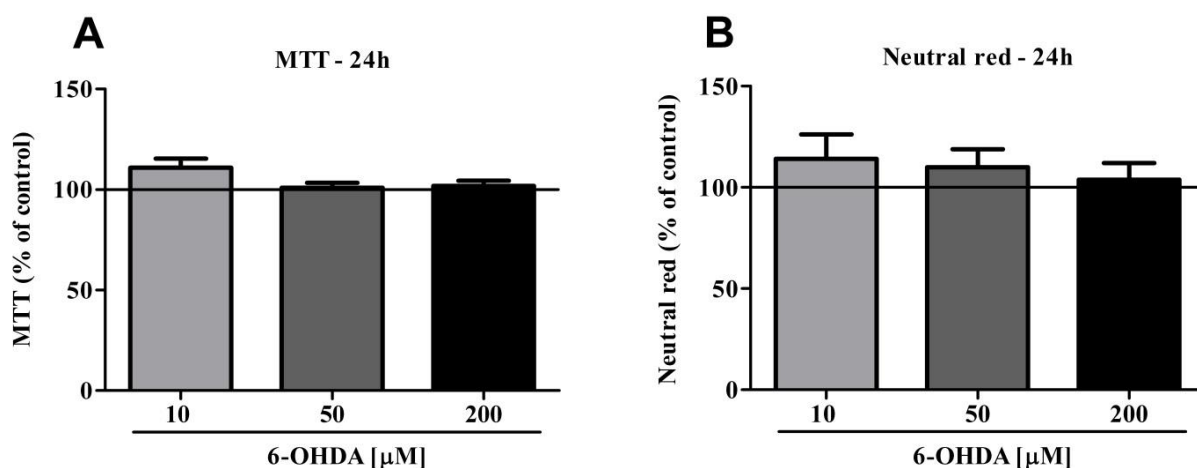


Figure 2. Metabolic viability of astrocyte cultures exposed to 6-OHDA. After confluence, astrocyte cultures were exposed to 6-OHDA 10, 50 or 200 μM . MTT reduction (a) and neutral red uptake (b) were measured at 24h. Each value represents the mean \pm standard error, expressed as percentage of control (assumed as 100%, indicated by line), from at least five independent experiments performed in triplicate.

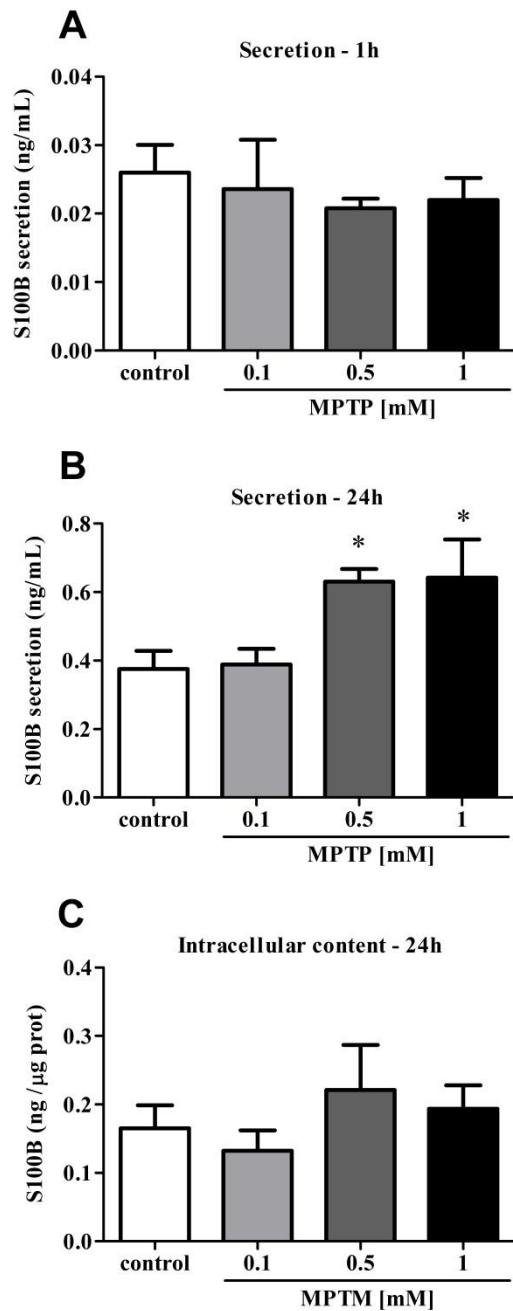


Figure 3. Effect of MPTP on S100B secretion and intracellular content. After confluence, cultures were exposed to MPTP 0.1, 0.5, or 1 mM for 24h. Extracellular S100B were measured by ELISA at 1h (a) and 24h (b). Intracellular S100B content was measured at 24h (c) by ELISA. Each value represents the mean \pm standard error of at least 5 independent experiments performed in triplicate. *Significantly different from control (one way ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.05$).

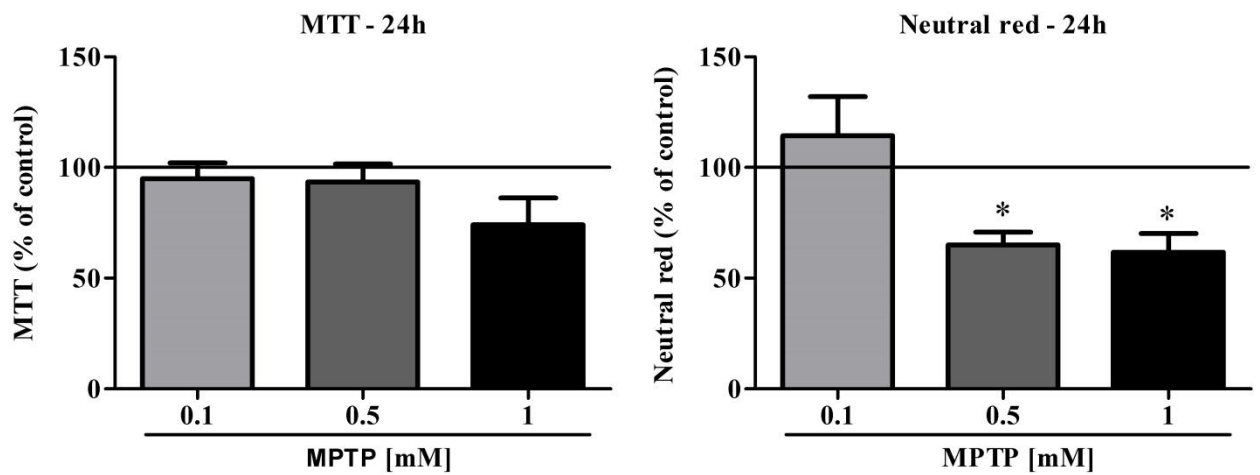


Figure 4. Metabolic viability of astrocyte cultures exposed to MPTP. After confluence, astrocyte cultures were exposed to MPTP 0.1, 0.5 or 1 mM. MTT reduction (**a**) and neutral red uptake (**b**) were measured at 24h. Each value represents the mean \pm standard error, expressed as percentage of control (assumed as 100%, indicated by line), from at least four independent experiments performed in triplicate. *Significantly different from control (one way ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.05$).

