

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Neurociências

Efeito da Huperzina-A sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e fatias hipocâmpais.

Paula Santana Lunardi

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, Março de 2010

Agradecimentos

Agradeço e dedico este trabalho ao Prof. Carlos Alberto Gonçalves, orientador/psicólogo/amigo. Obrigada pela feliz oportunidade, por acreditar em mim.

Sou grata, especialmente, às meninas da cultura, Srtas Marina, Maria, Fabiana, Carol e Elisa, sempre muito competentes e ao mesmo tempo divertidas!

À adorável Daniela, pela tranquilidade e experiência, ajudando sempre que possível, principalmente nos momentos mais cruciais deste trabalho.

A Srta Patrícia, pelo exemplo de vida, disciplina e pela eterna disponibilidade para o conhecimento, tanto no trabalho como àquela destinadas as conversas sobre a vida.

À querida Leticia, por todos os risos e conversas filosóficas despretensiosas que me motivavam sempre e ainda me inspiram.

Ao Paulo, um menino incrivelmente adorável, pela parceria e por todas as músicas que conhecemos juntos e que ainda vamos conhecer.

A todas as pessoas admiráveis do laboratório 33 no Departamento de Bioquímica desta universidade, que estão fazendo pesquisa científica nesse país com muita dedicação e responsabilidade.

Ao João, meu querido e dedicado namorado, pelas declarações de amor mais apaixonadas, por ser paciente e generoso comigo!

E por último, mas não menos importante, agradeço ao carinho e amor incondicional dos meus pais, Laura e Arcide, e ao companherismo eterno da minha irmã, Giovana.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) resulta de múltiplos eventos patogênicos, que incluem anormalidades no processamento protéico, inflamação e estresse oxidativo, levando à destruição seletiva de populações neuronais, especialmente de neurônios colinérgicos. Tal hipótese colinérgica justifica o uso de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) como a estratégia utilizada para tratamento de pacientes com DA. Huperzina A (HupA), um alcalóide *Licopodium* extraído de uma espécie vegetal (*Huperzia serrata*) de uso tradicional pela medicina chinesa, parece se apresentar como uma alternativa. A HupA atua como um inibidor potente, reversível e altamente específico da AChE. Sua potência como anticolinesterásico é similar ou superior à da fisostigmina, galantamina, donepezil e tacrina, anticolinesterásicos aprovados para o tratamento da DA. Este alcalóide também demonstrou múltiplos efeitos neuroprotetores, incluindo modificação do processamento do peptídeo β -amilóide, redução do estresse oxidativo, proteção neuronal contra apoptose e regulação da expressão e secreção de fatores tróficos, tais como fator de crescimento neuronal e em situações de injúria com comprometimento de funções glutamatérgicas. A S100B é uma proteína da família S100 de proteínas ligantes de cálcio, produzida e secretada por astrócitos no SNC. Quando em baixas concentrações no meio extracelular (nanomolar), ela é trófica; já em concentrações maiores (micromolar), é tóxica, podendo levar à apoptose. Sabe-se que a S100B está envolvida na patofisiologia de diversas doenças neurodegenerativas, como por exemplo, na DA, no qual ocorre um aumento dos níveis dessa proteína no líquido em sua fase precoce. Neste trabalho investigamos o efeito da HupA, da tacrina (tetraaminoacridina ou THA) e da acetiltiocolina (ATCh) em astrócitos e em fatias hipocâmpais, quanto à secreção e conteúdo intracelular de S100B e proteína fibrilar glial ácida (GFAP), durante 1 e 24 h. A HupA (100 μ M) aumentou a secreção em cultura de astrócitos em 1 h, mas diferentemente causou uma redução em fatias hipocâmpais, bem como ATCh (100 μ M). Após 24 h de tratamento, foi possível observar em cultura de astrócitos um efeito da tacrina a 100 μ M sobre a redução do conteúdo de S100B intracelular, mas não de HupA ou ATCh. O imunocôntéudo de GFAP não foi alterado após os tratamentos. Uma análise geral desses resultados nos mostra que a HupA pode regular mecanismos de secreção da S100B. Além disto, a modulação de secreção desta proteína parece ser modulada por receptores colinérgicos.

