

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

**Efeito da fluoxetina e serotonina sobre a secreção
de S100B em culturas de astrócitos e fatias
hipocampais de ratos**

Ana Carolina Tramontina

Orientador

Prof. Carlos Alberto Gonçalves

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

Porto Alegre, março de 2008

**Efeito da fluoxetina e serotonina sobre a secreção
de S100B em culturas de astrócitos e fatias
hipocámpais de ratos**

Ana Carolina Tramontina

Das Utopias
(Mário Quintana)

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes seriam os caminhos
Sem a mágica presença das estrelas!

Agradecimentos

Ao CA, agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela amizade e por ter confiado no meu potencial.

Ju Frizzo e Ana Feoli, obrigada por todo o ensinamento e paciência na iniciação científica.

Carmem, obrigada pelos ensinamentos e grandes ajudas no lab.

Fran, querida irmã. Obrigada por tudo que me ensinastes dentro e fora do lab 33, pela ajuda com os experimentos, pelos caminhos abertos, pela tua sincera amizade e principalmente pelo exemplo de pessoa e pesquisadora a seguir. Obrigada por ser minha irmã!

À Pati, pela amizade, pelo auxílio com as fatias, dicas e conselhos.

Carol e Lari... agradeço de coração todo o tempo dispensado e toda a ajuda. Não sei o que seria de mim sem o trabalho de vocês!

Dani e Marina, obrigada pela amizade e colaboração na parte inicial do trabalho.

Ao André, obrigada pela amizade, pelas consultorias e principalmente pelas muitas risadas compartilhadas.

À Alessandra pelo suporte com o material da cultura e pela amizade.

Ale Swarowski e Lê Ribeiro... obrigada por trazer mais alegria para o lab, com a espera pela Joana e Melissa!!

Colegas do Lab33: Lets, Nina, Lucas, Victório, Renata, Fafá, Ju Rocha, Rafaela... obrigada pelos agradáveis dias de convivência, pela amizade, e pelas muitos problemas e risadas compartilhadas.

Meus pais, Valmor e Carmem. Obrigada pelo amor, pela preocupação e pelas oportunidades que me proporcionaram. Obrigada por existirem!

Márcio, minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelo apoio constante, pelo teu amor. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais,
Valmor e Carmem, à minha irmã Francine
e ao meu noivo, Márcio.
Vocês são a minha vida!!

Índice

Parte I

Resumo	8
Abstract	9
Lista de Abreviaturas	10
Introdução	
1.1. Astrócitos na organização do sistema nervoso central	11
1.2. S100B - Proteína marcadora de astrócitos	14
1.2.1. Efeitos extracelulares da proteína S100B	14
1.2.2. Secreção de S100B	15
1.3. Neurotransmissão Serotoninérgica	17
1.3.1. Serotonina e desenvolvimento do SNC	18
Objetivos Gerais	20

Parte II

Resultados

<i>Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin.</i>	23
---	----

Parte III

Discussão	41
Referências Bibliográficas	48

Parte I

Resumo

A S100B é uma proteína ligante de cálcio expressa e secretada por astrócitos, e possui efeito parácrino sobre os neurônios, atuando como fator neurotrófico. Estudos clínicos sugerem que níveis plasmáticos elevados de S100B estão correlacionados positivamente com a resposta à terapia antidepressiva, particularmente quando se utilizam inibidores seletivos da recaptação de serotonina, mas este mecanismo ainda é desconhecido. Neste trabalho foi avaliada a secreção de S100B em culturas primárias de astrócitos e fatias hipocâmpais de ratos expostos à fluoxetina e serotonina. Foi observado um significativo aumento da secreção de S100B frente à fluoxetina, e este efeito foi aparentemente dependente de PKA. Estes dados reforçam a importância da fluoxetina, independentemente da serotonina e receptores serotoninérgicos, no tratamento antidepressivo, bem como o papel da S100B nos distúrbios depressivos.

Abstract

S100B is a calcium-binding protein, produced and secreted by astrocytes, which has a putative paracrine neurotrophic activity. Clinical studies have suggested that peripheral elevation of this protein is positively correlated with therapeutic antidepressant response, particularly selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs); however, the mechanism remains unclear. Here, we measured S100B secretion directly in hippocampal astrocyte cultures and hippocampal slices exposed to fluoxetine and observed a significant increment of S100B release in the presence of this SSRI, apparently dependent on PKA. Moreover, we found that serotonin (possibly 5HT_{1A} receptor) reduces S100B secretion and antagonizes the effect of fluoxetine on S100B secretion. These data reinforce the effect of fluoxetine, independently of serotonin and serotonin receptors, suggesting a putative role for S100B in depressive disorders and that other molecular targets may be relevant for antidepressant activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC – sistema nervoso central

ATP adenosina trifosfato

GFAP – proteína ácida fibrilar glial

RAGE – receptor para produtos finais de glicação avançada

BDNF – fator neurotrófico derivado de cérebro

AMPC – adenosina 3'5' monofosfato cíclica

LPA – ácido lisofosfatídico

DCG-IV – 2'3'-dicarboxiciclopropil glicina

II mGluR - receptores metabotrópicos de glutamato do grupo II

5HT-1A-R – receptor de serotonina do tipo 1A

5HT – serotonina , 5-hidroxitriptamina

SERT – transportador de serotonina

MAO-A – monoamina oxidase-A

SSRIs – inibidores seletivos da recaptção de serotonina

PKA – proteína cinase dependente de AMP cíclico

H89 – *N*-[2-(*p*-Bromocinamilamino)ethyl]-5-isoquinolina sulfonamida

NAN-190 - 1-(2-methoxyphenil)-4-[4-(2-ftalimido)butil]piperazina

1. Introdução

1.1. Astrócitos na organização do sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é composto por dois tipos celulares – neurônios e células gliais. Os neurônios foram por muito tempo considerados os elementos celulares responsáveis pelo processamento da informação, enquanto as células gliais eram reconhecidas apenas pelo seu papel de suporte (Perea e Araque 2005). Nas últimas décadas um grande número de pesquisas demonstra que as células da glia não atuam apenas como um elemento de suporte neuronal, mas sim como um componente ativo em funções cerebrais essenciais (Van Eldik e Wainwright 2003).

As células da glia são divididas em dois grupos principais, a macroglia, composta de astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais, e a microglia, composta de células fagocíticas envolvidas em respostas inflamatórias (Perea e Araque 2005). Os astrócitos compreendem 50 % da massa cerebral sendo assim as células gliais mais abundantes no SNC (Gee e Keller 2005). Entre os diferentes tipos de células gliais, os astrócitos têm recebido atenção especial, provavelmente pela sua íntima relação com neurônios e sinapses (Perea e Araque 2005).

Os astrócitos são denominados desta maneira por apresentarem formato estrelar, e apresentam uma estrutura complexa, caracterizada por um denso arranjo de processos que se comunicam com neurônios e parede vascular (Nedergaard et al. 2003). Estas células comunicam-se por junções do tipo gap, formando um grande sincício (Halassa et al. 2006). São classificados de acordo com a morfologia e localização em astrócitos protoplasmáticos (tipo 1 em cultura), localizados na substância cinzenta e astrócitos fibrosos (tipo 2 em cultura) localizados na substância branca (Raine 2006).

As funções dos astrócitos nas atividades cerebrais têm sido demonstradas por muitos estudos, e dentre estas funções podemos citar:

- a) Durante o desenvolvimento, os astrócitos direcionam a migração dos neurônios e projeções neuríticas através da produção de fatores tróficos, matriz extracelular e moléculas de adesão (Van Eldik e Wainwright 2003);
- b) Influenciam na morfologia e diferenciação neuronal, modulando a atividade e número de sinapses (Ransom et al. 2003);
- c) Participam da formação e auxiliam na manutenção da barreira hemato-encefálica (Nedergaard et al. 2003);
- d) Tamponam o ambiente extracelular através da captação de efetores químicos, substratos metabólicos, hormônios e íons (Van Eldik e Wainwright 2003);
- e) Regulam a duração e amplitude da neurotransmissão através da atuação dos receptores para neurotransmissores e neuropeptídeos e pela presença de canais iônicos (Van Eldik e Wainwright 2003);
- f) Atuam na resposta imune cerebral, respondendo a injúrias através de resposta inflamatória (Gee e Keller 2005);
- g) Estocam glicose na forma de glicogênio, que é degradado, fornecendo lactato aos neurônios em situações de necessidade (Brown e Ransom 2007);
- h) Regulam os níveis extracelulares de glutamato (Danbolt 2001);
- i) Modulam a transmissão sináptica, exercendo papel no processamento de informações no cérebro (Newman 2003; Parpura e Haydon 2000).