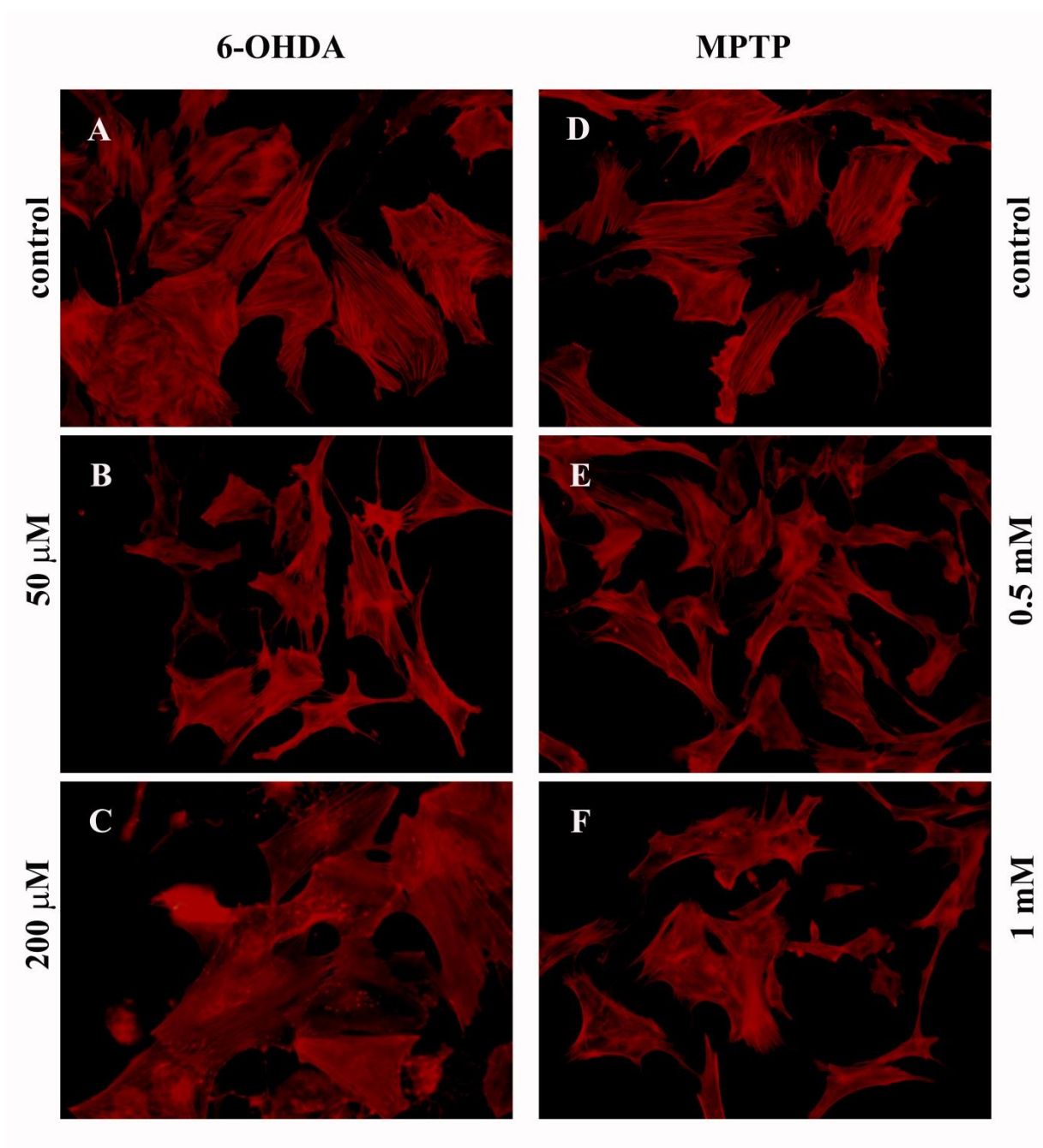


Figure 5. Astrocytes morphology. Rhodamine-labelled phalloidin images of the actin cytoskeleton of control astrocytes (A, D) and astrocytes exposed to 6-OHDA (B, C) or MPTP (E, F). After confluence, cultures were exposed to toxins for 24h. After that they were fixed and stained with rhodamine-labelled phalloidin.

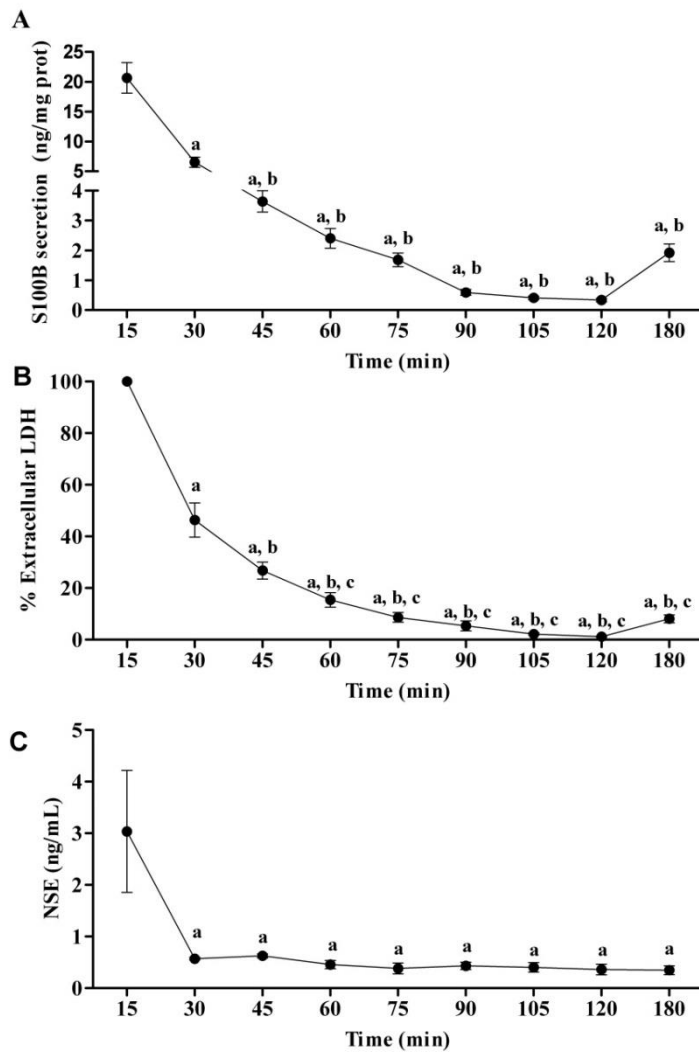


Figure 6. Characterization of S100B secretion and cell integrity in acute striatal slices.

Striatal slices of 0.3 mm were incubated in a HEPES-buffered saline for 180 min. From time zero to 120 min, the medium was replaced every 15 min. (a) S100B was measured in the medium by ELISA. Cellular integrity was measured by two different assays, (b) LDH activity and (c) NSE content and in the medium. LDH was expressed as percentage of the initial activity (at 15 min), assumed as 100% in each experiment. Each value represents the mean \pm standard error from at least 10 (a), 4 (b) or 10 (c) independent experiments performed in triplicate. *a* Significantly different from 15 min; *b* significantly different from 30 min; *c* significantly different from 45 min (one- way ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.05$).

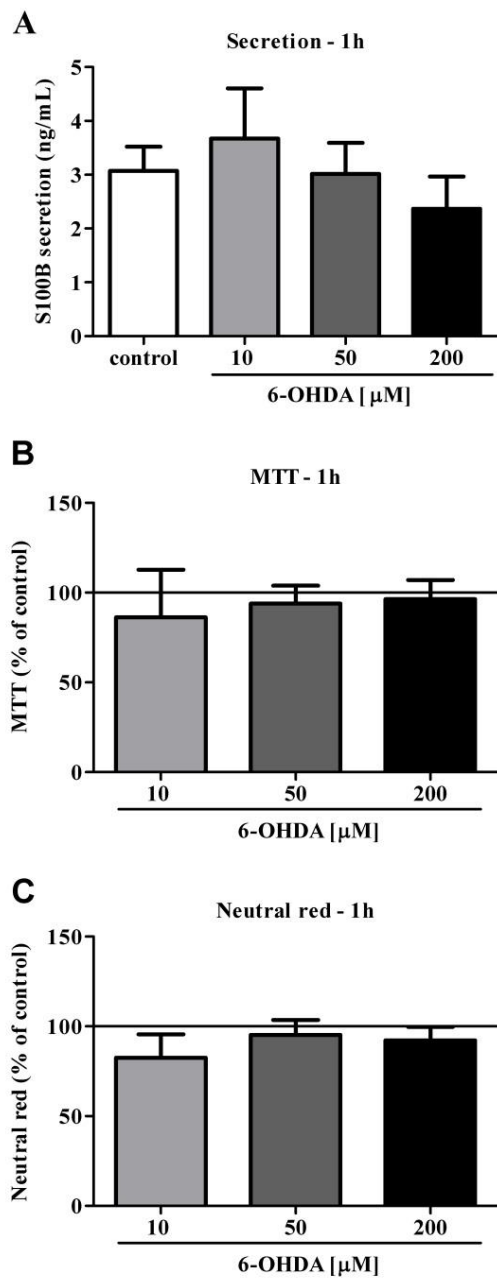


Figure 7. S100B secretion in acute striatal slices exposed to 6-OHDA. The 30 days old Wistar rats were sacrificed by decapitation and 0.3 mm striatal slices were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, slices were exposed to 6-OHDA 10, 50 or 200 μ M for 1 h. Extracellular S100B was measured by ELISA (a). Cell viability was analyzed by MTT reduction (b), and neutral red uptake (c), at the end of treatment. Each value represents the mean \pm standard error of at least four independent experiments.

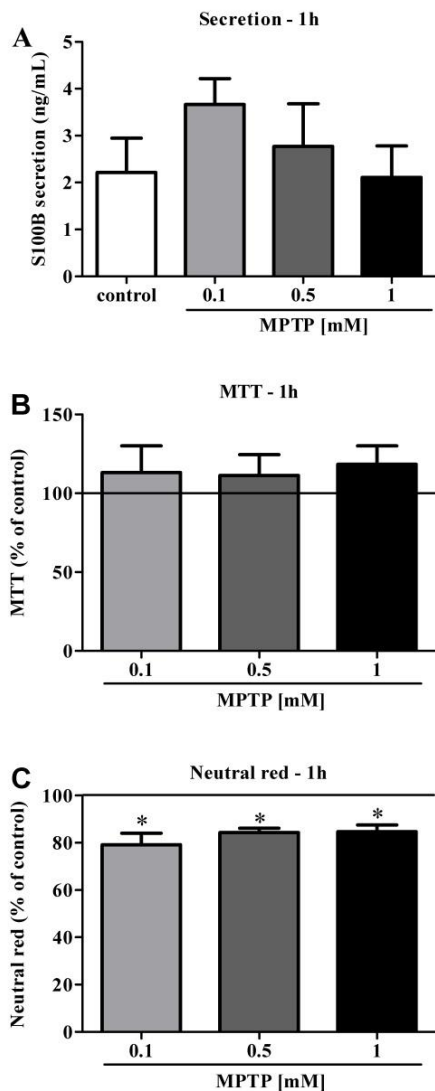


Figure 8. S100B secretion in acute striatal slices exposed to MPTP. The 30 days old Wistar rats were sacrificed by decapitation and 0.3 mm striatal slices were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, slices were exposed to MPTP 0.1, 0.5 or 1 mM for 1 h. Extracellular S100B was measured by ELISA (a). Cell viability was analyzed by MTT reduction (b), and neutral red uptake (c), at the end of treatment. Each value represents the mean \pm standard error of at least four independent experiments. *Significantly different from control (one way ANOVA followed by Duncan's test, $p < 0.05$).