Abstract

Alzheimer's Disease (AD) results in multiple pathogenic events, which include abnormalities of protein process, inflammation and oxidative stress, leading to a neuronal population destruction, especially of cholinergic neurons. This cholinergic hypothesis justifies the use of acetylcholinesterase inhibitors (AChE) as the strategy for patients with AD. Huperzine A (HupA), a novel *Lycopodium* alkaloid isolated originally from a traditional Chinese medicine, seems to be an alternative. HupA is a reversible, potent and selective AChE. Its potency and duration of AChE inhibition rival those of physostigmine, galanthamine, donepezil and tacrine, approved for treatment of DA. HupA also demonstrated multiple neuroprotector effects, including modifying the β -amyloid processing, decreasing oxidative stress, protecting neurons against apoptosis and also expressing and regulating secretion of trophic factors, such as neuronal growth factor (NGF) and also acts reducing glutamatergic excitotoxicity. S100B is a calcium-binding protein, produced and secreted by astrocytes in the central nervous system (CNS) and plays a regulatory role in the cytoskeleton and cell cycle. Moreover, extracellular S100B, a marker of glial activation in several conditions of brain injury, for example in AD, has a trophic or apoptotic effect on neurons, depending on its concentration. Here we investigated the effect of HupA, tacrine (tetraminoacridine or THA) and acetylthiocholine (ATCh), on S100B secretion, S100B and GFAP intracellular content in cortical astrocytes cultures and hippocampal slices treated for 1 and 24 h. For 1 h, HupA and ATCh (100 μ M) increased the secretion in astrocytes for 1 h, but caused a reduction on hippocampal slices ($P < 0.05$). After 24 h of treatment, tacrine (100 μ M) reduced the S100B intracellular content in astrocytes cultures, but it was not observed with HupA or ATCh. The GFAP immunoccontent did not change after these treatments. Generally, our data show that HupA can regulate S100B secretion mechanisms and that this modulation could be activated by cholinergic receptors.

Lista de abreviaturas

DA: Doença de Alzheimer

AChE: acetilcolinesterase

HupA: Huperzina A

ATCh: acetiltiocolina

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

RAGE: receptor para produtos finais de glicação avançada

SNC: sistema nervoso central

NMDA: N-metil-d-aspartato

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de abreviaturas	v
1. Introdução	7
1.1. Doença de Alzheimer e Demência	7
1.2. Hipótese Colinérgica	8
1.3. Huperzina-A	10
1.4. Astrócitos e Doença de Alzheimer	11
1.4.1 Proteína S100B	12
1.4.2 GFAP	14
2. Objetivo	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. Metodologia	17
3.1. Cultura primária de astrócitos	17
3.2. Preparação de fatias de hipocampo	17
3.3. Tratamento farmacológico	18
3.4. Determinação de dano celular	18
3.5. Secreção e imunoconteúdo de S100B	19
3.6. Imunoconteúdo de GFAP	19
3.7. Outras medidas	19
3.8. Análise estatística	19
4. Resultados	20
5. Discussão	28
6. Conclusões	31
7. Perspectivas	32
8. Referências	33

1. Introdução

1.1. Doença de Alzheimer e Demência

Falhas cognitivas, tais como, prejuízo de aprendizado e memória são freqüentemente observadas no envelhecimento normal e nos estados patológicos relacionados com a terceira idade, incluindo a depressão e doenças neurodegenerativas, tal como a Doença de Alzheimer (DA) (Jellinger 2006, Amara *et al.* 2010).

