

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

**LPS MODULA A SECREÇÃO DE S100B: UM ESTUDO NO LÍQUIDO
CEREBROESPINAL E EM CULTURAS DE ASTRÓCITO DE RATOS**

MARIA CRISTINA BARÉA GUERRA

ORIENTADOR

CARLOS ALBERTO SARAIVA 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

2010

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, a minha querida avó, meus irmãos, minha tia Perpétua e meu amado esposo. Muito obrigada por todo o incentivo, confiança e amor. Vocês são a minha vida!!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele nada aconteceria.

À toda minha família por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!!!

À minha querida amiga Fernanda, sempre uma grande incentivadora e a quem eu admiro muito, te adoro!

À Marina, com todas as minhas forças, que além de uma grande amiga, foi uma pessoa com quem aprendi muito, tornando possível a realização deste trabalho. Nunca vou ter palavras para te agradecer, te adoro!!

À Fafá que é uma pessoa incrível, uma fofa, sempre incansável na colaboração deste trabalho, obrigada por tudo!!

Às queridas Elisa e Carol por toda a dedicação e apoio, vocês são ótimas!

À velha guarda do lab 33 que me recebeu com tanto carinho: Pati, André, Dani, Ana Carolina, Lets, Renata, Lucas e Nina.

À Caro, Lari, Krista, pessoas tão queridas e amigas, por todo o apoio e amizade.

À Paulinha e a Camila por todas as palavras de apoio e otimismo.

À professora Carmem que sempre me recebeu com muito carinho.

À todos do LAB 33 com os quais eu tive o privilégio de trabalhar me divertindo. Vocês são ótimos!!!

Ao professor CA que me proporcionou a oportunidade ímpar de aprender e trabalhar neste laboratório maravilhoso. Nunca vou ter palavras para agradecer.

Índice

Parte I.....	2
Resumo	3
Abstract.....	4
Lista de abreviaturas	5
Introdução	7
1. Astrócitos.....	7
1.1. Proteína S100B	9
2. Inflamação	11
2.1. Neuroinflamação e a proteína S100B.....	12
2.1.1. Modelo de neuroinflamação com o uso do LPS.....	15
Objetivos.....	19
Parte II	20
Parte III.....	51
Resumo dos resultados.....	52
Discussão	54
Referências Bibliográficas.....	61

Parte I

Resumo

A resposta inflamatória no cérebro é primeiramente mediada pela microglia, entretanto evidências sugerem uma importância crucial dos astrócitos nesse processo. A S100B, uma proteína ligante de cálcio, secretada por astrócitos, tem sido considerada como sendo uma citocina neurotrófica. Neste trabalho nós avaliamos se o conteúdo de S100B no líquido e no soro de ratos Wistar é afetado pela administração intraperitoneal (IP) ou intracerebroventricular (ICV) de LPS, bem como se culturas de astrócitos primários respondem diretamente ao LPS. Nossos dados sugerem que a secreção da S100B no tecido cerebral é estimulada rápida e persistentemente *in vivo* pela administração ICV ou IP de LPS. Diferente da S100B, nós observamos um aumento da concentração de TNF- α no soro, mas não no líquido após a administração IP de LPS. Em cultura de astrócitos e fatias hipocâmpais de animais jovens (30 dias), nós observamos uma estimulação direta na secreção de S100B induzido pelo LPS na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, mesmo concentrações mais baixas de LPS (0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$), em culturas de astrócitos, o LPS foi capaz de induzir uma diminuição na secreção de S100B em 24 h de tratamento, sem mudanças significativas no conteúdo intracelular dessa proteína. Além disso, após 24 h de exposição ao LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$), nós observamos uma diminuição do conteúdo intracelular de glutathione e um aumento no conteúdo de GFAP. Juntos esses dados contribuem para o entendimento dos efeitos do LPS em astrócitos, particularmente sobre a secreção de S100B, e nos ajuda a interpretar alterações na concentração dessa proteína no líquido e no soro em doenças neuroinflamatórias.

Abstract

Inflammatory response in brain is primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes. S100B, a calcium-binding protein secreted by astrocytes has been assumed as neurotrophic cytokine. In this work we evaluated if S100B content in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of Wistar rats is affected by LPS administered by intraperitoneal (IP) or intracerebroventricular (ICV), as well as, if primary astrocyte cultures respond directly to lipopolysaccharide (LPS). Our data suggest that S100B secretion in brain tissue is stimulated fast and persistently *in vivo* by LPS, administered ICV or IP. Differently from S100B, we observed an increase in serum TNF α , but not in CSF after IP administration of LPS. In isolated astrocytes and acute hippocampal slices we observed a direct stimulation on S100B secretion by LPS at concentration of 10 μ g/mL. However, even lower levels of LPS in astrocyte cultures were able to induce a decrease of S100B secretion 24 h afterwards, without significant changes in the intracellular content of S100B. In addition, after 24 h exposure to LPS we observed a decrease of glutathione and an increase of GFAP. Together these data contribute to understanding the effect of LPS on astrocytes, particularly on S100B secretion, and it help us to interpret cerebrospinal fluid and serum changes of this protein in neuroinflammatory diseases.

Lista de abreviaturas

AP1	Proteína Ativadora 1
BHE	Barreira Hematoencefálica
COX2	Ciclooxigenase 2
ERK	Cinase regulada por sinalização celular
GABA	γ -aminobutirato
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GSH	Glutathiona
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
INF- γ	Interferon Gama
IL-1 β	Interleucina 1- beta
IL-6	Interleucina - 6
IRAK	Cinase associada a IL-1R
LBP	Proteína Ligante de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Cinase Ativadora de Mitógeno
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MyD88	Fator 88 de Diferenciação Mielóide

NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear
PAMPS	Padrões Moleculares Associado à Patógeno
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
SNC	Sistema Nervoso Central
TIR	Domínio de receptor de IL1/Toll
TLR4	Receptor “toll like” 4
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRAF 6	Fator 6 associado ao receptor do Fator de Necrose tumoral

Introdução

1. Astrócitos

Os astrócitos foram inicialmente caracterizados como uma população homogênea de células gliais do Sistema Nervoso Central (SNC) que apresentam uma morfologia estrelada, estendendo numerosos processos que circundam neurônios vizinhos e vasos sanguíneos (Wang & Bordey 2008). Entretanto têm sido visto que os astrócitos apresentam uma morfologia heterogênea sendo divididas em duas subpopulações baseadas em sua localização e morfologia: astrócitos protoplasmáticos e fibrosos (Wang & Bordey 2008).

Essas células originalmente chamadas de neuroglia ou simplesmente glia que compreende além de astrócitos, microglia e oligodendrócitos, foram vistas como tendo uma única função de proporcionar orientação, suporte estrutural e servir como fonte de nutrientes e isolamento para os neurônios (Van Eldik & Wainwright 2003), pois não apresentam axônio e a habilidade de formar potenciais de ação (Wang & Bordey 2008). Contudo, nas últimas décadas, novas pesquisas demonstraram que os astrócitos não são somente suportes passivos da arquitetura e homeostase neuronal sem papel na integração de sinal, mas sim participantes ativos com neurônios em todas as funções essenciais do cérebro (Bezzi & Volterra 2001).

Entre algumas funções dos astrócitos estão: promoção da maturação neuronal, formação das sinapses, sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento, regulação da angiogênese, indução e manutenção da barreira hemato-encefálica, tamponamento de íons do meio extracelular como o potássio, metabolismo e captação de neurotransmissores (GABA e glutamato), suporte metabólico, detoxificação protegendo neurônios contra excitotoxicidade e manutenção do microambiente viável para

neurônios (Wang & Bordey 2008). Os astrócitos apresentam vários marcadores entre os quais se destacam a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína S100B.

Um dos papéis mais importantes dos astrócitos no Sistema Nervoso Central (SNC) é a vigilância imunológica, respondendo a lesões, patógenos ou outros insultos ativando uma resposta inflamatória crítica para a defesa ao hospedeiro (Van Eldik & Wainwright 2003). Esta resposta inflamatória leva ao processo de ativação glial, ocorrendo mudanças na expressão de diversas proteínas, incluindo proteínas de citoesqueleto como GFAP e citocinas como IL1 β (Akiyama *et al.* 2000).

Os astrócitos também servem como uma ponte entre o SNC e o sistema imunológico podendo fagocitar células e agir como células apresentadoras de antígenos (Montgomery 1994). Culturas de astrócitos apresentam antígenos para linfócitos T de uma maneira específica a qual é restrita pelo complexo principal de histocompatibilidade (Fontana *et al.* 1984). Além disso, os astrócitos são capazes de expressar receptores envolvidos na imunidade incluindo receptores *Toll-like* e componentes do sistema do complemento (Farina *et al.* 2007). Finalmente, essas células gliais produzem várias citocinas como IL-6 e quimiocinas que agem como imunomediadores em cooperação com os produzidos pela microglia.

Entre as células neuronais, os astrócitos são as células mais resistentes ao estresse oxidativo e proporcionam proteção aos neurônios principalmente devido a seu alto conteúdo de Glutathione (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina e também o principal antioxidante cerebral (Aoyama *et al.* 2008). Além disso, o astrócito secreta GSH que serve de substrato para síntese deste peptídeo nos neurônios (Dringen *et al.* 2000). A habilidade para reduzir ou sintetizar GSH é um importante fator que deve determinar como se encontra o estado redox celular, visto que o estresse oxidativo tem sido associado com o desenvolvimento de condições patológicas como as doenças neuroinflamatórias.

1.1. Proteína S100B

A proteína S100B faz parte de uma família de proteínas denominadas S100, ligante de cálcio do tipo EF-hand, caracterizadas por sua alta solubilidade e compreendendo 25 membros expressos de maneira célula específica (Donato 2001). Esta proteína foi originalmente isolada de cérebro bovino a cerca de 40 anos como uma mistura purificada de 2 proteínas S100 (S100B e S100A1) e denominada S100 pela sua solubilidade parcial em uma solução 100% saturada de sulfato de amônio (Moore 1965). Como os outros membros da família S100, a S100B têm uma estrutura homodimérica onde cada monômero beta é de aproximadamente 10.5 kDa, tendo dois sítios de ligação ao cálcio e sítios independentes para ligação ao zinco, e também duas pontes de sulfeto, mas a estrutura dimérica é mantida independente deste aspecto (Goncalves *et al.* 2008).

A S100B é expressa em um restrito número de tipos celulares como: astrócitos, linfócitos, oligodendrócitos maduros, células progenitoras neurais, certas populações neuronais, adipócitos entre outras, e sua expressão também está aumentada em vários tumores, no cérebro de idosos, e no cérebro de pacientes afetados pela doença de Alzheimer, epilepsia crônica, infecção por HIV entre outras condições patológicas cerebrais (Donato *et al.* 2009). A proteína S100B se localiza no citoplasma das células, como um homodímero na qual as duas subunidades são mantidas juntas por ligações não-covalentes e são arranjadas de um modo antiparalelo sendo encontrada na forma solúvel bem como associada com membranas intracelulares dos centrossomos, microtúbulos e filamentos intermediários tipo III (Donato 2003). O gene humano que codifica a S100B está no cromossomo 21q22.3 com conseqüente super expressão da proteína na Síndrome de Down (Mrak & Griffin 2004).