References

1. Mythri RB, Venkateshappa C, Harish G, et al. (2011) Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson's disease brains. *Neurochem Res* 36:1452–63. doi: 10.1007/s11064-011-0471-9
2. Fahn S (2003) Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991:1–14. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07458.x
3. Melrose HL, Lincoln SJ, Tyndall GM, Farrer MJ (2006) Parkinson's disease: A rethink of rodent models. *Exp Brain Res* 173:196–204. doi: 10.1007/s00221-006-0461-3
4. Bové J, Perier C (2012) Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 211:51–76. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.057
5. Javitch J a, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2173–2177. doi: 10.1073/pnas.82.7.2173
6. Chan P, DeLanney LE, Irwin I, et al. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem* 57:348–51. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb02134.x
7. Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5:77–82.
8. Brück D, Wenning GK, Stefanova N, Fellner L (2015) Glia and alpha-synuclein in neurodegeneration: A complex interaction. *Neurobiol Dis.* doi: 10.1016/j.nbd.2015.03.003
9. Teismann P, Tieu K, Cohen O, et al. (2003) Pathogenic Role of Glial Cells in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 18:121–129. doi: 10.1002/mds.10332
10. Bosson A, Boisseau S, Buisson A, et al. (2015) Disruption of dopaminergic transmission remodels tripartite synapse morphology and astrocytic calcium activity within substantia nigra pars reticulata. *Glia* 63:673–683. doi: 10.1002/glia.22777
11. Niranjana R (2014) The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Mol Neurobiol* 49:28–38. doi: 10.1007/s12035-013-8483-x
12. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 277–90.

13. Schaf D V., Tort ABL, Fricke D, et al. (2005) S100B and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11:39–43. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.07.002
14. Gonçalves C-A, Concli Leite M, Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 41:755–763. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003
15. Eldik LJ Van, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B : Beneficial and detrimental functions in the brain. 21:97–108.
16. Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60:614–632. doi: 10.1002/jemt.10303
17. Batassini C, Broetto N, Tortorelli L, et al. (2015) Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plast.*
18. Gottfried C, Valentim L, Salbego C, et al. (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions : specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27(HSP27). *Brain Res* 833:142–149. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01503-6
19. Soto-Otero Ra and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of som, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, et al. (2000) Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 74:1605–12. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x
20. Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, et al. (2009) S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res* 34:1603–11. doi: 10.1007/s11064-009-9949-0 ET - 2009/03/17
21. Leite MC, Galland F, Brolese G, et al. (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 ST – A simple, sensitive and widely applicab. doi: S0165-0270(07)00595-X [pii] 10.1016/j.jneumeth.2007.11.021 ET - 2008/01/08
22. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119:203–10 ST – Re-examination and further developmen.
23. Leite MC, Galland F, de Souza DF, et al. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* 87:2439–46. doi: 10.1002/jnr.22083
24. Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, et al. (2009) S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca²⁺ and K⁺. *Neurochem Res* 34:1603–1611. doi: 10.1007/s11064-009-9949-0

25. Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, et al. (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14:483–9.
26. Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60:614–32. doi: 10.1002/jemt.10303
27. Gomide V, Chadi G (2005) Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. *Int J Neurosci* 115:537–55. doi: 10.1080/00207450590521064
28. Gordon MN, Schreier WA, Ou X, et al. (1997) Exaggerated astrocyte reactivity after nigrostriatal deafferentation in the aged rat. *J Comp Neurol* 388:106–19. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19971110)388:1<106::AID-CNE7>3.0.CO;2-5
29. Muramatsu Y, Kurosaki R, Watanabe H, et al. (2003) Expression of S-100 protein is related to neuronal damage in MPTP-treated mice. *Glia* 42:307–313. doi: 10.1002/glia.10225
30. Sathe K, Maetzler W, Lang JD, et al. (2012) S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. *Brain* 135:3336–47. doi: 10.1093/brain/aws250
31. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–1131. doi: 10.1038/nprot.2008.75
32. Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909 ST – Parkinson's disease: mechanisms and . doi: S0896627303005683 [pii] ET - 2003/09/16
33. Wei X, He S, Wang Z, et al. (2014) Fibroblast growth factor 1 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: an in vitro and in vivo investigation in experimental models of parkinson ' s disease. 6:664–677.
34. Iwata-ichikawa E, Kondo Y, Miyazaki I, et al. (1999) Glial Cells Protect Neurons Against Oxidative Stress via Transcriptional Up-Regulation of the Glutathione Synthesis. 2334–2344. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722334.x
35. Nagy JI, Li WEI (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* 12:4567–4572. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.01331.x
36. Nardin P, Tramontina F, Leite MC, et al. (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* 50:774–82. doi: 10.1016/j.neuint.2007.01.013

DISCUSSÃO

A DP é caracterizada pela morte progressiva de neurônios dopaminérgicos da SN, que provoca notáveis prejuízos motores nos pacientes. Além da morte neuronal, também acontece astrogliose (Cabezas et al. 2013), que corresponde à reação dos astrócitos a algum estímulo nocivo e envolve alterações morfológicas e moleculares nestas células, sendo normalmente evidenciada através do aumento no imunoconteúdo de GFAP, um filamento intermediário do citoesqueleto destas células. Além da GFAP, a proteína S100B também tem sido utilizada como um marcador de plasticidade astrogliar. Importante salientar que estas duas proteínas não necessariamente mudam ao mesmo tempo e no mesmo sentido. Por exemplo, em um trabalho do nosso grupo foi mostrado que exercício físico em ratos alterou o conteúdo de GFAP no hipocampo, mas não o conteúdo de S100B (Bernardi et al. 2013). Também já foi mostrado, no modelo de demência induzida por estreptozotocina, uma alteração no conteúdo de S100B no hipocampo, sem nenhuma alteração de GFAP, no tempo avaliado (Biasibetti et al. 2013).

Entender esta resposta astrogliar é essencial para melhor entender a patogênese da DP e de outras doenças neurodegenerativas, permitindo assim que novas estratégias terapêuticas sejam sugeridas. Neste trabalho, utilizamos um modelo da DP em ratos, induzido pela toxina dopaminérgica 6-OHDA. Esta toxina tem sido muito utilizada para avaliar potenciais estratégias de tratamento (Blandini & Armentero 2012). A toxina pode ser injetada no estriado, no FPM ou diretamente na SN, e normalmente a injeção é unilateral. Em função de proporcionar uma lesão mais gradual, acredita-se que a lesão no estriado seja mais útil para estudar os mecanismos envolvidos na morte celular da DP, enquanto o modelo por infusão no FPM seria mais aplicável para testar estratégias terapêuticas e tratar os sintomas motores (Bové & Perier 2012).

Neste trabalho, utilizamos um protocolo baseado em três injeções unilaterais de 6-OHDA no estriado ventrolateral, conforme descrito por Kirik e colaboradores (1998), o qual possibilita uma lesão lenta, progressiva e parcial, que demora mais de três semanas para estabelecer-se e equivale à fase de sintomas iniciais da DP. A lesão é consequência da perda de axônios terminais, seguida por uma degeneração retrógrada. A dose total é dividida em três infusões a fim de evitar o dano não específico já descrito quando a injeção é feita em apenas um local (Kirik et al. 1998). A escolha do estriado ventrolateral para realização das infusões justifica-se pelo fato de que esta área recebe inervação exclusivamente da SN, ao contrário do estriado dorsomedial, que também recebe inervação da área tegmentar ventral. Além disso, o estriado ventrolateral equivale ao putâmen de primatas e humanos, região do estriado que apresenta a depleção de dopamina mais pronunciada em pacientes com a doença (Bernheimer et al. 1973). Como controle, utilizamos animais Sham, os quais foram submetidos ao mesmo protocolo de cirurgia, porém receberam infusão estriatal apenas do veículo utilizado para diluir a 6-OHDA (ácido ascórbico).

Realizada a cirurgia, os animais foram avaliados 1, 7 e 21 dias após. A lesão foi confirmada pelo comportamento rotacional induzido por metilfenidato (40 mg/kg), bem como pela redução no imunoconteúdo de TH no estriado e SN 21 dias após a cirurgia. Outros animais foram utilizados para obtenção de LCR e amostras encefálicas de estriado e SN.

O metilfenidato inibe a recaptção de dopamina, provocando uma assimetria na sinalização deste neurotransmissor em animais lesionados unilateralmente, o que promove uma assimetria motora, evidenciada pelo comportamento rotacional (Chopin et al. 1999). Os animais apresentaram rotações já no primeiro e sétimo dias pós-cirurgia. No entanto, apenas após 21 dias o número de rotações foi significativamente maior do que nos animais

do grupo controle (Sham). Sabe-se que a dose utilizada de metilfenidato (40 mg/kg) é capaz de induzir atividade rotacional em animais com pelo menos 50% de perda de neurônios TH-positivos (Silvestrin et al. 2009). De acordo com o conteúdo de TH observado no estriado, vemos que aos sete dias já ocorreu uma redução considerável, igual à vista aos 21 dias. Dessa forma, o resultado das rotações parece contraditório, uma vez que os animais giraram muito menos aos sete dias do que aos 21 dias. Esse dado pode ser explicado por possíveis mecanismos capazes de compensar a depleção de dopamina. Estes mecanismos envolvem o aumento na liberação de dopamina pelos terminais dopaminérgicos remanescentes, além de um aumento de receptores e sensibilização dos mesmos (Deumens et al. 2002).

