

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

*EFEITO DO GLUTAMATO SOBRE A SECREÇÃO
DA PROTEÍNA S100B EM CULTURA DE
ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS*

DANIELA GONÇALVES ANTUNES

Orientador

CARLOS ALBERTO GONÇALVES

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

Porto Alegre

2002

*“Ler faz o homem completo,
discutir faz o homem hábil
e escrever faz um homem exato”.*

Francis Bacon

*Ao Celso pelo amor e por me fazer mais feliz
Ao nosso filho que virá completar a nossa felicidade*

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, pelos ensinamentos e por terem sempre apoiado as minhas decisões. Amo vocês!

Um agradecimento especial aos meus irmãos, Alessandro e Daiane, que são o meu orgulho e por também se orgulharem de mim.

À Marina, minha bolsista, não só por ter sido meu braço direito no último ano deste trabalho, mas também pela dedicação, carinho e amizade. Te adoro muito!

À Dani e a Mo, por terem sido não só colegas, tornando o ambiente de trabalho sempre agradável, mas amigas em todas as horas. Amo vocês gurias!

Ao Andreas, por ter me ensinado a técnica do ELISA que foi o coração deste trabalho e também por ser um grande amigo.

Aos professores (Beti, Suca e Cris) e todos os colegas do saudoso FPC pela convivência, pelos ensinamentos, pelo carinho e principalmente pela amizade. Aproveito para fazer um agradecimento especial a professora Susana (Suca) por ter proporcionado a minha entrada neste grupo de pesquisa, além do tempo dedicado as discussões dos meus resultados e pelas caronas até o Campus do Vale para fazermos as leituras das amostras.

Ao laboratório do professor Jorge Guimarães, por ter possibilitado a leitura das placas de ELISA.

À Liane e à Sirlene pelas dosagens do AMPc.

À Verlaine e à Cecília pelo apoio técnico e pelo carinho de todos os dias.

À Carmem e ao Guido, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao professor Diogo, pelo apoio de sempre.

Um agradecimento carinhoso ao nosso LaBS100, Denise, Cristina, Ju, Fran, Erica, Bina e Marina, não só pelo apoio técnico (as culturas), mas por terem tornado os dias mais agradáveis.

Às secretarias de Pós-graduação e graduação pela dedicação ao nosso trabalho e ao Departamento.

Ao CNPq, FAPERGS e PRONEX pelo apoio financeiro.

Por fim, um agradecimento muito especial para a pessoa que tornou possível a realização deste trabalho em seu laboratório, mesmo que isso lhe tenha causado alguns aborrecimentos. Agradeço não só pelo orientador que és (teórico e prático), tendo sempre o tempo do mundo para as suas alunas, mas pelo grande amigo que representas para mim. **Obrigada CA, realmente, por tudo.**

RESUMO

A proteína S100B pertence à família S100 de proteínas ligantes de Ca^{+2} . Sua expressão dá-se primariamente em astrócitos, os quais também secretam esta proteína, exercendo um papel trófico sobre as células vizinhas. A adição de S100B tem promovido a sobrevivência de neurônios em cultura e, recentemente, tem sido proposto um papel protetor da S100B contra a excitotoxicidade. Neste trabalho investigamos a liberação de S100B na presença de alta concentração de glutamato. A secreção de S100B em astrócitos de ratos em cultura foi quantificada, pelo método de ELISA, durante 24 horas após uma privação de soro de 30 minutos (condição estimulada) ou não (condição basal). A integridade dos astrócitos foi analisada por ensaios de exclusão de azul de tripan e medida da LDH. Glutamato (1 mM) não teve efeito sobre a secreção basal de S100B, mas diminuiu a liberação 1h depois da privação de soro. A privação de soro que estimulou a liberação de S100B foi dependente de síntese protéica e reduzida por Rp-AMPC e H-89, sugerindo o envolvimento da via AMPC/PKA, possivelmente sobre o elemento sensível ao AMPC no gene de S100B. Além disso, a privação de soro foi acompanhada por um aumento transitório do conteúdo intracelular de AMPC. Nossos resultados sugerem que o proposto papel neurotrófico da S100B, pelo menos em cultura de astrócitos hipocâmpais, poderia estar prejudicado por altos níveis de glutamato. Não está claro ainda se o efeito do glutamato é medeado por receptores. Na tentativa de investigar o mecanismo envolvido usamos inibidores do transporte de glutamato e agonistas de glutamato. Os resultados indicam que ambos receptores metabotrópicos do Grupo I/II e transportadores de glutamato estão envolvidos no decréscimo da secreção de S100B induzida pelo glutamato.

ABSTRACT

The S100B protein belongs to the S100 family of calcium binding proteins. The protein is primarily expressed by astrocytes and secreted by these cells, playing a neurotrophic role in neighboring cells. Addition of S100B has increased survival of neurons and promoted neurite extension and recently a protective role against glutamate-induced excitotoxicity has been proposed. Here we investigated S100B release in presence of high glutamate. After serum-deprivation for 30 min (stimulated condition) or not (basal condition) S100B release in hippocampal astrocyte cultures was measured during 24 h by ELISA. Integrity of astrocytes was analysed by trypan blue exclusion and LDH assays. Glutamate at 1 mM had no effect on basal secretion of S100B, but it decreased S100B release in serum-deprived astrocytes after 1h. Serum-deprivation stimulated release of S100B was dependent on protein synthesis and was reduced by Rp-cAMP and H89, suggesting an involvement of cAMP/PKA, possibly on cAMP response element in the S100B gene. In addition, serum-deprivation was accompanied by a transitory increase of intracellular content of cAMP. Our results suggest that the putative neurotrophic role of extracellular S100B, at least in cultured hippocampal astrocytes, could be damaged by high levels of glutamate. It is not clear yet if this glutamate effect is mediated by glutamate receptors. In order to investigate the mechanism involved we used inhibitors of glutamate transport and agonists of glutamate. Results indicate that both type I/II metabotropic receptors and glutamate transporters are involved in glutamate-induced decreasing of S100B secretion.

ÍNDICE

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Componentes do sistema nervoso central	1
I.1.1. Neurônios	1
I.1.2. Neuroglia	2
I.1.2.1. Microglia	3
I.1.2.2. Oligodendrócitos	4
I.1.2.3. Astrócitos	4
I.1.2.3.1. Plasticidade neural: fatores neurotróficos	6
I.2. Proteína S100B	7
I.2.1. Expressão da proteína S100B	8
I.2.2. Papel extracelular da S100B	9
I.2.2.1. Secreção da proteína S100B	9
I.2.2.2. Atividade extracelular da proteína S100B	10
I.3. Modulação glutamatérgica: receptores e transportadores	12
I.3.1. Receptores de glutamato	13
I.3.2. Transportadores de glutamato	15
II. OBJETIVOS	17

II.1. Secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocampais	17
II.2. Análise dos mecanismos envolvidos na redução da secreção de S100B por glutamato em cultura de astrócitos privados de SFB	18
III. MATERIAIS E MÉTODOS	19
III.1. Cultura primária de astrócitos	19
III.2. Experimentos para análise da secreção de S100B em cultura de astrócitos	22
III.3. Quantificação da secreção de S100B pelo método de ELISA	24
III.4. Quantificação do conteúdo intracelular de AMPc	27
III.5. Verificação da viabilidade celular	28
III.6. Análise estatística	29
IV. RESULTADOS	30
IV.1. Perfil de secreção da S100B em cultura de astrócitos hipocampais	30
IV.2. Efeito do glutamato sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocampais	32
IV.3. Envolvimento da síntese protéica na secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocampais	34
IV.4. Envolvimento da via de transdução AMPc/PKA no mecanismo de secreção da S100B em cultura da astrócitos hipocampais	36
IV.5. Avaliação do mecanismo celular envolvido na redução da secreção de S100B induzida pelo glutamato em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB	39
IV.5.1. Análise do envolvimento do mecanismo de transporte de glutamato na secreção de S100B em astrócitos estimulados pela ausência de soro	39
IV.5.2. Análise do envolvimento dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos na secreção da S100B em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB	41

IV.5.3 Análise do envolvimento dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos na secreção de S100B em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB	42
V. DISCUSSÃO	43
VI. CONCLUSÕES	48
VII. BIBLIOGRAFIA	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.:	Os principais componentes do SNC e suas interrelações. Legenda: VS: vasos sanguíneos; V: espaço ventricular; M: superfície da meninge. Segundo Raine (1994).	3
Figura 2.:	Estrutura molecular da proteína S100B. Segundo Donato (1999).	7
Figura 3.:	Mecanismos de transdução de sinal acoplados aos mGluRs. Segundo Raine (1994).	14
Figura 4.:	Captação de glutamato dependente de Na ⁺ . A entrada de cada molécula de glutamato carrega junto três Na ⁺ e sai um K ⁺ e uma molécula de bicarbonato. Adaptado de Hof e colaboradores (1999).	15
Figura 5.:	Esquema da técnica utilizada para o preparo de culturas primárias de astrócitos hipocâmpais segundo Gottfried (1996).	21
Figura 6.:	Curva de tempo para a secreção de S100B em cultura de astrócitos estimuladas ou não pela ausência de SFB.	31
Figura 7.:	Efeito do glutamato sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocâmpais.	33
Figura 8.:	Efeito da cicloheximida sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocâmpais.	35
Figura 9.:	Envolvimento da via de transdução AMPc/PKA no mecanismo de secreção da proteína S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB.	37
Figura 10.:	Avaliação do envolvimento da via de transdução de sinal AMPc/PKA sobre o efeito do glutamato no mecanismo de secreção da proteína S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB.	38
Figura 11.:	Avaliação do envolvimento do mecanismo de transporte de glutamato na secreção de S100B em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB.	40
Figura 12.:	Avaliação do envolvimento dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos na secreção de S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB.	41

Figura 13: Avaliação do envolvimento dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos na secreção de S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB.

LISTA DE TABELAS

Tabela III.1.:	Lista de reagentes especiais e materiais utilizados na confecção e manutenção das culturas primárias de astrócitos hipocâmpais	19
Tabela III.2.:	Lista de reagentes utilizados nos experimentos para análise da secreção de S100B	22
Tabela III.3.1.:	Anticorpos e placas utilizadas na quantificação de S100B	25
Tabela III.3.2.:	Tampões e outros reagentes utilizados no método de ELISA	25
Tabela III.4.1.:	Materiais utilizados na quantificação do AMPc	27
Tabela III.5.1.:	Materiais utilizados na técnica de viabilidade celular	28

LISTA DE ABREVIATURAS

1S,3R-ACPD	ácido (1S,3R)-1- aminociclopentano-1,3-dicarboxílico
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxasol-4-propiónico
ATP	Adenosina trifosfato
L-AP4	ácido 2-amino-4-fosfonobutírico
ATP	adenosina trifosfato
Ca ²⁺	íon cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Cl ⁻	Íon cloreto
Cu ²⁺	Íon cobre
DAG	diacilglicerol
DCG IV	2-(2,3-dicarboxiciclopropil)-glicina
EGTA	ácido etilenoglicol tetracético
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
Fk	forscolina
GABA	Ácido γ -Amino Butírico
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GluR	receptor glutamatérgico
mGluR	receptor glutamatérgico metabotrópico
iGluR	receptor glutamatérgico ionotrópico
GTP	Guanosina trifosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HEPES	ácido etanosulfônico-2-hidroxietil-piperazina
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
K ⁺	íon potássio
KA	cainato
KCl	cloreto de potássio
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
Mg ²⁺	íon magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio

Na ⁺	íon sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NGF	Fator de crescimento de neurônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
Pi	fosfatidil inositol
PIP ₂	fosfatidil inositol-4,5-difosfato
PKA	proteína quinase dependente de AMP _c
PKC	proteína quinase dependente de Ca ⁺² e fosfolipídios
PDC	"L-trans pyrrolidine-2-4 dicarboxylic acid"
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	sistema nervoso central
Zn ²⁺	Íon zinco

I. INTRODUÇÃO

O neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal (prêmio Nobel em 1906) foi o pioneiro nos estudos histológico do tecido cerebral. Seu trabalho demonstrou que o cérebro era um órgão como outro, formado por inúmeras células. Mas, apesar disso, estas células apresentavam características peculiares, o que possibilitava uma intensa intercomunicação entre elas.

A partir de estudos eletrofisiológicos feitos nas décadas de 50 e 60, principalmente por Hodgkin e Huxley (1952) no neurônio gigante da lula, os mecanismos utilizados nesta intercomunicação, entre as células nervosas, começaram a ser esclarecidos. Logo, estes trabalhos demonstraram que o século XX foi o marco das grandes descobertas em relação a este fascinante “mundo” que é o sistema nervoso central (SNC).

O SNC, tratado durante muito tempo como uma caixa preta, sempre representou um desafio para os cientistas, não só pela sua complexidade, mas pela importância humana que a compreensão do cérebro representa. Cada vez mais, busca-se explicar as bases biológicas para compreender nosso comportamento, memória, aprendizado, para que com isso, se possa explicar desordens e patologias que atingem este sistema.

O desenvolvimento de novas técnicas de estudos (cultura de células ou cultura organotípica, por exemplo) tem contribuído muito para o avanço das pesquisas na área das neurociências. Mas, ainda, existem muitas barreiras entre o que observamos *in vitro* e o que realmente ocorre *in vivo*. Apesar disso, os modelos existentes permitem uma melhor compreensão dos processos neurais tanto ao nível celular quanto molecular.

I.1. Componentes do sistema nervoso central

I.1.1. Neurônios

Os neurônios são células de origem ectodérmica capazes de transmitir sinais elétricos. Esta capacidade de condução elétrica dá-se pela passagem de correntes iônicas através de poros, também chamados de canais, presentes na sua membrana. Estes poros podem ser permeáveis somente a cátions, como

Na^{+2} , K^{+} e Ca^{+2} , ou a ânios, como Cl^{-} , seu principal representante (Clapham, 1995).

As células neuronais são formadas pelo corpo celular, também chamado de soma, o qual é o centro metabólico da célula. Do corpo celular partem uma série de processos: os dendritos, que são receptores de sinais químicos e elétricos (pós-sináptico), e o axônio, um longo e, geralmente, único prolongamento responsável pela condução do impulso elétrico para as células adjacentes (pré-sináptico).

O principal meio de comunicação entre os neurônios é as sinapses. As sinapses químicas são compostas por um terminal pré-sináptico, capaz de liberar neurotransmissores, e uma membrana pós-sináptica, onde, em sua superfície, estão presente receptores capazes de transmitir a mensagem trazida pelos neurotransmissores.

I.1.2. Neuroglia

As células gliais, ou neuroglia, foram descritas em 1946 por Virchow como sendo mero componente de suporte estrutural para as células neuronais. Na década de 50, estudos realizados em astrócitos demonstraram que estas células davam não só suporte estrutural, mas também suporte metabólico aos neurônios, principalmente no metabolismo de neurotransmissores, como glutamato e GABA, de íons K^{+} e no metabolismo energético, regulando a quantidade de glicose cerebral (Kimmelberg & Norenberg, 1989).