A S100B no SNC é principalmente expressa e exclusivamente secretada por astrócitos constitutivamente e sobre estimulação astrocítica com vários agentes (Pinto *et al.* 2000), incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Edwards & Robinson 2006); a S100B possui efeitos parácrinos e autócrinos nas células gliais, neurônios e microglia. Esta proteína tem muitos alvos intracelulares estando envolvida na regulação de proteínas do citoesqueleto (ex: GFAP) (Frizzo *et al.* 2004), moduladores do ciclo celular (ex: p53) (Lin *et al.* 2001) e a proteína fosfatase calcineurina (Leal *et al.* 2004). Além de alvos intracelulares, a S100B apresenta efeitos extracelulares observados em culturas neuronais dependendo de sua concentração, uma vez que em concentrações picomolar e nanomolar apresenta efeito trófico, enquanto em concentrações micromolar, efeito apoptótico. Estes efeitos envolvem ativação via receptor RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada) de vias de sinalização como ERK e NK- κ B (Donato *et al.* 2009). Um aspecto importante a ser considerado é que expressão genética, a expressão protéica e a secreção da proteína S100B podem ser eventos independentes (Goncalves *et al.* 2008). Estudos em culturas de astrócitos de ratos indicam que variações da S100B extracelular não são necessariamente acompanhados por mudanças no conteúdo intracelular como visto com altos níveis de amônia a qual aumentou a secreção dessa proteína sem alterar seu conteúdo intracelular (Leite *et al.* 2006). Por outro lado, cultura de astrócitos em meio com altos níveis de glicose mostrou uma diminuição na secreção e no conteúdo intracelular (Nardin *et al.* 2007).

A S100B tem sido vista como um útil marcador molecular de dano cerebral em um número de diferentes situações agudas ou crônicas. Vários estudos têm considerado elevação nos níveis de S100B como um componente de resposta neuroinflamatória, particularmente em doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer, porém é muito difícil a comparação dos níveis de S100B em cultura de células com aqueles

encontrados no líquido ou soro, uma vez que estes níveis refletem várias possíveis fontes de S100B.

2. Inflamação

A inflamação representa a resposta de um sistema de defesa do corpo que o protege contra ampla razão de insultos e repara o dano tecidual provocado por estes. O processo inflamatório é definido por suas características facilmente observadas como rubor (devido à vasodilatação), inchaço (devido ao edema), calor (devido ao intenso metabolismo) e dor (devido à sensibilização dos nociceptores). Este processo está diretamente associado com aderência e invasão de leucócitos e mediadores solúveis através das respostas vasculares como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, onde eles migram do lúmen dos vasos sanguíneos para os tecidos infectados e ou danificados (Allan & Rothwell 2003). A chegada dos leucócitos ao sítio de infecção é seguida pela liberação de enzimas degradativas e espécies reativas de oxigênio, levando a destruição do agente invasor e do tecido danificado, seguindo para seu reparo. Contudo, é muito importante que o recrutamento de leucócitos para o tecido seja extremamente regulado, pois, seu sistema efetor usado para eliminar o corpo estranho é potencialmente tóxico para o tecido sadio (Moynagh 2005).

O processo inflamatório envolve uma cascata de eventos locais no tecido danificado incluindo mediadores específicos da inflamação como cininas, prostanoídes, quimiocinas, citocinas (ex. IL-1, IL-6 e TNF- α), bem como muitas respostas sistêmicas tais como febre, mudanças comportamentais, os quais juntos constituem a resposta de fase aguda (Allan & Rothwell 2003). As respostas de defesa ao hospedeiro são geralmente benéficas para o organismo, promovendo a sobrevivência tecidual e

conservando a energia do organismo, entretanto, a inflamação não regulada ou prolongada é altamente prejudicial.

2.1. Neuroinflamação e a proteína S100B

O encéfalo foi considerado por muito tempo como um local privilegiado imunologicamente, visto que apresenta uma barreira hematoencefálica (BHE) e ausência de sistema linfático. No entanto atualmente tem havido mudanças a esse respeito, sendo agora reconhecido que SNC mantém uma resposta inflamatória, mostrado através da ativação da microglia, invasão local de células imunológicas circulantes, produção de citocinas e outros fatores imunológicos. Além disso, a inflamação cerebral está frequentemente associada com ativação e proliferação de astrócitos seguinte a resposta inflamatória inicial (Schultzberg *et al.* 2007).

A maior parte das desordens neurodegenerativas tem um componente inflamatório, isto é verdadeiro para condições agudas e para desordens crônicas como, por exemplo, a doença de Alzheimer (Allan & Rothwell 2003) onde também foi visto uma elevação nos níveis da proteína S100B no líquido em estágios mais precoces desta doença (Peskind *et al.* 2001).

Estudos em lesões no SNC têm focado predominantemente em neurônios, uma vez que são as células que excitáveis deste sistema, entretanto, as células gliais vêm recebendo muita atenção por parte de estudiosos em relação desordens no SNC.

As primeiras células gliais implicadas na resposta inflamatória são a microglia, estas são células especializadas com propriedades e características similares a macrófagos, sendo normalmente as primeiras células do cérebro a serem ativadas em

situação de injúria. São importantes células fagocíticas e liberam numerosas moléculas inflamatórias particularmente citocinas tais como interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) que são importantes no recrutamento de astrócitos. A microglia também responde a interferon γ (IFN)- γ e TNF- α expressando moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe I e II (MHC-I e MHC-II) bem como moléculas coestimulatórias (B7-1,-2) conferindo-lhe assim a função de células apresentadoras de antígenos (Halliday *et al.* 2000).

Os astrócitos, tipos de células gliais mais abundantes no SNC, têm sido reconhecidos como contribuidores potencialmente importantes para a resposta imunológica e inflamatória dentro do cérebro, através da síntese e liberação de proteínas do complemento e proteínas de fase aguda, síntese de prostanoídes, fatores de crescimento neuronal como, por exemplo, NGF e a proteína S100B e citocinas como a IL-6, IL1 e TNF- α . Eles também expressam moléculas MHC podendo agir como uma célula apresentadora de antígenos (Halliday *et al.* 2000).

Em situações de injúria no SNC, os astrócitos ficam em um estado ativado chamado de astrogliose, tendo como marcador desta condição a proteína GFAP que é a proteína de filamentos intermediários do citoesqueleto específica de astrócitos maduros. (O'Callaghan & Sriram 2005). Esta proteína é modificada por fosforilação particularmente em sítios específicos na porção N-terminal e isto modula a plasticidade de filamentos intermediários gliais (Rodnight *et al.* 1997). O aumento no imunoconteúdo de GFAP – independentemente de haver ou não proliferação astrogliar – é comumente usado como medida de astrogliose.

Outro importante marcador de ativação astrogliar é a proteína S100B, embora ela não seja exclusivamente encontrada em astrócitos. Esta proteína, como já mencionado, é secretada por astrócitos e proposta como um marcador periférico de dano

cerebral (Goncalves *et al.* 2008). Um dos motivos para este conceito vem do fato da S100B estar implicada no ciclo das citocinas, uma proposta para a Doença de Alzheimer (Griffin 2006). Em situações que levem a injúria no SNC como, por exemplo, um processo inflamatório, astrócitos e microglia, estão ativadas. A microglia ativada superexpressa a citocina IL-1 β , a qual ativa os astrócitos, levando a um aumento da expressão de S100B por estas células (Sheng *et al.* 1996). Estudos mostram que a secreção de S100B seguida da estimulação por IL1 β foi induzida em culturas de astrócitos primários, células de glioma C6 e em fatias hipocâmpais de ratos envolvendo a via das MAPK e sinalização via o fator de transcrição NF- κ B (de Souza *et al.* 2009). Tem sido mostrado também que a S100B regula positivamente a expressão de IL-1 β pela microglia (Griffin 2006).

Foi mostrado que a ligação da S100B ao receptor RAGE na linhagem microglial BV-2 resulta na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 os quais cooperam para estimular IL-1 β , TNF- α a enzima, COX-2, contribuindo assim para a neuroinflamação (Bianchi *et al.* 2008). A enzima COX-2 é a enzima limitante na síntese de prostanóides como as prostaglandinas mediadoras da inflamação como a prostaglandina E₂ (PGE₂). Sua expressão no cérebro é altamente regulada em condições fisiológicas, e tem sido mostrado que sua expressão é dividida em duas fases: precocemente em neurônios e mais tarde em células não neuronais como astrócitos (Takemiya *et al.* 2007). Estudos mostram que cultura de astrócitos de ratos tratadas com lipopolissacarídeo (LPS) aumentou a produção de prostaglandinas por parte destas células via COX-2 com um evidente envolvimento de NF- κ B (Pistritto *et al.* 1999).

2.1.1. Modelo de neuroinflamação com o uso do LPS

O LPS é uma molécula de lipopolissacarídeo que constitui a bicamada lipídica de bactérias gram-negativas, como por ex a bactéria *Escherichia coli*, sendo crítico na estabilidade da membrana. Sua molécula é composta por três distintos domínios: uma cadeia lateral de polissacarídeo (Antígeno O) ligada à região do “core”, um oligossacarídeo (2-ceto-3-ácido deoxioctônico), este por sua vez está ligado a uma molécula lipídica (Lipídeo A). O antígeno O varia entre as espécies de bactérias gram-negativas tanto em composição como em comprimento, enquanto do core e do lipídeo A são mais conservados entre as diferentes espécies destas bactérias. O domínio lipídeo A é o componente bioativo e tóxico da endotoxina reconhecido durante a infecção humana (Leon *et al.* 2008).

LPS é uma molécula alvo, uma vez que sua presença é crítica na estabilidade da membrana bacteriana e tem um papel proeminente na intensificação da resposta imunológica (Janeway & Medzhitov 2002); ele tem sido implicado como a molécula responsável por uma variedade de patologias que vão de leves como febre a letais como choque séptico e morte. Esta molécula desencadeia a liberação de muitas citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e é provavelmente o estímulo mais frequentemente usado para desencadear vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica (Glezer *et al.* 2007).

A via de sinalização desencadeada por LPS inicia com a ligação deste ao receptor TLR4, este receptor faz parte de uma família de receptores “Toll-like” (TLR_S) descritos como um receptor transmembrana tipo I que controla o desenvolvimento do eixo dorsal-ventral da *Drosophila melanogaster* (Hashimoto *et al.* 1988), tendo um papel na resposta imunológica a infecção por fungo nesta espécie (Lemaitre *et al.* 1996).

Os receptores TLR_s são uma grande família de receptores evolucionariamente conservados no sistema imune de vertebrados, que reconhecem modelos moleculares associados a patógenos (PAMPS), produzidos por diversos organismos incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas e compreendem 10 genes funcionais em mamíferos (Uematsu & Akira 2006). Eles são expressos por célula gliais no SNC sinalizando para dano e autoimunidade neste sistema. A microglia expressa uma ampla variedade destes receptores (TLR_s1-9), assim como os astrócitos (Carpentier *et al.* 2008, Bowman *et al.* 2003).

A ativação de TLR4 por LPS (figura 1) inicia uma sequência de sinalização intracelular similar a observada com a ativação do receptor para IL1 (IL-1RI). O LPS se liga com a proteína ligante de LPS (LBP) e também á proteína CD14 ancorada na membrana da célula alvo, a qual transfere o LPS para o receptor TLR4 de uma maneira dependente da glicoproteína extracelular MD-2; através do domínio TIR, ocorre o recrutamento do fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88) que se associa com a proteína cinase IRAK4 que interage com IRAK, a qual ativa o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) seguindo da liberação do fator de transcrição nuclear NF- κ B de seu inibidor IKB, deslocando-se para o núcleo celular. O recrutamento do complexo MyD88/IRAK/TRAF6 pode também ativar a proteína cinase ativadora de mitógeno (MAPK) em particular a via cinase Jun (JNK) que leva a formação do complexo proteína ativadora-1 (AP-1). A translocação nuclear de NF- κ B e AP-1 é um dos mais poderosos mecanismos para a transcrição de genes que codifica a maioria das proteínas envolvidas na imune inata como as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, enzima como a COX-2, quimiocinas entre outras (Glezer *et al.* 2007).