Gliose, evidenciada pelo aumento de GFAP, ocorre após injeção estriatal de 6-OHDA (Nakagawa & Schwartz 2004). Podemos ver na Tabela 1 que aumento de GFAP também já foi observado após injeção de 6-OHDA no FPM e SN, bem como após injeção i.p. de MPTP. Nós encontramos um aumento de GFAP no estriado ipsilateral à lesão sete e 21 dias após a administração de 6-OHDA, o que está de acordo com achados prévios (Carbone et al. 2012; Aponso et al. 2008). No entanto, apesar da redução de TH observada na SN, não observamos aumento de GFAP nesta estrutura. Outros trabalhos já mostraram aumento de GFAP na SN (exemplos na Tabela 1) em diferentes tempos. Talvez, nas nossas condições experimentais, a gliose tenha ocorrido em algum momento entre os dias de avaliação ou ocorreria apenas depois. Para ter certeza, teríamos que realizar imunohistoquímica em outros dias após a lesão.

Até onde sabemos, nosso trabalho mostra pela primeira vez a dosagem de GFAP no LCR no modelo da DP induzido por 6-OHDA. Elevações da proteína GFAP já foram identificadas em algumas condições de dano encefálico agudo, como acidente vascular cerebral (Hjalmarsson et al. 2014), bem como em doenças crônicas, como a doença de

Alzheimer (Jesse et al. 2009) e a demência vascular (Wallin et al. 1996). Na DP, no entanto, não foram identificadas alterações, em estudos prévios (Holmberg et al. 1998; Abdo et al. 2004; Petronilho et al. 2012; Constantinescu et al. 2010). Identificamos nos ratos um aumento transitório de GFAP induzido por 6-OHDA no sétimo dia após a lesão. Este aumento pode estar refletindo o cenário agudo de dano. Vale observar que no sétimo dia observamos uma redução significativa no conteúdo de TH no estriado, mostrando que há intensa degeneração neste período. Podemos ainda especular que seria possível detectar em humanos uma elevação desta proteína durante o início da DP ou durante períodos de exacerbação, sugerindo a sua investigação como um biomarcador. Biomarcadores são geralmente moléculas periféricas que apresentam valor diagnóstico ou prognóstico em uma determinada condição fisiológica alterada ou doença (Gonçalves et al. 2008).

Até o momento, não há nenhum biomarcador definitivo para a DP. A busca por marcadores bioquímicos periféricos de dano ao SNC tem aumentado nas últimas décadas. Algumas características da DP explicam porque os biomarcadores seriam de particular importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Sabe-se que o início da doença ocorre décadas antes do início dos sintomas motores que a caracterizam. Quando diagnosticada, o dano já progrediu por um período estimado de 5 a 15 anos e já aconteceu uma perda de 60 a 80% dos neurônios da SN (Miller & O'Callaghan 2015). Isso em função dos mecanismos compensatórios que retardam a manifestação dos sintomas mais evidentes (Arkadir et al. 2014). O desenvolvimento de biomarcadores permitiria testar estratégias de intervenção no início da doença, além de monitorar o progresso destas intervenções.

A proteína S100B tem sido utilizada como um marcador de dano encefálico (Gonçalves et al. 2008; Guerra et al. 2011). Alguns autores têm sugerido um papel ativo desta proteína na DP (Niranjan 2014; Sathe et al. 2012; Liu et al. 2008).

Em dois trabalhos realizados em pacientes com DP, não foram identificadas alterações de S100B no LCR (Abdo et al. 2004; Abdo et al. 2007); entretanto, um trabalho mais recente identificou um aumento (Sathe et al. 2012). Além disso, este último trabalho também realizou uma investigação *post-mortem* na SN, identificando uma astrogliose, com base no aumento de S100B.

Resultados conflitantes quanto a dosagens de S100B também foram observados em modelos da doença com administração intraestriatal de 6-OHDA (Tabela 1). Por exemplo, um aumento de astrócitos positivos para S100B foi descrito no estriado e na SN (Gomide & Chadi 2005). Entretanto, em outro trabalho, apesar do aumento de GFAP, não foram identificadas alterações em S100B de dois a 14 dias após a administração de 6-OHDA (Gordon et al. 1997). Nós não identificamos, através da técnica de ELISA, alteração de S100B no estriado ou SN. Porém, encontramos um aumento (de aproximadamente 7 ng/mL) no LCR um dia após a cirurgia estereotáxica. Levando-se em conta trabalhos prévios do laboratório, sabemos que a medida de S100B em condições basais é menor do que 2 ng/mL (Guerra et al. 2011; Leite et al. 2008). Este aumento em S100B um dia após a cirurgia foi observado tanto no grupo Sham (animais que receberam infusão de veículo) quanto no grupo 6-OHDA. Então, provavelmente, este aumento deve-se à lesão mecânica induzida pela agulha. A ativação astrogliar no estriado induzida por lesão mecânica já foi descrita, com base na imunorreatividade de GFAP (Gomide et al., 2005). Podemos observar no estriado, um dia após a cirurgia, um aumento nos níveis de GFAP medido por ELISA, tanto no grupo Sham quanto no grupo 6-OHDA, quando comparado com o respectivo estriado contralateral (teste t, $P < 0,05$).

Este aumento de S100B evidenciado no LCR reflete secreção em resposta a uma lesão encefálica aguda e provavelmente não está restrita ao estriado. Sabemos que a quantidade secretada frequentemente é menor do que o conteúdo intracelular desta

proteína, o que explica porque as alterações intra e extracelulares não estão necessariamente associadas (Gonçalves et al. 2008). Os valores de S100B no líquido podem ser considerados benéficos desde que abaixo de 20 ng/mL (ou seja, nM) (Gonçalves et al. 2008). Isso de acordo com trabalhos em cultura de neurônios, que mostraram que concentrações na ordem de pico e nanomolar seriam neurotróficas, enquanto concentrações micromolares seriam consideradas tóxicas e apoptóticas (Donato et al. 2009). A elevação que observamos está abaixo de 10 ng/mL e seria, portanto, benéfica. Porém, focalmente, no local de liberação, a concentração de S100B que está sendo secretada/liberada pode estar em concentrações mais altas, exercendo efeito tóxico nos neurônios vizinhos.

As alterações observadas nos animais lesionados com 6-OHDA estão representadas na Figura 3.

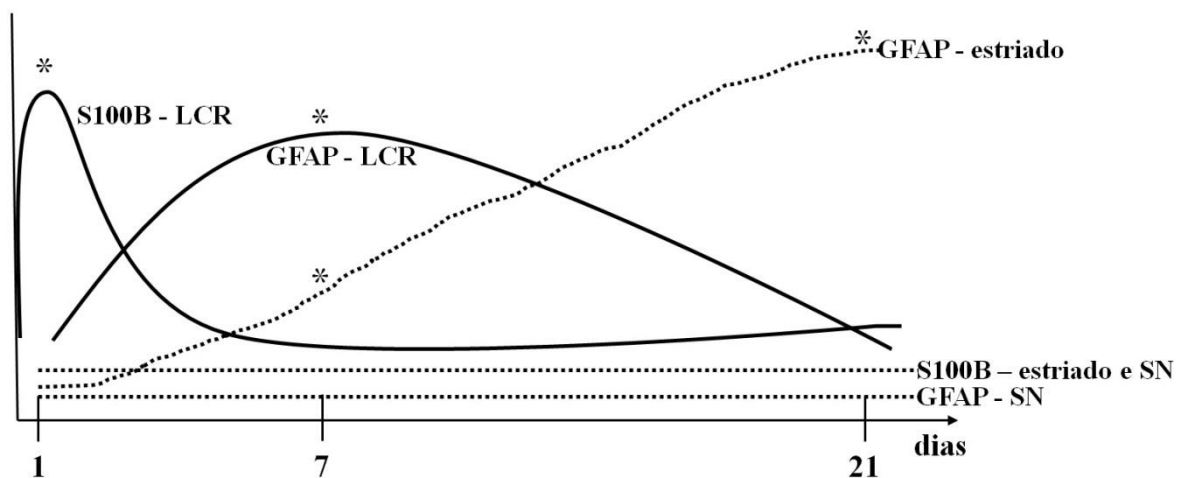


Figura 3. Flutuações nos marcadores glias S100B e GFAP em animais lesionados com 6-OHDA. * indica diferença significativa, conforme explicado no Capítulo I. LCR: líquido cefalorraquidiano. SN: substância negra.

Como evidenciamos um aumento inicial e transitório de S100B no LCR, mascarado, porém, por uma provável lesão mecânica, nosso próximo passo foi investigar a

capacidade da toxina 6-OHDA de induzir secreção de S100B em culturas primárias de astrócitos e também em fatias estriatais frescas.

Conforme tabela 2, vários trabalhos já evidenciaram alterações no imunoconteúdo de S100B no estriado e SN após administração de MPTP. O trabalho de Sathe e colaboradores (2012) mostrou um aumento de S100B na SN imediatamente após tratamento com MPTP, evidenciando o envolvimento desta proteína na toxicidade inicial provocada por MPTP. Assim, resolvemos testar o efeito também desta toxina na secreção de S100B, em cultura de astrócitos e em fatias estriatais frescas.

Detectamos um aumento na secreção de S100B em culturas de astrócitos expostas a 6-OHDA (1h e 24h) e MPTP (24h), sem, contudo, alterar o conteúdo intracelular. Importante ressaltar que já foi demonstrada a presença de DAT em astrócitos (Murphy-royal et al. 2015), embora o mecanismo de ação da 6-OHDA também envolva a formação de ERO no meio extracelular (Blum et al. 2001).