A modulação sináptica efetuada pelos astrócitos os faz serem reconhecidos como o terceiro elemento da sinapse (Halassa et al. 2006). Estas células expressam receptores para neurotransmissores incluindo glutamato, GABA (ácido gama-aminobutírico), noradrenalina e acetilcolina, entre outros (Perea e Araque 2005; Fellin e Carmignoto 2004). Durante a liberação destes neurotransmissores na sinapse, os astrócitos demonstram variações intracelulares de Ca^{2+} , o que pode atuar como sinal intra e intercelular com conseqüências funcionais relevantes no SNC (Perea e Araque 2005), levando inclusive à liberação de gliotransmissores como o glutamato e o ATP, que atuam modulando a transmissão sináptica e a excitabilidade neuronal (Newman 2003).

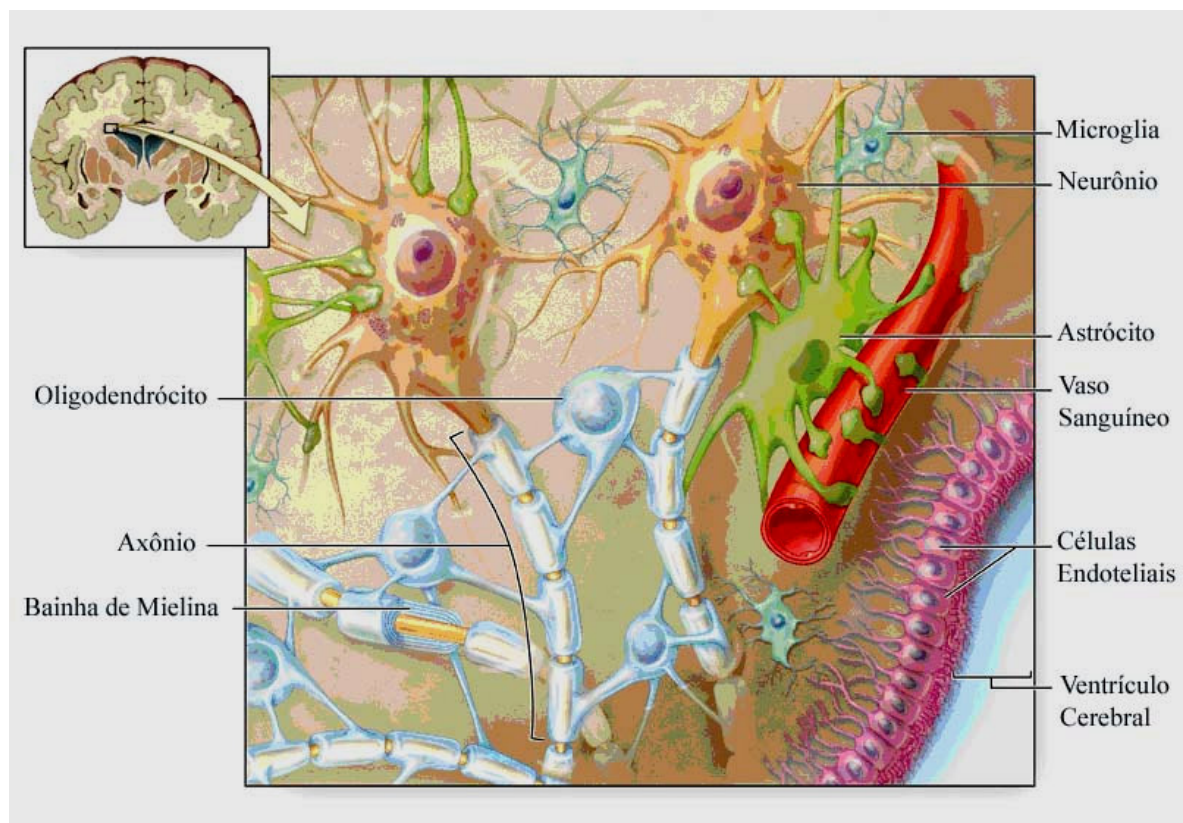


Figura 1: Os principais grupos celulares do SNC e suas inter-relações. Adaptado de www.indiana.edu

1.2. S100B - Proteína marcadora de astrócitos

Os astrócitos possuem três proteínas específicas usadas como marcadoras, a GFAP (proteína ácida fibrilar glial, componente do citoesqueleto), a glutamina sintetase (responsável pela formação de glutamina a partir do glutamato) e a S100B.

A S100B é uma proteína de 21 KDa, ligante de cálcio do tipo EF hand. Esta proteína foi primeiramente isolada de cérebro bovino, e denominada “S100” por sua solubilidade em solução de sulfato de amônio 100% (Van Eldik e Wainwright 2003).

Estruturalmente, a proteína S100B forma homodímeros constituídos de duas subunidades β unidas por pontes de dissulfeto e capazes de se ligarem a proteínas alvos (Donato 2003).

A S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos, e exerce efeitos parácrinos em neurônios e microglia, e autócrinos em astrócitos (Ponath et al. 2007), além de possuir vários alvos intracelulares- atua modulando a fosforilação de algumas proteínas como a GFAP e p53 entre outras, a proliferação de neurônios e células gliais, a integridade do citoesqueleto e regulando a homeostase do cálcio (Donato 2003).

1.2.1. Efeitos extracelulares da proteína S100B

Extracelularmente a proteína S100B pode ter efeitos tróficos ou tóxicos, dependendo da sua concentração. Níveis extracelulares de S100B na ordem de nanomolar têm efeito neurotrófico, induzindo o crescimento de neuritos, aumentando a sobrevivência neuronal e servindo como molécula guia para o desenvolvimento de neurônios, além de possuir atividade neurotrófica ou neuroprotetora após dano cerebral. Um possível mecanismo pelo qual a S100B exerce seu papel neuroprotetor é por interação com RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada), estimulação

do fator de transcrição NFκB e por levar a um aumento da expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2 nos neurônios.

Em concentrações micromolares a S100B exerce efeitos neurotóxicos, por mecanismo dependente da indução de liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1β, fator de necrose tumoral-α e interleucina-6 na glia e interleucina-6 em neurônios (Van Eldik e Wanwright 2003) e estimula a secreção de óxido nítrico por astrócitos e microglia (Donato 2001). Algumas doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e a Síndrome de Down apresentam níveis aumentados de S100B, sugerindo que esta proteína pode ter papel na patogênese de desordens cerebrais. Como citocina, a S100B pode atuar tanto na fisiologia de desordens neurodegenerativas típicas como em doenças inflamatórias, que possivelmente irão gerar uma desordem do tipo Alzheimer (Donato 2001). Os efeitos neurotóxicos da S100B também são mediados via interação com RAGE, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de citocromo C e ativação da cascata das caspases, com posterior indução de apoptose.

1.2.2. Secreção de S100B

Embora a secreção de S100B por astrócitos esteja bem caracterizada, o mecanismo envolvido na sua exportação ainda é desconhecido. No gene desta proteína não existe um domínio sinalizando para secreção (Nishi et al. 2000). De fato, estudos mostraram que a secreção desta proteína não ocorre pelo mecanismo clássico via retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O mesmo se dá por vias não-clássicas de secreção de proteínas (Davey et al. 2001; Gerlach et al. 2006), podendo envolver o transporte da S100B via membrana lipídica (Garbuglia et al. 2000) ou transporte mediado por RAGE (Hsieh et al. 2004). Outro mecanismo possível é a promoção de um

processo de liberação através de vesículas, estimulado por BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) (Djalali et al. 2005).