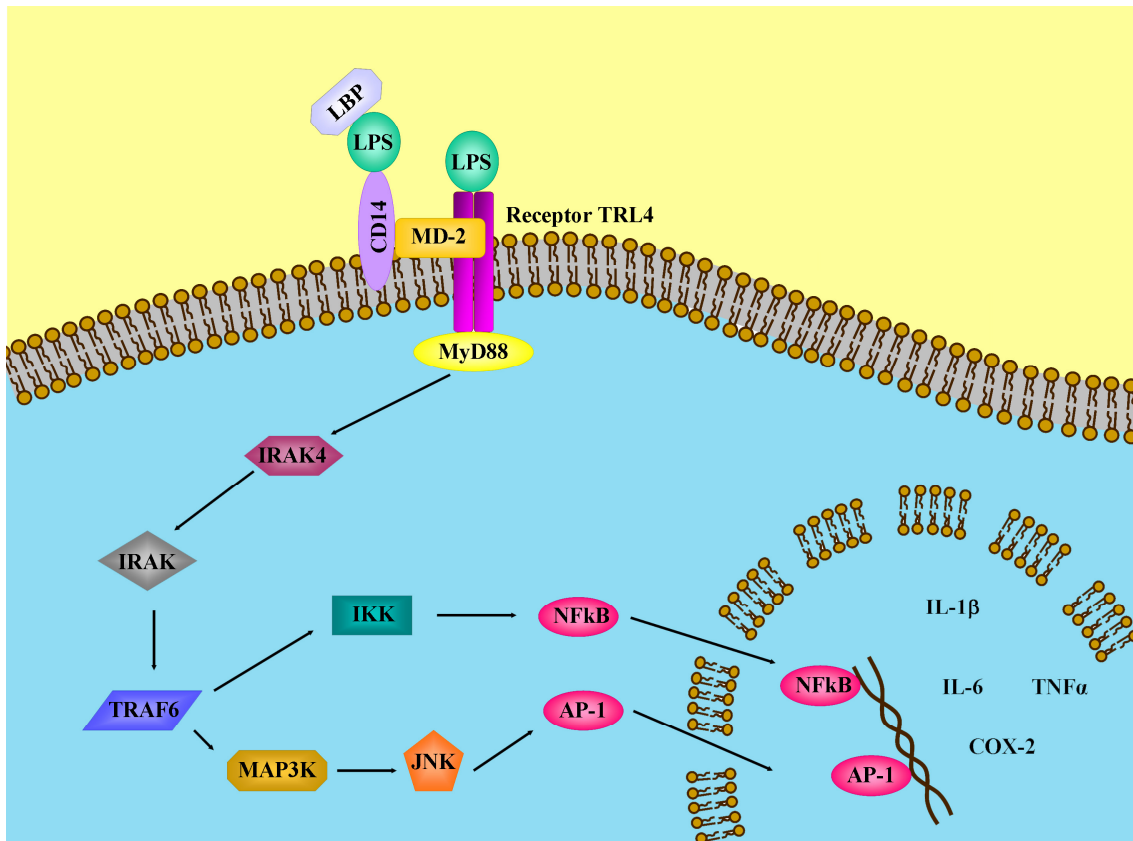


Figura 1: Sinalização por LPS

Por essas características e sua alta imunoatividade, o LPS é muito usado por pesquisadores para desenvolver modelos de neuroinflamação *in vivo* e *in vitro*. Estudos *in vitro* mostram que cultura de astrócitos neonatais de diferentes regiões cerebrais exibe diferenças na expressão de fatores pró-inflamatórios sob estímulo com LPS (Kipp *et al.* 2008), assim como em outro estudo usando o mesmo modelo *in vitro* mostrou que LPS induz uma regulação positiva de enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) e uma regulação negativa de enzimas que catalizam a sua degradação (Johann *et al.* 2008).

Um estudo *in vivo* usando injeções de LPS intracerebroventricular para mimetizar um quadro de inflamação cerebral em camundongos, mostrou ocorrer um recrutamento e adesão de leucócitos a microvasculatura cerebral e que este recrutamento é mediado por células que apresentam a via de sinalização TLR4/CD14

como a microglia, e que a sinalização por TNF- α é crítica para o recrutamento de leucócitos (Zhou *et al.* 2006). Estudos também mostram em outro modelo *in vivo* que injeção intraperitoneal de LPS em camundongos velhos promove hiperatividade microglial estando associada com indução exagerada das citocinas pró-inflamatória IL-1 e da anti-inflamatória IL-10 (Henry *et al.* 2009).

Entretanto ainda não há estudos mostrando o efeito desta molécula sobre a secreção e o imunoconteúdo da proteína S100B, uma vez que esta também sido mostrada uma peça importante no processo inflamatório.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do LPS, como um modelo de neuroinflamação, sobre a secreção e o imunoconteúdo de S100B em astrócitos *in vivo* e *in vitro*.

Objetivos específicos

Analisar a secreção e o imunoconteúdo de S100B em culturas primárias de astrócitos de ratos neonatos frente a um estímulo inflamatório com LPS;

Avaliar o efeito de LPS sobre a secreção de S100B em fatias hipocâmpais de ratos;

Analisar o conteúdo de S100B em soro e líquido de ratos que receberam LPS intracerebroventricular e intraperitoneal;

Avaliar uma possível relação do efeito de LPS com mudanças no conteúdo de GFAP em cultura de astrócitos;

Analisar a secreção e o imunoconteúdo de GSH em cultura de astrócitos e fatias hipocâmpais de ratos.

Parte II

LPS modulates S100B secretion: an study in cerebrospinal fluid and
astrocyte cultures of rats

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Neuroimmunology.

LPS modulates S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures of rats

Maria Cristina Guerra^{*}, Lucas Tortorelli^{*}, Fabiana Galland, Carolina Da Ré, Elisa N Bouchacort, Douglas S Engelke, Letícia Rodrigues, Marina C Leite[§], Carlos-Alberto Gonçalves

^{*} Contributed equally to the work.

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: Marina Concli Leite

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brazil

E-mail: marina.leite@ufrgs.br

Fax: 55-51-3308 5535

Abstract

Inflammatory response in brain is primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes. S100B, a calcium-binding protein secreted by astrocytes has been assumed to be a neurotrophic cytokine. In this work, we evaluated whether S100B content in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of Wistar rats is affected by LPS, administered by intraperitoneal (IP) or intracerebroventricular (ICV), as well as whether primary astrocyte cultures respond directly to lipopolysaccharide (LPS). Our data suggest that S100B secretion in brain tissue is stimulated fast and persistently *in vivo* by LPS, administered ICV or IP. Differently from S100B, we observed an increase in serum TNF α , but not in CSF after IP administration of LPS. In isolated astrocytes and acute hippocampal slices, we observed a direct stimulation in S100B secretion by LPS at a concentration of 10 μ g/mL. However, even lower levels of LPS in astrocyte cultures were able to induce a decrease in S100B secretion 24 h afterwards, without significant changes in the intracellular content of S100B. In addition, after 24 h exposure to LPS we observed a decrease in glutathione and an increase in GFAP. Together, these data contribute to the understanding of the effect of LPS on astrocytes, particularly on S100B secretion, and help us to interpret cerebrospinal fluid and serum changes in this protein in neuroinflammatory diseases.

Key words: astrocyte, GFAP, glutathione, LPS, S100B

1. Introduction

S100B is small, very soluble calcium-binding protein that is highly expressed and secreted by astrocytes in the central nervous system (see (Donato et al., 2009) for a review). This protein has many putative intracellular targets (e.g. glial fibrillary acidic protein) and, like other protein members of the S100 family, is involved in the regulation of cytoskeleton and cell cycle. Moreover, extracellular S100B at nanomolar levels in *in vitro* assays plays a trophic role in astrocytes, neurons and microglia. Many modulators of S100B secretion have been described in astrocyte preparations, such as forskolin, lyso-phosphatidic acid (Pinto et al., 2000), fluoxetine (Tramontina et al., 2008) and kainate (Sakatani et al., 2008). Its secretion is also affected by metabolic disorders such as elevated concentrations of glutamate (Buyukuysal, 2005), glucose (Nardin et al., 2007) and ammonium (Leite et al., 2006). Other cells in the brain (e.g. oligodendrocytes (Steiner et al., 2007)) and outside (e.g. adipocytes (Haimoto et al., 1985)) also express this protein, but whether S100B is secreted by these cells and which secretagogues are involved remain to be better characterized.

This protein has been proposed as a marker of astroglial activation in brain disorders and changes in its cerebrospinal fluid and/or serum content have been associated with various neurological and psychiatric diseases (Rothermundt et al., 2003; Sen and Belli, 2007). Such disorders commonly have an important inflammatory component, in which S100B has often been assumed to be a cytokine. Recently, we demonstrated that IL-1beta, modulates S100B secretion (de Souza et al., 2009). Moreover there is evidence that S100B modulates and is modulated by pro-inflammatory cytokines (Bianchi et al.; Kim et al., 2004; Ponath et al., 2007). However, we do not know if primary signals in the induction of inflammatory response (e.g. LPS) directly modulate S100B.

Astrocytes are the most abundant glial cells in the brain, where they play key roles in neurotransmitter metabolism, antioxidant defense and regulation of extracellular concentration of potassium (Belanger and Magistretti, 2009). GFAP, as mentioned above, is a specific marker of astrocytes and, frequently, its elevation is a strong sign of astrogliosis, which occurs in several conditions involving brain injury (Eng et al., 2000). Inflammatory response in the brain is primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes as well (Farina et al., 2007). Like microglia, these cells have a toll-like receptor type 4 (TLR4), which belongs to TLR family receptors in the vertebrate immune system and specifically recognizes LPS (Carpentier et al., 2008).

Some recent studies have reported that astrocytes respond to LPS, decreasing the expression of some proteins, for example gap junction proteins (Liao et al.), and increasing the expression of others, for example GFAP and glutathione-S-transferase (Brahmachari et al., 2006; Vergara et al.). Interestingly, we demonstrated that gap junction inhibitors increase the secretion of S100B in astrocytes and hippocampal slices (Leite et al., 2009).

Our working hypothesis is that S100B is released by astrocytes as a cytokine in response to LPS. In this study, we evaluated whether S100B content in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of rats is affected by LPS when administered by via intraperitoneal or intracerebroventricular, as well as whether astrocyte cultures respond directly to LPS. In parallel, we investigated whether LPS affects the content of GFAP and glutathione in astrocyte cultures to allow us to evaluate indirectly and respectively, astrogliosis and antioxidant defense (based on the capacity of synthesis and release of glutathione). Moreover, we measured the profile of secretion of TNF_{α} , a well-known cytokine in the presence of LPS.

2. Material and Methods

Materials - Poly-L-lysine, antibody anti-S100B (SH-B1), methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), neutral red, and lipopolysaccharides from *Escherichia coli* (LPS) 055:B5 were purchased from Sigma. Fetal calf serum (FCS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and other materials for cell culture were purchased from Gibco. Polyclonal anti-S100B and anti-rabbit peroxidase linked were purchased from DAKO and GE, respectively.

Surgical Procedure for Intracerebroventricular (ICV) LPS Infusion - Procedures were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Adult Wistar rats (90 days old) were used. For ventricle access, the animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. A midline sagittal incision was made in the scalp and one burr hole was drilled in the skull over both ventricles. The following coordinates were used: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the brain surface (Rodrigues et al., 2009). Rats received 5 μ L ICV/side of LPS 2.5 μ g/ μ L or phosphate-buffered saline (control). After the surgical procedure, rats were kept in a stereotactic holder for 30 min or 24 h and the CSF was obtained by puncture of the cisterna magna using an insulin syringe. A maximum volume of 30 μ L was collected over a 3 min period to minimize risk of brain stem damage. Cerebrospinal fluid samples were frozen (-20°C) until S100B analysis. The blood samples were obtained with intracardiac puncture, and the animals were killed by decapitation. The blood samples were incubated at room temperature (25°C) for 5 min and centrifuged at 3200 rpm for 5 min. Serum was stored at -20°C until the day of analysis.