A DA tornou-se a doença neurodegenerativa mais freqüente no mundo, sendo responsável por mais de 65% dos casos de demência na população idosa, além de promover outras desordens relacionadas que inevitavelmente levam a um prejuízo severo e, finalmente, à morte. As mudanças demográficas resultantes do aumento na expectativa de vida, levam a um aumento dramático nos distúrbios relacionados à demência senil e à DA em si. Estudos apontam que cerca de 1/3 da população estará mais idosa (acima dos 65 anos) e cerca de 1/4 estarão acima de 80 anos sendo considerado fator de risco para desenvolver demências. O número estimado de pacientes dementes na Europa é de 7 a 8 milhões, e nos EUA 4 a 5 milhões, com aumento para 14 e 16 milhões, respectivamente até 2050 (Jellinger 2006). Um recente estudo organizado pela Alzheimer's Disease International previu um aumento global de indivíduos dementes, a partir dos dados atuais - 24,3 a 42 milhões em 2020 - para o dobro a cada 20 anos, chegando a 81 milhões em 2040. Os níveis deste aumento em países desenvolvidos estão previstos para 100% entre 2001 e 2040, entretanto estes dados aumentam para mais de 300% na Índia, China e seus vizinhos asiáticos (Ferri *et al.* 2005). Portanto, e devido ao envelhecimento demográfico das sociedades mundiais, o impacto econômico da DA crescerá extraordinariamente sem avanços suficientes em intervenções terapêuticas ou preventivas, tornando ainda mais graves os desafios para os setores da saúde pública e social.

Dentre as conseqüências representativas da sintomatologia da DA, incluem-se distúrbios progressivos das funções cognitivas, incluindo memória, julgamento, iniciativa, orientação física e linguagem (Nussbaum & Ellis 2003). Dentre as características neuropatológicas da DA, destacam-se perdas seletivas neuronais e sinápticas, presença de placas neuríticas extracelulares contendo o peptídeo β -amilóide e emaranhados neurofibrilares (NFTs) compostos de formas hiperfosforiladas da proteína Tau (Morrison & Hof 1997, Masters *et al.* 1985, Hasegawa *et al.* 1992,

Glenner *et al.* 1984, Delacourte & Defossez 1986). Embora essas características ocorram ocasionalmente em pessoas idosas, elas não estão necessariamente relacionadas aos prejuízos cognitivos mais freqüentes nesta fase da vida, onde os casos mais freqüentes são reconhecidos como demência senil (Dickson 2009).

1.2. Hipótese Colinérgica

Uma variedade de estudos em humanos indicaram que as vias colinérgicas das regiões do prosencéfalo basal e do prosencéfalo rostral, bem como as projeções ao tálamo, possuem um importante papel na decisão consciente, atenção, memória de trabalho e um número adicional de processos mnemônicos (Berger-Sweeney *et al.* 2001, Dotigny *et al.* 2008, Perry *et al.* 1999). Por mais de 20 anos, estudos com encéfalos de indivíduos em idade avançada e com DA têm consistentemente encontrado danos ou anormalidades nessas vias, particularmente as projeções do prosencéfalo basal, que parecem correlacionar-se com a intensidade do declínio cognitivo (Terry & Buccafusco 2003). De acordo com essa hipótese, a hipótese colinérgica da DA, a destruição dos neurônios colinérgicos no prosencefalo basal e a resultante perda da transmissão colinérgica central contribuem enormemente para os sintomas cognitivos e não-cognitivos dos pacientes com a doença (Bartus *et al.* 1982, Toyota *et al.* 2007). No início, a perda de neurônios ocorre no núcleo basal e córtex entorrinal, onde os neurônios colinérgicos são preferencialmente afetados. Com o progresso da doença, mais de 90% dos neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert são perdidos (Davies & Maloney 1976). Corroborando essa hipótese, estudos realizados em modelos animais têm demonstrado que a perda da função colinérgica nessas áreas está de fato associada a declínios na capacidade de aprendizagem e memória (Zarrindast *et al.* 2002, Lindner *et al.* 2006). Reduções nas atividades das enzimas colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE) podem ser observadas nos tecidos nervosos dos pacientes com DA em estágios mais avançados (Perry *et al.* 1977, Strong *et al.* 1991). Estas enzimas estão envolvidas na síntese e degradação da acetilcolina (ACh), respectivamente, e sua redução observada na DA sugere uma destruição seletiva dos neurônios colinérgicos.