A imagem de que as células gliais apenas exerciam a função de suporte mecânico e metabólico somente foi modificada na década de 70, quando receptores β -adrenérgicos foram descobertos em astrócitos. Isso mostrou que estas células, apesar de não serem excitáveis, podem responder a mudanças do meio extracelular (Kimmelberg & Norenberg, 1989; Laming et al., 2000), contribuindo assim para a plasticidade neural.

Algumas características são cruciais para a diferenciação de células neuronais e glias. Entre estas se destacam a incapacidade das células gliais de formarem contatos sinápticos e a habilidade de dividir-se ao longo da vida (Raine, 1994). Além disso, a membrana destas células difere da neuronal por não ser

excitável, como dito anteriormente, ter potencial de repouso mais negativo e maior permeabilidade a íons K^+ (Barres, 1991).

Na figura 1, podemos observar a estreita relação entre as células que compõem o SNC. Além disso, as diversas funções exercidas pelas células gliais também estão representadas nesta figura, como a formação da mielina, a participação na barreira hemato-encefálica e suporte estrutural.

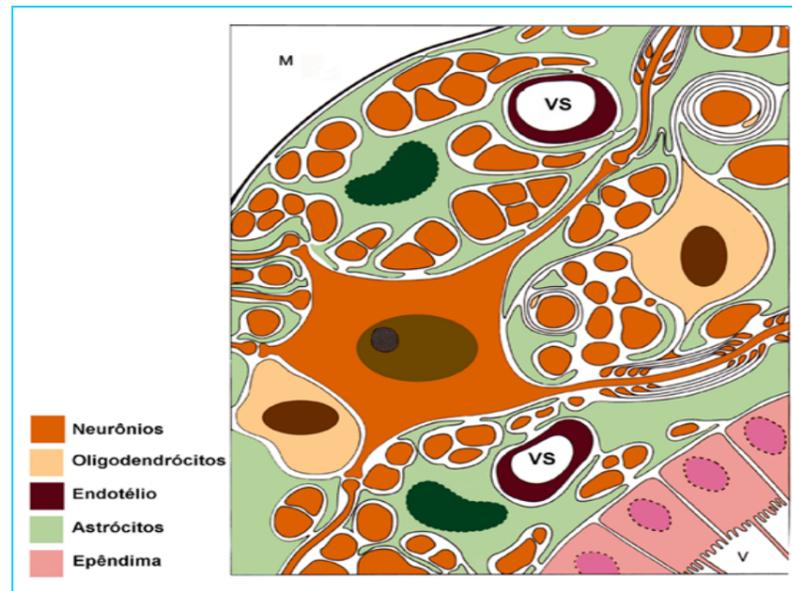


Figura 1: Os principais componentes do SNC e suas interrelações. Legenda: VS: vasos sanguíneos; V: espaço ventricular; M: superfície da meninge. Segundo Raine (1994).

A neuroglia é dividida em três grupos principais: a microglia (de origem mesodérmica), a macroglia (de origem ectodérmica), composta pelos astrócitos e oligodendrócitos e as células epêndimárias (glia radial), também de origem ectodérmica, responsáveis pelo revestimento dos ventrículos cerebrais e do canal central da medula espinhal (Raine, 1998).

I.1.2.1. Microglia

As células da microglia compõem cerca de 5 a 20% do volume cerebral e, por causa da sua mobilidade, são considerados os macrófagos do SNC. (Streit, 1995).

No SNC adulto, a microglia pode apresentar-se em três diferentes formas (Streit, 1995):

- ✓ ramificada ou em repouso: presente no cérebro hígido;
- ✓ ativada ou reativa: observada em estados patológicos do cérebro, apesar de não apresentar capacidade fagocitária;
- ✓ fagocitária: nesta forma, a microglia exerce a função de eliminar resíduos de células cerebrais mortas.

Em casos de dano neuronal, há a liberação de neurotoxinas as quais agem sobre a microglia, promovendo a passagem da sua forma intermediária para a ativada (Streit, 1996). Esta ação benéfica exercida pela microglia, onde auxilia na regeneração neuronal, tem sido questionada, uma vez que alguns estudos demonstraram que estas células produzem agentes neurotóxicos quando em cultura (Streit, 1993).

I.1.2.2. Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são as células responsáveis pela mielinização dos neurônios no SNC. Segundo Rio Hortega (1928), estas células são abundantes na substância branca do cérebro e são classificadas em três tipos (citado por Szuchet, 1995):

- ✓ interfasciculares: encontrados justapostos aos prolongamentos neuronais, promovendo sua mielinização;
- ✓ perineuronais: localizados junto ao soma neuronal;
- ✓ perivasculares: envolvem vasos sanguíneos.

I.1.2.3. Astrócitos

As células astrogliais, ou simplesmente astrócitos, são as mais abundantes no SNC, ocupando cerca de 50% do volume cerebral (Pope, 1978). Estas células são conhecidas desde o século XIX, mas durante muito tempo não despertaram o interesse dos cientistas, pois eram tratadas somente como suporte estrutural para os neurônios, os quais eram realmente importantes.

Esta imagem puramente estrutural dos astrócitos tem tornado-se enfraquecida nos últimos 40 anos. Muitos estudos têm demonstrado que os

astrócitos são as células que apresentam maior diversidade funcional no cérebro, além de uma capacidade altamente dinâmica de alterar seu fenótipo no decorrer da vida (Shao e McCarthy, 1994).

Os astrócitos, chamados assim pelo seu aspecto estrelar, são classificados em dois subtipos: os astrócitos fibrosos, que se encontram principalmente na substância branca do cérebro, e os astrócitos protoplasmáticos, encontrados em maior concentração na substância cinzenta onde circundam o corpo neuronal, dendritos e sinapses. Ambos os tipos estão em contato com capilares sanguíneos e neurônios. Esta classificação é um pouco diferente em cultura, onde são classificados em astrócitos do tipo 2 e 1, respectivamente (Kimelberg & Norenberg, 1989).

Algumas estruturas cerebrais apresentam tipos característicos de astrócitos, como a glia de Bergmann no cerebelo, as células de Muller na retina e pituitócitos na glândula pituitária (Shao e McCarthy, 1994).

Muitos trabalhos têm atribuído aos astrócitos importantes funções, dentre as quais pode-se destacar:

- ✓ auxiliam na migração de neurônios durante o desenvolvimento cerebral através da formação de fibras pela glia radial (Hatten e Mason, 1990; Hunter e Hatten, 1995);

- ✓ fornecem fatores tróficos para neurônios, antes mesmo de estes estabelecerem seus contatos sinápticos (Schwartz e Mishler, 1990);

- ✓ estocam glicogênio, sendo a principal reserva energética do cérebro (Hamprrecht e Dringen, 1995);

- ✓ tamponam níveis iônicos extracelulares preservando a atividade excitatória neuronal (Walz, 1989; Newman, 1995);

- ✓ participam do metabolismo glutamatérgico, sendo a única célula nervosa que contém a enzima glutamina sintetase (Kimelberg e Katz, 1985; Kimelberg & Norenberg, 1989).

Outra importante função exercida pelos astrócitos refere-se ao processo de cicatrização nervosa, conhecida como astrogliose reativa. Este processo ocorre após injúrias cerebrais, e tem sido registrado em doenças como: síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), encefalopatias espongiformes causadas por príons, doenças inflamatórias desmielinizantes, injúrias traumáticas agudas no cérebro e doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer. Em função da

astrogliose reativa, há um aumento no conteúdo intracelular de uma proteína marcadora de astrócitos, a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que compõe os filamentos intermediários destas células (Eng e Ghirnikar, 1994). Em casos como o do mal de Alzheimer, há também o aumento da expressão de outra proteína marcadora de astrócitos, a proteína S100B, a qual pode estar envolvida na patogenia desta doença (Griffin et al., 1998).

I.1.2.3.1. Plasticidade neural: fatores neurotróficos

Os astrócitos, como já foi dito anteriormente, são fundamentais para o desenvolvimento cerebral não só por guiarem os neurônios, mas também por produzirem e liberarem quantidades apropriadas de fatores tróficos para estas células, antes e durante a formação das conexões funcionais no indivíduo adulto (Schwartz e Mishler, 1990). Assim, através da liberação destes fatores, os astrócitos atuam sobre a maturação, diferenciação e sobrevivência dos neurônios que estão ao seu redor (Banker, 1982; Manthorpe et al., 1986). Entre os fatores neurotróficos expressos por essas células destaca-se: o NGF, o FGF e a S100B.

Na literatura há muito pouca informação a cerca da distribuição e localização dos fatores neurotróficos durante o desenvolvimento do SNC. Lu et al. (1991) demonstrou que em nervo óptico 10 dias pós-natal, o qual possui somente células gliais, há níveis detectáveis de mRNA do NGF. Isso poderia indicar que, além do seu papel neurotrófico, o NGF expresso pelas células gliais, durante o desenvolvimento do SNC, exerceria uma influência trófica sobre o crescimento axonal, atuando como um guia.

Em cérebro de rato, foi estabelecido que há um aumento nos níveis de FGF entre 10 e 40 dias pós-natal (Caday et al., 1990). Este período de desenvolvimento é caracterizado pela proliferação glial, crescimento neuronal e, também, pela formação das sinapses, sugerindo que o FGF desempenharia uma importante função neste processo.

Ainda não foram realizados trabalhos demonstrando as concentrações de S100B, uma proteína expressa somente por astrócitos, durante o desenvolvimento do SNC. Entretanto existem evidências de que a S100B estimula o crescimento de neuritos (Kligman & Marshak, 1985) e aumenta a sobrevivência de neurônios (Winningham-Major et al., 1989; Azmitia et al., 1990; Marshak, 1990).

I.2. Proteína S100B

A S100B é uma proteína primariamente sintetizada pelos astrócitos. É um homodímero ($\beta\beta$) de 21kDa, onde cada monômero caracteriza-se pela presença de dois sítios de ligação para o Ca^{2+} do tipo EF-hand, os quais podem ser observados na figura 2 (Donato, 1999). As proteínas pertencentes à Família S100, entre as quais está a S100B, são assim chamadas por serem 100% solúveis em uma solução saturada de sulfato de amônia, e foram inicialmente purificadas a partir de cérebro bovino (Moore, 1965). Além do Ca^{2+} , esta proteína é capaz de ligar-se ao Zn^{2+} (Shäfer et al., 1996, Donato, 1991), com uma afinidade relativamente alta, e ao Cu^{2+} (Nishikawa et al., 1997).

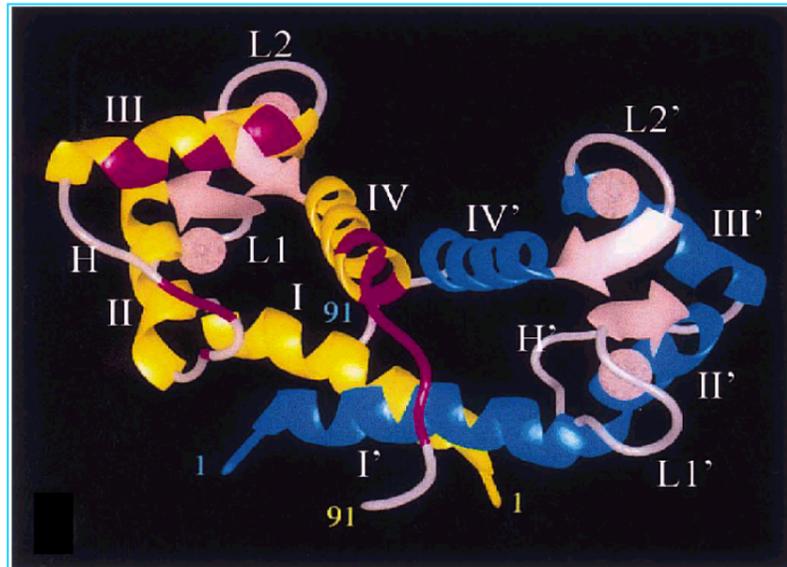


Figura 2: Estrutura molecular da proteína S100B. Segundo Donato (1999).

Alguns estudos têm atribuído a S100B um papel na regulação da polimerização de proteínas do citoesqueleto, como os microtúbulos e filamentos intermediários do tipo III (GFAP e Vimentina, por exemplo), através da interação de resíduos da porção N-terminal com uma subunidade da proteína alvo (Sorci et al., 1998; Donato, 2001). Da mesma forma, esta proteína pode também regular a fosforilação de algumas proteínas bloqueando a interação das quinases com seus substratos. Entre as proteínas alvo que tem sua fosforilação inibida pela S100B estão: a GAP-43 (ou neuromodulina), a proteína supressora de tumor p53 e a vimentina (Donato, 1999). Estudos feitos em nosso laboratório demonstraram que

a S100B atua, também, sobre a fosforilação da GFAP, pois uma vez presente no meio de incubação da fração citoesquelética, obtida de hipocampo de ratos jovens, reduz a fosforilação desta proteína (Ziegler et al., 1998).

Entre outras funções importantes exercidas por esta proteína, tem-se seu papel como mediadora dos sinais de Ca^{2+} em processos como crescimento, diferenciação e mobilidade celular (Scotto et al., 1998). Além disso, esta proteína estimula a proliferação de astrócitos e de células de glioma C6, aumenta a sobrevivência de neurônios e promove a extensão de neuritos. Assim sendo, a S100B não exerce somente funções intracelulares relacionadas à regulação do Ca^{2+} , mas também pode ser secretada para o meio extracelular exercendo funções sobre as células vizinhas (Donato, 2001).

I.2.1. Expressão da proteína S100B

Como foi colocado anteriormente, a S100B é sintetizada primariamente pelos astrócitos, podendo ser secretada por estas células. O gene que codifica esta proteína localiza-se no cromossomo 21q22.3, o que leva a um aumento da sua expressão na Síndrome de Down (Griffin et al., 1989).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o aumento intracelular nos níveis de AMPc resulta em um aumento na síntese de S100B, em células C6 de glioma de rato. Isto poderia levar a ativação do elemento resposta do AMPc (CREB), descrito em humanos como regulador do gene da S100B (Donato, 1999).