A secreção de S100B em cultura de astrócitos é regulada por AMP cíclico (AMPC), tendo um aumento quando se utilizam agentes como a forskolina, que aumenta a concentração deste segundo mensageiro nos astrócitos. O ácido lisofosfatídico (LPA) que atua ativando a RhoA e tem um efeito oposto à forskolina, quando se trata da mudança na morfologia dos astrócitos (estelação), também aumenta a secreção da proteína (Pinto et al. 2000). A S100B tem sua secreção relacionada inversamente à captação de glutamato, possivelmente por envolver o AMPC como mediador. O LPA, que aumenta a secreção de S100B, como já citado, induz uma diminuição na captação de glutamato (Tramontina et al. 2006).

DCG-IV, um agonista seletivo para o grupo II dos receptores metabotrópicos de glutamato (II mGluR) leva a uma redução na secreção de S100B em cultura de astrócitos, sugerindo que os II mGluR estão mediando o efeito do glutamato na secreção de S100B (Tramontina et al. 2006). De acordo com este estudo, Kanumilli e colaboradores demonstraram que os II mGluR estão negativamente acoplados à adenil ciclase.

A secreção de S100B também é regulada por agonistas dos receptores serotoninérgicos 1A (5HT_{1A}-R), que levam a um aumento na secreção de S100B em astrócitos cultivados (Whitaker-Azmitia et al. 1990; Ahlemeyer et al. 2000). Contudo, 5HT_{1A}-R é negativamente acoplado à adenil ciclase (Adayev et al. 2005) e ao aumento do AMPC, que é associado à secreção de S100B (Pinto et al. 2000). Ainda não está claro como a serotonina (5HT) pode aumentar a secreção de S100B via diminuição de AMPC.

1.3. Neurotransmissão Serotoninérgica

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) foi inicialmente identificada por seus efeitos no músculo liso e por aumentar o tônus vascular. Em meados do século XX, as plaquetas foram identificadas como a fonte desta substância e em 1948 foi isolada e identificada como fator vasoconstritor, assim a 5-hidroxitriptamina foi nomeada serotonina. Em estudos independentes foi caracterizada uma substância encontrada nas células intestinais que também atuava contraindo o músculo liso. Esta substância foi chamada enteramina. Em 1952 foi confirmado que a serotonina e a enteramina eram a mesma substância. Em 1953, a serotonina foi detectada em extratos cerebrais em um ensaio que utilizava moluscos. Assim verificou-se que a serotonina é localizada em três sistemas: plaquetas, trato gastrointestinal e cérebro (Hensler, 2006).

A serotonina é uma amina biogênica que tem seus efeitos bastante conhecidos, e entre eles podemos citar: atuação no tônus vascular causando vasoconstrição, na contração do músculo liso cardiovascular e gastrointestinal, bem como atuação como neurotransmissor no SNC (Sanders-Bush e Mayer 2006).

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, no interior dos neurônios, estocada em grânulos secretórios através de um transportador vesicular e liberada para a fenda sináptica por exocitose (Sanders-Bush e Mayer 2006). A serotonina liberada na fenda sináptica é recaptada pelos neurônios serotoninérgicos (Azmitia e Whitaker-Azmitia 1995). Este processo é mediado pelo transportador de serotonina conhecido como SERT (serotonin transporter, Persico et al. 2001), que regula a quantidade de serotonina na fenda, conseqüentemente influenciando a transmissão sináptica. A serotonina recaptada é degradada pela enzima monoamina-oxidase, preferencialmente pelo subtipo A (MAO-A) (Hensler 2006), que é encontrada

em células neuronais e não-neuronais (astrócitos e células endoteliais). Além de ser degradada, a serotonina citoplasmática pode ser estocada ou transportada para vesículas (Azmitia e Whitaker-Azmitia, 1995). A captação de serotonina também tem sido descrita em cultura primária de astrócitos, bem como a presença de MAO-A e B (Hirst et al. 1998), o que favorece a idéia de que a captação e metabolismo da serotonina pelas células gliais exerce funções importantes na regulação da concentração extracelular deste neurotransmissor. As características farmacológicas dos SERT gliais já foram descritas, indicando semelhança com os SERT neuronais (Inazu 2001).

Os efeitos biológicos da serotonina são iniciados pela sinalização através dos seus múltiplos receptores. São sete classes (5-HT₁₋₇) totalizando um total de quinze receptores distintos, pelos quais a serotonina pode exercer seus efeitos sobre a excitabilidade neuronal. Com exceção da classe de receptores 5-HT₃, canais iônicos que conduzem Na⁺ e K⁺, todos os demais são receptores acoplados à proteína G (GPCR – G protein-coupled receptor), e exercem seus efeitos através de cascatas de sinalização que envolvem adenil ciclase e fosfolipase C (Adayev et al. 2004).

Nas células gliais já foi observada a presença de receptores 5-HT_{1A}. Nos neurônios eles atuam como auto-receptores e sua ativação resulta na inibição da liberação de neurotransmissores (Azmitia 2001). Além disso, receptores 5-HT₂ foram detectados em células gliais e linhagens de glioma (Maxishima et al. 2001; Merzak et al. 1996).

1.3.1. Serotonina e desenvolvimento do SNC

A serotonina tem sido extensamente implicada no comportamento, mecanismos fisiológicos e processos patológicos, estando as alterações deste sistema envolvidas em diversos distúrbios de caráter mental como a depressão, ansiedade e esquizofrenia

(Sánden et al. 2000).

A serotonina pode influenciar processos como a neurogênese ou remoção de neurônios, refinamento dendrítico, remodelagem e manutenção da sinapse e migração celular. A influência da serotonina ocorre em períodos críticos específicos, e é ligada a presença e atuação de fatores tróficos no tecido alvo (Whitaker-Amitia et al. 2001).

A S100B é considerada um potente fator trófico para os neurônios serotoninérgicos (Nishiyama et al. 2002), e tem sua liberação regulada pelo receptor 5-HT_{1A} (Azmitia e Whitaker-Azmitia 1995). Estudos *in vitro* demonstraram que a redução ou ausência de S100B prejudica o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos (Ueda et al. 1994). Camundongos mutantes, que apresentam uma significativa redução na expressão de S100B, apresentam uma diminuição das fibras serotoninérgicas, o que sugere que a expressão normal da S100B é importante para a inervação serotoninérgica (Ueda et al. 1994). Entretanto, estudos mais recentes demonstram que a ausência de S100B não afeta o desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos *in vivo*. Estes resultados sugerem que a diminuição da inervação serotoninérgica encontrada nos camundongos mutantes não é causada apenas pela redução da S100B, e sim por atuação de outros fatores tróficos que podem ter papéis essenciais no desenvolvimento serotoninérgico (Nishiyama et al. 2002).

Um outro fator que tem sido implicado no crescimento e diferenciação dos neurônios serotoninérgicos é o BDNF, que seria importante para o desenvolvimento e sobrevivência do sistema serotoninérgico (Djalali et al. 2005). Estudos sugerem que S100B e BDNF interagem para exercer efeitos complementares na maturação de neurônios serotoninérgicos (Nishi et al. 2000).

2. Objetivos Gerais

1- Observar o efeito da serotonina sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e fatias hipocampais;

2- Avaliar o efeito da fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e fatias hipocampais;

3- Avaliar possíveis vias e receptores envolvidos na atuação da serotonina e fluoxetina sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e fatias hipocampais.

Parte II

Artigo a ser submetido à revista

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin

Ana Carolina Tramontina, Larissa D Bobermin, Caroline Zanotto, Daniela F Souza, Marina C Leite, Patrícia Nardin, Francine Tramontina, Carmem Gottfried, Carlos-Alberto Gonçalves*

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

*Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brazil

E-mail: casg@ufrgs.br

Fax: 55-51-3308 5535

ABSTRACT

S100B is a calcium-binding protein, produced and secreted by astrocytes, which has a putative paracrine neurotrophic activity. Clinical studies have suggested that peripheral elevation of this protein is positively correlated with therapeutic antidepressant response, particularly selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs); however, the mechanism remains unclear. Here, we measured S100B secretion directly in hippocampal astrocyte cultures and hippocampal slices exposed to fluoxetine and observed a significant increment of S100B release in the presence of this SSRI, apparently dependent on PKA. Moreover, we found that serotonin (possibly via 5HT_{1A} receptor) reduces S100B secretion and antagonizes the effect of fluoxetine on S100B

Key words: astrocyte; depressive disorders; fluoxetine; hippocampus; serotonin; S100B

Abbreviations: cAMP, cyclic AMP; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; H89, *N*-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide; 5HT_{1A}-R, serotonergic receptor 1A; NAN-190, 1-(2-methoxyphenyl)-4-[4-(2-phthalimido)butyl]piperazine; PKA, protein kinase dependent on cAMP; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor.