Analisando a viabilidade das células expostas à 6-OHDA, percebemos que não houve alteração, quando analisada através do ensaio de redução do MTT e também através da captação de vermelho neutro. O MPTP, por outro lado, provocou uma redução da captação de vermelho neutro pelos astrócitos. Sabe-se que a captação de vermelho neutro depende da capacidade das células de manter os gradientes de pH, através da produção de ATP (Repetto et al. 2008). A produção de ATP pode ter sido alterada, uma vez que a toxina MPTP, após ter sido convertida a MPP^+ pelas células gliais é capaz de inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Dauer & Przedborski 2003). O MPTP, aparentemente, provocou algum tipo de prejuízo na viabilidade dos astrócitos, podendo ter ocasionado algum dano de membrana. Assim, devemos considerar a possibilidade de que este aumento de S100B encontrado no meio extracelular deva-se à liberação de S100B e

não propriamente à secreção. Para ter certeza, algum ensaio de integridade celular deve ser realizado, como a avaliação da atividade extracelular de LDH, por exemplo.

A concentração de 6-OHDA de 200 μM é capaz de causar uma redução da viabilidade em cultura de neurônios (Wei et al. 2014; Lopes et al. 2012). No entanto, não observamos prejuízos em astrócitos e fatias, tratadas com essa concentração, o que pode ser explicado pela maior resistência dos astrócitos ao estresse oxidativo (Iwata-ichikawa et al. 1999).

Ao analisar a morfologia celular, através de marcação do citoesqueleto de actina por faloidina, podemos observar nos controles a forma poligonal, característica destas células em cultura (Rodnight & Gottfried 2013). Não foram observadas alterações morfológicas com 1h de tratamento (dados não mostrados). Em 24h, também não vemos alterações morfológicas muito evidentes entre os tratamentos e o controle, exceto pelo fato de estarem um pouco mais esticadas, quando na presença das toxinas. Parece que a secreção de S100B induzida por 6-OHDA não está relacionada com alterações morfológicas, o que está de acordo com dados da literatura (Pinto et al. 2000).

Também testamos o efeito destas toxinas em fatias frescas de estriado. Este tipo de preparação tem algumas vantagens em comparação às culturas celulares. Nas fatias, o contato entre as células permanece preservado, bem como a interação entre diferentes tipos celulares – neurônios, astrócitos e microglia (Nagy & Li 2000). Entretanto, a presença de diferentes tipos celulares faz com que a interpretação dos dados seja mais complexa. Outro ponto negativo é o fato de que estas fatias não permanecem viáveis por muito tempo, não permitindo a avaliação de tratamentos longos.

A secreção de S100B em fatias hipocâmpais frescas já havia sido caracterizada (Nardin et al., 2009). Entretanto, não sabíamos se as fatias de estriado responderiam da mesma maneira. Dessa forma, realizamos uma série de experimentos a fim de avaliar o

tempo necessário para recuperação metabólica destas fatias, bem como o tempo em que permanecem viáveis. Avaliamos, ao longo de 180 min, no meio extracelular, a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), o conteúdo de enolase específica do neurônio (NSE) e o conteúdo de S100B. Podemos verificar que há uma redução significativa nesses três parâmetros nos primeiros 30 min e que a partir dos 60 min estão estabilizados, permanecendo estáveis até os 180 min. Assim, optamos por padronizar o tempo de estabilização de 2 h e o tratamento com duração de 1h. Alguns ensaios realizados (Anexo 2) mostram que a secreção de S100B em fatias de estriado é responsiva e apresenta comportamento diferente do já conhecido em fatias de hipocampo. Por exemplo, ao contrário do que acontece no hipocampo, 0,2 mM de K^+ não foi capaz de estimular a secreção de S100B em estriado. Isso mostra a heterogeneidade entre as populações de astrócitos das duas estruturas.

As toxinas 6-OHDA e MPTP, incubadas durante 1h, não causaram alteração na secreção de S100B em fatias estriatais frescas. A diferença na resposta em relação às culturas de astrócitos pode ter muitas explicações. Talvez o tempo de incubação tenha sido curto para causar alguma resposta. Ainda, a permeabilidade das fatias também pode ter influenciado, uma vez que as toxinas não conseguem entrar em contato direto com todas as células, já que a fatia tem 300 μm . Além disso, temos uma influência também dos neurônios à presença das toxinas, os quais podem, de alguma maneira, estar influenciando a secreção de S100B.

Kearns e colaboradores (2006) descreveram uma técnica interessante para estudo da DP *in vitro*. Consiste em cultura de fatias obtidas de secções parasagittais do encéfalo, contendo a SN, o FPM e o estriado. Seria uma possibilidade para estudar a secreção de S100B em fatias expostas às toxinas por um tempo maior.

Sabendo que a toxina MPTP é capaz de inibir a cadeia respiratória mitocondrial, testamos outra droga com esse efeito, a azida sódica. Conforme podemos ver no Anexo 2, esta última foi capaz de aumentar a secreção de S100B, sem prejuízos na integridade celular (evidenciado pela atividade de LDH extracelular), servindo como um controle positivo da nossa preparação. Podemos especular que o efeito da 6-OHDA no aumento da secreção também possa ter sido via inibição da cadeia respiratória mitocondrial.

A toxina MPTP foi capaz de reduzir a captação de vermelho neutro também nas fatias. A avaliação de LDH nos permitirá analisar a integridade da membrana e a avaliação de NSE nos permitira descobrir se há morte neuronal.

Nos ensaios *in vitro* com a toxina 6-OHDA utilizamos glutathiona (GSH) como veículo. Classicamente, utiliza-se ácido ascórbico como veículo (Bové & Perier 2012) e foi o que utilizamos nos experimentos *in vivo*. No entanto, nos experimentos *in vitro*, tivemos que optar pelo uso de outro antioxidante, GSH, para superar uma limitação metodológica na medida de S100B (ver Anexo 1). Importante enfatizar que em todos os ensaios testamos o veículo e este não provocou alteração, quando comparado com o controle sem GSH.

Embora a participação da glia na neurodegeneração seja um consenso, ainda está em aberto se o processo de astrogliose reativa representa uma tentativa de prevenir danos adicionais, ou se acaba gerando sinais prejudiciais, contribuindo com a perda neuronal. No entanto, parece que a neurodegeneração desencadeia a astrogliose e microgliose; os astrócitos reativos, por sua vez contribuem com a neuroinflamação, que é considerada um componente importante e amplificador das doenças neurodegenerativas (Lobsiger & Cleveland 2007). Foi descrito que camundongos nocaute para S100B apresentaram maior sobrevivência de neurônios positivos para TH, quando injetados com MPTP (Sathe et al. 2012), evidenciando o papel ativo desta proteína no processo inicial de degeneração. O aumento na secreção de S100B provocado por 6-OHDA observado nas culturas de

astrócitos é mais uma evidência que reforça a participação destas células no processo inicial de degeneração.

Um fato importante é que existem algumas evidências de que a 6-OHDA pode ser considerada uma neurotoxina endógena, uma vez que sua presença já foi mostrada em encéfalo de humanos (Curtius et al. 1974), bem como na urina de pacientes com DP tratados com L-DOPA (Andrew et al. 1993). A presença desta toxina pode ser explicada pelos níveis significativos de dopamina, peróxido de hidrogênio e ferro livre que os neurônios da SN contêm. Uma reação não-enzimática entre estes elementos poderia levar à formação de 6-OHDA (Linert et al. 1996).

Importante salientarmos algumas limitações deste trabalho. Primeiro, nós escolhemos o modelo de 6-OHDA. Sabemos que estes resultados envolvendo parâmetros gliais precisam ser confirmados em outros modelos. Segundo, a lesão mecânica induzida pela agulha mascarou a lesão induzida por 6-OHDA. Em estudos futuros deste modelo, a proteína S100B deve ser medida entre 2 e 5 dias, o que permitiria identificação de um possível aumento de S100B no LCR induzido por 6-OHDA. Terceiro, este estudo teve como foco dois marcadores clássicos de ativação astrogliar: S100B e GFAP. Entretanto, é importante considerar que a heterogeneidade dos astrócitos e que outros marcadores também merecem atenção, como Aquaporina-4 (Xiao & Hu 2014) ou Glt-1 (Massie et al. 2010), particularmente porque tem sido mostrado que a disfunção astrocitária está envolvida no início e progressão da DP.

CONCLUSÕES

Avaliamos dois marcadores de plasticidade astrogliar em um modelo em ratos da DP, obtido através da infusão intraestriatal de 6-OHDA. Os dados apresentados reforçam várias ideias a respeito da DP. Porém, os achados também indicam várias limitações do modelo utilizado para estudar esta doença. A ativação astrogliar, sinalizada pelo aumento de GFAP no estriado e LCR, precede o dano neuronal; entretanto, a alteração inicial no conteúdo de S100B no LCR parece estar relacionada à lesão mecânica, o que nos impede de avaliar a toxicidade da 6-OHDA neste período. Porém, a toxicidade glial da 6-OHDA foi confirmada pelo aumento da secreção em culturas de astrócitos. A toxina MPTP também teve este efeito em cultura.

Décadas de estudos em patologia e fisiologia focaram nas anomalias neuronais envolvidas em doenças encefálicas, mas está cada vez mais evidente que os astrócitos têm um papel importante. Investigações na DP sempre estiveram focadas na agregação de proteínas, neurotoxicidade, aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e defeitos na maquinaria de degradação de proteínas (Schulz 2008). No entanto, tem crescido o número de artigos que mostram evidências do envolvimento da glia nesta doença. Nosso trabalho contribui com o conhecimento nesta área, mostrando alguns aspectos importantes em relação aos marcadores gliais S100B e GFAP, reforçando a participação dos astrócitos no processo de degeneração, além de apontar novas perspectivas de estudo.

PERSPECTIVAS

Tanto no experimento *in vivo* quanto no experimento em culturas:

- Medir conteúdo das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α .
- Medir conteúdo de BDNF.
- Medir conteúdo do receptor RAGE.