Diversos fatores têm sido reportados como reguladores da expressão da S100B, entre estes se destacam:

- ✓ a dexametasona, a qual causa um efeito bifásico nos níveis do RNA mensageiro (mRNA) da S100B em cultura de astrócitos hipocampais de ratos (Niu et al., 1997);

- ✓ a forskolina (Higashida et al., 1985) e as catecolaminas (Labourdette e Mandel, 1980), as quais estimulam o aumento na concentração intracelular da proteína S100B em células de glioma de rato C6 e GA-1, sendo este processo dependente de AMPc;

- ✓ o b-FGF-2, o qual pode diminuir (“short-term”) ou aumentar (“long-term”) os níveis do mRNA da S100B dependendo do tempo de exposição a este

fator trófico, provavelmente devido a mudanças na regulação da transcrição gênica (Hinkle et al., 1998);

✓ a interleucina-1 β , a qual causa uma supressão na expressão do mRNA da S100B em astrócitos corticais, tanto num tratamento longo quanto num curto, sem causar uma diminuição significativa na concentração intracelular desta proteína (Hinkle et al., 1998);

✓ e o β -amilóide, o qual estimula a síntese de ambos, mRNA e proteína S100B, em células de glioma C6 e cultura primária de astrócitos (Peña et al., 1995). Isto está de acordo com trabalhos que demonstram um significativo aumento no conteúdo da proteína S100B no cérebro de pacientes com Mal de Alzheimer, onde o β -amilóide induz a formação das placas senis. Este aumento nos níveis de S100B é encontrado em astrócitos ativados associados a essas placas (Donato, 1999).

I.2.2. Papel extracelular da S100B

O interesse pelo estudo da atividade extracelular da S100B tem aumentado nos últimos anos. O fato de que esta proteína pode ser secretada, pelos astrócitos (Shashoua et al., 1984) e por células de glioma C6 (Van Eldik and Zimmer, 1987), fez com que os pesquisadores buscassem quais os fatores que induzem esta secreção e o papel da S100B no meio extracelular.

I.2.2.1. Secreção da proteína S100B

Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc, em altas concentrações (5mM) foram capazes de estimular a secreção de S100B em duas linhagens de glioma de rato (C6 e GA-1). Da mesma forma, os nucleotídeos ATP, ADP e GTP (5mM) induziram a secreção de S100B nestas células. Este efeito parece ser dependente da diminuição da concentração de Ca²⁺ extracelular, uma vez que a adição de Ca²⁺ no meio inibiu esta secreção estimulada pelos nucleotídeos. Além disso, o EGTA (1mM), um quelante de Ca²⁺, também estimulou a secreção de S100B em células GA-1 (Susuki et al., 1987).

Outro potente indutor da secreção de S100B é o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Este hormônio induziu a secreção de S100B em células de glioma C6 e GA-1, de uma forma dependente de concentração. O mecanismo envolvido neste processo ainda não está claro, mas não há o envolvimento da redução na concentração de Ca^{2+} extracelular e nem o aumento intracelular de AMPc (Susuki et al., 1987).

Apesar do ACTH ter induzido a secreção de S100B, outros hormônios, como as catecolaminas (epinefrina, noraepinefrina, dopamina) e a acetilcolina, não foram capazes de estimular a secreção de S100B em células de glioma de rato (Susuki et al., 1987).

Ciccarelli et al. (1999) demonstrou um aumento na secreção de S100B em cultura de astrócitos corticais. Esta secreção foi observada através da estimulação de receptores adenosina A_1 e do subtipo 3 dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR3) por agonistas específicos, CCPA e DCG-IV respectivamente. Entretanto, não há evidências na literatura de que o ácido glutâmico seja capaz de induzir a secreção desta proteína.

I.2.2.2. Atividade extracelular da proteína S100B

As funções extracelulares exercidas pela S100B dependem muito da sua concentração. Isto porque, em concentrações micromolares, a S100B exerce um efeito tóxico sobre as células vizinhas e, em concentrações nanomolares, desempenham um papel neurotrófico (Donato, 2001).

Alguns estudos têm demonstrado que, durante o desenvolvimento do SNC, a S100B atua sobre os neurônios, estimulando a extensão de neuritos (Kligman, 1985) e a sobrevivência destas células (Van Eldik et al., 1991; Ueda et al., 1995). Além disso, recentes estudos mostraram evidências de que a S100B protege células neuronais *in vitro* contra danos causados por altas concentrações de glutamato e estaurosporina (Ahlemeyer et al., 2000). Desta forma, esta proteína parece ser capaz de proteger os neurônios contra injúrias cerebrais (Barger et al., 1995; Iwasaki et al., 1997), exercendo um papel neurotrófico sobre estas células.

Este efeito neurotrófico da S100B extracelular sobre os neurônios é dependente da translocação nuclear do NF- κ B e da regulação da expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2 nas células alvo (Donato, 2001), os quais são

dependentes da ligação da S100B no RAGE, um receptor de membrana (Huttunen et al., 2000).

O RAGE é um receptor multiligante da família das imunoglobulinas, onde se liga, entre outras moléculas, o β -amilóide, a anfoterina e a S100A12. A anfoterina ao ligar-se no RAGE desencadeia uma série de sinalizações intracelulares. Entre as vias ativadas por esta molécula está a cascata Ras/MAPK, que induz a translocação nuclear do NF κ B aumentando, assim, a sobrevivência de neurônios, e a via de sinalização Cdc42/Rac, envolvida no processo de extensão dos neuritos (Huttunen et al., 1999). Estas duas vias podem também estar envolvidas na ativação do RAGE pela S100B em neuroblastos, uma vez que a S100B e a anfoterina exercem um efeito aditivo sobre estas células (Huttunen et al., 2000).

Além do seu efeito sobre os neurônios, a S100B também atua sobre os astrócitos e células de glioma C6 (Selinfreund et al., 1991), estimulando sua proliferação. Um estudo feito em nosso laboratório, em cultura primária de astrócitos, demonstrou que a S100B extracelular aumenta a fosforilação da ERK, um componente da via Ras/MAPK. Conseqüentemente, esta fosforilação torna a ERK ativa para exercer suas funções, dentre as quais está a indução da proliferação celular. Isto sugere que o efeito desta proteína sobre a proliferação dos astrócitos pode ser mediado pela via Ras/MAPK (Gonçalves et al., 2000). De acordo com esta observação está o trabalho de Selinfreund (1991), o qual demonstra que a S100B extracelular induz os fatores de transcrição c-myc e c-fos em células gliais.

Ainda não há evidências de que o RAGE seja expresso por astrócitos. Mas linhagens de astrócitos que expressam RAGE e células de glioma C6 transfectados com RAGE cDNA são estimuladas por S100B, resultando na ativação do NF κ B (Huttunen et al., 2000; Taguchi et al., 2000).

A porção C-terminal da S100B não é essencial para sua atividade neurotrófica, mas a presença dos resíduos de cisteína nas posições 68 e 84 (Winningham-Major et al., 1989) e do estado de oxidação destes resíduos (Selinfreund et al., 1991; Scotto et al., 1998) parece ser fundamental para esta função. Isto foi constatado em nosso laboratório, onde foi observado que a S100B oxidada foi mais potente em ativar a ERK (via Ras/MAPK) do que a preparação reduzida desta proteína (Gonçalves et al., 2000).

Apesar dos seus efeitos neurotróficos, a S100B extracelular, em concentrações micromolares, é considerada neurotóxica. Concentrações altas desta proteína são encontradas em cérebro de pacientes com Síndrome de Down e Mal de Alzheimer, como já foi colocado anteriormente, sugerindo um envolvimento da S100B na patogenia de desordens neurodegenerativas associadas a estas doenças (Donato, 2001).

Além disso, a S100B também é capaz de induzir a apoptose em neurônios e astrócitos (Fanó et al., 1993; Hu et al., 1997). Um estudo feito recentemente demonstrou que a S100B induz apoptose em neurônios pela ativação do RAGE. Esta interação, S100B/RAGE, resultou num aumento das espécies reativas de oxigênio, liberação do citocromo C e ativação da cascata das caspases (Huttunen et al., 2000). Outro estudo demonstrou que esta proteína pode estimular a expressão do mRNA da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e aumentar a atividade desta enzima em astrócitos (Hu et al., 1996). Assim, há uma elevada produção de óxido nítrico e seus derivados neurotóxicos ocasionando um estresse oxidativo, o que resulta na morte de células neuronais (Hu et al., 1997).

Baseando-se nestas informações, a S100B secretada é geralmente vista como uma citocina, assim como a interleucina-1. Desta forma, em concentrações baixas (nM) promove a sobrevivência neuronal, mas em altas concentrações (uM) é neurotóxica (Donato, 2001).

I.3. Modulação glutamatérgica: receptores e transportadores

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos, onde desempenha um importante papel na plasticidade e na neurotoxicidade (Nakanishi, 1992). Sua ação no cérebro é mediada por um grupo de receptores presentes não só em neurônios como também em células gliais. Esses receptores são classificados em ionotrópicos e metabotrópicos, sendo esta divisão baseada nas diferenças existentes, nestes receptores, quanto a sua estrutura molecular, mecanismos de transdução ativados e propriedades farmacológicas.

O controle dos níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica é fundamental para a prevenção da excitotoxicidade neuronal, ocasionada por insultos agudos no cérebro. Nestes casos, os astrócitos, além dos neurônios,

desempenham um importante papel na remoção do glutamato do meio extracelular, uma vez que apresenta em suas membranas uma família de proteínas transportadoras específicas para esta molécula (Sims & Robinson, 1999).

I.3.1. Receptores de glutamato

Os receptores glutamatérgicos estão amplamente distribuídos no SNC, onde estão envolvidos em uma variedade de processos durante o desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação, migração e plasticidade sináptica (McDonald & Johnston, 1990). Entretanto, a expressão dos diferentes tipos destes receptores apresenta uma variação regional e de desenvolvimento bastante específica, indicando que estes podem exercer variadas funções quanto ao desenvolvimento e modulação do SNC.

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) constituem um grupo de receptores ligados a proteínas G. O glutamato, ao ligar-se nestes receptores, ativam uma proteína G que pode ativar ou inibir a adenilato ciclase ou estimular a fosfolipase C (figura 3), regulando, assim, a síntese de diferentes mediadores intracelulares (IP₃, AMPc ou GMPc). Dentro deste grupo de receptores já se conhecem oito subtipos, os quais estão divididos em três grupos (Pin & Duvoisin, 1995; Conn & Pin, 1997).

Além dos receptores glutamatérgicos acoplados a proteínas G, existem também receptores associados a canais catiônicos denominados ionotrópicos (iGluR). Estes são classificados em dois grupos: os receptores NMDA e os não-NMDA, sendo este último constituído pelos receptores AMPA e cainato. Em uma mesma sinapse, em geral, encontram-se os três tipos de receptores ionotrópicos, onde estão envolvidos na amplificação do sinal glutamatérgico (Cotman et al., 1995).

Os receptores NMDA são voltagem-dependentes e altamente permeáveis a Ca⁺² (Collingridge & Watkins, 1994). Estes parecem desempenhar, no SNC, um papel fundamental na potenciação de longa duração (LTP), na depressão de longa duração (LTD) e em eventos de plasticidade. Entretanto, quando superativados, podem causar severos danos via excitotoxicidade (Cotman et al., 1995; Gottlieb & Matute, 1997). Já os receptores AMPA e cainato medeiam a transmissão sináptica

excitatória rápida. São permeáveis a Na^+ e K^+ e estão associados primariamente a canais não-dependentes de voltagem (Cotman et al., 1995).

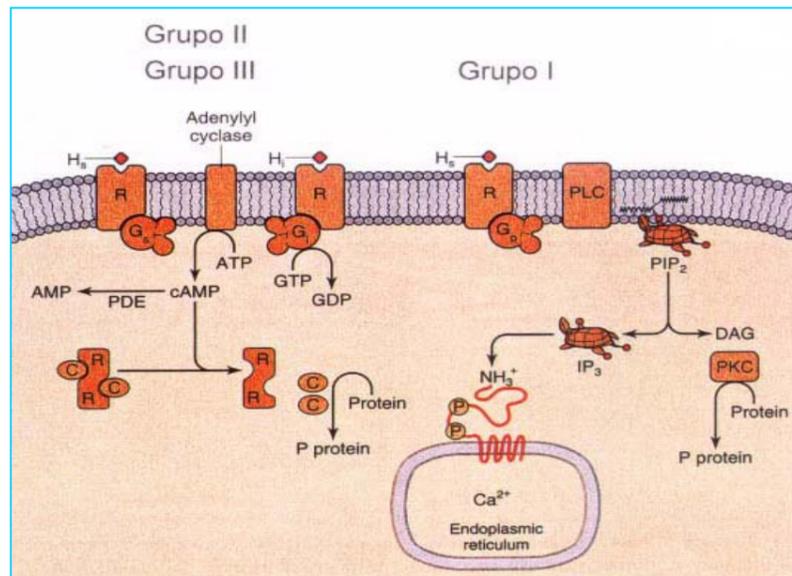


Figura 3: Mecanismos de transdução de sinal acoplados aos mGluRs. Segundo Raine (1994).

Não há, ainda, evidências claras de que estes receptores sejam expressos e funcionais em astrócitos *in vivo*, mas recentes trabalhos em culturas deste tipo celular e de diferentes regiões cerebrais, demonstraram que estas células podem expressar mRNAs para iGluRs e para todos os tipos de mGluRs: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (Balazs et al., 1997; Wroblewska et al., 1998; Mineff & Valtschanoff, 1999; Shelton & McCarthy, 1999).

I.3.2. Transportadores de glutamato

Os astrócitos são as principais células do SNC responsáveis pela captação de glutamato após a liberação deste pelos neurônios. Isto porque este é o grupo de células que mantém a homeostase do meio extracelular evitando, assim, eventos de excitotoxicidade (Gegelashvili et al., 1997).

Esta capacidade de captar glutamato extracelular só é possível porque os astrócitos expressam em sua membrana uma série de moléculas transportadoras

deste neurotransmissor. Nos últimos anos têm sido descritos cinco distintos cDNAs para os transportadores de glutamato, dependentes de Na^+ e de voltagem, no SNC: EAAT-1 (GLT-1), EAAT-2 (GLAST), EAAT-3 (EAAC-1), EAAT-4 e EAAT-5 (Schultz & Stell, 1996; Arriza et al., 1997; Swanson & Seid, 1999; Domercq & Matute, 1999; Duan et al., 1999).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a captação de glutamato em astrócitos é eletrogênica e dependente de Na^+ , conforme mostra a figura 4. Hanson e colaboradores (1997) mostraram que o rápido inchamento dos astrócitos causado pelo glutamato envolve o transportador eletrogênico dependente de Na^+ , o cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ e a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase.

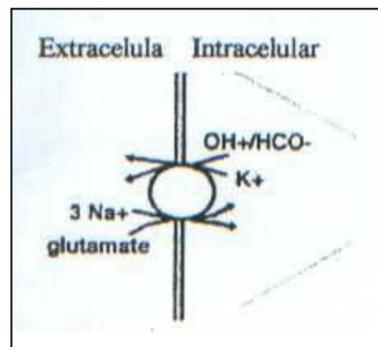


Figura 4: Captação de glutamato dependente de Na^+ . A entrada de cada molécula de glutamato carrega junto três Na^+ e sai um K^+ e uma molécula de bicarbonato. Adaptado de Hof e colaboradores (1999).