A hipótese colinérgica fornece a base racional para abordagem terapêutica atual em pacientes com DA e demências relacionadas. Os ensaios clínicos atuais têm se direcionado para drogas que melhorem os níveis de ACh no cérebro e assim, compensar

as perdas da função colinérgica, incluindo precursores de ACh, agonistas muscarínicos, agonistas nicotínicos e inibidores de colinesterases. Dentre as estratégias citadas, a que desempenhou os melhores resultados, embora discretos, foi o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Francis *et al.* 2010, Francis *et al.* 2005).

Várias classes de anticolinesterásicos têm sido estudadas para o tratamento da DA. Elas diferem no seu mecanismo de inibição (reversível, pseudo-irreversível ou irreversível), metabolismo e seletividade cerebral. A fisiostigmina, um inibidor de curta duração, foi uma das primeiras drogas que ofereceu resultados promissores. Tacrina (THA ou tetrahydroaminoacridina) foi o primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos para uso terapêutico em DA. A tacrina tem efeito moderado, mas significativo, no alívio dos sintomas de DA de intensidade leve e moderada, e parece exibir, além da inibição da colinesterase, uma variedade de outras propriedades farmacológicas (Summers *et al.* 1986). Entretanto, sua aplicação é limitada devido aos sérios efeitos adversos, que incluem distúrbios gastrointestinais e hepatotoxicidade, forçando os pacientes a descontinuarem o tratamento (Knapp *et al.* 1994, Knopman *et al.* 1996). Donepezil (Aricept®) inaugurou uma nova geração de anticolinesterásicos com melhor seletividade para a AChE no sistema nervoso central (SNC) quando comparado a tacrina. Esse composto tem meia vida plasmática de 70 horas e, ao contrário da tacrina, não está associado à hepatotoxicidade; no entanto, causa significativos efeitos adversos resultantes da ativação do sistema colinérgico periférico (náuseas, vômitos e diarreia) (Mohs & Davis 1982, Wang *et al.* 2010). Desta geração mais recente, outros anticolinesterásicos também estão disponíveis, tais como a rivastigmina (Exelon®) e a galantamina (Reminyl®) (Hansen *et al.* 2008, Birks 2006, Onor *et al.* 2007, Erkinjuntti *et al.* 2008). Tacrina, donepezil e galantamina são inibidores reversíveis da AChE, sendo que a galantamina, um composto natural e o fármaco mais recentemente aprovado pelo FDA, tem servido de protótipo para desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos (Michaelis 2003). Uma outra abordagem para terapia da DA, em estágios mais avançados e severos, consiste na combinação de um anticolinesterásico e memantina, um antagonista não-competitivo de receptor NMDA, pois a excitotoxicidade glutamatérgica mediada por receptores NMDA parece exercer um papel importante nos processos de morte neuronal observados na DA assim como em outras condições neurodegenerativas (Bleich *et al.* 2003, Hynd *et al.* 2004). Estas novas abordagens e outros estudos que permitem investigar novos compostos capazes de melhorar o

funcionamento cognitivo com a mínima produção de efeitos adversos são de extrema relevância para terapêutica da DA.