INTRODUCTION

The mechanisms of action of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), and other antidepressant drugs are still unclear, despite the significant progress in pharmacological therapy for mental diseases. Some studies have suggested S100B, a glial protein, to be a putative target of fluoxetine and/or a mediator of its antidepressant activity (Manev and Manev, 2001). Accordingly, increased serum levels of S100B have been shown to be positively correlated with therapeutic responses in major depression (Hetzel et al., 2005).

S100B is a calcium-binding protein produced, predominantly, in the central nervous system by astrocytes. This protein belongs to a family of S100 proteins involved in the modulation of cell proliferation and regulation of the cytoskeleton (Donato, 2001). In addition, S100B is secreted by astrocytes and has, at nanomolar concentrations, neurotrophic actions on neurons and glial cells. Its *in vitro* neurotrophic actions include neurite outgrowth, survival of neurons and protection against glucose deprivation and excitotoxicity (Van Eldik and Wainwright, 2003). The protective activity of S100B is possibly mediated by activation of receptors for advanced glycation end products (Donato, 2001). We have shown that astrocyte glutamate uptake is stimulated by S100B (Tramontina et al., 2006), supporting its protective role in excitotoxic damage (Ahlemeyer et al., 2000).

Agonists of the serotonergic receptor 1A (5HT_{1A}-R), particularly ipsapirone and BayX3702, have been reported to stimulate S100B secretion in rat astrocyte cultures (Whitaker-Azmitia et al., 1990; Ahlemeyer et al., 2000). These and other data support a consensus that S100B is trophic for serotonergic neurons and that serotonin (via 5HT_{1A}-R) stimulates S100B secretion. However, other findings argue against the hypothesis

that S100B has a crucial role in neurite extension of serotonergic neurons (Nishiyama et al., 2002). Moreover, 5HT_{1A}-R is negatively coupled to adenylyl cyclase (Adayev et al., 2005), and intracellular cAMP increment, in turn, is commonly associated with S100B secretion (Labourdette and Mandel, 1980; Pinto et al., 2000).

5HT_{1A} agonists were reported not to induce changes in S100B content in the hippocampus of rats (Azmitia and Whitaker-Azmitia, 1991; Ahlemeyer et al., 2000), however, fluoxetine induced an increase in hippocampal S100B (Manev and Manev, 2001; Akhisaroglu et al., 2003). The expression of S100B protein and S100B secretion, however, are not necessarily linked (Tramontina et al., 2002) and, as such, we studied the effect of fluoxetine, as well as serotonin, on S100B secretion in rat hippocampal astrocyte culture and acute hippocampal slices.

METHODS

Animals. Wistar rats were obtained from our breeding colony, maintained under controlled light and environmental conditions (12 hour light/12 hour dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) and had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. All procedures were performed following the regulations of the local animal house authorities.

Material. Cell culture media, serotonin, HEPES, anti-S100B (SH-B1), o-phenylenediamine and H89, an inhibitor of protein kinase dependent on cAMP (PKA), were purchased from Sigma. Fluoxetine hydrochloride and NAN-190, a specific 5HT_{1A} antagonist, were purchased from Tocris. Polyclonal anti-S100 antibody and anti-rabbit peroxidase-conjugated anti-IgG were purchased from DAKO and Amersham, respectively. Fetal calf serum (FCS) was purchased from Cultilab (São Paulo, Brazil).

Cell culture. Primary hippocampal astrocyte cultures (type 2) from Wistar rats were prepared, as previously described (Gottfried et al., 2002). Briefly, hippocampi of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and mechanically dissociated in Ca^{2+} and Mg^{2+} -free balanced salt solution. Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO_2 /95% air at 37°C and allowed to grow to confluence and used at 21 days, *in vitro*. S100B secretion essays were carried out in serum-free DMEM.

Preparation of hippocampal slices. Wistar rats (30 days-old) 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, adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O_2 . The hippocampi were dissected and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slices were then transferred immediately into 24-well culture plates, each well containing 0.3 mL of physiological medium and only one slice. The medium was changed every 15 min with fresh saline medium at room temperature. Following a 120 min equilibration period, slices were incubated in medium containing fluoxetine or other compounds, as indicated in the results for 1 h at 30°C.

ELISA for S100B. The S100B concentration was determined in the culture medium at 1, 6, 24 h and in the incubation medium of slices at 1 h. The ELISA for S100B was carried out as described previously (Leite et al., 2008). Briefly, 50 μL of sample plus 50 μL of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

Other measurements. Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard (Peterson, 1977). Extracellular S100B content was referred to as "secretion", based on the cell integrity measurement (data not shown), by measuring LDH activity with a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil) and Trypan blue exclusion assay (Tramontina et al., 2000).

Statistical analysis. Data from the experiments are presented as mean \pm standard error and evaluated by one-way ANOVA followed by the Tukey's test, assuming $p < 0.05$.

RESULTS

Fluoxetine (at 100 nM) induced a transitory increase in extracellular S100B in astrocyte hippocampal cultures (at 1 and 6 h, Fig 1A and B, respectively); however, no effect of fluoxetine was observed at 24 h (Fig 1C). In hippocampal slices, fluoxetine increased S100B secretion at 1 hour (Fig 2); this effect was blocked by H89, an inhibitor of protein kinase dependent on cAMP (PKA), in both the astrocyte culture (Fig 1A) and hippocampal slices (Fig 2A).

Serotonin (at 50 nM) induced a significant decrease in S100B secretion in astrocytes culture at 6 and 24 h after the treatment with fluoxetine (Fig 1B and C, respectively), but not at 1h (Fig 1A). A decrease in S100B secretion was also observed in hippocampal slices at 1 hour (Fig 2A). A similar effect was obtained with serotonin at 25 and 250 μ M (data not shown). In order to investigate whether this effect occurred via the 5HT_{1A}-R, we employed NAN-190, a specific 5HT_{1A} antagonist; this antagonist was able to block the effect of serotonin on astrocyte cultures and hippocampal slices (inset of the Fig 1B and Fig 2B, respectively).

Interestingly, the increase in S100B secretion, induced by fluoxetine, was reduced in astrocyte cultures (significantly at 6h, Fig 1B) and blocked in hippocampal slices by serotonin (Fig 2A).

DISCUSSION

Fluoxetine induced a transitory increase in extracellular S100B in astrocyte hippocampal cultures (at 1 and 6 h). No effect of fluoxetine was observed at 24 h, suggesting a clearance of this compound by astrocytes or a down-regulation of its target in these cells. As such, fluoxetine, in addition to inducing S100B hippocampal production during chronic treatment (Manev and Manev, 2001), can induce the release of S100B, favoring the neurotrophic extracellular activity of this protein.

Interestingly, astrocyte cultures express high levels of P450 (Malaplate-Armand et al., 2004), which could be involved in the metabolization of fluoxetine, as occurs in liver (Mandrioli et al., 2006). However, such a speculation requires further investigation and should be considered in the antidepressant therapeutic response. Moreover, although there is evidence to suggest that astrocytes have a serotonin transporter similar to that of neurons (Inazu et al., 2001), little is known about the sites of action of antidepressants on astrocytes, and a positive correlation with cAMP levels has been suggested (Chen and Rasenick, 1995; Slamon and Pentreath, 2000); our data, however, support this possibility. The effect of fluoxetine on S100B secretion was blocked by H89, an inhibitor of protein kinase dependent on cAMP (PKA), indicating that this kinase is involved in the mechanism. Furthermore, H89 *per se* reduced the S100B secretion induced by serum deprivation in accordance with previous observations (Labourdette and Mandel, 1980; Pinto et al., 2000; Gonçalves et al., 2002).