Culturas puras de astrócitos expressam basicamente GLAST, sendo a expressão de GLT-1 bastante reduzida. Entretanto, astrócitos cultivados na presença de neurônios expressam tanto GLAST quanto GLT-1 (Brown, 1998; Swanson & Seid, 1998). Neste sistema *in vitro* é possível bloquear este mecanismo de captação de glutamato. Um dos bloqueadores mais utilizados é o ácido dicarboxílico L-trans-PDC, o qual atua como um análogo conformacional do glutamato e não é transportado pelos captadores. Este somente impede, de uma maneira competitiva, o transporte de glutamato (Isaacson & Nicoll, 1993; Griffiths et al., 1994). Outra maneira de impedir a entrada de glutamato é através da utilização de um inibidor de transporte aniônico, visto que a captação deste neurotransmissor é dependente da entrada de Na^+ , conforme mostrado na figura 5 (Law, 1996; Miyamoto & Del Monte, 1994).

II. OBJETIVOS

II.1. Secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocampais

- ✓ Verificar o perfil de secreção da proteína S100B em cultura de astrócitos hipocampais em duas condições: DMEM sem soro ou com 1% de SFB, num período de 24 horas;
- ✓ Analisar o efeito do glutamato em duas concentrações: uma fisiológica (0,1mM) e uma excitotóxica (1mM), sobre a secreção de S100B nas duas condições já citadas;
- ✓ Verificar o envolvimento da síntese protéica na secreção de S100B, também, nas duas condições testadas;
- ✓ Quantificar o conteúdo intracelular de AMPc nos tempos 0, 5 e 30 minutos após a retirada de soro e, além disso, verificar o efeito do glutamato 1mM sobre o conteúdo deste mensageiro intracelular;
- ✓ Verificar o envolvimento da via de transdução AMPc/PKA somente nas células privadas de soro, visto que esta condição estimulou a secreção de S100B.

II.2. Análise dos mecanismos envolvidos na redução da secreção de S100B por glutamato em cultura de astrócitos privados de SFB

- ✓ Analisar o envolvimento da via de transdução AMPc/PKA no efeito do glutamato sobre a secreção de S100B;
- ✓ Avaliar o envolvimento do mecanismo de transporte de glutamato sobre esta redução da secreção de S100B;
- ✓ Verificar o envolvimento dos três grupos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos ;
- ✓ Avaliar o envolvimento dos três diferentes tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1. Cultura primária de astrócitos (de acordo com Gottfried, 1996)

III. 1.1. Materiais

Animais: Os animais utilizados nesta técnica eram ratos Wistar de 1 a 2 dias pós-natal (P1 ou P2) provenientes do ratário do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Tabela III.1: Lista de reagentes especiais e materiais utilizados na confecção e manutenção das culturas primárias de astrócitos hipocâmpais

Material	Fonte
DMEM	Sigma
HEPES	Sigma
Poli-L-lisina	Sigma
Garamicina	Shering-Plough
fungizona	GibcoBRL
Soro fetal bovino (SFB)	Cultilab
NaHCO ₃ e outros sais utilizados	Merck
Placas com 24 poços (2cm ² de diâmetro)	Sigma

Soluções utilizadas:

DMEM pH 7,6 (meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco):

Solução constituída por uma mistura de sais inorgânicos, vitaminas, aminoácidos, glicose e vermelho de fenol. Era adicionado a este meio 0,032% garamicina, 1% fungizona e os tampões HEPES (8,39mM) e NaHCO₃ (23,8mM) em água deionizada Milli-Q. Para complementar o meio com fatores tróficos, hormônios e outros fatores essenciais às células foi adicionado à solução 10% de soro fetal bovino.

CMF-BSS pH 7,4 (solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio): Solução composta por NaCl (136,9mM), KCl (5,36mM), Na₂HPO₄ (1,1mM), glicose (6,1mM), vermelho de fenol (0,00025%) e água deionizada Milli-

Q. A ausência de Ca^{+2} e Mg^{+2} , nesta solução, tinha como objetivo facilitar a dissociação mecânica das células, isto porque estes cátions são necessários para a estabilização de várias moléculas de adesão celular (Takeichi et al., 1988; Kemler et al., 1989).

III. 1.2. Métodos

III. 1.2.1. Cultura de astrócitos hipocampais

As placas “multiwell” utilizadas para o desenvolvimento das culturas eram previamente incubadas com um substrato de poli-L-lisina. Isto tinha como objetivo favorecer a adesão dos astrócitos na placa, uma vez que este substrato interage mais intensamente com as moléculas da matriz extracelular do que com o poliestireno. Segundo Banker e Goslin (1982), grande parte dos tipos celulares adere em poliaminoácidos (poli-L-lisina; poli-L-ornitina), mas nem todos crescem adequadamente, o que não é o caso dos astrócitos.

Eram utilizados, em cada cultivo, uma ninhada de 8 a 10 ratos (1 a 2 dias pós-natal) para o preparo de 6 a 8 placas de cultura. Os animais eram sacrificados por decapitação e as cabeças eram imediatamente colocadas numa placa de Petry contendo CMF-BSS e levadas para a câmara de fluxo laminar.

Os cérebros eram cuidadosamente removidos da caixa craniana e colocados numa segunda placa de Petry, ainda contendo CMF-BSS, onde eram retiradas as meninges para evitar a contaminação com fibroblastos, e posteriormente os hipocampos eram separados (Robertson et al., 1989). As células eram dissociadas, contadas e semeadas conforme mostra a figura 5.

Sucessivas trocas de meio eram realizadas a cada 4 dias onde eram removidas células que normalmente ficam aderidas sobre os astrócitos (neurônios, microglia e oligodendrócitos), além de serem renovados os nutrientes para as células. Na densidade semeada (cerca de 200.000 por poço) as culturas tornavam-se confluentes já no final da segunda semana de cultivo, quando já não era mais detectada a presença de neurônios (Vinadé et al., 1997).

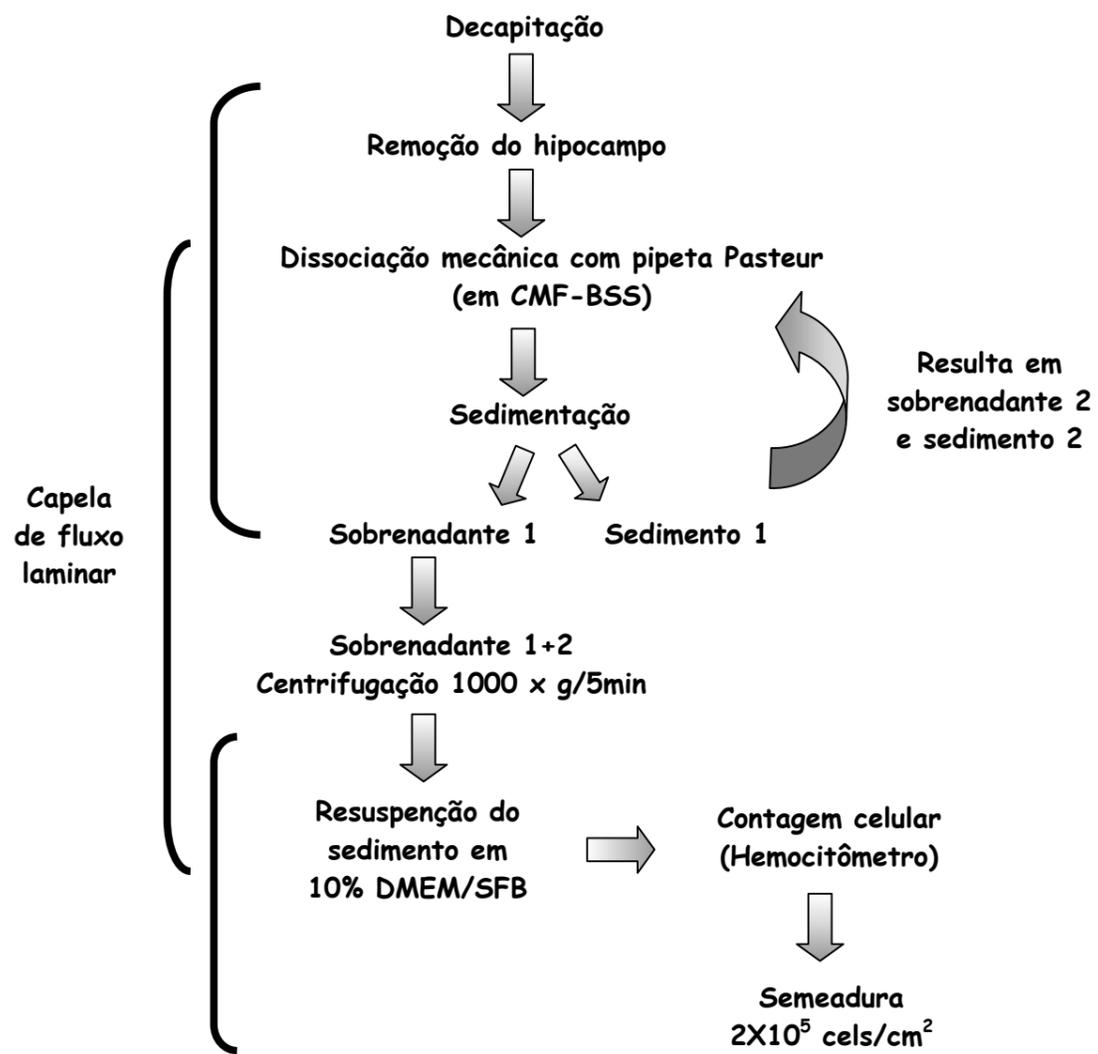


Figura 5. Esquema da técnica utilizada para o preparo de culturas primárias de astrócitos hipocâmpais segundo Gottfried (1996).

III. 2. Experimentos para análise da secreção de S100B em cultura de astrócitos

III. 2.1 Materiais

Culturas: Foram utilizadas culturas primárias de astrócitos hipocâmpais com idade entre 21 e 30 dias.

Tabela III.2: Lista de reagentes utilizados nos experimentos para análise da secreção de S100B

Reagentes	Fonte
ciclohexemida	Sigma
PDC ("L-trans pyrrolidine-2-4 dicarboxylic acid")	RBI
H89	Sigma
Rp-AMPC	RBI
Forskolina	Sigma
D-aspartato	Sigma
glutamato	Tocris
1S,3R-ACPD	Tocris
DCG IV	Tocris
L-AP4	Tocris
NMDA	Tocris
AMPA	Tocris
cainato	Sigma

Soluções utilizadas:

Meio de Cultura com 1% de SFB		Meio de Cultura sem SFB	
DMEM	1%	DMEM	1%
HEPES	8,39mM	HEPES	8,39mM
NaHCO ₃	23,8 mM	NaHCO ₃	23,8 mM
Fungizona	1%	Fungizona	1%
Garamicina	0,032%	Garamicina	0,032%
SFB	1%	SFB	--

III. 2.2 Métodos:

III.2.2.1 Experimentos para obtenção da curva de tempo de secreção de S100B

Nestes experimentos as culturas foram incubadas durante 30 minutos com DMEM sem soro ou com 1% de SFB. Após este período, o meio de cultura era trocado por um DMEM com 1% SFB e o perfil de secreção de S100B foi monitorado durante 24 horas. Foram coletadas alíquotas de 50ul nos tempos de 0,5, 1, 2, 4, 8 e 24 horas depois da troca de meio (DMEM 1%SFB).

III.2.2.2 Experimentos com glutamato e forskolina

As culturas foram incubadas como descrito anteriormente. Nos poços tratados foi adicionado 1mM de glutamato nas células estimuladas ou não pela ausência de soro, 0,1mM de glutamato ou 10uM de forskolina somente nas células estimuladas pela ausência de soro. Após esta incubação, o meio foi trocado para um DMEM com 1% de SFB e uma alíquota de 50ul foi coletada 1 hora depois.

III.2.2.3 Experimentos com ciclohexemida

As culturas foram incubadas como descrito anteriormente, sendo que nas células tratadas foi adicionado 0,5ng% de ciclohexemida durante este período de incubação e depois da troca de meio. Após 1 hora foi coletada uma amostra de 50ul para posterior análise da secreção de S100B.

III.2.2.4 Experimentos com H89 e Rp-AMPC

Para a realização destes experimentos era necessário que houvesse um volume exato (500ul) de meio dentro dos poços da placa de cultivo. Por isso, foi feita uma troca de meio, 24 horas antes, com DMEM 10% de SFB.

O H89 e Rp-AMPC foram colocados 15 minutos antes do período de incubação, ou seja, nos 500ul de DMEM 10% de SFB. O meio foi trocado e as células tratadas também receberam estes inibidores durante os 30 minutos de

incubação com meio sem soro. Após o meio foi trocado, novamente, mas para um DMEM com 1% de SFB e 1 hora depois uma alíquota de 50ul foi coletada.

III.2.2.5 Experimentos com PDC e D-aspartato

As culturas foram tratadas com 1mM de glutamato, 1mM de aspartato ou 1mM de PDC e 1mM de glutamato em meio sem soro por 30 minutos. Após a incubação o meio foi trocado para um DMEM com 1% de SFB e uma hora depois foi coletada uma alíquota de 50ul para posterior análise da secreção de S100B.

As células tratadas com PDC e glutamato foram observadas ao microscópio e submetidas ao método de exclusão por azul de Trypan para verificação de uma possível morte celular, o que não foi constatado.

III.2.2.6 Experimentos com agonistas de receptores glutamatérgicos

As culturas foram tratadas com agonistas de receptores glutamatérgicos: metabotrópicos 1S,3R-ACPD (20uM), DCG IV (1uM) ou L-AP4 (100uM); ou ionotrópicos: NMDA (100uM), AMPA (100uM) ou Cainato (100uM) durante 30 minutos em meio sem soro. Após esta incubação, o meio foi trocado para um DMEM com 1% de SFB e uma alíquota de 50ul foi coletada.

Observação: Todas as alíquotas coletadas nestes diferentes experimentos eram congeladas a -20°C, no máximo durante uma semana, até serem quantificadas pelo método de ELISA.

III.3 Quantificação da secreção de S100B pelo método de ELISA (protocolo baseado em Green et al., 1997)

III.3.1 Materiais

Tabela III.3.1: Anticorpos e placas utilizadas na quantificação de S100B

Materiais	Fonte
Anti-S100 β monoclonal (clone SH-B1)	Sigma
Anti-S100 β policlonal conjugado a peroxidase	Dako
Placas de poliestireno para ELISA (96 poços)	Nunc (maxisorp)

Tabela III.3.2: Tampões e outros reagentes utilizados no método de ELISA

Materiais	Fonte
Tampão carbonato-bicarbonato	Sigma
Tampão Barbital	Sigma
Fosfato de sódio monobásico	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	Reagen
NaCl	Merck
CaCl ₂	Merck
HCl	Merck
Albumina de soro bovino (BSA) Fração 5	INLAB
Tween 20	Sigma
Fast OPD (O-fenilenodiamina)	Sigma

Soluções utilizadas:

PBS (tampão fosfato salina, pH 7,6): tampão preparado a partir da mistura de 95ml de uma solução 0,2M de fosfato de sódio monobásico, 405ml de uma solução 0,2M de fosfato de sódio dibásico e 500ml de uma solução 0,1M de cloreto de sódio. Este tampão permanecia estável por 30 dias.