Intraperitoneal (IP) LPS Infusion - Wistar rats (90 days old) were used for intraperitoneal injection of 0.3 mL of LPS 250 µg/Kg or phosphate-buffered saline (control). After 30 min or 24 h, the animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus for CSF puncture. Blood samples were obtained with intracardiac puncture, and the animals were killed by decapitation.

Cell culture - Primary astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described (Gottfried et al., 1999). Procedures were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Briefly, cerebral cortex of newborn Wistar rats (1–2 days old) were removed and mechanically dissociated in Ca²⁺- and Mg²⁺-free balanced salt solution, pH 7.4, containing (in mM): 137 NaCl; 5.36 KCl; 0.27 Na₂HPO₄; 1.1 KH₂PO₄ and 6.1 glucose. The cortex were cleaned of meninges and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1000 RPM for 5 min the pellet was resuspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.39mM HEPES, 23.8mM NaHCO₃, 0.1% amphotericin, 0.032% gentamicin and 10% fetal calf serum (FCS). Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO₂/95% air at 37°C and allowed to grow to confluence and used at 15 days in vitro.

Hippocampal Slices - Hippocampal slices were prepared, as previously described (Nardin et al., 2009). Procedures were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Thirty-day old Wistar rats were killed by decapitation, the brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄, and 10 glucose, adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O₂. 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 (maintained at 25°C). Following a 120-min equilibration period, the medium was removed and replaced with physiological saline with or without LPS for 60 min at 30°C on a warm plate. Afterwards, media were collected and stored at -70°C until S100B or TNF measurement.

S100B measurement - S100B was measured by ELISA, as previously described (Leite et al., 2008). Briefly, 50 µl of sample plus 50 µl of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/ml.

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

MTT reduction assay - Cells were treated with 50 µg/mL Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Afterwards, the media was removed and MTT crystals were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650nm. The reduction of MTT was calculated as (abs 560 nm) – (abs 650 nm).

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

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

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

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α) measurement - The assay was carried out in 100 µL of CSF, serum or extracellular medium, using a rat TNF-α ELISA from eBioscience. Values were expressed as ratio: [TNF-α] of LPS-treated group / [TNF-α] of control group.

Statistical Analysis - Parametric data are reported as mean ± standard error and were analyzed by Student's *t* test (when two groups were considered) or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test, in the SPSS-16.0. Data from GFAP measurements were log transformed to satisfy the assumption of statistical tests when necessary. Tests are specified in the legends, assuming $p < 0.05$.

3. Results

LPS induced an increase in cerebrospinal fluid S100, but not in the serum

Anesthetized adult rats received 10 μ L ICV of 2.5 μ g/ μ L LPS or phosphate-buffered saline (control). CSF, collected by cisterna magna puncture, as well as blood, collected by intracardiac puncture, at 30 min or 24 h after and a significant and persistent increase in CSF S100B was observed in 30 min (Fig 1A), without significant changes in S100B serum content (Fig 1B). Interestingly, when rats received IP LPS (250 μ g/Kg body) they also exhibited an increase in CSF S100B in 30 min, but not in 24 h (Fig 1C), and again no significant changes in serum S100B were observed when compared with controls that received phosphate-buffered saline (Fig 1D). Notice that, assuming a body weight of rats of 0.3 Kg, the amount of LPS administered IP and ICV was 75 and 25 μ g, respectively.

LPS directly affects S100B secretion, apparently without changing the intracellular content of this protein

In order to investigate whether this effect was directly on astrocytes we added different concentrations of LPS (from 0.01 to 30 μ g/mL) in primary astrocyte cultures and extracellular S100B was measured at 1 h (Fig 2A) and 24 h (Fig 2B). In 1 h, LPS (at concentration from 10 μ g/mL onwards) increased S100B secretion. Conversely, at 24 h, LPS caused a decrease in S100B secretion even at as low a concentration as 0.01 μ g/mL. Acute hippocampal slices were also exposed to LPS for 1 h (Fig 2C) and a decrease in S100B secretion was observed at LPS concentrations from 0.1 to 1 μ g/mL, but at 10 μ g/mL, an increase in S100B secretion was induced by LPS.

After 24 h of exposure to LPS, we measured S100B and GFAP content in lysed preparations of astrocyte cultures (Fig 3A and 3B, respectively). No significant changes

were observed in S100B content, but interestingly an increase in GFAP content was observed at all concentrations of LPS.

LPS decreased glutathione content, but did not affect cell viability and integrity

Another parameter analyzed to evaluate astroglial activity was the content of intra and extracellular glutathione. After exposure to LPS (at 0.1 $\mu\text{g/mL}$), we observed a decrease in the intracellular content in glutathione of astrocytes after 24 h, but not in 1 h (Fig 4A). In addition, an increase in the extracellular content of glutathione was observed in 24 h. Hippocampal slice preparations also exhibited a decrease in glutathione content after LPS exposure for 1 h, but differently from culture preparations, we were not able to detect the extracellular content (Fig 4B).

In order to detect a possible toxic effect of LPS in our preparations, we evaluated their capacities for MTT reduction, neutral red incorporation and LDH release. No changes in MTT reduction assay (Fig 5A) or in neutral red assay (Fig 5B) were induced in astrocyte cultures exposed to LPS (from 0.01 to 30 $\mu\text{g/mL}$). In addition, no changes in LDH release were seen (data not shown). Similar assays were also carried out in slice preparations confirming cell viability and integrity (data not shown).

LPS induced a transient TNF_α increase in serum and CSF

Finally, we measured a classical inflammatory cytokine, TNF_α , in response to LPS *in vivo* to confirm the activity of this compound and compare to that obtained with S100B protein. Differently from S100B, 30 min after IP administration of LPS (approximately 75 μg), we observed an increase in serum TNF_α (about 58 x), but not in CSF (Table 1). No changes were observed in the TNF_α content in serum or CSF 24 h after IP administration of LPS. When LPS (25 μg) was administered ICV we found an increase in CSF at 30 min (about 1.9 x).

4. Discussion

S100B has been proposed as a marker of brain injury and its elevation in CSF has been assumed to be a signal of astroglial activation (Rothermundt et al., 2003; Sen and Belli, 2007). Moreover, it is assumed that S100B from CSF easily crosses the blood brain barrier and a S100B increment in peripheral blood would be indicative of brain injury. However, in some pathophysiological conditions other interpretations are possible and, consequently, an intense debate has been developed, mainly because there are extra-cerebral sources of S100B (Goncalves et al., 2008).

Herein, we evaluated S100B levels in CSF, serum and astrocyte cultures of rats exposed to LPS. Cells of the innate immune system should respond to this stimulus, secreting cytokines and other cells could respond secondarily to the primary response. We found an increase in CSF S100B at 30 min after LPS both for ICV and by IP administration. Clearly and surprisingly, no increment in serum S100B occurred in either condition. Moreover, the CSF S100B increase remained until 24 h (at least). This suggests a brain specific LPS-induced release of S100B, i.e., peripheral immune cells stimulated by LPS did not release or cause a detectable S100B release from potential extra-cerebral sources of S100B (e.g. adipocytes). Notice that TNF α levels increased in serum and CSF under this condition. If TNF α is able to mediate S100B secretion (Edwards and Robinson, 2006), it only did this in brain tissue.

Other aspects must be emphasized. The increase in CSF S100B was not accompanied or followed by a increase in serum, at least in measurements in the evaluated times (0.5 and 24 h after LPS). This increase was fast and persistent. Notice that controls of ICV administration of LPS exhibited higher levels of CSF S100B (Fig 1A), compared to IP controls (Fig 1C), suggesting a lesion due to an invasive procedure.

Astrocytes in culture secreted S100B directly in response to LPS (from 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on) at 1h, but in 24 h a decrease in secretion (dependent on LPS concentration) was observed even at lower concentrations. This suggests a biphasic response, i.e. an increase in S100B secretion, followed by a decrease. This profile was observed in astrocyte cultures under other conditions, such as exposure to beta-hydroxybutyrate (Leite et al., 2004). This fast and transient stimulation of S100B secretion in astrocyte cultures was also observed for the cytokine IL-1 β , but without a decrease at 24 h (de Souza et al., 2009). This finding could suggest that the LPS effect is direct and independent of secondary-released IL-1 β . Other studies have reported an increase in cell content of S100B after 24 h of exposure to IL-1 β in C6 glioma cells (Sheng et al., 1996) or no change in astrocyte cultures after 48 h (Hinkle et al., 1998) and a decrease in cell content after 3 days of exposure to TNF α in astrocyte cultures (Edwards and Robinson, 2006). However, these studies did not measure S100B secretion adequately and it is not possible to speculate about a secondary effect of these two cytokines after long-term LPS exposure on S100B secretion in our conditions. Therefore, in agreement with our working hypothesis, it appears that LPS is able to directly modulate S100B secretion. In addition, when we used acute hippocampal slices to evaluate S100B secretion at 1 h, we also observed an increase in S100B secretion with LPS at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but conversely we observed a decrease in LPS at 0.1 or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These preparations are complex from a cellular view, i.e. in addition to astrocytes, they contain active microglia and neurons, which makes the interpretation of the control of S100B release difficult. However, a similar result, obtained in response to endothelin-1, has also been observed (Leite et al., 2009). This compound, due to the blocking effect on gap junction, increased S100B secretion in astrocyte cultures in the first hour, but 6 hours afterwards, it decreased S100B secretion. Similarly, in acute hippocampal slices, endothelin-1 decreases S100B

secretion at 1h. Potentially, both LPS and endothelin-1 down-regulate gap junction proteins. Although have no doubt about the effect of LPS and endothelin-1 on S100B secretion in acute hippocampal slices, we have no explanation for this effect, when compared to that observed in isolated astrocytes, at this moment.

Secreted S100B is a very small part of total cell content (less than 0.5% is found in the medium of astrocyte cultures at 24 h) and changes in S100B secretion are not necessarily accompanied by changes in the cell content (Goncalves et al., 2008). In fact, LPS changed the S100B secretion without affecting the cell content of this protein. On the other hand, GFAP content was increased in all concentrations of LPS used, indicating an astroglial activation. This is in agreement with previous reports about the effect of LPS on astrocyte cultures (Brahmachari et al., 2006; Vergara et al.). This reinforces the idea that GFAP and S100B have distinct regulatory mechanisms of expression and that astrogliosis (assumed as GFAP increment) could be, or not, accompanied by changes in cell S100B content (Buffo et al., 2008).

Another interesting aspect was the decrease in glutathione content after LPS exposure. We carried out assays using LPS at 0.1 µg/mL, because although we did not observe a stimulation of S100B secretion in astrocytes at this concentration at 1 h, we detected a decrease in acute hippocampal slices and in astrocyte culture 24 h afterwards, as well as an increase in GFAP. The decrease in the glutathione content in astrocytes at 24 h (but not at 1 h) is possibly associated with the up-regulation of glutathione-S-transferase, as observed very recently (Vergara et al.). Part of the decrease could involve an intense exportation of this peptide, since it serves as an extracellular antioxidant, and also provides substrates for neuronal synthesis of glutathione (Dringen and Hirrlinger, 2003). In fact, we observed an increment in extracellular glutathione in astrocyte cultures after 24 h. Similarly, we found a decrease in glutathione content in acute

hippocampal slices exposed to LPS, but no detectable changes were observed in the extracellular medium. This apparent technical insensitivity could be due to neuronal uptake, degradation and binding of glutathione in this preparation.