No experimento *in vivo*:

- Avaliar S100B e GFAP no LCR, SN e estriado, nos dias 2 a 5.
- Avaliar a secreção de S100B em fatias estriatais de animais administrados com 6-OHDA e MPTP (ensaios *ex vivo*).

Nos experimentos em fatias:

- Realizar ensaios de integridade celular (LDH, NSE).
- Testar doses mais altas das toxinas em fatias.
- Tratar as fatias por um tempo maior, por 2h em vez de 1h.

REFERÊNCIAS

- Abbott, N.J., 2005. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and molecular neurobiology*, 25(1), pp.5–23.
- Abdo, W.F. et al., 2004. Cerebrospinal fluid analysis differentiates multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 19(5), pp.571–9.
- Abdo, W.F. et al., 2007. CSF neurofilament light chain and tau differentiate multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 28(5), pp.742–7.
- Al-Jarrah, M.D. & Jamous, M., 2011. Effect of endurance exercise training on the expression of GFAP, S100B, and NSE in the striatum of chronic/progressive mouse model of Parkinson's disease. *NeuroRehabilitation*, 28(4), pp.359–63.
- Andrew, R. et al., 1993. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochemical research*, 18(11), pp.1175–7.
- Aponso, P.M., Faull, R.L.M. & Connor, B., 2008. Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 151(4), pp.1142–53.
- Arkadir, D., Bergman, H. & Fahn, S., 2014. Redundant dopaminergic activity may enable compensatory axonal sprouting in Parkinson disease. *Neurology*, 82(12), pp.1093–8.
- Ballard, P.A., Tetrud, J.W. & Langston, J.W., 1985. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*, 35(7), pp.949–56.
- Banati, R.B., Daniel, S.E. & Blunt, S.B., 1998. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 13(2), pp.221–7.
- Barbosa, M.T. et al., 2006. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). *Movement Disorders*, 21(6), pp.800–808.
- Bernardi, C. et al., 2013. Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats. *Neural plasticity*, 2013, p.709732.
- Bernheimer, H. et al., 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the neurological sciences*, 20(4), pp.415–55.

- Biasibetti, R. et al., 2013. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behavioural brain research*, 236(1), pp.186–93.
- Blandini, F. & Armentero, M.-T., 2012. Animal models of Parkinson's disease. *The FEBS journal*, 279(7), pp.1156–66.
- Blum, D. et al., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65(2), pp.135–172.
- Bové, J. & Perier, C., 2012. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, pp.51–76.
- Businaro, R. et al., 2006. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against A β amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases A β amyloid neurotoxicity at high doses. *Journal of Neuroscience Research*, 83(5), pp.897–906.
- Büyükuysal, R.L., 2005. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochemistry international*, 47(8), pp.580–8.
- Cabezas, R. et al., 2013. Astrocytes Role in Parkinson: A Double-Edged Sword. "Neurodegenerative Diseases", book, Chapter 20.
- Carbone, M., Duty, S. & Rattray, M., 2012. Riluzole neuroprotection in a Parkinson's disease model involves suppression of reactive astrocytosis but not GLT-1 regulation. *BMC neuroscience*, 13, p.38.
- Carlsson, A., 1959. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacological reviews*, 11(2, Part 2), pp.490–493.
- Chadi, G. & Gomide, V.C., 2004. FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Cell biology international*, 28(12), pp.849–61.
- Chan, P. et al., 1991. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *Journal of neurochemistry*, 57(1), pp.348–51.
- Chopin, P., Colpaert, F.C. & Marien, M., 1999. Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 288(2), pp.798–804.
- Colangelo, A.M. et al., 2012. Targeting reactive astrogliosis by novel biotechnological strategies. *Biotechnology Advances*, 30(1), pp.261–271.

- Connolly, B.S. & Lang, A.E., 2014. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 311(16), pp.1670–83.
- Constantinescu, R. et al., 2010. Consecutive analyses of cerebrospinal fluid axonal and glial markers in Parkinson's disease and atypical Parkinsonian disorders. *Parkinsonism & related disorders*, 16(2), pp.142–5.
- Curtius, H.C. et al., 1974. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. *Journal of chromatography*, 99, pp.529–40.
- Damier, P. et al., 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience*, 52(1), pp.1–6.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), pp.1–105.
- Dauer, W. & Przedborski, S., 2003. Parkinson ' s Disease : Mechanisms and Models. , 39, pp.889–909.
- Deumens, R., Blokland, A. & Prickaerts, J., 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental neurology*, 175(2), pp.303–17.
- Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique*, 60(6), pp.540–51.
- Donato, R., 2001. S100 : a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. , 33, pp.637–668.
- Donato, R. et al., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(6), pp.1008–22.
- Dutra, M.F. et al., 2012. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurological Sciences*, 33(5), pp.1137–1144.
- Eddleston, M. & Mucke, L., 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1), pp.15–36.
- Eldik, L.J. Van & Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B : Beneficial and detrimental functions in the brain. , 21, pp.97–108.
- Elkon, H., Melamed, E. & Offen, D., 2004. Oxidative Stress, Induced by 6-Hydroxydopamine, Reduces Proteasome Activities in PC12 Cells: Implications for the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 24(3), pp.387–400.

- Escartin, C. & Bonvento, G., 2008. Targeted Activation of Astrocytes : A Potential Neuroprotective Strategy. , pp.231–241.
- Esposito, E. et al., 2012. Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 7(8).
- Esposito, G. et al., 2012. The antiprotozoal drug pentamidine ameliorates experimentally induced acute colitis in mice. *Journal of neuroinflammation*, 9(277), pp.1–12.
- Fahn, S., 2003. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, pp.1–14.
- Feng, Y., Jankovic, J. & Wu, Y.-C., 2014. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 349(1-2), pp.3–9.
- Ferraro, T.N. et al., 1986. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology*, 25(9), pp.1071–4.
- Giuliani, P. et al., 2012. Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. *Panminerva medica*, 54(1 Suppl 4), pp.43–51.
- Glinka, Y., Gassen, M. & Youdim, M.B.E.T.-1997/01/01, 1997. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl*, 50, pp.55–66.
- Glinka, Y.Y. & Youdim, M.B., 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European journal of pharmacology*, 292(3-4), pp.329–32.
- Gomide, V., Bibancos, T. & Chadi, G., 2005. Dopamine cell morphology and glial cell hypertrophy and process branching in the nigrostriatal system after striatal 6-OHDA analyzed by specific stereological tools. *The International journal of neuroscience*, 115(4), pp.557–582.
- Gomide, V. & Chadi, G., 2005. Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. *The International journal of neuroscience*, 115(4), pp.537–55.
- Gomide, V.C., Silveira, G.A. & Chadi, G., 2005. Transient and widespread astroglial activation in the brain after a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *The International journal of neuroscience*, 115(1), pp.99–117.
- Gonçalves, C.-A., Concli Leite, M. & Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, 41(10), pp.755–763.
- Gordon, G.R.J., Mulligan, S.J. & MacVicar, B.A., 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*, 55(12), pp.1214–21.

- Gordon, M.N. et al., 1997. Exaggerated astrocyte reactivity after nigrostriatal deafferentation in the aged rat. *The Journal of comparative neurology*, 388(1), pp.106–19.
- Gottfried, C. et al., 1999. Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions : specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27(HSP27). *Brain Research*, 833, pp.142–149.
- Graybiel, A.M., 1995. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*, 5, pp.733–41.
- Griffin, W.S. et al., 1998. Glial-neuronal interactions in Alzheimer’s disease: the potential role of a “cytokine cycle” in disease progression. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 8(1), pp.65–72.
- Guerra, M.C. et al., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of neuroinflammation*, 8(1), p.128.
- Halliday, G.M., Stevens, C.H. & Hons, B., 2011. Glia : Initiators and Progressors of Pathology in Parkinson ’ s Disease. , 26(1), pp.6–17.
- Heizmann, C.W., Fritz, G. & Schäfer, B.W., 2002. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, pp.d1356–68.
- Hjalmarsson, C. et al., 2014. Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *Journal of central nervous system disease*, 6, pp.51–8.
- Holmberg, B. et al., 1998. Increased cerebrospinal fluid levels of neurofilament protein in progressive supranuclear palsy and multiple-system atrophy compared with Parkinson’s disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 13(1), pp.70–7.
- Hu, J. et al., 1996. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 271(5), pp.2543–7.
- Hu, J. & Van Eldik, L.J., 1999. Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain research*, 842(1), pp.46–54.
- Iwata-ichikawa, E. et al., 1999. Glial Cells Protect Neurons Against Oxidative Stress via Transcriptional Up-Regulation of the Glutathione Synthesis. , pp.2334–2344.
- Javitch, J. a et al., 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 - tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(7), pp.2173–2177.