Solução de lavagem: solução composta por 0,1% de albumina de soro bovino em PBS contendo 0,05% de Tween 20.

Solução de bloqueio: consiste em uma solução 2% de albumina de soro bovino em PBS.

Tampão de incubação: solução obtida a partir da adição de CaCl₂, numa concentração final de 0,2mM, em tampão Barbital (60mM, pH 8,6).

III.3.2. Método

III.3.2.1 ELISA para S100B (Tramontina et al., 2000)

As placas utilizadas para a dosagem de S100B eram previamente incubadas com 100ul de anti-S100 β monoclonal (clone SH-B1) em tampão carbonato-bicarbonato (50mM, pH 9,5), numa diluição de 1:1000, durante 48 horas à temperatura de 7°C (câmara fria). Após este período, as placas eram lavadas por 3 vezes com 200ul de solução de lavagem e incubadas com 100ul de solução de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente. Esta etapa tinha como objetivo cobrir, com albumina, todos os sítios inespecíficos no fundo dos poços, ou seja, aqueles sítios onde não havia o anticorpo adsorvido. Evita-se, assim, que a proteína de interesse seja adsorvida no fundo do poço, o que alteraria os resultados obtidos.

Durante o período de bloqueio, as amostras eram descongeladas e diluídas, numa diluição de 1:2, com 50ul de uma solução 0,2% de albumina em PBS.

Com o término do período de bloqueio, a placa era lavada 1 vez com 200ul de solução de lavagem e estava pronta para receber as amostras. Em cada poço da placa era adicionado 50ul do tampão de incubação e 50ul de amostra. A placa de ELISA era colocada sobre uma placa aquecida a 37°C e incubada durante 3 horas.

Decorrido o período de incubação, os poços eram novamente lavados com 200ul de solução de lavagem. Eram, então, incubados com 100ul de anti-S100 β policlonal conjugado a peroxidase, numa diluição de 1:1000 em tampão de incubação, por mais 1 hora em temperatura ambiente.

A etapa final deste método consiste na incubação da placa, após todo este processo, com 200ul de um substrato da peroxidase (OPD - o-fenilenodiamina), no escuro, durante 30 minutos em temperatura ambiente. Antes desta incubação, a placa era lavada por 3 vezes com solução de lavagem e 1 vez com PBS.

Para parar e estabilizar a reação adicionava-se em cada poço 50ul de uma solução de HCl 3N. O produto da reação da peroxidase com o OPD tem uma cor amarelada. Assim, obtínhamos nossos resultados a partir da leitura da

absorbância desta cor produzida. Realizávamos estas leituras num leitor de ELISA (Tecan-modelo Spectra) em 492nm.

III.4. Quantificação do conteúdo intracelular de AMPc (Tasca et al., 1995)

III.4.1 Materiais

Tabela III.4.1: Materiais utilizados na quantificação do AMPc

Materiais	Fonte
PKA – Proteína quinase A	Sigma
[³ H] AMPc	Amersham
Tris e EDTA	Sigma
Triton	Sigma

Soluções utilizadas:

Tampão AMPc (pH 7,4): solução composta por 50mM de Tris/HCl e 4mM de EDTA.

[³H] AMPc: solução constituída de 10ul de [³H] AMPc em 20ml do tampão AMPc.

Proteína ligadora: solução composta por 1ml da solução mãe (10mg de PKA em 10ml do tampão AMPc), 160mg de albumina e 15ml do tampão AMPc.

Carvão ativado: 1,3g de carvão ativado e 1g de albumina dissolvidos em tampão AMPc.

Líquido de cintilação: composto por 2 l de tolueno, 1 l de triton (comum), 16,5g de PPO e 250mg de POPOP.

III.4.2. Método

III.4.2.1 Ensaio do AMPc

O conteúdo intracelular de AMPc foi quantificado em três momentos: imediatamente após a retirada do soro (tempo 0), 5 e 30 minutos depois e,

também, 5 minutos após a exposição ao glutamato 1mM. Após este período, as células foram lisadas com 200ul do tampão AMPc e centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. Duas alíquotas de 40ul foram retiradas do sobrenadante para a dosagem de proteínas (Lowry). Foi, então, colocado num eppendorf 50ul do mesmo sobrenadante, sobre o qual foram adicionados 50ul de [³H] AMPc e 100ul da proteína ligadora (PKA – proteína quinase A), sendo estes tubos imediatamente agitados. Os tubos foram incubados em gelo por 4 a 16 horas.

Em cada tubo parou-se a reação com a adição de 100ul de carvão ativado. Os mesmos foram imediatamente agitados e centrifugados por 2 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, foi retirada uma alíquota de 120ul do sobrenadante, sem ressuspender o carvão precipitado. Esta alíquota foi colocada em um “vial”, juntamente com 3ml de líquido de cintilação, e posteriormente, contada no cintilador.

A concentração de AMPc foi calculada subtraindo-se o valor do branco da amostra (ou a curva, sendo o valor utilizado 100%=0 pmoles) e, o valor obtido, extrapolado na curva de calibração. Estes valores foram divididos pela proteína, para fornecer o valor final da concentração de AMPc em pmol/mg de proteína.

III.5. Verificação da viabilidade celular

III.5.1 Materiais

Tabela III.5.1: Materiais utilizados na técnica de viabilidade celular

Materiais	Fonte
Azul de Tripán	Sigma
NaCl	Merck

Solução utilizada:

Solução de azul de Tripán: 1,2% de azul de tripán em 140mM de NaCl.

III.5.2. Método

III.5.2.1 Método de exclusão por azul de Tripán (Tramontina et al, 2000)

Este método foi utilizado nos experimentos com glutamato e PDC com o objetivo de verificar a integridade celular, isto porque tratamos as células com uma alta concentração destas drogas (1mM), o que poderia culminar em morte.

O azul de Tripán, por ser incapaz de atravessar a membrana plasmática intacta, somente cora os núcleos das células lisadas ou perfuradas. Assim, tornou-se amplamente utilizado em estudos que necessitam a verificação da integridade celular (Xu et al., 1999; Fuse et al., 1998).

Após o tratamento com glutamato e PDC as células recebiam 50ul da solução de azul de Tripán (concentração final no poço de 0,2%) e a placa era gentilmente agitada durante 5 a 10 segundos. Após ser agitada, a placa era levada ao microscópio de contraste de fase, onde os núcleos corados com azul de Tripán eram contados. Dois campos de 100 células eram contados em cada poço.

III.6 Análise estatística

A análise estatística de todos os resultados foi realizada através da aplicação do ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Convém salientar que, nós assumimos os valores de secreção de S100B no final da incubação de 30 minutos como sendo 100%.

IV. RESULTADOS

IV. 1. Perfil de secreção da S100B em cultura de astrócitos hipocampais

Nestes experimentos buscou-se verificar o perfil de secreção de S100B em cultura primária de astrócitos hipocampais em duas condições: DMEM sem soro ou com 1% de SFB, durante 24 horas. A redução da concentração de soro, de 10 para 1%, faz-se necessária devido à presença de S100B no SFB, o que alteraria nossos resultados.

A figura 6 demonstra o perfil de secreção nestas duas condições. Pode-se observar que já aos 30 minutos, pós-privação de soro, há uma grande secreção de S100B, a qual se mantém até 2 horas. Esta secreção é significativamente maior do que a observada em meio de cultura com 1% de SFB. A partir de 4 horas não há mais diferença na secreção desta proteína, nas condições testadas, chegando a um platô em 24 horas.

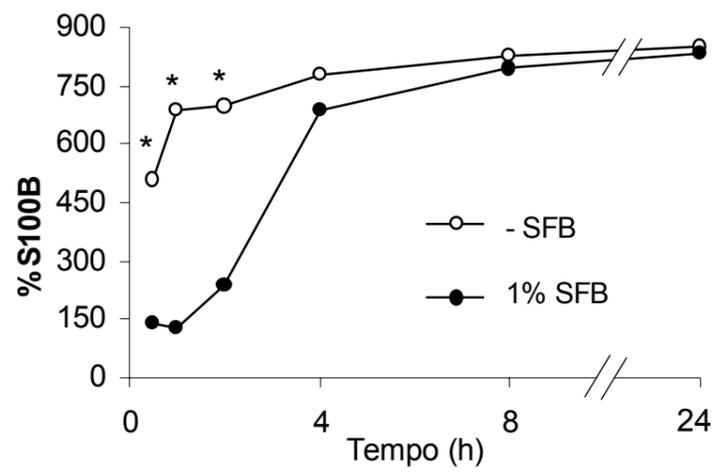


Figura 6: Curva de tempo para a secreção de S100B em cultura de astrócitos estimuladas ou não pela ausência de SFB. As células foram tratadas durante 30 minutos com DMEM sem soro ou com 1% de SFB. Após o meio foi trocado por um DMEM com 1% de SFB e a secreção de S100B foi analisada por 24 horas e quantificada pelo método de ELISA. Cada ponto representa a média de 4-7 independentes experimentos realizados em triplicatas. * $p < 0,05$.

IV.2. Efeito do glutamato sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocampais

Estes experimentos tiveram como objetivo verificar o efeito de 1mM de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos, sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos.

Pode-se observar, na figura 7, que o glutamato não teve efeito sobre a secreção basal de S100B (controle) em células incubadas com DMEM contendo 1% de SFB. Mas nas células estimuladas pela ausência de soro, o glutamato foi capaz de reduzir significativamente a secreção de S100B em torno de 46%. Este efeito do glutamato não foi observado em concentrações fisiológicas (0,1mM).

Convém salientar que, durante a incubação de 30 minutos com glutamato 1mM, as culturas foram observadas ao microscópio de contraste de fase e constatou-se que as células incharam independente da ausência ou presença de soro. Após 1 hora da retirada do glutamato, os astrócitos voltaram ao aspecto normal, confirmando resultados descritos por Gottfried (2000).

Nestes experimentos as células foram coradas com azul de Tripán para verificação da integridade celular, uma vez que se usou uma alta concentração de glutamato (1mM). Apesar disso, não foi observada alteração na viabilidade celular imediatamente e após 24h a exposição ao glutamato.

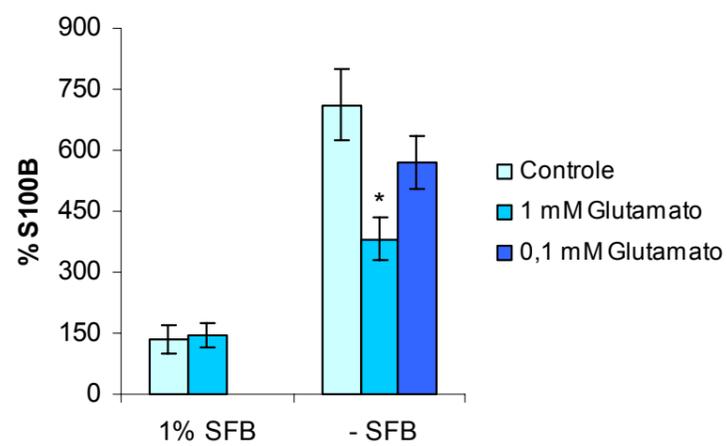


Figura 7: Efeito do glutamato sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocâmpais. Foram utilizados meios de cultura com ou sem 1% de SFB, sendo que as células tratadas receberam 1mM ou 0,1mM de glutamato durante 30 minutos. Após o meio foi trocado por um DMEM com 1% de SFB, sendo a secreção de S100B quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em triplicatas com n de 4-5. * $p < 0,01$.

IV. 3. Envolvimento da síntese protéica na secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocampais

Como foi observado na figura 6, a ausência de SFB no meio de cultivo estimulou uma alta secreção de S100B quando comparado a condições basais, ou seja, presença de soro. Logo, estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se a síntese protéica estava ou não envolvida neste aumento de secreção.

A figura 8 mostra que a secreção de S100B, na ausência de SFB, foi inibida em torno de 54% pela ciclohexemida, um inibidor de síntese protéica. O mesmo não foi observado quando as células foram tratadas com este inibidor, mas na presença de 1% de SFB.

Estes resultados demonstram que parte deste aumento de secreção dá-se por síntese da proteína S100B ou de alguma proteína envolvida na secreção de S100B. Entretanto, não só este mecanismo celular está envolvido, visto que a inibição não reduziu a secreção a níveis basais.

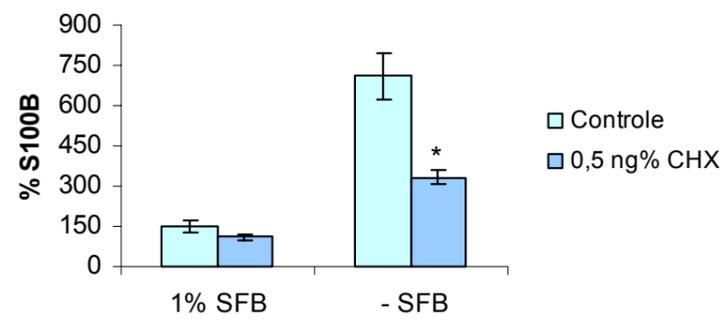


Figura 8: Efeito da ciclohexemida sobre a secreção de S100B em cultura de astrócitos hipocâmpais. As células foram tratadas com 0,5 ng% de CHX, durante e após o período de incubação, em meio de cultura com ou sem 1% de SFB. Após o período de incubação de 30 minutos o meio foi trocado por um DMEM com 1% de SFB e a secreção de S100B foi quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em triplicatas com n de 3-4. * $p < 0,05$.

IV.4. Envolvimento da via de transdução AMPc/PKA no mecanismo de secreção da S100B em cultura de astrócitos hipocampais

Alguns estudos têm demonstrado que a expressão da proteína S100B é dependente de AMPc, um importante sinalizador intracelular. Com base nestes estudos, investigamos o envolvimento da via de transdução de sinal AMPc/PKA no mecanismo de secreção desta proteína em astrócitos estimulados pela ausência de soro, bem como quantificamos o conteúdo intracelular do AMPc nestas células.

Nestes experimentos, obteve-se um aumento transitório no conteúdo intracelular de AMPc 5 minutos após a retirada do soro, sendo este aumento parcialmente inibido pela presença de 1mM de glutamato (figura 9A). Após 30 minutos, os níveis intracelulares desta molécula voltaram aos níveis basais (controle).