In spite of this decrease in antioxidant defense, both preparations exhibited excellent viability and integrity, based on MTT reduction assays, neutral red incorporation and LDH release. These assays, performed in parallel to assays for S100B measurements, allowed us to be emphatic throughout the text about S100B *secretion*, instead of S100B *release*.

Although we have assumed S100B to be a cytokine, until now, based on current literature (e.g. (Liu et al., 2005)), some caution should be taken in this categorization. For example, in contrast to classical cytokines, S100B is not produced exclusively for secretion, only a very small part is exported. More recently, some authors have suggested that S100B, like other members of the S100 family, may act as an alarmin or damage-associated molecular pattern (see (Bianchi, 2007) for a review). However, independently of these conceptions, our data suggest that S100B secretion is modulated by LPS.

In summary, these data suggest that S100B secretion in brain tissue is stimulated rapidly and persistently *in vivo* by LPS, administered ICV or IP. In isolated astrocytes and acute hippocampal slices, we observed a direct stimulation on S100B secretion by LPS at a concentration of 10 µg/mL. However, even lower levels of LPS were able to induce a decrease in S100B secretion 24 h afterwards, without significant changes in the intracellular content of S100B. In addition, after 24 h of exposure to LPS, we observed a decrease in glutathione and an increase in GFAP. Together, these data contribute to our understanding of the effect of LPS on astrocytes, particularly on S100B secretion

and help us to interpret cerebrospinal fluid and serum changes of this protein in neuroinflammatory diseases and brain disorders, in general.

Acknowledgements. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

References

- Belanger, M., Magistretti, P.J., 2009. *The role of astroglia in neuroprotection. Dialogues Clin Neurosci* 11, 281-295.
- Bianchi, M.E., 2007. *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J Leukoc Biol* 81, 1-5.
- Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R., *S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. Neurobiol Aging* 31, 665-677.
- Brahmachari, S., Fung, Y.K., Pahan, K., 2006. *Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. J Neurosci* 26, 4930-4939.
- Browne, R.W., Armstrong, D., 1998. *Reduced glutathione and glutathione disulfide. Methods Mol Biol* 108, 347-352.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.P., Mori, T., Gotz, M., 2008. *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3581-3586.
- Buyukuysal, R.L., 2005. *Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. Neurochem Int* 47, 580-588.
- Carpentier, P.A., Duncan, D.S., Miller, S.D., 2008. *Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. Brain Behav Immun* 22, 140-147.
- de Souza, D.F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L.S., Rigo, M.M., Gottfried, C., Leal, R.B., Goncalves, C.A., 2009. *S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. J Neuroimmunol* 206, 52-57.

- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. *S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. Biochim Biophys Acta 1793, 1008-1022.*
- Dringen, R., Hirrlinger, J., 2003. *Glutathione pathways in the brain. Biol Chem 384, 505-516.*
- Edwards, M.M., Robinson, S.R., 2006. *TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. J Neural Transm 113, 1709-1715.*
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem Res 25, 1439-1451.*
- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. Trends Immunol 28, 138-145.*
- Goncalves, 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.*
- Gottfried, C., Valentim, L., Salbego, C., Karl, J., Wofchuk, S.T., Rodnight, R., 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.*
- Haimoto, H., Kato, K., Suzuki, F., Nagura, H., 1985. *The ultrastructural changes of S-100 protein localization during lipolysis in adipocytes. An immunoelectron-microscopic study. Am J Pathol 121, 185-191.*
- Hinkle, D.A., Harney, J.P., Cai, A., Hilt, D.C., Yarowsky, P.J., Wise, P.M., 1998. *Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 beta regulate S100 beta expression in cultured astrocytes. Neuroscience 82, 33-41.*

- Kim, S.H., Smith, C.J., Van Eldik, L.J., 2004. Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production. *Neurobiol Aging* 25, 431-439.
- Leite, M., Frizzo, J.K., Nardin, P., de Almeida, L.M., Tramontina, F., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2004. Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull* 64, 139-143.
- Leite, M.C., Brolese, G., de Almeida, L.M., Pinero, C.C., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2006. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull* 70, 179-185.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169, 93-99.
- Leite, M.C., Galland, F., de Souza, D.F., Guerra, M.C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2009. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*.
- Liao, C.K., Wang, S.M., Chen, Y.L., Wang, H.S., Wu, J.C., Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Liu, L., Li, Y., Van Eldik, L.J., Griffin, W.S., Barger, S.W., 2005. S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. *J Neurochem* 92, 546-553.

- Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Leite, M.C., Thomazi, A.P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Donato, R., Goncalves, C.A., 2009. *S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca(2+) and K (+). Neurochem Res.*
- Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Battastini, A.M., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2007. *S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. Neurochem Int 50, 774-782.*
- Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C.A., Wofchuk, S., Rodnight, R., 2000. *Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. FEBS Lett 486, 203-207.*
- Ponath, G., Schettler, C., Kaestner, F., Voigt, B., Wentker, D., Arolt, V., Rothermundt, M., 2007. *Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. J Neuroimmunol 184, 214-222.*
- Rodrigues, L., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J.A., Achaval, M., Goncalves, C.A., 2009. *Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. J Alzheimers Dis 17, 193-202.*
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H., Arolt, V., 2003. *S100B in brain damage and neurodegeneration. Microsc Res Tech 60, 614-632.*
- Sakatani, S., Seto-Ohshima, A., Shinohara, Y., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Itohara, S., Hirase, H., 2008. *Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. J Neurosci 28, 10928-10936.*

- Sen, J., Belli, A., 2007. *S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain?* *J Neurosci Res* 85, 1373-1380.
- Sheng, J.G., Ito, K., Skinner, R.D., Mrak, R.E., Rovnaghi, C.R., Van Eldik, L.J., Griffin, W.S., 1996. *In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis.* *Neurobiol Aging* 17, 761-766.
- Steiner, J., Bernstein, H.G., Biela, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., Keilhoff, G., Bogerts, B., 2007. *Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain.* *BMC Neurosci* 8, 2.
- Tramontina, A.C., Tramontina, F., Bobermin, L.D., Zanotto, C., Souza, D.F., Leite, M.C., Nardin, P., Gottfried, C., Goncalves, C.A., 2008. *Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin.* *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32, 1580-1583.
- Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andreatza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Goncalves, C.A., 2007. *Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state.* *J Neurosci Methods* 162, 282-286.
- Vergara, D., Martignago, R., Bonsegna, S., De Nuccio, F., Santino, A., Nicolardi, G., Maffia, M., *IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes.* *J Neuroimmunol.*

Figure legends

Figure 1. **LPS induced an increase in cerebrospinal fluid S100, but not in the serum.** Intracerebroventricular injection of LPS, or saline solution, was carried out in adult Wistar rats under anaesthesia. After 30 min or 24 h, cerebrospinal fluid was collected by magna puncture (A) and blood by intracardiac puncture (B). Control group is represented by grey bars and LPS group is represented by open bars. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. Intraperitoneal infusion of LPS, or saline solution, was carried out in adult Wistar rats under anaesthesia. After 30 min or 24 h, cerebrospinal fluid was collected by magna puncture (C) and blood by intracardiac puncture (D). Control group is represented by grey bars and LPS group is represented by open bars. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 2. **S100B secretion was modified by LPS in astrocyte cultures and acute hippocampal slices.** Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by the DMEM without serum in the presence or absence of LPS (from 0.01 to 30 $\mu\text{g/mL}$). S100B was measured by ELISA at 1 h (A) and 24 h (B). Each value is a mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different, assuming $p < 0.05$. Adult Wistar rats were killed by decapitation and 0.3 mm hippocampal slices were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, hippocampal slices were exposed to LPS (from 0.1 to 10 $\mu\text{g/mL}$) and the extracellular content of S100B measured by ELISA at 1 h. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in

triplicate. Means indicated by different letters are significantly different, assuming $p < 0.05$.

Figure 3. Intracellular GFAP content was modified by LPS without changes in intracellular S100B content in astrocytes. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the presence or absence of LPS (from 0.01 to 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells were lysed and intracellular content of S100B (A) and GFAP (B) was measured by ELISA. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from the respective control ($p < 0.05$).

Figure 4. GSH content and secretion was modified by LPS in astrocyte cultures. (A) Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by the DMEM without serum in the presence or absence of LPS 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Media were collected at 1 or 24 h and GSH was measured (open bars). Cells were lysed and GSH intracellular content was measured (grey bars). Each value represents the mean (\pm standard error) of at least 3 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from respective control ($p < 0.05$). (B) Adult Wistar rats were killed by decapitation and 0.3 mm hippocampal slices were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, hippocampal slices were exposed to 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS and intracellular content of S100B was measured by ELISA at 1 h. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from respective control ($p < 0.05$).

Figure 5. **LPS did not affect cell viability.** Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. Confluent astrocytes were exposed to LPS (from 0.01 to 30 $\mu\text{g/mL}$), during 24 h. At the end, cells were incubated with MTT (A) or neutral red (B). Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate.

Table 1. TNF- α content in serum and CSF after LPS administration^a.

time	IP		ICV	
	serum	LCR	serum	LCR
30 min	58.6	1	1	1.9
24 h	1	1	1	1

^a Values were expressed as ratio: [TNF- α] of LPS-treated group / [TNF- α] of control group.