Serotonin (at 50 nM) induced a decrease in S100B secretion, at 6 and 24 h in astrocyte culture and at 1h in hippocampal slices. This effect was blocked by NAN-190,

a specific 5HT_{1A} antagonist. Moreover, serotonin antagonized the effect of fluoxetine at 1h. Since the effect of fluoxetine, apparently, depends on cAMP, it may be speculated that serotonin may act by binding to a receptor coupled negatively to adenylyl cyclase. Although this possibility is totally compatible with the mechanisms of signal transduction for serotonin receptors (particularly 5HT_{1A}-R), previous data have demonstrated the induction of S100B secretion with 5HT_{1A}, using the agonists ipsapirone and Bay X 3702 (Whitaker-Azmitia et al., 1990; Ahlemeyer et al., 2000). Notably, the effect of ipsapirone was not observed on S100B secretion, but on a putative effect of S100B present in glial-conditioned media on neuronal serotonin transport (Whitaker-Azmitia et al., 1990). In another study that employed Bay X 3702, the S100B secretion increment was observed at 24 h of exposure (Ahlemeyer et al., 2000). In spite of methodological differences (Fisher 344 rats and the use of secondary cortical astrocyte cultures), the reasons for this discrepancy are unclear at the moment.

It is also worthy of note that, at 24 h, no effect of fluoxetine was detected on the intracellular content of S100B or glial fibrillary acidic protein (data not shown). This reinforces the idea that S100B intracellular content variation and S100B secretion are not necessarily associated (Leite et al., 2006; Nardin et al., 2007). However, chronic *in vivo* exposure to fluoxetine increased S100B hippocampal content in rodents (Manev and Manev, 2001; Akhisaroglu et al., 2003). For the first time, to our knowledge, serotonin was used herein to investigate S100B secretion rather than serotonin agonists. However, further studies are necessary to characterize serotonin receptors under our conditions of astrocyte culture and hippocampal slices, although current literature suggests that 5HT_{1A}-R is present in the limbic structures in the early stage of postnatal rat life (Patel and Zhou, 2005).

Conclusions. The present data are relevant with regard to the effect of fluoxetine on S100B release, which could contribute to increase hippocampal neurogenesis, proposed to have an antidepressant effect (Malberg et al., 2000, Manev and Manev, 2001). These data reinforce of the theory that fluoxetine, independently of serotonin and serotonin receptors, may be relevant for antidepressant activity in other molecular targets. Moreover, it may be hypothesised that the blockade of 5HT_{1A} autoreceptors, in combination with SSRIs, may produce a faster onset of the antidepressant effect in man (Middlemiss et al., 2002). Furthermore, an expansion of the concept of blockade of 5HT_{1A}, including astrocyte receptors, reinforces this hypothesis.

Acknowledgements. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPERGS and FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00. We would like to thank Ms. Alessandra Heizelmann for technical support with cell culture.

REFERENCES

Adayev T, Ranasinghe B, Banerjee P (2005). Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Biosci Rep* 25; 363-385.

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J (2000). S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res* 858; 121-128.

Akhisaroglu M, Manev R, Akhisaroglu E, Uz T, Manev H (2003). Both aging and chronic fluoxetine increase S100B content in the mouse hippocampus. *Neuroreport* 14;1471-1473.

Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM (1991). Awakening the sleeping giant: anatomy and plasticity of the brain serotonergic system. *J Clin Psychiatry* 52 (Suppl); 4-16.

Chen J, Rasenick MM (1995). Chronic treatment of C6 glioma cells with antidepressant drugs increases functional coupling between a G protein (Gs) and adenylyl cyclase. *J Neurochem* 64;724-32.

Donato R (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33;637-668.

Gonçalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E et al (2002). High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* 13;1533-1535.

Gottfried C, Tramontina F, Goncalves D, Goncalves CA, Moriguchi E, Dias RD et al (2002): Glutamate uptake in cultured astrocytes depends on age: a study about the effect of guanosine and the sensitivity to oxidative stress induced by H₂O₂. *Mech Ageing Dev* 123;1333-1340.

Hetzel G, Moeller O, Evers S, Erfurth A, Ponath G, Arolt V, Rothermundt M (2005). The astroglial protein S100B and visually evoked event-related potentials before and after antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 178;161-166.

Inazu M, Takeda H, Ikoshi H, Sugisawa M, Uchida Y, Matsumiya T (2001). Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochem Int* 39;39-49.

Labourdette G, Mandel P (1980). Effect of norepinephrine and dibutyryl cyclic AMP on S-100 protein level in C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 96;1702-1709.

Leite MC, Brolese G, de Almeida LM, Piñero CC, Gottfried C, Gonçalves CA (2006). Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull* 70;179-185.

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R et al (2008). A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods In Press*

Malaplate-Armand C, Leininger-Muller B, Batt AM (2004). Astrocytic cytochromes p450: an enzyme subfamily critical for brain metabolism and neuroprotection. *Rev Neurol* 160;651-658.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20;9104-9110.

Mandrioli R, Forti GC, Raggi MA (2006). Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: the role of cytochrome p450. *Curr Drug Metab* 7;127-133.

Manev R, Uz T, Manev H (2001). Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 420;R1-2.

Middlemiss DN, Price GW, Watson JM (2002). Serotonergic targets in depression. *Curr Opin Pharmacol* 2;18-22.

Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM et al (2007). S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* 50;774-782.

Nishiyama H, Takemura M, Takeda T, Itohara S(2002).Normal development of serotonergic neurons in mice lacking S100B. *Neurosci Lett* 321;49-52.

Patel TD, Zhou FC (2005).Ontogeny of 5-HT1A receptor expression in the developing hippocampus. *Dev Brain Res* 157;42-57.

Peterson GL (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83;346-356.

Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Karl J, Goncalves CA et al (2000). Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett* 486;203-207.

Slamon ND, Pentreath VW (2000). Antioxidant defense against anti depressants in C6 and 1321N1 cells. *Chem Biol Interact* 127;181-199.

Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Portela LV, Goncalves CA (2000). Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Protoc* 6;86-90.

Tramontina F, Conte S, Goncalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L et al (2002). Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol* 22; 373-378.

Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO et al (2006). Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 26; 81-86.

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003). The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21; 97-108.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1990). Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528;155-8.

Figure 1

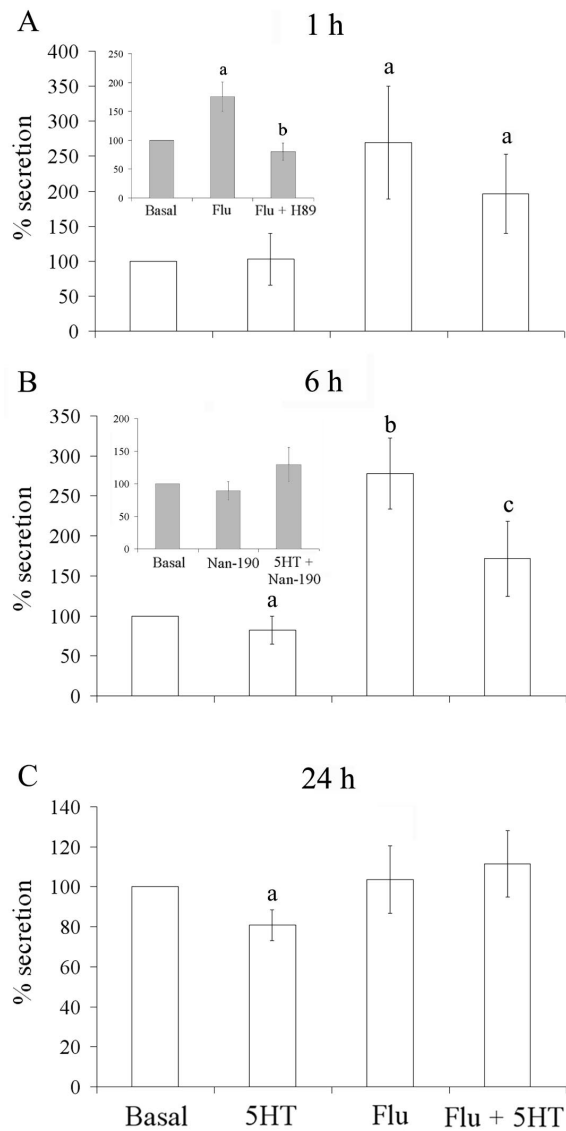


Figure 1. Fluoxetine stimulates S100B secretion in astrocyte cultures. Rat primary hippocampal astrocyte cultures were exposed to 50 nM serotonin (5HT) or 100 nM fluoxetine (Flu) or both (Flu + 5HT) and samples from media were collected at 1, 6 and 24 h. S100B was measured by ELISA. Basal values were assumed as being 100% in 6

independent experiments performed in triplicate. Inset in A, refers to another set of experiments (N=4) in which H89 (PKA inhibitor) was added at a concentration of 10 μ M. Inset in B, refers to another set of experiments (N=5) in which NAN-190 (a 5HT_{1A} antagonist) was added at a concentration of 1 μ M. ^a and ^b indicate significant statistical difference (ANOVA with Tukey's post hoc test; $p < 0.05$).