1.3. Huperzina A

O resultado de vários estudos confirmando o efeito benéfico de algumas espécies vegetais, tal como *Panax ginseng* e *Gingko biloba*, em ensaios biológicos relacionados a doenças neurodegenerativas ou déficits cognitivos, acabou gerando interesse no estudo de outras plantas com perfil semelhante (Lee *et al.* 2008, Yamaguchi *et al.* 1997, Curtis-Prior *et al.* 1999, Zhong *et al.* 2000, Arushanian & Beier 2008). Neste contexto, não é surpreendente o interesse na medicina tradicional chinesa, com sua experiência acumulada durante séculos, na procura por novas drogas nos tempos atuais. A Huperzina A (HupA) é um bom exemplo desta linha de pesquisa (Zangara 2003). A HupA é um alcalóide extraído da planta chinesa *Huperzia serrata*, conhecida na medicina popular chinesa como *Qian Ceng Ta* (“pagoda de mil camadas”) ou *Jin Bu Huan* (“mais valioso que ouro”), usada tradicionalmente para tratar febre, inflamação, desordens hematológicas e esquizofrenia. A HupA foi isolada pela primeira vez e sua estrutura química caracterizada no final dos anos 80 (Tang *et al.* 1986, Wang *et al.* 1986). Esta molécula pertence a classe dos alcalóides sesquiterpenos insaturados, com uma metade piridínica e grupamento amino primário (fórmula empírica $C_{15}H_{18}N_2O$, peso molecular 242). O isômero (-) do alcalóide é dez vezes mais potente do que sua forma análoga (+). O modo de inibição reversível da AChE parece estar relacionado à ligação da HupA com resíduos aromáticos do sítio ativo da enzima, entre Tri 86 e Tir 337, como obtido por análise estrutural de raios-X e imagem por computador (Raves *et al.* 1997).

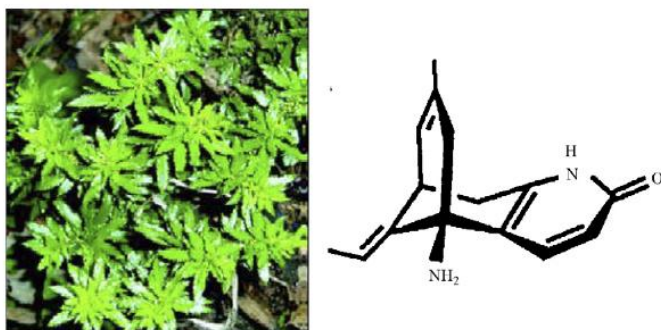


Figura 1. A planta chinesa *Huperzia serrata* (*Qian Ceng Ta*) e a estrutura da Huperzina A (Zhang *et al.* 2008).

A HupA apresenta efeitos adversos mínimos, sem hepatotoxicidade ou efeitos colinérgicos periféricos significativos, tais como tonturas, náuseas, dores de cabeça e hipotensão. Isto pode ser em parte explicado pela alta especificidade da HupA para AChE quando comparada à BuChE (IC_{50} AChE = 0,082 μ M e IC_{50} BuChE = 74,43 μ M em córtex e soro de rato, *in vitro*, respectivamente) e ao padrão de inibição da AChE tipo competitivo-misto (Wang et al. 1986, Cheng et al. 1996). Ainda, estudos *in vivo* indicaram que a HupA possui alta biodisponibilidade oral e penetra a barreira hematoencefálica mais facilmente do que os outros inibidores. O nível máximo de atividade anticolinesterásica em córtex de rato e cérebro total foi atingido em 30 e 60 minutos, respectivamente, e se manteve durante 6 horas após administração da HupA, via oral (Tang et al. 1989, Tang et al. 1994, Wang & Tang 1998, Wang et al. 1988). A HupA também demonstrou múltiplos efeitos neuroprotetores, incluindo modificação no processamento do peptídeo β -amilóide, redução do estresse oxidativo, proteção neuronal contra apoptose e regulação da expressão e secreção do fator de crescimento neuronal (Zhang & Tang 2006). Além disso, pesquisas sobre o mecanismo de inibição do receptor glutamatérgico mostraram que a HupA inibe receptores NMDA reversivelmente de modo não-competitivo (Zhang & Hu 2001, Ved et al. 1997). Considerando a excitotoxicidade glutamatérgica uma característica implicada na patogênese da DA, a atividade antagonista do receptor NMDA aliada à inibição da AChE pela HupA pode reduzir o progresso da DA e melhorar os sintomas, tornando-se assim, uma estratégia alternativa à combinação de donepezil e memantina (Li et al. 2007). O fato da etiologia da DA envolver múltiplos mecanismos torna a HupA uma substância relevante, pois anticolinesterásicos que possam atuar em múltiplos alvos, independentes do mecanismo colinérgico, parecem apresentar mais vantagens para tratamento da doença (Pepeu & Giovannini 2009).