Figure 1

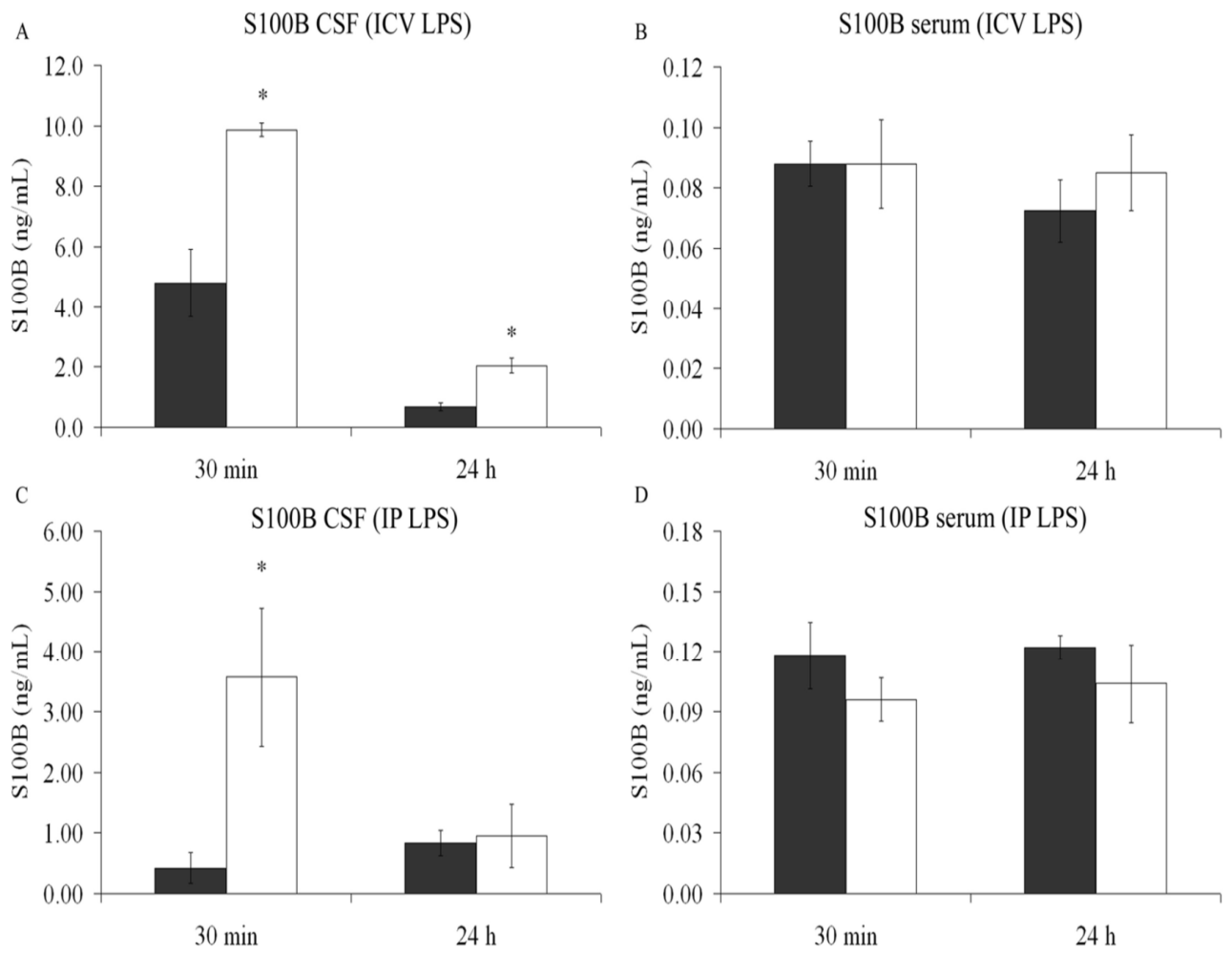


Figure 2

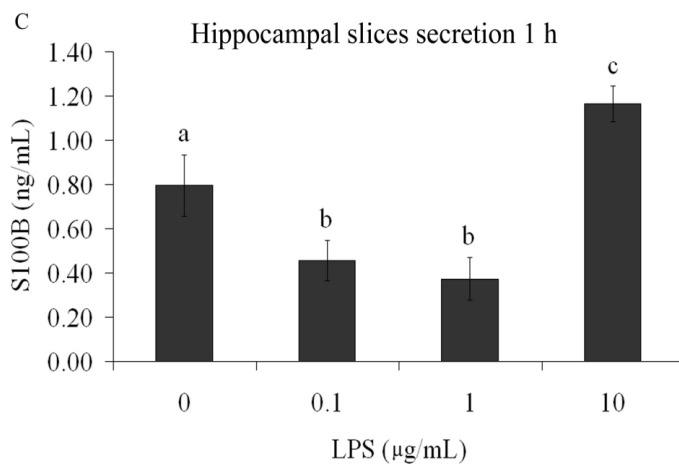
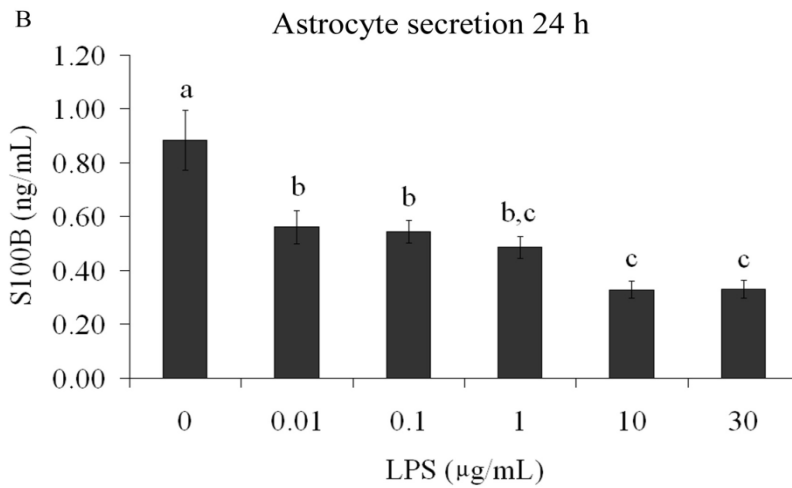
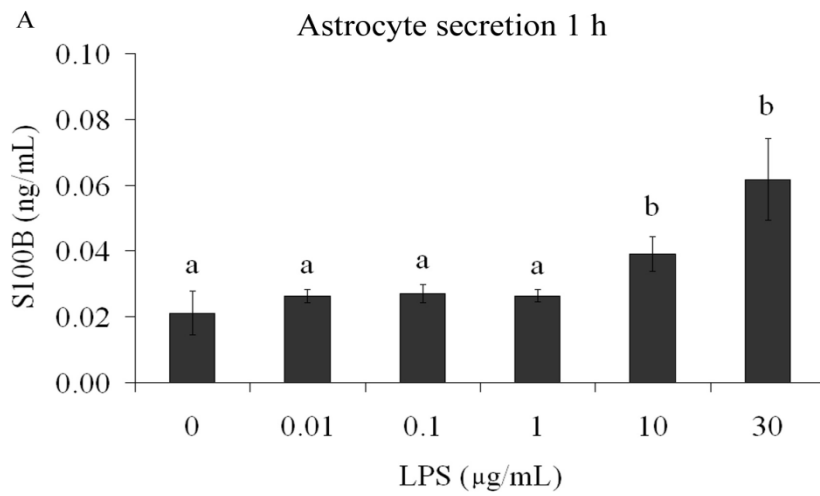
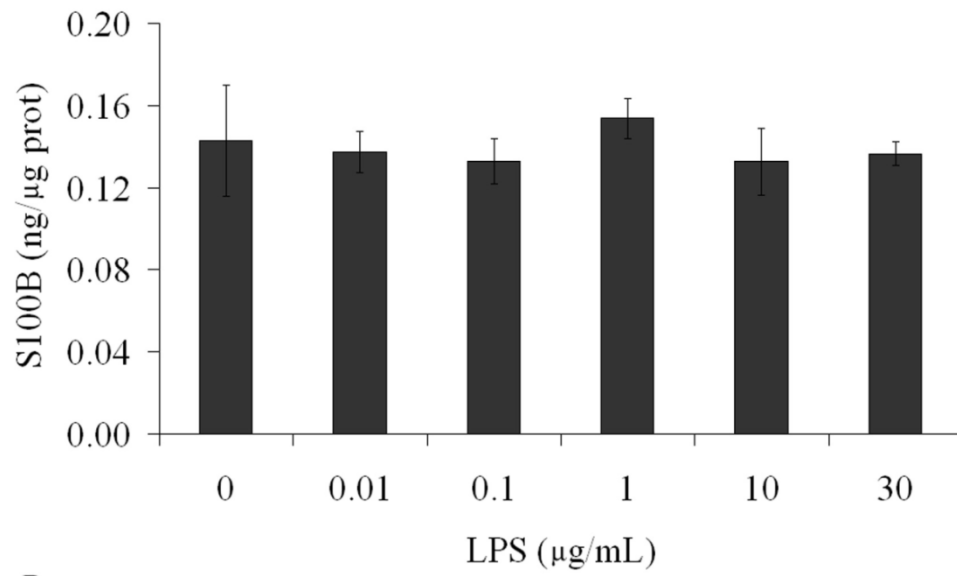


Figure 3

A



B

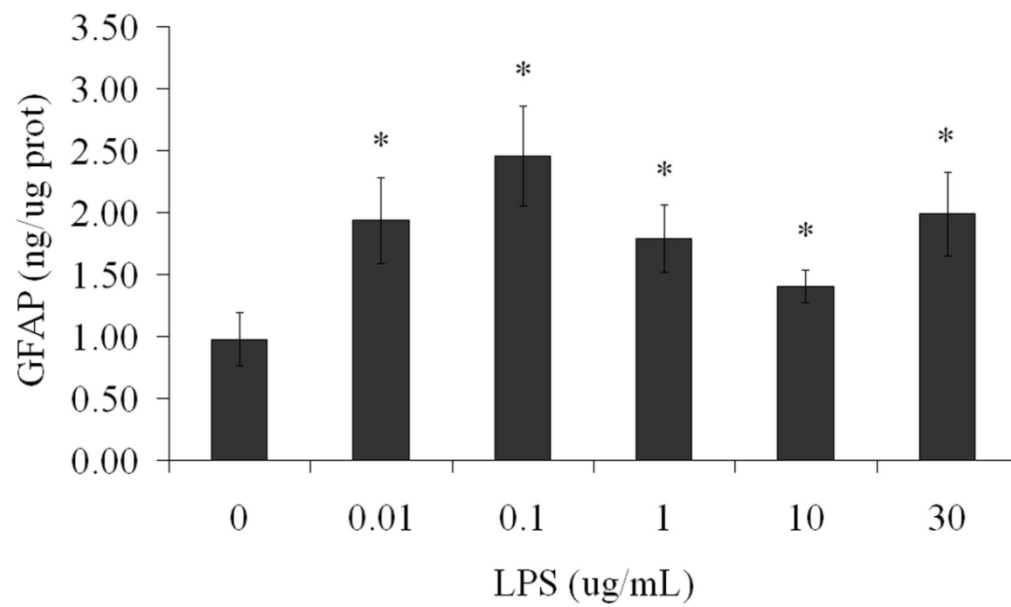


Figure 4

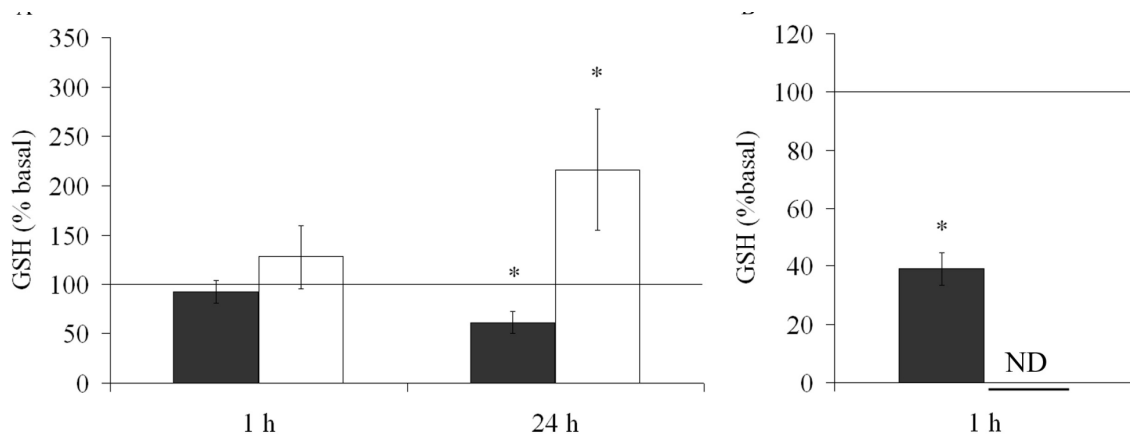
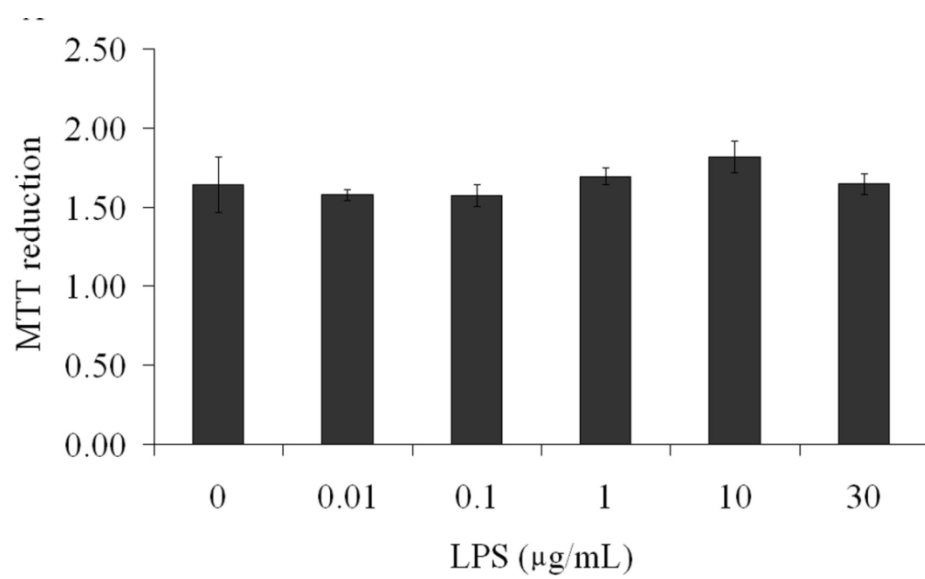
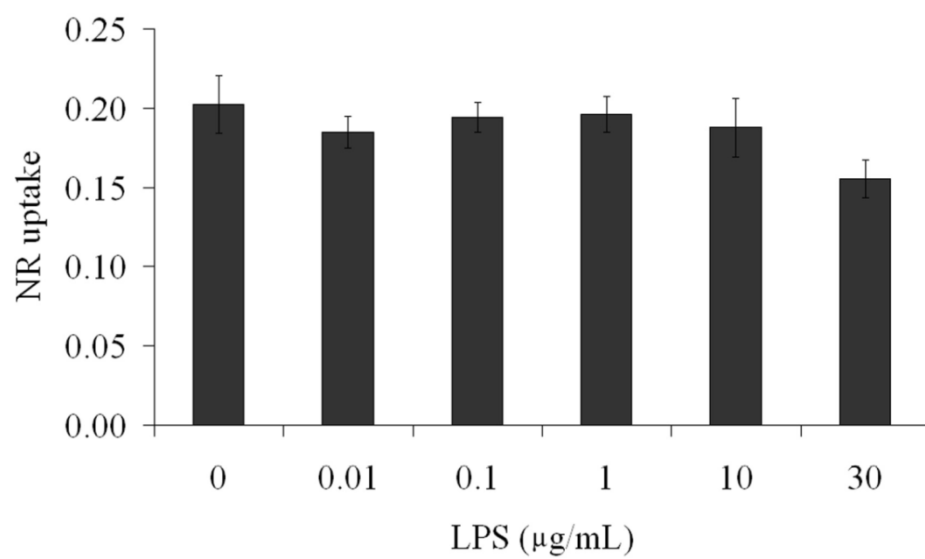