Figure 2.

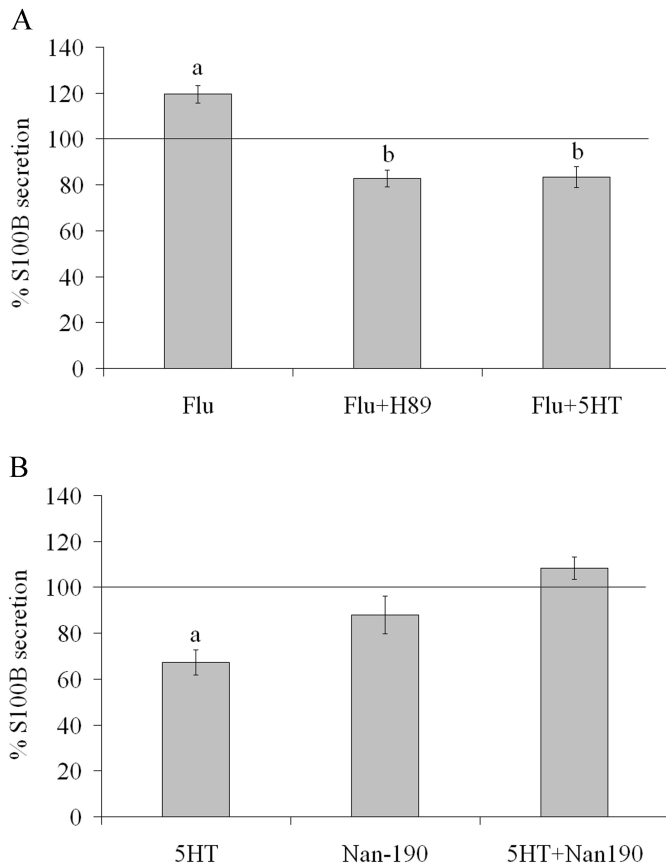


Figure 2. *Fluoxetine stimulates and serotonin reduces S100B secretion in hippocampal slices.* Acute hippocampal slices from 30-day old rats were exposed to 50 nM serotonin (5HT) or 100 nM fluoxetine (Flu) or both (Flu + 5HT). H89 and NAN-190 were used at concentrations of 10 and 1 μ M, respectively. Basal values were assumed as being 100% in 5 independent experiments performed in triplicate. ^a and ^b indicate significant statistical difference (ANOVA with Tukey's post hoc test; $p < 0.05$).

Parte III

Discussão

A serotonina desempenha diversas funções na regulação do desenvolvimento do SNC, assumindo um papel importante e único como neurotransmissor no SNC já desenvolvido. O envolvimento da serotonina em doenças como autismo, (Whitaker-Azmitia 2001), ansiedade, depressão e em outros distúrbios psiquiátricos é bem conhecido (Azmitia e Whitaker-Azmitia 1995).

A hipótese monoaminérgica foi a primeira teoria da depressão. Ela sugeria que um ou mais neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina e dopamina) em níveis baixos poderiam levar à depressão. Um refinamento desta hipótese sugere que as desordens depressivas se devem especificamente a uma redução na função serotoninérgica cerebral (Middlemiss 2002). O desenvolvimento dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs), como a fluoxetina reforça esta idéia, visto que a elevação dos níveis de serotonina cerebrais resulta em efeito antidepressivo (Boer et al. 2007)

Os astrócitos participam do metabolismo da serotonina uma vez que possuem toda a maquinaria necessária: receptores de serotonina (Azmitia 2001), transportadores (Inazu et al. 2001), e enzimas de degradação (Hirst et al. 1998). A proteína S100B, por sua vez, tem sido implicada como um importante fator trófico atuante no desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos, e seus efeitos provavelmente são mantidos durante toda a vida do indivíduo, mesmo sabendo que os níveis de S100B caem com a idade (Whitaker-Azmitia 2001). Estudos mostram que a secreção da proteína S100B é aumentada pela estimulação dos receptores 5HT_{1A} (Whitaker-Azmitia, 1990, Ahlemeyer 2000). Nishiyama e colaboradores demonstraram, porém, que a ausência de S100B não afeta o desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos,

sugerindo que a redução da inervação ocorrida em camundongos knockout para S100B não é devida apenas à redução da expressão de S100B, sugerindo que outros fatores tróficos estão atuando na modulação do sistema de transmissão serotoninérgico (Nishiyama et al. 2002).

Contrário ao esperado, nosso estudo demonstra que a serotonina atua diminuindo a secreção da S100B em culturas de astrócitos a partir de 6h, e em fatias de hipocampo em 1h. Este efeito é revertido quando se adiciona Nan-190, um agonista de receptor $5HT_{1A}$, o que demonstra que possivelmente a serotonina estaria atuando via este receptor. Todas as concentrações de serotonina utilizadas (5, 25 e 250 μM) apresentaram este efeito. Uma vez que $5HT_{1A}$ -R é negativamente acoplado à adenil ciclase (Adayev et al. 2005), seria justificável a atuação da serotonina neste receptor levar a uma redução da secreção de S100B, já que esta é associada ao aumento do AMPc intracelular (Pinto et al. 2000), embora a literatura aponte a ativação destes receptores como promotora de aumento na secreção de S100B.

Entretanto, os estudos que mostram o aumento da secreção de S100B via receptor $5HT_{1A}$, descrevem apenas os efeitos de agonistas deste receptor, e não o efeito da serotonina. Ainda é necessário verificar, se em nossas condições de trabalho, agonistas de receptor $5HT_{1A}$ causariam o mesmo efeito relatado na literatura, além de verificar a expressão destes receptores nas culturas e nos animais utilizados, visto que estudos recentes demonstram que este receptor possui expressão transitória em astrócitos. A diminuição do número de receptores $5HT_{1A}$ se dá por autoinibição, uma vez que ocorre em resposta ao aumento dos níveis de serotonina (Azmitia 2001).

As distintas respostas obtidas entre nosso estudo e o descrito por Ahlemeyer e colaboradores poderiam envolver as diferentes condições de trabalho. No trabalho citado são utilizadas culturas secundárias de astrócitos obtidas de córtex de ratos Fisher,

enquanto as culturas utilizadas em nosso trabalho são primárias e obtidas de hipocampo de ratos Wistar, o que poderia levar a uma diferente expressão dos receptores serotoninérgicos nas células. Para avaliar a S100B, Ahlemeyer utilizou ratos Wistar, que foram tratados com agonista 5HT_{1A} por via intravenosa por 6, 12 ou 24 h, avaliando apenas a expressão da proteína em córtex e hipocampo (onde não obteve resultado significativo), e não a secreção da mesma. Em nosso trabalho, utilizamos fatias hipocampais obtidas de ratos Wistar de 30 dias. Estas fatias foram tratadas com serotonina por 1h, sendo o primeiro trabalho da literatura que utiliza o neurotransmissor para avaliar secreção de S100B, e não um agonista de 5HT_{1A}-R. Apesar das diferenças metodológicas serem relevantes, ainda não são claras as razões para as discrepâncias nos resultados obtidos.