1.4. Astrócitos e Doença de Alzheimer (DA)

Células astrogliais, as quais residem tanto na substância cinzenta quanto na branca, são os principais elementos do sistema homeostático cerebral, sendo responsáveis por todos os aspectos de suporte metabólico, nutrição, controle do ambiente iônico e da ação de neurotransmissores, regulação da barreira hematoencefálica e defesa do SNC (Giaume et al. 2007, Belanger & Magistretti 2009, Perea et al. 2009). Além disso, os astrócitos estão envolvidos em numerosas cascatas de

sinalização, as quais incluem vias de receptores da membrana plasmática e segundo mensageiros intracelulares (Halassa *et al.* 2009, Fellin 2009, Condorelli *et al.* 1999, Verkhratsky & Toescu 2006). Os astrócitos desempenham um papel muito importante na resposta à injúria por mudanças nas atividades metabólicas, na defesa antioxidante e na secreção de fatores neurotróficos (Chen & Regan 2004, Hughes *et al.* 2010, Abramov & Duchon 2005, Struzynska 2009). Entretanto, a contribuição dos astrócitos para a patofisiologia da DA e os mecanismos moleculares e de sinalização relacionados ainda são muito pouco compreendidos.

Sabe-se que a sinalização por íons cálcio (Ca^{+2}) em astrócitos na forma de ondas transitórias intra e intercelular desempenham um papel importante na comunicação bidirecional entre neurônios e astrócitos (Pasti *et al.* 1997, Scemes & Giaume 2006, Fellin 2009) e, potencialmente, modulam a atividade e sobrevivência neuronal (Parri *et al.* 2001, Takano *et al.* 2006). Existem muitos trabalhos evidenciando que alterações na regulação das concentrações de Ca^{+2} em astrócitos contribuem para a patofisiologia da DA. A astrogliose reativa na DA caracterizada por uma *upregulation* da GFAP (proteína fibrilar glial ácida) e proteína S100B (Peskind *et al.* 2001, Pamplona *et al.* 2005) está associada à produção do peptídeo β -amilóide e à formação de neuritos anormais que contribuem para o surgimento de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares (Rodriguez *et al.* 2009, Casas *et al.* 2004). As conseqüências moleculares e celulares desta alteração na concentração do Ca^{+2} intracelular em neurônios na DA e seus efeitos sobre neurotoxicidade estão bem documentadas (LaFerla 2002). De fato, estudos recentes têm demonstrado que o peptídeo $\text{A}\beta$ sozinho e em baixas concentrações é capaz de induzir diretamente ondas de cálcio intracelular transitórias e ondas intercelulares espontâneas em astrócitos isolados de culturas purificadas, levantando a possibilidade do efeito da exposição direta de $\text{A}\beta$ sobre astrócitos *in vivo* no encéfalo com DA (Chow *et al.* 2010).

1.4.1 Proteína S100B

A S100B é uma proteína membro da família S100 do tipo acídica com peso molecular de 21 kDa, existente como um homodímero consistindo de duas subunidades β . A S100B é uma proteína ligante de Ca^{+2} com 4 sítios de ligação para o Ca^{+2} (Heizmann 1999, Isobe & Okuyama 1978), mais 4 sítios de ligação para o Cu^{+2} (Nishikawa *et al.* 1997) e de 6 a 8 sítios de ligação ao Zn^{+2} (Donato *et al.* 1991,

Heizmann 1999, Schafer & Heizmann 1996, Zimmer *et al.* 1995). Tais sítios de ligação influenciam a capacidade da proteína ligar-se ao Ca^{+2} .