Figure 5

A



B



Parte III

Resumo dos resultados

Efeito de LPS sobre o conteúdo de S100B *in vivo*

Injeção intraperitoneal de LPS		
Tempo	Soro	LCR
30 min	-	↑
24 h	-	-

Injeção intracerebroventricular de LPS		
Tempo	Soro	LCR
30 min	-	↑
24 h	-	↑

Efeito de LPS sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos primários

Tempo	Secreção de S100B
1 h	↑
24 h	↓

Efeito de LPS sobre a secreção de S100B em fatias de hipocampo após 1h de exposição

Concentrações de LPS	Secreção de S100B
0,1 µg/ml e 1 µg/ml	↓
10 µg/ml	↑

Efeito de LPS sobre o conteúdo intracelular de S100B e GFAP em 24h de exposição

	Conteúdo intracelular
GFAP	↑
S100B	-

Efeito de LPS na concentração de 0,1 µg/ml sobre o conteúdo intracelular e extracelular de GSH em cultura de astrócitos nos tempos de 1 h e 24 h

Tempo	Conteúdo intracelular	Conteúdo extracelular
1 h	-	-
24 h	↓	↑

Efeito de LPS na concentração de 0,1µg/ml sobre o conteúdo intracelular de GSH em fatias de hipocampo em 1h de exposição

Tempo	Conteúdo intracelular	Conteúdo extracelular
1 h	↓	ND

Efeito de LPS sobre TNF- α no modelo *in vivo*

Injeção intraperitoneal de LPS		
Tempo	Soro	LCR
30 min	↑	-
24 h	-	-
Injeção intracerebroventricular de LPS		
Tempo	Soro	LCR
30 min	-	↑
24 h	-	-

(ND) = Não Detectado

(-) = sem alteração em relação ao basal

↑ = aumento em relação ao basal

↓ = redução em relação ao basal

Discussão

A proteína astrogliar S100B é amplamente usada como um parâmetro de ativação glial e/ou morte em várias condições que resultam em dano ao SNC. Um dos principais componentes em diversas desordens agudas ou crônicas no SNC é o processo inflamatório no qual a proteína S100B, junto com outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL1 β e TNF- α , tem grande importância.

Estudos mostram que IL-1 β estimula os astrócitos a expressarem S100B (Griffin 2006). Foi demonstrado que a secreção de S100B é induzida através da estimulação por IL-1 β em cultura primária de astrócitos, células de glioma C6 e em fatias hipocâmpais de ratos com provável envolvimento da via MAPK e sinalização via NF- κ B (de Souza et al. 2009). A S100B, quando ligada ao RAGE, em células microgлияis, regula positivamente a expressão de IL-1 β , TNF- α e COX-2 através da ativação de NF- κ B e AP-1 (Bianchi et al. 2008). A S100B é capaz de induzir a expressão de IL-1 β em culturas de microglia e neurônios de ratos de uma maneira dependente de tempo e concentração (Liu *et al.* 2005).

O LPS, o principal componente imunogênico da membrana externa de bactérias gram-negativas, é o alvo principal para o reconhecimento pelo sistema imunológico desencadeando a expressão pela célula alvo de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (Palsson-McDermott & O'Neill 2004). No entanto, existem poucos estudos relacionando LPS com a proteína S100B. Um estudo mostra que os níveis de S100B estão aumentados no soro fetal e materno na presença de dano na massa branca periventricular em fetos de ovelha após a administração sistêmica do LPS (Garnier *et al.* 2009, Garnier *et al.* 2006), sugerindo que os níveis sanguíneos da proteína S100B possam ser uma ferramenta na detecção precoce de danos no SNC. Em nosso trabalho

nós investigamos o efeito do LPS sobre o conteúdo extracelular e intracelular de S100B usando modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Nos animais que receberam LPS via ICV ocorreu um aumento significativo e persistente (pelo menos por 24 h) no conteúdo de S100B no líquido. Esse aumento da S100B pode ser devido à relação desta proteína com a resposta imunológica. Sabe-se que a microglia ativada no processo inflamatório libera IL-1 β a qual é uma das moléculas responsáveis pela ativação astrocítica levando ao aumento da secreção de S100B por estas células (de Souza et al. 2009). Como visto com a IL-1 β o TNF- α também estimula a liberação de S100B por astrócitos (Edwards & Robinson 2006). Isso sugere que, no caso de um insulto cerebral por LPS, deve haver o aumento da concentração extracelular de S100B, que pode ativar ainda mais a microglia a produzir IL-1 β e TNF- α fechando um ciclo. Entretanto, não se pode descartar um efeito estimulatório do LPS diretamente sobre a secreção de S100B em astrócitos, que também apresentam receptores TLR4. Por outro lado, não foi observada alteração de concentração de S100B no soro dos animais tratados com LPS via ICV. Apesar de essa proteína ser capaz de atravessar a barreira hemato encefálica e por isso ser considerada como marcadora periférica de dano cerebral, nossos resultados mostraram um aumento da concentração de S100B no LCR, sem alteração na concentração dessa proteína no soro. Isso pode indicar que os valores de concentração encontrados no soro podem não refletir os valores de S100B no LCR e que nem sempre se pode estabelecer uma correlação direta entre esses valores (pelo menos nos tempos avaliados).

Da mesma forma, quando os ratos receberam LPS via IP nenhuma alteração na concentração de S100B no soro foi observada. Os adipócitos não apenas possuem o receptor para LPS do tipo TLR4 como também são capazes de secretar a maior parte do TNF- α produzido no processo inflamatório em humanos (Hoareau *et al.*). Além disso,

sabe-se que essas células são as principais células secretoras de S100B na periferia (Netto *et al.* 2006). O fato de a concentração extracelular dessa proteína não ter sido alterada no soro com a injeção IP de LPS, indica que as vias que sinalizam para a secreção da S100B podem ser diferentes em astrócitos e adipócitos. A S100B vem sendo considerada como uma citocina inflamatória (Liu *et al.* 2005), no entanto atualmente esse conceito está sendo discutido (Bianchi 2007). Nesse trabalho observamos um aumento da concentração de TNF- α no soro de ratos tratados com LPS sem alteração na concentração de S100B, indicando que nem sempre o aumento da secreção dessa proteína está relacionado com a secreção de citocinas inflamatórias. Sendo assim, deve-se ter cuidado ao se referir a S100B como sendo um marcador neuroinflamatório periférico.

Quando os ratos foram tratados com LPS via IP, apesar de não haver resposta periférica de S100B, surpreendentemente ocorreu um aumento dessa proteína no LCR. Vários estudos nas últimas décadas têm mostrado que o SNC recebe sinais do sistema imunológico periférico e vice-versa (Kumar & Sharma). Sendo assim, as citocinas como IL-6, IL1 β e TNF- α liberadas durante o processo inflamatório periférico causado pela injeção IP de LPS podem sinalizar para o aumento de S100B no SNC ou ainda aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, propiciando a passagem do LPS para o SNC.

Para investigar um possível efeito direto do LPS sobre a secreção de S100B em astrócitos, nós utilizamos culturas primárias. Um aumento na secreção de S100B em 1h de exposição ao LPS foi observado apenas nas concentrações mais altas testadas. Esse resultado foi semelhante ao observado no LCR de ratos tratados com injeção ICV de LPS, confirmando um efeito direto do LPS sobre os astrócitos. Ao contrário, uma diminuição na secreção de S100B foi observada em 24 h de exposição ao LPS em

cultura de astrócitos em todas as concentrações testadas. Esse efeito pode ser devido ao fato dessas células estarem isoladas de outros tipos celulares (e.g. neurônios e microglia). Sendo assim, o único efeito observado é o efeito do LPS sobre os astrócitos, sem a participação de outras células, que *in vivo* podem manter o aumento da secreção de S100B por mais tempo devido a secreção de citocinas inflamatórias. Dessa forma, devemos considerar que a concentração de S100B no LCR não reflete apenas um efeito direto do LPS sobre os astrócitos, como também um efeito indireto sobre outros tipos celulares. Além da ausência de um estímulo mais persistente por ativação microglial, em cultura de astrócitos pode ocorrer uma dessensibilização dos receptores de LPS, visto que, por ser um sistema fechado, as concentrações de LPS se mantêm por mais tempo estimulando esses receptores.

O tratamento de fatias hipocâmpais de rato com LPS por 1 h resultou em um aumento no conteúdo extracelular de S100B na maior concentração de LPS testada, confirmando o resultado observado nos modelos *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, uma redução no conteúdo extracelular de S100B foi observada em fatias hipocâmpais nas concentrações mais baixas de LPS, semelhante ao que ocorreu em cultura de astrócitos em 24 h de exposição ao LPS.

Em relação ao conteúdo intracelular de S100B e GFAP após 24 h de exposição ao LPS não houve mudanças no conteúdo de S100B, mas foi observado um aumento no conteúdo de GFAP em todas as concentrações de LPS. Esse aumento no conteúdo de GFAP indica uma ativação astrogliar. Estudos têm mostrado que LPS induz a expressão de GFAP em cultura de astrócitos (Brahmachari *et al.* 2006, Vergara *et al.*) Em várias doenças neuroinflamatórias, o aumento da expressão de GFAP corresponde a intensidade da ativação astrogliar, entretanto o mecanismo pela qual a expressão astrogliar de GFAP está aumentada no SNC ainda não está claro (Eng & Ghirnikar

1994). Essas diferenças encontradas no conteúdo intracelular de GFAP e S100B frente a um insulto com LPS reforçam a idéia que essas proteínas têm distintos mecanismos regulatórios de expressão. Portanto, um conceito de astrogliose baseado no aumento de GFAP pode ou não ser acompanhado por mudanças no conteúdo intracelular de S100B (Buffo *et al.* 2008).