- Jesse, S. et al., 2009. Glial fibrillary acidic protein and protein S-100B: different concentration pattern of glial proteins in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 17(3), pp.541–51.
- Jiang, H. et al., 1993. Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res*, 613, pp.347–51.
- Kearns, S.M. et al., 2006. A method for a more complete in vitro Parkinson's model: Slice culture bioassay for modeling maintenance and repair of the nigrostriatal circuit. *Journal of Neuroscience Methods*, 157(1), pp.1–9.
- Khan, M.M. et al., 2010. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1328, pp.139–151.
- Kim, J.S. et al., 1996. Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 27(9), pp.1553–7.
- Kirik, D., Rosenblad, C. & Bjorklund, A., 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*, 152, pp.259–77.
- Kuruvilla, K.P. et al., 2013. Oxidative stress mediated neuronal damage in the corpus striatum of 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats: Neuroprotection by Serotonin, GABA and Bone Marrow Cells Supplementation. *Journal of the Neurological Sciences*, 331(1-2), pp.31–37.
- Leaver, K.R. et al., 2009. Oral pre-treatment with epigallocatechin gallate in 6-OHDA lesioned rats produces subtle symptomatic relief but not neuroprotection. *Brain research bulletin*, 80(6), pp.397–402.
- Lees, A.J., Hardy, J. & Revesz, T., 2009. Parkinson's disease. *Lancet*, 373(9680), pp.2055–66.
- Leite, M.C. et al., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *Journal of neuroscience methods*, 169(1), pp.93–9.
- Leite, M.C. et al., 2006. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain research bulletin*, 70(2), pp.179–85.
- Linert, W. et al., 1996. Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen--their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1316(3), pp.160–8.

- Liu, Y., Buck, D.C. & Neve, K.A., 2008. Novel interaction of the dopamine D2 receptor and the Ca²⁺ binding protein S100B: role in D2 receptor function. *Molecular pharmacology*, 74(2), pp.371–8.
- Lobsiger, C.S. & Cleveland, D.W., 2007. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nature neuroscience*, 10(11), pp.1355–1360.
- Lopes, F.M. et al., 2012. Evaluation of the Neurotoxic/Neuroprotective Role of Organoselenides Using Differentiated Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line Challenged with 6-Hydroxydopamine. *Neurotoxicity research*.
- Marenholz, I., Heizmann, C.W. & Fritz, G., 2004. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and biophysical research communications*, 322(4), pp.1111–22.
- Marsden, C.D. & Obeso, J.A., 1994. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Brain*, 117 (Pt 4), pp.877–97.
- Massie, A. et al., 2010. Time-dependent changes in GLT-1 functioning in striatum of hemi-Parkinson rats. *Neurochemistry international*, 57(5), pp.572–8.
- McKeating, E.G., Andrews, P.J. & Mascia, L., 1998. Relationship of neuron specific enolase and protein S-100 concentrations in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury. *Acta neurochirurgica. Supplement*, 71, pp.117–9.
- Meredith, G.E., Sonsalla, P.K. & Chesselet, M.-F., 2008. Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta neuropathologica*, 115(4), pp.385–98.
- Middeldorp, J. & Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), pp.421–443.
- Miller, D.B. & O'Callaghan, J.P., 2015. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metabolism*, 64(3), pp.S40–S46.
- Mirza, B. et al., 1999. The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 95(2), pp.425–432.
- Muramatsu, Y. et al., 2003. Expression of S-100 protein is related to neuronal damage in MPTP-treated mice. *Glia*, 42(3), pp.307–313.
- Murphy-royal, C. et al., 2015. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nature Neuroscience*, 18(2), pp.219–228.
- Nagy, J.I. & Li, W.E.I., 2000. A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: Actions of ischemia, glutamate and elevated potassium. *European Journal of Neuroscience*, 12(12), pp.4567–4572.

- Nakagawa, T. & Schwartz, J.P., 2004. Gene expression profiles of reactive astrocytes in dopamine-depleted striatum. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(3), pp.275–80.
- Nardin, P. et al., 2011. In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(5), pp.1291–6.
- Nardin, P. et al., 2007. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochemistry international*, 50(5), pp.774–82.
- Nardin, P. et al., 2009. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res*, 34, pp.1603–11.
- Niranjan, R., 2014. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. *Molecular neurobiology*, 49(1), pp.28–38.
- Otto, M. et al., 1997. S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of neurology*, 244(9), pp.566–70.
- Ozansoy, M. & Başak, a. N., 2012. The Central Theme of Parkinson's Disease: α -Synuclein. *Molecular Neurobiology*, (October 2012), pp.1–6.
- Papa, M. et al., 2014. Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 42, pp.35–54.
- Pasquali, L., Caldarazzo-Ienco, E. & Fornai, F., 2014. *Handbook of Neurotoxicity*,
- Patil, S.P. et al., 2014. Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology*, 86, pp.192–202.
- Pekny, M. & Nilsson, M., 2005. Astrocyte Activation and Reactive Gliosis. , 434(October 2004), pp.427–434.
- Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, 32(8), pp.421–31.
- Petronilho, F. et al., 2012. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity*, 26(6), pp.904–10.
- Pinto, S.S. et al., 2000. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters*, 486(3), pp.203–207.
- Ponath, G. et al., 2007. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *Journal of neuroimmunology*, 184(1-2), pp.214–22.

- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V. & Fahn, S., 1995. Antiparkinsonian therapies and brain mitochondrial complex I activity. *Mov Disord*, 10, pp.312–7.
- Ramírez-García, G., Palafox-Sánchez, V. & Limón, I.D., 2015. Nitrosative and cognitive effects of chronic l-DOPA administration in rats with intra-nigral 6-OHDA lesion. *Neuroscience*, 290, pp.492–508.
- Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), pp.1125–1131.
- Richardson, P.J., Kase, H. & Jenner, P.G., 1997. Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 18, pp.338–44.
- Rodnight, R. & Gottfried, C., 2013. Morphological plasticity of cultured astrocytes: stellation versus growth General features of process formation by stellation. , pp.263–275.
- Rodriguez, M. et al., 2015. Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell*, pp. 1-16.
- Sathe, K. et al., 2012. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. *Brain : a journal of neurology*, 135(Pt 11), pp.3336–47.
- Schlachetzki, J.C.M. et al., 2013. Studying neurodegenerative diseases in culture models. , pp.92–100.
- Schulz, J.B., 2008. Update on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurology*, 255 Suppl , pp.3–7.
- Segura-Aguilar, J. et al., 2014. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 129(6), pp.898–915.
- Segura-Aguilar, J. & Kostrzewa, R.M., 2015. Neurotoxin Mechanisms and Processes Relevant to Parkinson's Disease: An Update. *Neurotoxicity Research*, pp.328–354.
- Selvakumar, G.P. et al., 2014. Escin attenuates behavioral impairments, oxidative stress and inflammation in a chronic MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Brain research*, 1585, pp.23–36.
- Silvestrin, R.B. et al., 2009. The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(2), pp.317–321.
- Sofroniew, M. V & Vinters, H. V, 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), pp.7–35.
- Soto-Otero, Ra. and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of som et al., 2000. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some

- antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 74(4), pp.1605–12.
- Sulzer, D., 2007. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, 30(5), pp.244–50.
- Svenningsson, P. et al., 1999. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol*, 59, pp.355–96.
- Teismann, P. et al., 2003. Pathogenic Role of Glial Cells in Parkinson ' s Disease. *Mov Disord*, 18(2), pp.121–129.
- Teismann, P. et al., 2012. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) deficiency protects against MPTP toxicity. *Neurobiology of Aging*, 33(10), pp.2478–2490.
- Thornton, E., Tran, T.T.B. & Vink, R., 2010. A substance P mediated pathway contributes to 6-hydroxydopamine induced cell death. *Neuroscience letters*, 481(1), pp.64–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.057> [Accessed June 7, 2012].
- Tramontina, F. et al., 2006. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(1), pp.81–6.
- Tripanichkul, W. & Jaroensuppaperch, E.O., 2013. Ameliorating effects of curcumin on 6-OHDA-induced dopaminergic denervation, glial response, and SOD1 reduction in the striatum of hemiparkinsonian mice. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(10), pp.1360–1368.
- Tsacopoulos, M. & Magistretti, P.J., 1996. Metabolic Coupling Glia and Neurons. , 76(3), pp.877–885.
- Wallin, A., Blennow, K. & Rosengren, L.E., 1996. Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of patients with dementia. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 7(5), pp.267–72.
- Watanabe, Y., Kato, H. & Araki, T., 2008. Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Metabolic Brain Disease*, 23(1), pp.51–69.
- Wei, X. et al., 2014. Fibroblast growth factor 1 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: an in vitro and in vivo investigation in experimental models of parkinson ' s disease. , 6(6), pp.664–677.
- Xiao, M. & Hu, G., 2014. Involvement of aquaporin 4 in astrocyte function and neuropsychiatric disorders. *CNS neuroscience & therapeutics*, 20(5), pp.385–90.
- Yan, J. et al., 2014. Simvastatin prevents neuroinflammation by inhibiting N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 in 6-hydroxydopamine-treated PC12 cells. *Journal of neuroscience research*, 92(5), pp.634–40.

Zecca, L. et al., 2002. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 510(3), pp.216–220.

ANEXO 1

6-OHDA altera medida da proteína S100B por ELISA

Sabendo que o estado redox da proteína S100B pode afetar o reconhecimento do anticorpo (Leite et al. 2008), conduzimos um experimento a fim de avaliar se a toxina 6-OHDA poderia estar interferindo na quantificação de S100B por ELISA. Observamos que ocorre uma redução no valor da absorvância da proteína S100B quando esta é coincubada com 6-OHDA. Vimos que este efeito depende da concentração de 6-OHDA, ou seja, quanto maior a concentração, menor a leitura, conforme Figura 1A. Note que a linearidade foi mantida.

Dessa forma, testamos a capacidade de alguns antioxidantes de evitar essa alteração na leitura de S100B quando incubada com 6-OHDA. Testamos ácido ascórbico, n-acetilcisteína (NAC) e glutathione (GSH), todos na concentração de 10 mM, de acordo com trabalho de Soto-Otero e colaboradores (Soto-Otero et al. 2000). Frente aos resultados obtidos, mostrados na Figura 1B, escolhemos a glutathione como veículo da 6-OHDA nos experimentos realizados em cultura e em fatias, uma vez que esta parece proteger a S100B da oxidação provocada pela 6-OHDA.