Estudos indicam que a proteína S100B participa funcionalmente como um regulador intracelular e um sinalizador extracelular (Donato *et al.* 2009). Dentro das células, S100B age como estimulador da proliferação e migração celular (Donato 2001, Heizmann 2002) bem como pode intervir na apoptose e na diferenciação celular (Arcuri *et al.* 2005) por mecanismos que dependem do tipo celular, do contexto e da condição celular (Donato *et al.* 2009). Além disso, a S100B regula a homeostase do Ca^{+2} , interage com muitas funções imunológicas do SNC e influencia a integridade do citoesqueleto (Rothermundt *et al.* 2003, Donato 2003).

A S100B pode ser secretada por diferentes tipos celulares e também é liberada por dano celular. Sua secreção é estimulada por agonistas de receptor 5-HT_{1a}, glutamato, adenosina e ácido lisofosfatídico (Pinto *et al.* 2000, Whitaker-Azmitia *et al.* 1990). No SNC, esta proteína é ativamente produzida e secretada por astrócitos e exerce efeitos regulatórios sobre a glia, neurônios e microglia de modo autócrino e parácrino (Adami *et al.* 2001). No meio extracelular, a S100B pode exercer efeitos opostos sobre neurônios, dependendo de sua concentração; ou seja, concentrações baixas de S100B (nanomolar) resultam em efeitos tróficos que promovem a sobrevivência celular neuronal durante o desenvolvimento e, após dano no SNC, estimulação de neuritos (Huttunen *et al.* 2000) e proteção de neurônios contra excitotoxicidade do glutamato (Ahlemeyer *et al.* 2000, Kogel *et al.* 2004). Entretanto, concentrações mais altas (micromolar) promovem efeitos tóxicos por induzir morte neuronal via apoptose (Van Eldik & Wainwright 2003). A interação de S100B com o receptor RAGE (sigla do inglês para “receptor para produtos finais de glicação avançada”) em células nervosas tem sido implicada em ambos os efeitos, neurotrófico e neurotóxico (Huttunen *et al.* 2000).

Encéfalos de pacientes com DA contêm níveis elevados de RNAm da S100B e da própria proteína (Griffin *et al.* 1989, Marshak *et al.* 1992, Mrak *et al.* 1996, Sheng *et al.* 1994). Além disso, uma associação progressiva da microglia superexpressando interleucina 1-beta, assim como astrócitos superexpressando S100B em estágios da doença com a presença de emaranhados neurofibrilares, têm sido documentados (Sheng *et al.* 1997). Estudos consideram que a ativação astrocítica e a superexpressão de S100B estão envolvidas na indução e manutenção dos neuritos distróficos e depósitos amilóide, sugerindo o conceito de uma cascata mediada por citocinas gliais subjacente à

progressão das mudanças neuropatológicas na DA (Mrak et al. 1996, Griffin *et al.* 1994).

1.4.2 Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês “glial fibrilar acid protein”) é a subunidade protéica de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial e é expressa principalmente em astrócitos diferenciados no SNC (Rodnight *et al.* 1997, Gomes *et al.* 1999).

Inicialmente, esta proteína foi isolada de lesões cerebrais (placas) de pacientes com esclerose múltipla (Eng *et al.* 2000) sendo reconhecida e amplamente utilizada como um marcador de astrócitos e de tumores em linhagem astrocítica (Pekny & Pekna 2004).

Estruturalmente, a GFAP é um polímero que consiste em uma região amino-terminal não-helicoidal altamente básica, uma região carbóxi-terminal não-helicoidal (responsável pela ligação entre os monômeros) e uma região central formada por uma extensa α -hélice, cuja seqüência de aminoácidos é conservada em relação a outras proteínas filamentosas intermediárias. Diferenças na estrutura destas proteínas são normalmente evidenciadas nos aminoácidos da região amino-terminal (Alberts 2002).