Outro importante aspecto que deve ser ressaltado é que a secreção e o conteúdo intracelular de S100B não estão necessariamente relacionados. Por exemplo, altos níveis de amônia induzem um aumento na secreção de S100B sem nenhuma alteração em seu conteúdo intracelular (Leite *et al.* 2006). Por outro lado, cultura de astrócitos em meio enriquecido com alta concentração de glicose mostrou uma diminuição na secreção de S100B também no conteúdo intracelular (Nardin *et al.* 2007).

Para avaliar a atividade astrogliar nós analisamos o conteúdo de glutathione (GSH). A glutathione é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina e é o principal antioxidante cerebral com uma concentração de 2-3 mM, sendo muito maior do que no sangue ou LCR e o seu local de síntese é o citoplasma da célula, onde se encontra em maior quantidade (Aoyama *et al.* 2008). Os astrócitos contêm a maior parte do conteúdo de GSH no SNC. Além disso, o astrócito secreta GSH que serve de substrato para síntese deste peptídeo nos neurônios (Dringen *et al.* 2000). Nossos resultados mostraram que não houve alteração no conteúdo intracelular e extracelular de GSH em astrócitos após 1h de exposição ao LPS. Entretanto, em 24 h observamos uma redução no conteúdo intracelular desse peptídeo em astrócitos podendo ser um indicativo de estresse oxidativo e também possivelmente associado a regulação positiva da glutathione-S-transferase descrito recentemente (Vergara *et al.*). Parte da diminuição poderá ser devido a uma intensa exportação deste peptídeo o qual serve como um importante antioxidante extracelular, bem como proporciona substratos para a síntese

neuronal de glutathione (Dringen & Hirrlinger 2003). Essa hipótese foi reforçada visto que em 24 h de exposição ao LPS foi observado um aumento no conteúdo extracelular de glutathione em cultura de astrócitos, talvez em uma tentativa de proteção.

Similarmente nós encontramos uma diminuição do conteúdo intracelular de glutathione em fatias hipocâmpais após 1 h de exposição ao LPS, mas nenhuma mudança foi observada no meio extracelular. Esta aparente falta de sensibilidade na técnica pode ter sido devido, em verdade, à captação pelos neurônios e degradação deste peptídeo na preparação.

Para garantir que não houve alteração na viabilidade e integridade das células analisadas foram feitos ensaios de redução de MTT, incorporação de vermelho neutro e liberação de LDH. Não houve alteração na viabilidade e integridade celular de acordo com as técnicas realizadas, apesar da diminuição de defesa antioxidante nos modelos estudados. A importância de fazer esses ensaios, especialmente em modelos *in vitro* e *ex vivo*, garante que o aumento da S100B extracelular, seja devido ao mecanismo de secreção e não a uma liberação inespecífica devido ao comprometimento na integridade de membrana celular ou a própria morte celular.

Finalmente, para validar o modelo inflamatório, nós dosamos a citocina pro-inflamatória clássica TNF- α , visto que esta citocina é um dos marcadores inflamatórios mais potentes, sendo também um dos mais estudados em modelos de neuroinflamação e inflamação periférica induzidos por LPS. Nossos resultados mostram um aumento transitório tanto no soro como no LCR nos ratos que receberam LPS IP e ICV, portanto, validando o modelo de inflamação por LPS.

Embora esteja bem descrito na literatura que a proteína S100B possa ser uma citocina (Liu et al. 2005), alguns cuidados para esta categorização devem ser

mencionados. Por exemplo, diferente das citocinas clássicas, a S100B não é produzida exclusivamente para secreção, somente uma pequena parte é secretada. Mais recentemente alguns autores têm sugerido que a S100B, como outros membros da família S100 poderiam funcionar como uma alarmina (Bianchi 2007). Entretanto, independente destes conceitos, nossos dados sugerem que a secreção de S100B é modulada por LPS.

Como conclusão, estes dados sugerem que a secreção de S100B em tecido cerebral é estimulada rápida e transitoriamente *in vivo* por LPS, administrado ICV ou IP. Em astrócitos isolados e fatias hipocâmpais nós observamos uma estimulação direta na secreção de S100B por LPS na concentração de 10 µg/mL. Entretanto, baixas concentrações de LPS foram capazes de induzir uma diminuição na secreção de S100B após 24 h de exposição ao LPS, sem mudanças significantes no conteúdo intracelular de S100B. Além disso, após 24 h de exposição, nós observamos uma diminuição de glutathiona e um aumento de GFAP. Juntos estes dados contribuem para entender o efeito de LPS em astrócitos particularmente na secreção de S100B e nos ajuda a interpretar mudanças nesta proteína que ocorrem no LCR e no soro em doenças neuroinflamatórias e desordens cerebrais em geral.

Referências Bibliográficas

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S. et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **21**, 383-421.
- Allan, S. M. and Rothwell, N. J. (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**, 1669-1677.
- Aoyama, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2008) Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*, **108**, 227-238.
- Bezzi, P. and Volterra, A. (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 387-394.
- Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**, 1-5.
- Bianchi, R., Giambanco, I. and Donato, R. (2008) S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging*.
- Bowman, C. C., Rasley, A., Tranguch, S. L. and Marriott, I. (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, **43**, 281-291.
- Brahmachari, S., Fung, Y. K. and Pahan, K. (2006) Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci*, **26**, 4930-4939.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A. P., Mori, T. and Gotz, M. (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3581-3586.
- Carpentier, P. A., Duncan, D. S. and Miller, S. D. (2008) Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun*, **22**, 140-147.

- de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B. and Goncalves, C. A. (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol*, **206**, 52-57.
- 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.
- Donato, R. (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, **60**, 540-551.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 1008-1022.
- Dringen, R., Gutterer, J. M. and Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, **267**, 4912-4916.
- Dringen, R. and Hirrlinger, J. (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem*, **384**, 505-516.
- Edwards, M. M. and Robinson, S. R. (2006) TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, **113**, 1709-1715.
- Eng, L. F. and Ghirmikar, R. S. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, **4**, 229-237.
- Farina, C., Aloisi, F. and Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, **28**, 138-145.
- Fontana, A., Fierz, W. and Wekerle, H. (1984) Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature*, **307**, 273-276.

- Frizzo, J. K., Tramontina, F., Bortoli, E., Gottfried, C., Leal, R. B., Lengyel, I., Donato, R., Dunkley, P. R. and Goncalves, C. A. (2004) S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res*, **29**, 735-740.
- Garnier, Y., Berger, R., Alm, S. et al. (2006) Systemic endotoxin administration results in increased S100B protein blood levels and periventricular brain white matter injury in the preterm fetal sheep. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **124**, 15-22.
- Garnier, Y., Frigiola, A., Li Volti, G. et al. (2009) Increased maternal/fetal blood S100B levels following systemic endotoxin administration and periventricular white matter injury in preterm fetal sheep. *Reprod Sci*, **16**, 758-766.
- Glezer, I., Simard, A. R. and Rivest, S. (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*, **147**, 867-883.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, **41**, 755-763.
- Griffin, W. S. (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*, **83**, 470S-474S.
- Halliday, G., Robinson, S. R., Shepherd, C. and Kril, J. (2000) Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **27**, 1-8.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, **52**, 269-279.
- Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M. and Godbout, J. P. (2009) Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged

- mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*, **23**, 309-317.
- Hoareau, L., Bencharif, K., Rondeau, P. et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNFalpha production in human adipocytes. *J Inflamm (Lond)*, **7**, 1.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Johann, S., Kampmann, E., Denecke, B., Arnold, S., Kipp, M., Mey, J. and Beyer, C. (2008) Expression of enzymes involved in the prostanoid metabolism by cortical astrocytes after LPS-induced inflammation. *J Mol Neurosci*, **34**, 177-185.
- Kipp, M., Norkute, A., Johann, S. et al. (2008) Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. *J Mol Neurosci*, **35**, 235-243.
- Kumar, V. and Sharma, A. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? *Int Immunopharmacol*, **10**, 9-17.
- Leal, R. B., Frizzo, J. K., Tramontina, F., Fieuw-Makaroff, S., Bobrovskaya, L., Dunkley, P. R. and Goncalves, C. A. (2004) S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport*, **15**, 317-320.
- Leite, M. C., Brolese, G., de Almeida, L. M., Pinero, C. C., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull*, **70**, 179-185.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- Leon, C. G., Tory, R., Jia, J., Sivak, O. and Wasan, K. M. (2008) Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm Res*, **25**, 1751-1761.

- Lin, J., Blake, M., Tang, C., Zimmer, D., Rustandi, R. R., Weber, D. J. and Carrier, F. (2001) Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J Biol Chem*, 276, 35037-35041.
- Liu, L., Li, Y., Van Eldik, L. J., Griffin, W. S. and Barger, S. W. (2005) S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors. *J Neurochem*, 92, 546-553.
- Montgomery, D. L. (1994) Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol*, 31, 145-167.
- Moore, B. W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 19, 739-744.
- Moynagh, P. N. (2005) The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat*, 207, 265-269.
- Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (2004) Trisomy 21 and the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63, 679-685.
- Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M. C., Tramontina, A. C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L. M., Battastini, A. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int*, 50, 774-782.
- Netto, C. B., Conte, S., Leite, M. C., Pires, C., Martins, T. L., Vidal, P., Benfato, M. S., Giugliani, R. and Goncalves, C. A. (2006) Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res*, 37, 683-686.
- O'Callaghan, J. P. and Sriram, K. (2005) Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf*, 4, 433-442.
- Palsson-McDermott, E. M. and O'Neill, L. A. (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113, 153-162.

- Peskind, E. R., Griffin, W. S., Akama, K. T., Raskind, M. A. and Van Eldik, L. J. (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 39, 409-413.
- Pinto, S. S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C. A., Wofchuk, S. and Rodnight, R. (2000) Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett*, 486, 203-207.
- Pistritto, G., Franzese, O., Pozzoli, G., Mancuso, C., Tringali, G., Preziosi, P. and Navarra, P. (1999) Bacterial lipopolysaccharide increases prostaglandin production by rat astrocytes via inducible cyclo-oxygenase: evidence for the involvement of nuclear factor kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*, 263, 570-574.
- Rodnight, R., Goncalves, C. A., Wofchuk, S. T. and Leal, R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*, 30, 325-338.
- Schultzberg, M., Lindberg, C., Aronsson, A. F., Hjorth, E., Spulber, S. D. and Oprica, M. (2007) Inflammation in the nervous system--physiological and pathophysiological aspects. *Physiol Behav*, 92, 121-128.
- Sheng, J. G., Ito, K., Skinner, R. D., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Van Eldik, L. J. and Griffin, W. S. (1996) In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging*, 17, 761-766.
- Takemiya, T., Matsumura, K. and Yamagata, K. (2007) Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int*, 51, 112-120.

- Uematsu, S. and Akira, S. (2006) Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med*, 84, 712-725.
- Van Eldik, L. J. and Wainwright, M. S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, 21, 97-108.
- Vergara, D., Martignago, R., Bonsegna, S., De Nuccio, F., Santino, A., Nicolardi, G. and Maffia, M. IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes. *J Neuroimmunol*.
- Wang, D. D. and Bordey, A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, 86, 342-367.
- Zhou, H., Lapointe, B. M., Clark, S. R., Zbytniuk, L. and Kubes, P. (2006) A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*, 177, 8103-8110.