A figura 9B mostra o efeito de inibidores desta via de transdução sobre a secreção da proteína S100B. Pode-se observar que o antagonista do AMPc, Rp-AMPc, foi capaz de reduzir a secreção em 62%, enquanto que o H89, inibidor específico da PKA, em 76%.

Estes dados sugerem que a via de transdução de sinal AMPc/PKA exerce um importante papel no aumento da secreção da proteína S100B em astrócitos estimulados pela ausência de soro. Para reforçar estes dados, foram realizados experimentos com forskolina, um potente ativador da adenilato ciclase, enzima esta responsável por aumentar o conteúdo intracelular de AMPc.

Na figura 10, pode-se observar que a forskolina também foi capaz de aumentar a secreção de S100B, sendo este aumento revertido pelo H89. Além disso, esta figura também mostra que o efeito produzido pelo glutamato nestas condições, ou seja, uma redução da secreção de S100B, não foi aditivo ao efeito do H89.

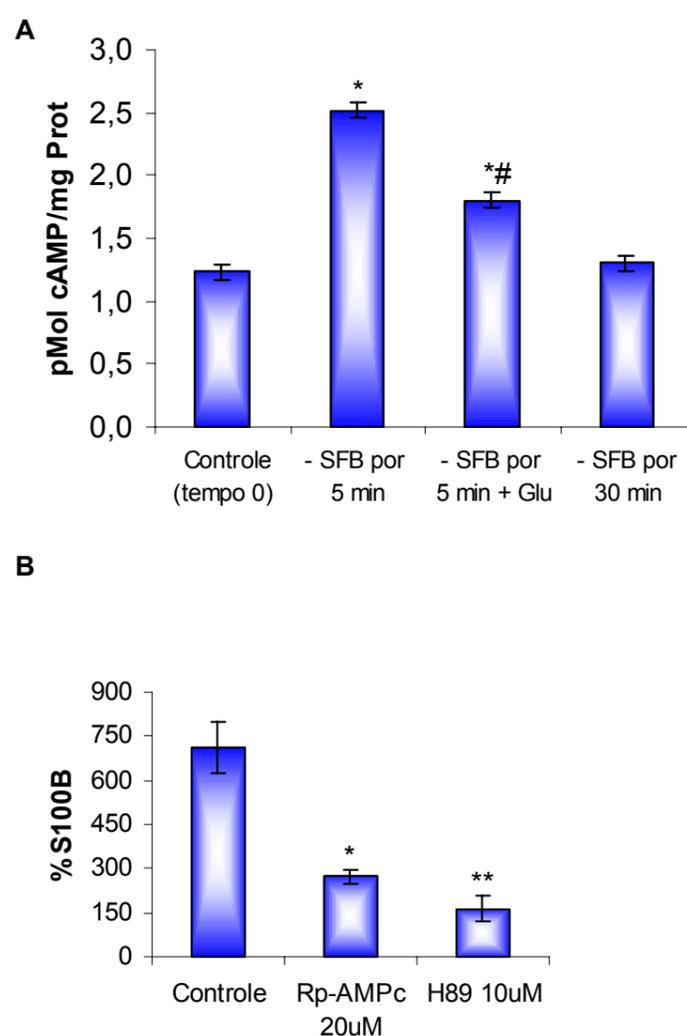


Figura 9: Envolvimento da via de transdução AMPc/PKA no mecanismo de secreção da proteína S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB. (A) O conteúdo intracelular de AMPc foi quantificado nos tempos 0 (controle), 5 e 30 minutos após a retirada do SFB e, também, 5 minutos após a exposição ao glutamato 1 mM em meio sem soro. **(B)** As células foram estimuladas pela ausência de soro e/ou tratadas com Rp-AMPC (20 uM) ou H89 (10 uM) 15 minutos antes e durante os 30 minutos de incubação em meio sem soro. Após o meio foi trocado por um DMEM com 1% de SFB e a secreção de S100B foi quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em triplicatas com n de 3-4. O conteúdo intracelular de AMPc foi diferente do controle em 5 minutos após a retirada do SFB (* $p < 0,05$) e este conteúdo foi diferente de 5 minutos em 5 min+Glu (# $p < 0,05$). A inibição da secreção de S100B foi diferente do controle nas células tratadas com Rp-AMPC (* $p < 0,05$) e com H89 (** $p < 0,01$).

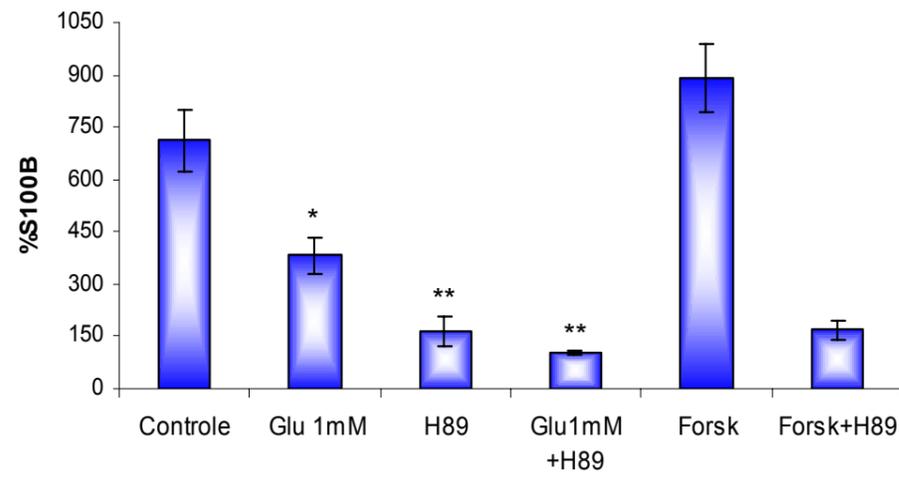


Figura 10: Avaliação do envolvimento da via de transdução de sinal AMPc/PKA sobre o efeito do glutamato no mecanismo de secreção da proteína S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB. As células foram estimuladas pela ausência de soro (controle) e/ou tratadas com 1mM de glutamato ou 10uM de forskolina (Forsk) durante o período de incubação de 30 minutos em DMEM sem soro, e com 10 uM de H89 15 minutos antes e durante este período de incubação. Após o meio foi trocado por um DMEM com 1% de SFB e a secreção de S100B foi quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em triplicatas com n de 3-6. A inibição da secreção de S100B foi diferente do controle nas células tratadas com glutamato (* $p < 0,05$) e com H89 e Glu+H89 (** $p < 0,001$).

IV.5. Avaliação do mecanismo celular envolvido na redução da secreção de S100B induzida pelo glutamato em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB

Baseando-se nos dados da figura 10, onde mostra que o glutamato e o H89 não apresentaram um efeito aditivo, foram realizados experimentos com o objetivo de investigar qual o mecanismo utilizado pelo glutamato na redução da secreção da proteína S100B em cultura de astrócitos estimulados pela ausência de SFB.

IV.5.1 Análise do envolvimento do mecanismo de transporte de glutamato na secreção de S100B em astrócitos estimulados pela ausência de soro

Analisando-se a figura 11, verifica-se que o PDC foi capaz de bloquear o efeito do glutamato sobre a secreção de S100B, demonstrando que o mecanismo de transporte está envolvido na ação do glutamato. Convém salientar que, durante estes experimentos, as células foram coradas com azul de Tripán para verificação da viabilidade celular, a qual não teve alteração.

Foram também realizados experimentos com o D-aspartato, outro aminoácido excitatório, que pode ser captado pelo mesmo transportador de glutamato. Este aminoácido não foi capaz de mimetizar o efeito do glutamato sobre a secreção de S100B (figura 11). Logo, estes dados sugerem que a redução da secreção de S100B induzida pelo glutamato não é causada somente pela sua captação, mas por alguma sinalização intracelular induzida por este aminoácido.

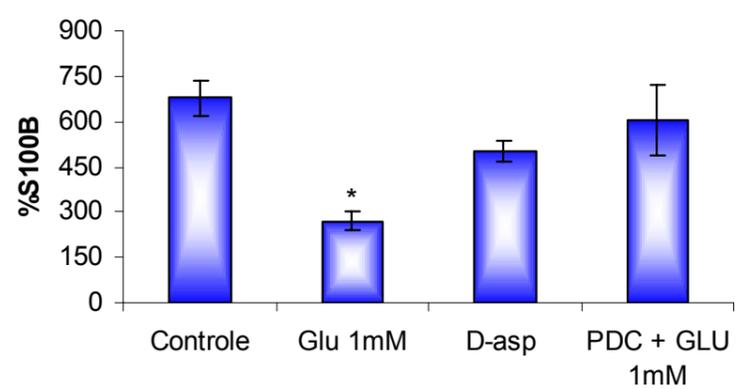


Figura 11: Avaliação do envolvimento do mecanismo de transporte de glutamato na secreção de S100B em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB. As células foram estimuladas pela ausência de soro (controle) e/ou tratadas com 1mM de glutamato, 1mM de D-aspartato ou 1mM de PDC e de glutamato durante o período de incubação de 30 minutos em DMEM sem soro. Após o meio foi trocado por um DMEM com 1% de SFB e a secreção de S100B foi quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam as médias \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em quadruplicatas com n de 4-6. A inibição da secreção de S100B foi diferente do controle nas células tratadas com glutamato (* $p < 0,001$).

IV.5.2 Análise do envolvimento dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos na secreção da S100B em cultura de astrócitos estimuladas pela ausência de SFB

A figura 12 mostra o efeito dos agonistas glutamatérgicos metabotrópicos sobre a secreção de S100B. Observa-se que o DCG-IV e o L-AP4 não mimetizaram o efeito induzido pelo glutamato. Mas o agonista 1S,3R-ACPD foi capaz de reduzir a secreção de S100B, sugerindo que, além do transporte, receptores glutamatérgicos metabotrópicos do Grupo I também podem estar envolvidos neste mecanismo.

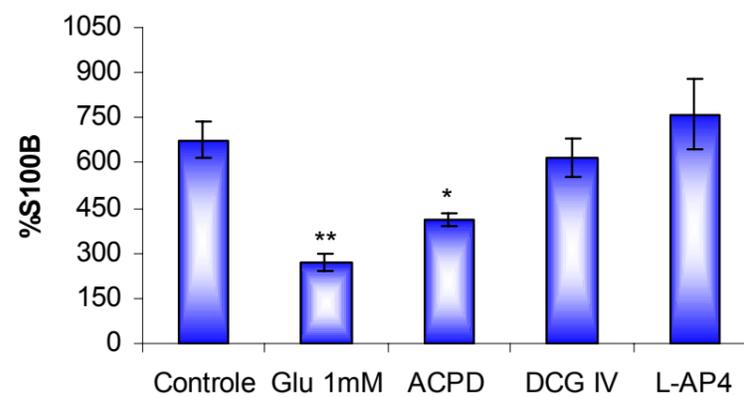


Figura 12: Avaliação do envolvimento dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos na secreção de S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB. As células foram estimuladas pela ausência de soro (controle) e/ou tratadas com 1mM de glutamato ou agonistas de receptores glutamatérgicos metabotrópicos: 1S, 3R-ACPD (20uM), DCG IV (1uM), L-AP4 (100uM) durante o período de incubação de 30 minutos. Após o meio foi trocado por um DMEM contendo 1% de SFB e a secreção de S100B foi quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em quadruplicatas com n de 4-6. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

IV.5.3 Análise do envolvimento dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos na secreção de S100B em cultura de astrócitos estimulados pela ausência de SFB

Nestes experimentos, buscou-se avaliar o envolvimento de receptores glutamatérgico ionotrópicos na redução da secreção de S100B, induzida pelo glutamato em astrócitos estimulados pela ausência de soro.

Nenhum dos três agonistas testados (NMDA, AMPA e cainato) foram capazes de mimetizar o efeito induzido pelo glutamato sobre a secreção de S100B nestas células. Entretanto, o cainato aumentou a secreção desta proteína (figura 13).

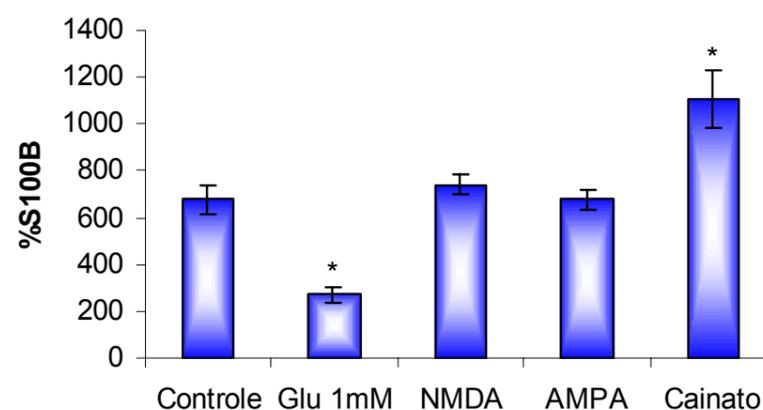


Figura 13: Avaliação do envolvimento dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos na secreção de S100B em astrócitos estimulados pela ausência de SFB. As células foram estimuladas pela ausência de soro (controle) e/ou tratadas com 1mM de glutamato ou agonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos: NMDA (100uM), AMPA (100uM), cainato (100uM) durante o período de incubação de 30 minutos. Após o meio foi trocado por um DMEM contendo 1% de SFB e a secreção de S100B foi quantificada 1 hora depois desta troca pelo método de ELISA. Os valores representam a média \pm erro padrão de independentes experimentos feitos em quadruplicatas com n de 4-6.* $p < 0,01$.

V. DISCUSSÃO

O glutamato é o neurotransmissor mais abundante na comunicação sináptica e seu aumento na fenda sináptica pode estar envolvido em diversas neuropatologias. Os astrócitos têm um papel fundamental na remoção do excesso de glutamato na fenda, bem como na secreção de fatores tróficos (incluindo a proteína S100B) que podem evitar ou atenuar uma situação de injúria.

Tal afirmação tem por base dois trabalhos na literatura: (i) Ciccarelli et al. 1999 sugerem que S100B pode ser liberada de astrócitos corticais em cultura pela estimulação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do subtipo 3; (ii) Ahlemeyer et al. 2000 mostram que S100B pode aumentar a sobrevivência de neurônios expostos a altas concentrações de glutamato. Entretanto, a secreção de S100B em astrócitos expostos a uma alta concentração de glutamato não havia sido demonstrada. Este foi o propósito desta investigação, usando astrócitos hipocámpais já que o hipocampo é uma estrutura bastante afetada por lesões excitotóxicas.

Injúrias induzidas em culturas de células neuronais, incluindo a superativação por glutamato, é comumente realizada em condições de privação de soro, condição esta que sozinha é capaz de induzir um certo grau de dano celular (Atabay et al., 1996; Xu et al., 2001). Além disso, astrócitos em cultivo, de diferentes regiões cerebrais, privados de soro apresentam um aumento no conteúdo intracelular e na secreção de S100B (Pinto et al., 2000). Estes trabalhos demonstram que remover o soro do meio de cultivo altera de forma significativa a resposta celular, incluindo a secreção de S100B.