Ainda é interessante avaliar que o trabalho de Whitaker-Azmitia e colaboradores (1990) citado anteriormente utiliza a ipsapirona, um agonista de 5HT_{1A}-R apenas para avaliar o efeito da S100B secretada em meio condicionado de glia sobre neurônios serotoninérgicos. O trabalho não demonstrou o aumento da expressão ou secreção da proteína, apenas propõe que este aumento esteja acontecendo.

A fluoxetina é um medicamento amplamente utilizado nos distúrbios depressivos. Atua inibindo seletivamente a recaptção de serotonina (SSRI- inibidor seletivo da recaptção de serotonina), aumentando a disponibilidade sináptica do neurotransmissor, e é um medicamento amplamente utilizado nos distúrbios depressivos (Sanders-Bush e Mayer 2006). Os antidepressivos, em especial a fluoxetina aumentam a neurogênese no tecido cerebral de mamíferos adultos (Malberg et al. 2000; Manev et al. 2001 1a), o que pode indicar que há uma deficiência na neurogênese em adultos, e esse fato pode ser a base patológica da depressão.

O mecanismo pelo qual os antidepressivos aumentam a neurogênese ainda não é claro, e estudos sugerem que algumas vias e fatores tróficos que são encontrados aumentados no tratamento antidepressivo exercem papel na regulação da neurogênese (Manev et al. 2001 1b). Malberg e colaboradores sugerem que a cascata do AMPc e o BDNF atuam no mecanismo de ação dos antidepressivos. Em um estudo de 2001, Manev e colaboradores tratam a S100B como um possível fator trófico que regula a neurogênese e é alvo de ação das drogas antidepressivas.

A fluoxetina aumenta o conteúdo hipocampal de S100B em ratos velhos tratados cronicamente, indicando que o declínio de S100B que ocorre com a idade não interfere na ação da fluoxetina sobre a S100B hipocampal (Akhisaroglu et al. 2003). Isto sugere que este efeito poderia estar diretamente relacionado à elevação da concentração de serotonina na fenda sináptica.

Nosso trabalho demonstra que, em cultura de astrócitos e em fatias hipocampais de ratos tratadas com fluoxetina, houve um aumento significativo na secreção de S100B. Em cultura, esse efeito foi proeminente em 1 e 6 h, havendo um aumento em torno de 150 a 200%, não havendo aumento significativo em 24h de tratamento. Nas fatias hipocampais, o aumento da secreção de S100B foi de 19%.

Em 24 h a elevação da secreção de S100B induzida por serotonina em culturas desaparece, efeito este possivelmente devido à metabolização da fluoxetina pelos astrócitos. A fluoxetina é degradada via citocromo P450 após administração oral (Naecz-Jawecki 2007). Além do fígado e outros órgãos periféricos, astrócitos e neurônios expressam as isoformas da família P450 (Meyer et al. 2007). Os níveis de expressão destas enzimas nas regiões cerebrais são relativamente baixos, mas em astrócitos elas estão presentes em altas concentrações, e podem exercer um papel crítico

na biotransformação de compostos endógenos e exógenos (Malaplate-Armand et al. 2004).

A presença de citocromo P450 nos astrócitos sugere que estas células têm a capacidade de metabolizar drogas psicoativas ou xenobióticos lipofílicos (Malaplate-Armand et al. 2004). Tendo em vista a presença de citocromo P450 em astrócitos, nosso trabalho sugere que, na cultura de astrócitos, a fluoxetina foi metabolizada após 24 h de tratamento, não apresentando efeito sobre a secreção de S100B.

O efeito da serotonina pode ser o grande determinante da quantidade de S100B secretada. No caso das culturas, não há presença de serotonina. Sem o neurotransmissor, que atuaria causando uma diminuição da secreção de S100B, o aumento da quantidade de S100B liberada é grande, em torno de 150% (1h) e 200% (6h).

Nas fatias hipocâmpais, há presença de astrócitos e neurônios serotoninérgicos, e a fluoxetina atua sobre os dois tipos celulares. Nos neurônios, a fluoxetina atua inibindo a recaptação da serotonina, aumentando as concentrações deste neurotransmissor na fenda. A serotonina, por sua vez, atua nos astrócitos, onde leva a uma diminuição da secreção da S100B. Somando-se a isso, a fluoxetina atua independentemente da serotonina sobre os astrócitos levando a um aumento da liberação de S100B. Desta forma, em fatias a liberação de S100B resultante é comparativamente menor do que em astrócitos no tempo avaliado (1h).

Embora evidências sugiram que os astrócitos possuam os SERT com características semelhantes aos neurônios (Inazu et al. 2001), pouco se sabe sobre os sítios de ação dos antidepressivos nos astrócitos, e uma correlação positiva com o AMPc tem sido sugerida (Slamon e Pentreath 2000). Nossos resultados vão de acordo com esta idéia, visto que o efeito da fluoxetina foi bloqueado por H89, um inibidor da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), indicando que esta cinase está envolvida.

Este fato também corrobora com a idéia de que a secreção da proteína S100B envolve a elevação dos níveis de AMPc intracelular (Gonçalves et al. 2000; Pinto et al. 2000).

Akhisaroglu e colaboradores sugerem que os efeitos da fluoxetina sobre a S100B estariam diretamente relacionados com a elevação da serotonina na fenda sináptica. Em nosso trabalho observamos que na presença de serotonina, a ação da fluoxetina foi revertida, ocorrendo uma diminuição da secreção de S100B em astrócitos (1 e 6h) e em fatias (1h). Em fatias, quando não há adição de serotonina, a concentração do neurotransmissor na fenda já é suficiente para neutralizar os efeitos da fluoxetina. Este efeito demonstra que a ação da fluoxetina de aumentar a secreção de S100B é independente de serotonina.

Os dados apresentados neste trabalho são relevantes no que se trata da ação da fluoxetina sobre a liberação de S100B, o que pode contribuir para o aumento da neurogênese hipocampal, processo proposto como tendo efeito no tratamento da depressão (Malberg et al. 2000; Manev e Manev 2001). Os resultados reforçam o a idéia de que o efeito da fluoxetina se dá de forma independente da serotonina e seus receptores.

O trabalho ainda reforça a idéia que a ativação de receptores 5HT_{1A} leva a uma diminuição na secreção de S100B, e sugere que o bloqueio dos 5HT_{1A}-R poderia, juntamente com os SSRI, atuar de forma mais rápida e eficaz no tratamento das desordens depressivas (Middlemiss et al. 2002).

Em resumo, os resultados sugerem que a fluoxetina ativa uma via dependente de PKA em astrócitos, levando a secreção de S100B. Por outro lado, a serotonina (via 5HT_{1A}) leva à redução da secreção de S100B. Um esquema do mecanismo proposto está representado na figura 2.