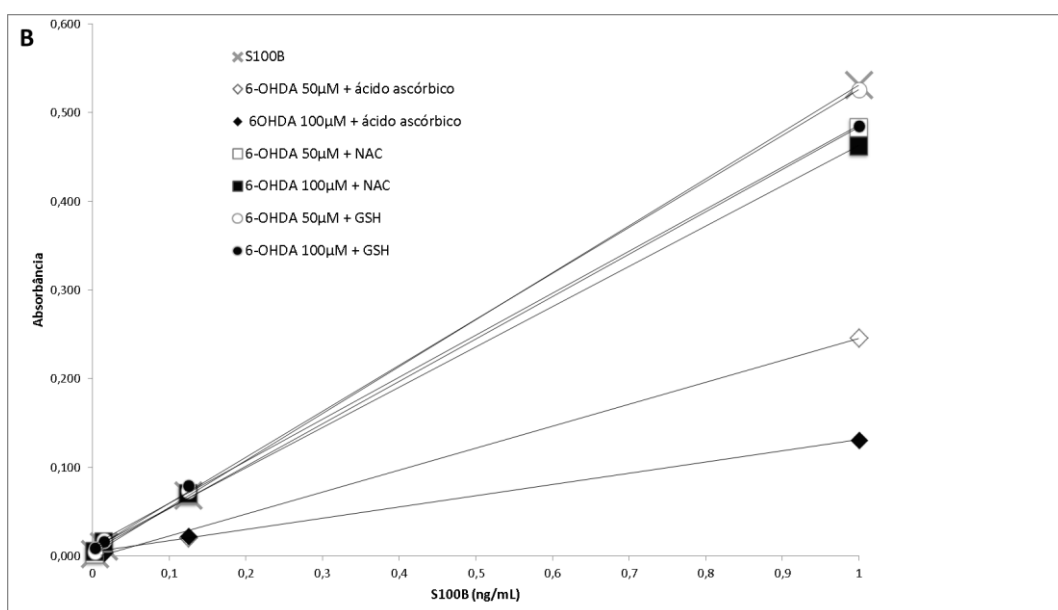
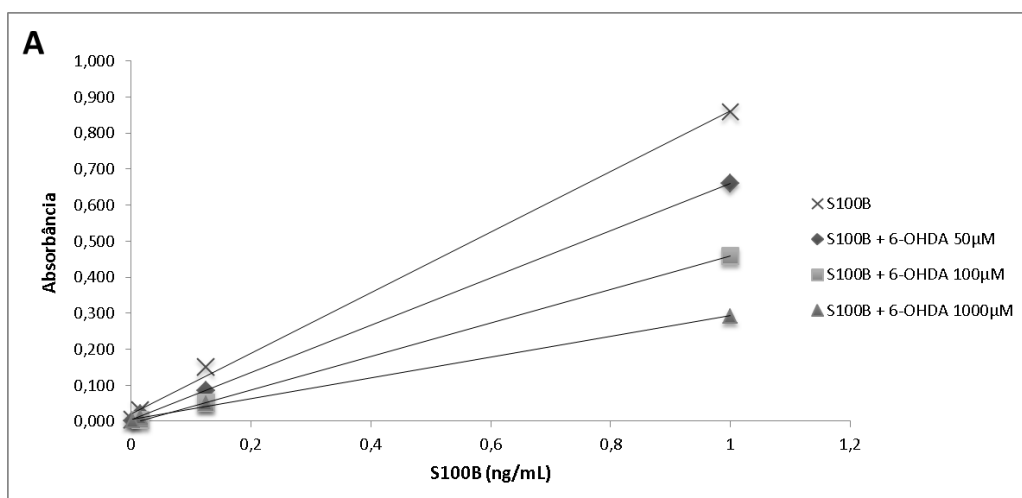


Figura 1. Medida de S100B em amostras expostas a 6-OHDA. (A) Amostras de S100B foram incubadas com 6-OHDA nas concentrações de 10, 50 ou 1000 μM . (B) Amostras de S100B foram incubadas com 6-OHDA (50 ou 100 μM). As soluções de 6-OHDA foram preparadas com os antioxidantes ácido ascórbico, N-acetilcisteína (NAC) ou glutathiona (GSH), na concentração 10 mM.

ANEXO 2

Secreção de S100B em fatias estriatais frescas

Após realizarmos a caracterização da secreção basal de S100B em fatias de estriado, fizemos alguns ensaios a fim de comparar a resposta destas fatias com a resposta já conhecida para fatias hipocampais.

Testamos o efeito da alteração na concentração de potássio (Figura 1A). Vimos que KCl na concentração de 30 mM provocou uma redução na secreção de S100B, resultado também observado em fatias hipocampais (P Nardin et al. 2009) e possivelmente relacionado ao influxo de K^+ para os astrócitos. Podemos observar que KCl na concentração de 0,2 mM provocou uma redução na secreção de S100B, resultado contrário ao já descrito em fatias hipocampais, em que se vê um aumento da secreção nestas condições (Patrícia Nardin et al. 2009). Acredita-se que este aumento na secreção esteja relacionado ao influxo de Ca^{2+} , provocado pela reduzida concentração de K^+ extracelular. Acredita-se que o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} provoque a secreção da proteína S100B. A redução na secreção observada nas fatias estriatais reflete uma possível diferença na população de astrócitos desta estrutura, em relação à população hipocampal. Estas diferenças precisam ser melhor exploradas.

Também testamos o efeito da apomorfina e de forskolina (Figura 1B). Sabe-se que apomorfina é capaz de reduzir a secreção de S100B em fatias hipocampais, o que deve-se possivelmente à estimulação de receptores D2, os quais são negativamente acoplados à adenilato ciclase (Nardin et al. 2011). O mesmo efeito foi observado em fatias estriatais. Quanto à forskolina, esta não teve efeito na secreção, diferente do observado em fatias hipocampais, nas quais a forskolina promoveu aumento de secreção, resultado explicado pelo aumento de AMP promovido por esta droga. (Pinto et al. 2000).

Durante os testes com as toxinas dopaminérgicas observamos que MPTP não foi capaz de alterar a secreção da proteína S100B. Como sabemos que esta toxina inibe a cadeia respiratória mitocondrial, resolvemos testar outra droga, a azida, a qual inibe o complexo citocromo-oxidase. Esta droga promoveu um aumento na secreção de S100B, mostrando que a fatia está responsiva, servindo como um controle positivo desta preparação experimental.

Importante salientar que a integridade celular foi avaliada nas fatias incubadas com concentrações alteradas de K^+ , com apomorfina, forskolina e azida, através da atividade de LDH extracelular, e não foram observadas alterações.

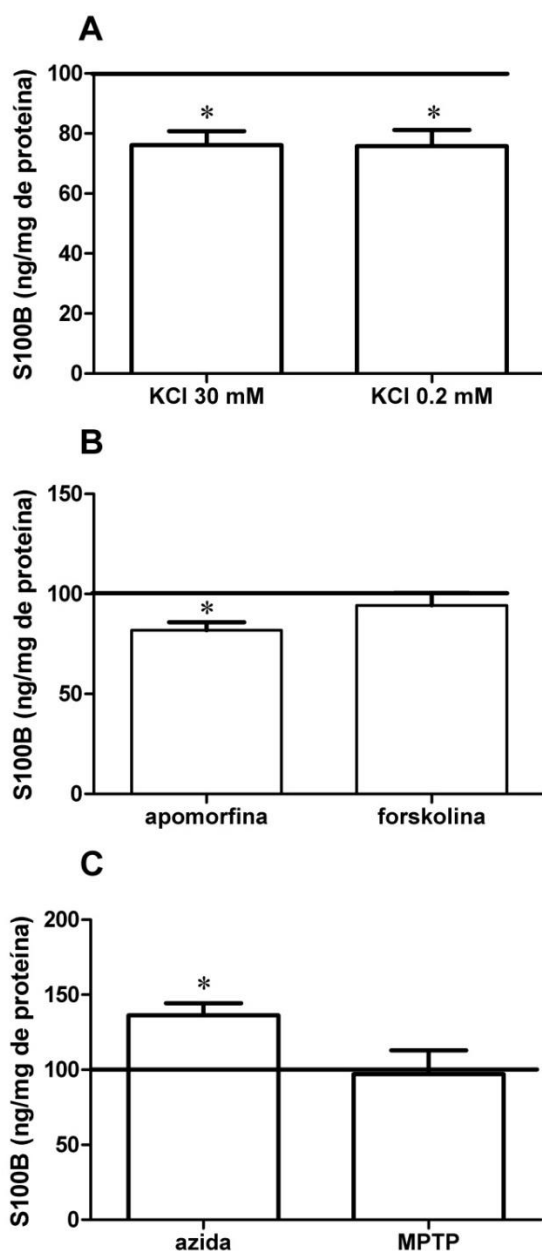


Figura 1. Secreção de S100B em fatias estriatais frescas. Ratos Wistar de 30 dias foram sacrificados e o estriado foi fatiado com o uso do equipamento McIlwain chopper, a 0,3 mm. Após o período de recuperação metabólica, de 2 horas, as fatias foram expostas a KCl 30 mM ou 0,2 mM (A), 100 μ M de apomorfina ou 10 μ M de forskolina (B), 5mM de azida sódica ou 1 mM de MPTP (C). Cada valor representa a média \pm erro padrão de pelo menos 5 experimentos realizados em triplicata. *Indica diferença significativa do controle (ANOVA de uma via seguida por pós-teste de Duncan, $P < 0,05$).