O fato de que a proteína S100B apresenta funções extracelulares, como estimular a extensão dos neuritos (Kligman, 1985) ou a proliferação de astrócitos e células de glioma C6 (Selinfreund et al., 1991), aumentou o interesse dos pesquisadores em buscar os fatores que induzem a secreção desta proteína para o meio extracelular demonstrando, assim, que a presença da S100B fora da célula não era somente resultante de morte celular. Diversos trabalhos na literatura, com este objetivo, demonstram o efeito de importantes moléculas sinalizadoras, como nucleotídeos cíclicos (AMPc, GMPc) e neurotransmissores (DCG-IV, um agonista de receptor glutamatérgico metabotrópico), estimulando a secreção de S100B,

estímulo este que pode ser revertido por Ca^{2+} ou antagonistas (Susuki et al., 1987; Ciccarelli et al., 1999).

Em nosso trabalho investigamos a secreção da proteína S100B em cultura primária de astrócitos hipocâmpais em duas condições: meio com e sem soro. Já aos 30 minutos observamos que as células privadas de soro apresentaram uma secreção de S100B maior comparada com as células que permaneceram com 1% de soro. Após 4 horas não há mais diferença na secreção desta proteína entre as condições testadas, chegando a um platô em 24 horas. A análise deste perfil foi monitorada através de um corante (azul de Trypan), o qual cora o núcleo de células que apresentam danos em suas membranas. Estes resultados demonstram que o simples fato das células permanecerem por algum tempo sem soro, o que é utilizado em muitas técnicas, pode alterar de forma significativa a sinalização celular. Assim, realizamos alguns experimentos com o objetivo de analisar algumas vias de sinalização as quais poderiam estar envolvidas com a secreção da nossa proteína de interesse, a S100B.

Tem sido estabelecido para o gene da S100B de seres humanos um elemento resposta para o AMPc (Allore et al., 1990). Alguns trabalhos mostram que um aumento na concentração deste mensageiro intracelular parece regular a expressão de S100B em células de glioma C6 de rato (Labourdette e Mandel, 1980; Higashida et al., 1985) e astrócitos (Pinto et al., 2000), desta forma indicam que o AMPc também pode estar regulando o gene da S100B nestas células. Nós demonstramos que um aumento na expressão de S100B induzida pela privação de soro ou forskolina é acompanhada por um aumento da sua secreção (Pinto et al., 2000). Além disso, existem evidências de que esta alteração na expressão de S100B induzidas pela privação de soro e pelo aumento da concentração de AMPc causam algumas respostas similares em astrócitos, como por exemplo, sobre a expressão da beta-actina (Ferrier et al., 1994) ou em outras células, sobre a expressão da CamKII em linhagens de células catecolaminérgicas de cérebro de ratos (Donai et al., 2000).

Com base nestes dados, nós propomos que a privação de soro estaria desencadeando um aumento na concentração intracelular de AMPc em astrócitos e isto estaria medeando a expressão de S100B e outras respostas. Para corroborar com esta hipótese, nós verificamos, através de nossos estudos, um aumento transitório na concentração intracelular de AMPc após a remoção de

soro, bem como na presença de forskolina, em astrócitos cultivados. Além disso, demonstramos que a secreção de S100B induzida pela privação de soro foi parcialmente inibida por cicloheximida, um inibidor de síntese protéica. Ainda para fortalecer esta hipótese, verificamos que o Rp-AMPC (um antagonista geral de AMPc) e o H-89 (um inibidor de PKA) foram capazes de diminuir a secreção de S100B induzida pela privação de soro. Isto sugere que no processo de secreção desta proteína em astrócitos hipocámpais há nova síntese de S100B ou de algum fator requerido para sua secreção, os quais podem estar envolvendo a via de transdução AMPc/PKA.

Pouco é conhecido a cerca do mecanismo através do qual a S100B é secretada (Rammes et al., 1997). Durante os experimentos, nós observamos que os astrócitos incharam ao serem tratados com 1mM de glutamato por 30 minutos, mas, apesar disso, a S100B não teve sua secreção aumentada nesse período. Isto poderia estar indicando que a secreção de S100B não envolve exocitose, uma vez que as proteínas secretadas por este mecanismo têm sua secreção aumentada durante o inchamento de células (Lang et al., 1998). De acordo com isto, nem a proteína S100B nem outra proteína S100 apresentam uma seqüência determinada do peptídeo sinal para a via clássica de secreção ER/Golgi (Rammes et al., 1997), sendo possível que esta proteína seja liberada pela glia por mecanismos semelhantes ao de outros fatores, como FGF, IL-1 e EGF (Barger et al., 1992). Há a possibilidade, também, do envolvimento de Ca^{2+} e lipídios de membrana, neste mecanismo de secreção, uma vez que a S100B interage com lipídios na presença de Ca^{2+} e muda as propriedades estruturais da bicamada lipídica (Zolese et al., 1988; Barger et al., 1992).

Independentemente do mecanismo de secreção, após morte celular ou por ativação de um processo de secreção, tem sido proposto que a proteína S100B extracelular em concentrações nanomolares pode proteger neurônios hipocámpais contra lesões induzidas por glutamato em meio livre de soro (Ahlemeyer et al., 2000). Apesar deste possível efeito neuroprotetor da S100B, nossos resultados sugerem que altas concentrações de glutamato diminuem a secreção de S100B induzida pela privação de soro em astrócitos hipocámpais. Esse efeito poderia estar sendo medeado por receptores e/ou transportadores de glutamato.

Visando investigar qual mecanismo estaria envolvido na inibição da secreção de S100B induzida por glutamato foram realizados experimentos com agonistas de receptores glutamatérgicos, com inibidores de captação de glutamato e, também, uma dosagem do conteúdo intracelular de AMPc em astrócitos tratados com 1mM de glutamato.

Os estudos feitos com glutamato sobre a dosagem intracelular de AMPc demonstraram uma redução parcial na concentração deste mensageiro intracelular após 5 minutos da retirada do soro, o que indica o envolvimento deste na inibição da secreção de S100B em células privadas de soro. Entretanto, glutamato e H89 não apresentaram um efeito aditivo, sugerindo a possibilidade de uma via comum.

Foram testados agonistas glutamatérgicos tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos. Isoladamente, somente o 1S,3R-ACPD, um agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópico do Grupo I e II, foi capaz de causar uma redução da secreção de S100B. Esse efeito poderia reforçar o possível papel destes receptores na neuroproteção em uma situação excitotóxica hipocampal.

Nos experimentos com DCG-IV não observamos nem um aumento (em presença de soro) nem uma diminuição (na ausência de soro) da secreção de S100B. Esta divergência, entre os nossos dados e os de Ciccarelli et al. (1999), pode ser devido à heterogeneidade regional dos astrócitos (Xu et al., 2001) ou diferentes condições de cultivo celular. Nossos resultados sugerem que a diminuição causada pelo glutamato não envolve a ativação do mGluR3 (Grupo II), apesar deste receptor estar envolvido na síntese do AMPc e, provavelmente, em fenômenos de neuroproteção (Bruno et al., 1998). Entretanto, o estudo realizado isoladamente com DCG-IV deve ser analisado com cautela e não pode ser comparado com estudos realizados com o glutamato, onde mais de um receptor pode ser ativado e a resposta final vem da interação entre eles.

O NMDA um agonista freqüentemente envolvido na ativação de receptores ionotrópicos em lesões excitotóxicas não causou nenhum efeito. Por outro lado, o cainato, surpreendentemente, causou um aumento na secreção de S100B. Tal fato reforça a desconfiança dos efeitos obtidos com agonistas isoladamente.

Por outro lado, o efeito do glutamato sobre a secreção de S100B poderia envolver, além de receptores, o transporte de glutamato. Uma evidência que aponta esta possibilidade é o fato que o PDC, um inibidor do transporte de

glutamato, bloqueou o efeito causado pelo glutamato. Entretanto, usando o D-aspartato que compete com o glutamato pela entrada não foi capaz de causar esse bloqueio. Isto exige um estudo mais detalhado, mas poderia sugerir que o efeito depende da entrada e de mais alguma etapa "interna" desencadeada somente pelo glutamato.

Em suma, independentemente do mecanismo que o glutamato causa a redução da liberação de S100B em astrócitos hipocâmpais, parece que o processo depende parcialmente de síntese protéica e envolve uma via dependente de AMPc/PKA. Os dados sugerem que o suposto papel neurotrófico da S100B, pelo menos na ausência de soro, poderia estar sendo prejudicada por altas concentrações de glutamato.

VI. CONCLUSÕES

- ✓ A secreção da proteína S100B em cultura primária de astrócitos privadas de soro é significativamente maior em relação às células que permaneceram com SFB durante todo o período de observação (24 horas). Foi observado um pico em 2 horas e, após 4 horas, não há mais diferença na secreção de S100B nas duas condições testadas.
- ✓ O glutamato 1mM diminuiu a secreção de S100B em células estimuladas pela ausência de soro, mas o mesmo não foi observado nas células que foram incubadas com 1% de SFB. Em concentrações fisiológicas (0,1mM), o glutamato não induz o mesmo efeito.
- ✓ A cicloheximida inibiu em torno de 54% a secreção de S100B nas células privadas de soro, mas não foi capaz de inibir a secreção desta proteína nas células com 1% de SFB.
- ✓ O conteúdo intracelular de AMPc foi 2 vezes maior, após 5 minutos de privação de soro, do que os níveis observados no tempo 0. Aos 30 minutos o conteúdo intracelular desta molécula volta aos níveis basais. O glutamato 1mM reduziu em torno de 28% o conteúdo de AMPc obtido após 5 minutos de privação de soro.
- ✓ O antagonista de AMPc, Rp-AMPC, reduziu a secreção de S100B em 62%, enquanto que o H89, inibidor específico da PKA, em 76%. A forskolina, um ativador da adenilato ciclase, aumentou a secreção de S100B nestas células, sendo este efeito revertido pelo H89, o que está de acordo com dados prévios obtidos em nosso laboratório (Pinto et al., 2000).
- ✓ O efeito inibitório do glutamato 1mM sobre a secreção de S100B, em cultura de astrócitos privados de soro, não foi aditivo ao efeito do H89.
- ✓ O PDC, um inibidor do transporte de glutamato, foi capaz de bloquear o efeito de 1mM de glutamato sobre a secreção de S100B em cultura de

astrócitos hipocampais privados de soro. Entretanto, o D-aspartato, que também pode ser captado por este transportador, não mimetizou o efeito inibitório do glutamato sobre a secreção de S100B.

- ✓ O DCGIV e o L-AP4 não mimetizaram o efeito do glutamato 1mM, mas o agonista de Grupo I, 1S,3R-ACPD, reduziu parcialmente a secreção de S100B em cultura de astrócitos privados de soro, comparado ao efeito do glutamato.

- ✓ O NMDA, AMPA e cainato não mimetizaram o efeito do glutamato 1mM sobre a secreção de S100B. Todavia, o cainato aumentou a secreção desta proteína em cultura de astrócitos hipocampais privados de soro.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AHLEMEYER B., BEIER H., SEMKOVA I., SCHAPER C. and KRIEGLSTEIN J. S-100 β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT_{1A}-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Research*, 858:121-128, 2000.
- ALLORE R.J., FRIEND W.C., O'HANLON D., NEILSON K.M. and BAUMAL R. Cloning and expression of the human S100 beta gene. *J Biol Chem.*, 265(26):15537-15543, 1990.
- ARRIZA J.L., ELIASOF S., KAVANAUGH M.P. and AMARA S.G. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:4155-4160, 1997.
- ATABAY C., CAGNOLI C.M., KHARLAMOV E., IKONOMOVIC M.D. and MANEV H. Removal of serum from primary cultures of cerebellar granule neurons induces oxidative stress and DNA fragmentation: protection with antioxidants and glutamate receptor antagonists. *J Neurosci Res*, 43(4):465-475, 1996.
- AZMITIA E.C. and DOLAN K. WHITAKER-AZMITIA P.M. S-100 β but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a serotonergic growth factor. *Brain Res.*, 516:354-356, 1990.
- BALAZS R., MILLER S., ROMANO C., DE VRIES A., CHUN Y. and COTMAN C.W. Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation. *J. Neurochem.*, 69(1):151-163, 1997.
- BANKER G.A., GOSLIN K. Primary dissociated cell cultures of neural tissue. *In Culturing Nerve Cells*, edited by Banker G., Goslin K., The Mit Press, London, cap. 3, 1982.
- BARGER S.W., WOLCHOK S.R. and VAN ELDIK L.J. Disulfide-linked S100 β dimers and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1160:105-112, 1992.
- BARGER S.W., VAN ELDIK L.J. and MATTSON M.P. S100 β protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res.*, 677:167-170, 1995.
- BARRES B.A. Glial ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*, 1:354-359, 1991.
- BROWN D.R. Neurons depend on astrocytes in a coculture system for protection from glutamate toxicity. *Mol. Cell. Neurosci.*, 13(5):379-389, 1998.
- BRUNO V., BATTAGLIA G., CASABONA G., COPANI A., CAIAGLI F. and NICOLETTI F. Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is

- mediated by transforming growth factor-beta. *J Neurosci.*, 18(23):9594-9600, 1998.
- CADAY C.G., KLAGSBRUN M., FANNING P.J., MIRZABEGIAN A. and FINKLESTEIN S.P. Fibroblast growth factor (FGF) levels in the developing rat brain. *Dev. Brain Res.*, 52:241-246, 1990.
- CICCARELLI R., DI IORIO P., BRUNO V., BATTAGLIA G., D'ALIMONTE I., D'ONOFRIO M., NICOLETTI F. and CACIAGLIA F. Activation of A₁ adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100 β protein from cultured astrocytes. *Glia*, 27:275-281, 1999.
- CLAPHAM D.E. Calcium Signaling. *Cell*, 80:168-259, 1995.
- COLLINGRIDGE G.L. and WATKINS J.C. The NMDA receptor, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, p.1-30, 1994.
- CONN P.J. and PIN J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37:205-237, 1997.
- COTMAN C.W., KAHLE J.S., MILLER S.E, ULAS J. and BRIDGES R.J. Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacology*, 7:75-85, 1995.
- DOMERCQ M. and MATUTE C. Expression of glutamate transporters in the adult bovine corpus callosum. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 20; 67(2):296-302, 1999.
- DONATO R. Perspectives in S100 protein biology. *Cell Calcium*, 12:713-726, 1991.
- DONATO R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1450:191-231, 1999.
- DONATO R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33:637-668, 2001.
- DONAI H., NAKAMURA M., SOGAWA Y., WANG J.K., URUSHIHARA M. and YAMAUCHI T. Involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neurite outgrowth induced by cAMP treatment and serum deprivation in a central nervous system cell line, CAD derived from rat brain. *Neurosci Lett.*, 293(2):111-114, 2000.
- DUAN S., ANDERSON C.M., STEIN B.A. and SWANSON R.A. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J. Neurosci.*, 19:10193-10200, 1999.
- ENG L.F. and GHIRNIKAR R.S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology*, 4:229-237.