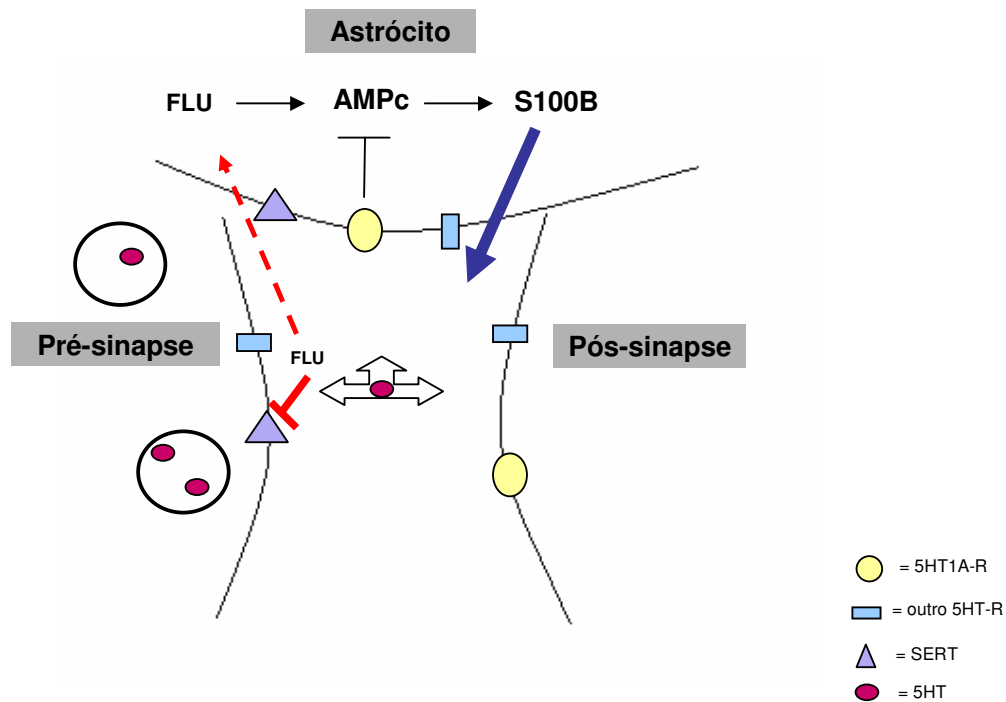


Figura 2. Representação esquemática da ação da fluoxetina e serotonina sobre a secreção de S100B envolvendo uma sinapse tripartite: pré-sinapse, pós-sinapse e astrócito.

Flu = fluoxetina

AMPC = adenosina 3'5' monofosfato cíclica

5HT = serotonina

SERT = transportador de serotonina

5HT_{1A}-R = receptor de serotonina da família 1, subtipo 1

Outro 5HT-R = receptor de serotonina não-5HT_{1A}.

Referências Bibliográficas

Adayev T, Ranasinghe B, Banerjee P. Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Bioscience Reports*. 25:363:385, 2005.

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Kriegstein J. S100 β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay X 3702. *Brain Research*. 858:121-128, 2000.

Azmitia E. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Research Bulletin*. 56(5):413-424, 2001.

Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. Anatomy, cell biology, and plasticity of the serotonergic system. *In*, *Psychopharmacology: The Fourth Generation of progress*. Raven Press, New York. 443-449, 1995.

Boer D, Den JA, Bosker FJ, Slaap BR. Serotonergic drugs in the treatment of depressive and anxiety disorders. *Human Psychopharmacology*. 15(5):315-336, 2000

Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 55(12):1263-71, 2007.

Danbolt, NC. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 65:1–105, 2003.

Davey GE, Murmann P, Heizmann CW. Intracellular Ca^{2+} and Zn^{2+} levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in Human Glioblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(33): 30819–30826, 2001.

Djalali S, Itje MH, Große G, Rothe T, Stroh T, Große J, Deng DR, Hellweg R, R. Grantyn, Hörtnagl H, Ahnert-Hilger G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *Journal of Neurochemistry*. 616-627, 2005.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 33:637-668, 2001.

Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique*., 60: 540-551, 2003.

Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signaling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *Journal of Physiology*. 559: 3-15. 2004.

Gee JR, Keller JN. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37(6):1145-50, 2005.

Garbuglia M, Verzini M, Hofmann A, Huber R, Donato R. S100A1 and S100B interactions with annexins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1498:192-206, 2000.

Gerlach R, Demel G, König U, Gross JHM, Raabe A, Seifert V, Kögel D. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*. 141(4): 1697-1701, 2006.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 13(2):54-63, 2007.

Hensler JG. Serotonin. *In* Basic Neurochemistry, Molecular cellular and medical aspects, capítulo 13, 7^a edição, Lippincott Williams e Wilkins editora, 2006.

Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP. Serotonin transporters in adult rat brain astrocytes revealed by [³H]5-HT uptake into glial plasmalemmal vesicles. *Neurochemistry International*. 33:11-22, 1998.

Hsieh HL, Schäfer BW, Weigle B, Heizmann CW. S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316:949–959, 2004.

Inazu M, Takeda H, Ikoshi H, Sugisawa M, Uchida Y, Matsumiya T. Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. *Neurochemistry International*. 39(1):39-49, 2001.

Kanumilli S, Toms NJ, Roberts PJ. Novel metabotropic glutamate receptor negatively coupled to adenylyl cyclase in cultures rat cerebellar astrocytes. *Glia* 46:1-7, 2004.

Malaplate-Armand C, Leininger-Muller B, Batt AM. Astrocytic cytochromes p450: an enzyme critical for brain metabolism and neuroprotection. *Reveu Neurologique*. 160(6-7):651-658, 2004.

Maxishima M, Shiga T, Shutoh F, Hamada S, Maeshima T, Okado N. Serotonin 2^a receptor-like immunoreactivity is detected in astrocytes but not in oligodendrocytes of rat spinal cord. *Brain Research*. 889:270-273, 2001.

Merzak A, koochekpour S, Fillion MP, Fillion G, Pilkington GJ. Expression of serotonin receptors in human fetal astrocytes and Glioma cell lines: A possible role in Glioma cell proliferation and migration. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 41:1-7, 1996.

Meyer RP, Gehlhaus M, Knoth R, Volk B. Expression and function of cytochrome p450 in brain drug metabolism. *Current Drug Metabolism*. 8(4):297-306, 2007.

Middlemiss DN, Price GW, Watson J. Serotonergic targets in depression. *Current Opinion in Pharmacology*. 2:18-22, 2002.

Nalecz-Jawecki G. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. *Chemosphere*. 70:29-35, 2007.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*.26:523-530, 2003.

Newman DB. Anatomy and neurotransmitters of brainstem motor systems. *Advances in Neurology*. 67:219-44, 1995.

Nishi M, Kawata M, Azmitia EC. Trophic interaction between brain-derived neurotrophic factor and 5HT_{1A} on cultured serotonergic neurons. *Brain Research*. 868:113-118, 2000.

Nishiyama H, Takemura M, Takeda T, Itohara S. Normal development of serotonergic neurons in mice lacking 5HT_{1A}. *Neuroscience Letters*. 321:49-52, 2002.

Parpura V, Haydon PG. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Neurobiology*. 97(15):8629-8634, 2000.

Pellerin, L. e Magistretti, P.J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist*. 10: 53-62, 2004.

Perea G, Araque A. Glial Calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium*.38:375-382, 2005.

Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall FS, Revay RS, Sora I, Arellano J, DeFelipe J, Gimenez-Amaya JM, Conciatori M, Marino R, Baldi A, Cabib S, Pascucci T, Uhl GR, Murphy DL, Lesch KP, Keller F. Barrel pattern formation requires serotonin

uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *Journal of Neuroscience*. 21:6862-6873, 2001.

Pinto S, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Karl J, Gonçalves CA, Wofchuk S, Rodnight R. Immunostaining and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters*. 486:203-207, 2000.

Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *Journal of Neuroimmunology*. 184:214-222, 2007

Raine CS. Neurocellular Anatomy. *In Basic Neurochemistry, Molecular cellular and medical aspects*, capítulo 1, 7^a edição, Lippincott Williams e Wilkins editora, 2006.

Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neuroscience*. 26: 520-522, 2003.

Sabders-Bush E, Mayer SE. 5-Hydroxytryptamine (serotonin): receptor agonists and antagonists. *In Goodman e Gilman's: The pharmacological Basis of Therapeutics*, 12 ed., McGraw-Hill, 2006.

Sándén N, Thorleif T, Blomstrand F, Persson PAI, Hansson E. 5-hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochemistry International*. 36:427-434, 2000.

Slamon ND, Pentreath VW. Antioxidant defense against antidepressants in C6 and 1321N1 cells. *Chemico-biological Interactions*. 127;181-199, 2000.

Tramontina F, Leite MC, Gonçalves D, Tramontina AC, Sousa DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk S, Gonçalves CA. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochemistry Research*. 31(6):815-820, 2006.

Ueda S, Hou XP, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Neuro-glial neurotrophic interaction in the S-100 retarded mutant mouse.(Polydactyly Nagoya). II. Co-cultures study. *Brain Research*. 633:284-288,1994.

Van Eldik L, Wainwright MS. The janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 21:97-108, 2003.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S100, and alters astroglial morphology. *Brain Research*. 528:155-158, 1990.

Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*. 56(5)479-485, 2001.