- FANÓ G., MARIGGIÓ M.A., ANGELELLA P., NICOLETTI I., ANTONICA A., FULLE S. and CALISSANO P. The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death PC12 cells. *Neuroscience*, 53(4):919-925, 1993.
- FERRIER R., HAD L., RABIE A. and FAIVRE-SARRAILH C. Coordinated expression of five tropomyosin isoforms and beta-actin in astrocytes treated with dibutyryl cAMP and cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton*, 28(4):303-316, 1994.
- FUSE T., YOON K.W, KATO T., YAMADA K. Heat induced apoptosis in human glioblastoma cell line A172. *Neurosurgery*, 42(4):843-849, 1998.
- GEGELASHVILI G., DANBOLT N.C. and SCHOUSBOE A. Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J. Neurochem.*, 69(6):2612-2615, 1997.
- GONÇALVES D.S., LENZ G., KARL J., GONÇALVES C.A. and RODNIGHT R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *NeuroReport*, 11:807-809, 2000.
- GOTTFRIED C. Dissociação celular e cultura de astrócitos de hipocampo: padronização metodológica e análise eletroforética do perfil fosfoprotéico. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, 1996.
- GOTTFRIED C. Cultura de astrócitos hipocámpais: perfil fosfoprotéico e análise morfológica. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, 2000.
- GOTTLIEB M. and MATUTE C. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampo CA1 area following transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17:290-300, 1997.
- GREEN A.J.E., KEIR G., THOMPSON E.J. A specific and sensitive ELISA for measuring S-100B in cerebrospinal fluid. *J. Immunol. Methods*, 205:35-41, 1997.
- GRIFFIN W.S.T., STANLEY L.C., LING C., WHITE L., McLEOD W., PERROT L.J., WHITE III C.L. and ARAOZ C. Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Downs' syndrome and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7611-7615, 1989.
- GRIFFIN W.S., SHENG J.G., ROYSTON M.C., GENTLEMAN S.M., MCKENZIE J.E., GRAHAM D.I., ROBERTS G.W., MRAK R.E. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potencial role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol*, 8:65-72, 1998.
- GRIFFITHS R., DUNLOP J., GORMAN A., SENIOR J. and GRIEVE A. L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate and cis-1-aminocyclobutane-1,3-dicarboxylate

behave as transportable, competitive inhibitors of the high-affinity glutamate transporters. *Biochem. Pharmacol.*, 20;47(2):267-274, 1994.

HANSSON E., BLOMSTRAND F., KHATIBI S., OLSSON T. and RONNBACK L. Glutamate induced astroglial swelling-methods and mechanisms. *Acta Neuroch Suppl.*, 70:148-151,1997.

HAMPRECHT B. and DRINGEN R. Energy metabolism. In *Neuroglia*, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, p.473-487, 1995.

HATTEN M.E. and MASON C.A. Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*, 15;46(9):907-916, 1990.

HIGASHIDA H., SANO M. and SATO K. Forskolin induction of S-100 protein in glioma and hybrid cells. *J. Cell. Physiol.*, 122:39-44, 1985.

HINKLE D.A., HARNEY J.P., CAI A., HILT D.C., YAROWSKY P.J. and WISE P.M. Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 β regulated S100 β expression in cultured astrocytes. *Neuroscience*, 82:33-41, 1998.

HODGKIN A.L. and HUXLEY A. F. A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol*, 117:500-544, 1952.

HOF P.R., TRAPP B.D., DE VELLIS J., CLAUDIO L. and COLMAN D.R. The cellular components of nervous tissue. In *Fundamental Neuroscience*. Ed. por Zigmond, Bloom, Landis, Roberts e Squire, Academic Press, Páginas 41-70, 1999.

HU J., CASTETS F., GUEVARA J.L. and VAN ELDIK L.J. S100 β stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 271:2543-2547, 1996.

HU J., FERREIRA A. and VAN ELDIK L.J. S100 β induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J. Neurochem.*, 69:2294-2301, 1997.

HUNTER K.E. and HATTEN M.E. Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirecional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc. of National Academy of Science USA*, 14;92(6):2061-2065,1995.

HUTTUNEN H.J., FAGES C. and RAUVALA H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NFkappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 274:19919-19924, 1999.

HUTTUNEN H.J., KUJA-PANULA J., SORCI G., AGNELETTI A.L., DONATO R. and RAUVALA H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by

- amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *J. Biol. Chem.*, 275:40096-40105, 2000.
- ISAACSON J.S. and NICOLL R.A. The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 70(5):2187-2191, 1993.
- IWASAKI Y., SHIOJIMA T. and KINOSHITA M. S100 β prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. *J. Neurol. Sci.*, 151:7-12, 1997.
- KEMLER K., OZAWA M., RINGWALD M. Calcium dependent cell adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 1(5):892-897, 1989.
- KIMELBERG H.K. and KATZ D.M. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science*, 228:889-891.
- KIMELBERG H.K. and NOREMBERG M.D. Astrocytes. *Scientific American*, 260:66-76, 1989.
- KLIGMAN D. and MARSHAK D.R. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:7136-7139, 1985.
- LABOURDETTE G. and MANDEL P. Effect of norepinephrine and dibutyryl cyclic AMP on S-100 protein level in C6 glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96:1702-1709, 1980.
- LAMING P.R., KIMELBERG H., ROBINSON S., SALM A., HAWRYLAK N., MÜLLER C., ROOTS B. and NG K. Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24:295-340, 2000.
- LANG F., BUSCH G.L., RITTER M., VOLKL H., WALDEGGER S., GULBINS E and HAUSSINGER D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.*, 78(1):247-306, 1998.
- LAW R.O. Volume regulation and the efflux of amino acids from cells in incubated slices of rat cerebral cortex. II Dependence on Ca²⁺ ions. *Biochem. Biophys. Acta*, 1314:43-48, 1996.
- LU B., YOKOYAMA M., DREYFUS C.F. and BLACK I.B. NGF gene expression in actively growing brain glia. *Neuroscience*, 11:318-326, 1991.
- MANTHORPE M., RUDGE J.S. and VARON S. Astroglial cell contributions to neuronal survival and neuritic growth. In "Astrocytes", Vol.3 (S. Fedoroff and A. Vernadakis, eds.), pp. 315-360. Academic Press, Orlando, Florida, 1986.
- MARSHAK D.R. S100 beta as a neurotropic factor. *Prog. Brain Res.*, 86:169-181, 1990.

- McDONALD J. and JOHNSTON M.V. Physiological and patophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Progress Neurobiology*, 28:197-276, 1990.
- MINEFF E. and VALTSCHANOFF J. Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci. Lett.*, 270(2):95-98, 1999.
- MIYAMOTO Y. and DEL MONTE M.A. Na(+)- dependent glutamate transporter in human retinal pigment epithelial cells. *Ivest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35(10):3589-3598, 1994.
- MOORE B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19:739-744, 1965.
- NAKANISHI S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. *Science*, 258:597-603, 1992.
- NEWMAN E.A. Glial cell regulation of extracellular potassium. In *Neuroglia*, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, p.717-731, 1995.
- NISHIKAWA T., LEE I.S.M., SHIRAISHI N., ISHIKAWA T., OHTA Y. and NISHIKIMI. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J. Biol. Chem.*, 272:23037-23041, 1997.
- NIU H., HINKLE P.M. and WISE P.M. Dexamethasone regulates basic fibroblast growth factor, nerve growth factor and S100 β expression in cultured hippocampal astrocytes. *Mol. Brain Res.*, 51:97-105, 1997.
- PEÑA L.A., BRECHER C.W. and MARSHAK D.R. β -Amylod regulates gene expression of glial trophic substance S100 β in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Mol. Brain Res.*, 34:118-126, 1995.
- PIN J.P. and DUVOISIN R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34(1):1-26, 1995.
- PINTO S.S., GOTTFRIED C., MENDEZ A., GONÇALVES D., KARL J., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S. and RODNIGHT R. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte culture from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters*, 486:203-207, 2000.
- POPE A. Neuroglia: quantitative aspects. In *Dynamic Properties of glia cells*, edited by Schoffeniels E., Franck G., Hertz I. and Tower D.B., Pergamond, London, p.13-20, 1978.
- RAINE C. Neurocellular anatomy. In *Basic Neurochemistry*, edited by George J. Siegel, Bernard W. Agranoff, R. Wayne Albers, Perry B. Molinoff, Raven Press, New York, p. 3-32, 1994.

- RAINE C. Neurocellular anatomy. In *Basic Neurochemistry*, edited by George J. Siegel, Bernard W. Agranoff, R. Wayne Albers, Perry B. Molinoff, Raven Press, New York, p. 3-32, 1998.
- RAMMES A., ROTH J., GOEBELER M., KLEMP M., HARTMANN M. and SORG C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem.*, 272(14):9496-9502, 1997.
- ROBERTSON R.T., ZIMMER J., GÄHWILER B.H. Dissection procedures for preparation of slice cultures. In *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*, edited by Abraham Shaha, Jean de Vellis, Antonia Vernadakis, Bernard Haber, Alan R. Liss, Inc., New York, p. 1-15, 1989.
- SCOTTO C., MÉLY Y., OHSHIMA H., GARIN J., COCHET C., CHAMBAZ E. and BAUDIER J. Cysteine oxidation in the mitogenic S100B protein leads to changes in phosphorylation by catalytic CKII- α subunit. *J. Biol. Chem.*, 273:3901-3908, 1998.
- SCOTTO C., DELOUME J.C., ROUSSEAU D., CHAMBAZ E. and BAUDIER J. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth, arrest and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7):4272-4281, 1998.
- SCHULTZ K. and STELL WK. Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci. Lett.*, 28; 211(3):191-194, 1996.
- SCHWARTZ J.P. and MISHLER K. Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Molecular Neurobiology*, 10:447-457, 1990.
- SELINFREUND R.H., BARGER S.W., PLEDGER W.J. and VAN ELDIK L.J. Neurotrophic protein S100 β stimulates glial cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3554-3558, 1991.
- SHÄFER B.W. and HEIZMANN C.W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.*, 21:134-140, 1996.
- SHAO Y. and McCARTHY K.D. Plasticity of astrocytes. *Glia*, 11:147-155, 1994.
- SHASHOUA V.E., HESSE G.W. and MOORE B.W. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *Journal of Neurochemistry*, 42:1536-1541, 1984.
- SHELTON M.K. and McCARTHY K.D. Mature hippocampal astrocytes exhibit functional metabotropic and ionotropic glutamate receptors *in situ*. *Glia*, 26:1-11, 1999.

- SIMS K.D. and ROBINSON M.B. Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 13:169-197, 1999.
- SORCI G., AGNELETTI A.L., BIANCHI R. and DONATO R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochimica et biophysica Acta*, 1448:277-289, 1998.
- STREIT W.J. Microglial-neuronal interactions. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6(4):261-266, 1993.
- STREIT W.J. Microglial cells. In, *Neuroglia*, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, p.85-96, 1995.
- STREIT W.J. The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology*, 17(3-4):671-678, 1996.
- SUSUKI F., KATO K., KATO T. and OGASAWARA N. S-100 protein in clonal astrogloma cells is released by adrenocorticotrophic hormone and corticotropin-like intermediated-lobe peptide. *Journal of Neurochemistry*, 49(5):1557-1563, 1987.
- SZUCHET S. The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. In, *Neuroglia*, edited by Helmut Kettenmann e Bruce R. Ransom, Oxford University Press, New York, p.23-43, 1995.
- SWANSON R.A. and SEID L.L. Barbiturates impair astrocyte glutamate uptake. *Glia*, 24:365-371, 1999.
- TAGUCHI A., BLOOD D.C., DEL TORO G., CANET A., LEE D.C., QU W., TANJI N., LU Y., LALLA E., FU C., HOFMANN M.A., KISLINGER T., INGRAM M., LU A., TANAKA H., HORI O., OGAWA S., STERN D.M. and SCHMIDT A.M. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*, 405:354-360, 2000.
- TAKEICHI M., HATTA K., NOSE A., NAGAFUGHI A. Identification of a gene family of cadhein cell adhesion molecules. *Cell Differentiation Development*, 25:91-94, 1988.
- TASCA C.I., VENDITE D., GARCIA K.L., SOUZA D.O. Effects of adenosine on cAMP production during early development in the optic tectum of chicks. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13:545-553, 1995.
- TRAMONTINA F., KARL J., GOTTFRIED C., MENDEZ A., GONÇALVES D., PORTELA L.V., GONÇALVES C.A. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Research Protocols*, 6:86-90, 2000.

- UEDA S., LEONARDI E.T.K., BELL J. and AZMITIA E.C. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S100 β antisense gene. *Mol. Brain Res.*, 29:365-368, 1995.
- VAN ELDIK L.J. and ZIMMER D.B. Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Research*, 436:367-370, 1987.
- VAN ELDIK L.J., CHRISTIE-POPE B., BOLIN L.M., SHOOTER E.M. and WHETSELL Jr W.O. Neurotrophic activity of S100 β in cultured dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res.*, 542: 280-285, 1991.
- VINADÉ L., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S., GOTTFRIED C., RODNIGHT R. Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Developmental Brain Research*, 104:11-17, 1997.
- XU D.Z., LU Q., KUBICKA R., DEITCH E.A. The effect of hypoxia/reoxygenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. *Journal of Trauma*, 46(2):280-285, 1999.
- XU L., SAPOLSKY R.M. and GIFFARD R.G. Differential sensitivity of murine astrocytes and neurons from different brain regions to injury. *Exp Neurol.*, 169(2):416-424, 2001.
- WALZ W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in neurobiology*, 33:309-333, 1989.
- WINNINGHAM-MAJOR F., STAECKER J.L., BARGER S.W., COATS S. and VAN ELDIK L.J. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 β proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J. Cell Biol.*, 109:3036-3071, 1989.
- WROBLEWSKA B., SANTI M.R. and NEALE J.H. N-acetylaspartylglutamate activates cyclic AMP-coupled metabotropic glutamate receptors in cerebellar astrocytes. *Glia*, 24(2):172-179, 1998.
- ZIEGLER D., INNOCENTI C., LEAL R., RODNIGHT R. and GONÇALVES C.A. The S100 β protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 23(10):1259-1263.
- ZOLESE G., TANGORRA A., CURATOLA G., GIAMBANCO I. and DONATO R. Interaction of S100 β protein with cardiolipin vesicles as monitored by electron spin resonance, pyrene fluorescence and circular dichroism. *Cell Calcium*, 9:149-157, 1988.