Durante o desenvolvimento do SNC e na astrogliose reativa ocorre um aumento na expressão de GFAP (Gomes et al. 1999). De fato, no desenvolvimento glial *in vivo* ocorre uma transição na expressão dos genes de proteínas filamentosas intermediárias. No início do desenvolvimento, a glia radial e astrócitos imaturos expressam principalmente vimentina. Posteriormente, a vimentina é progressivamente substituída pela GFAP em astrócitos diferenciados ou maduros (Wofchuk & Rodnight 1995). Em cultura primária de astrócitos, entretanto, a vimentina coexiste com GFAP durante todo o tempo de cultivo (Gottfried 1996). Após dano ou trauma e em diversas patologias do SNC, os astrócitos tornam-se reativos e respondem de maneira característica, denominada astrogliose reativa, a qual é caracterizada por proliferação e hipertrofia astrocítica, aumento na síntese de GFAP e outras transformações bioquímicas e citológicas (Eng & Lee 1995). Estudos mostram algumas evidências da participação direta dos astrócitos na formação e evolução morfológica de placas amilóide da DA (Nagele *et al.* 2004). Durante astrogliose reativa, os astrócitos são forçados a desistir de suas atividades neuroprotetoras, ou seja, suas funções biológicas, tais como,

tamponamento de íons potássio (K^+) e de glutamato do meio extracelular podem estar prejudicadas, favorecendo a despolarização neuronal, influxo excessivo de Ca^{+2} e conseqüente dano excitotóxico neuronal (Hansson & Ronnback 2003). Nos estágios iniciais da DA, os astrócitos reativos são bem visíveis na camada molecular do córtex cerebral e também estão muito próximos das placas amilóides nas camadas subjacentes das células piramidais (Wisniewski & Wegiel 1991). Embora a natureza da origem dessa ativação astrocítica sob essas circunstâncias seja desconhecida, estudos têm mostrado que o tratamento com agregados amilóides, proteína β -amilóide ou a parte central intacta da placa amilóide isolada de encéfalos humanos com DA, podem estimular a ativação de astrócitos *in vitro* (DeWitt *et al.* 1998) e que, uma vez ativados, estes astrócitos podem se ligar e, então, degradar $A\beta$, sugerindo uma função direta destas células na degradação e remoção de $A\beta$ em encéfalos com DA (Nagele *et al.* 2003).

Estudos em culturas mistas com astrócitos e neurônios tratados com o peptídeo β -amilóide ($A\beta_{1-42}$) e seu fragmento tóxico ($A\beta_{25-35}$) provocaram aumentos esporádicos e/ou oscilações de Ca^{+2} citosólico que perduraram por muitas horas (Abramov *et al.* 2003). Estas respostas foram observadas unicamente em astrócitos e não em neurônios, e foram geradas pelo influxo de Ca^{+2} do espaço extracelular, aparentemente pelos canais transmembrana formados pelas proteínas $A\beta$. É relevante destacar que as flutuações de Ca^{+2} estão de alguma forma relacionadas à morte neuronal, a qual ocorreu 24 h depois do tratamento destas células com $A\beta$. De fato, a inibição do influxo de Ca^{+2} nesse estudo, teve um efeito neuroprotetor (Abramov *et al.* 2003).

Tendo em vista a importância farmacológica do alcalóide HupA, bem como a participação de células astrogliais em aspectos importantes no que tange a sintomatologia da DA, este trabalho visa investigar os efeitos da HupA em cultura primária de astrócitos e em fatias hipocâmpais sobre a secreção e conteúdo intracelular das proteínas S100B e GFAP. Além disso, iniciar um estudo que proponha uma possível modulação colinérgica sobre a secreção de S100B através do tratamento com ATCh.

2. Objetivo

Neste trabalho verificamos os efeitos da HupA, tacrina e ATCh sobre a secreção da proteína S100B em duas preparações: cultura primária de astrócitos e fatias de hipocampo.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Analisar os efeitos de HupA, tacrina e ATCh sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos, durante 1 e 24 h;

2.1.2. Analisar os efeitos de HupA, tacrina e ATCh sobre a secreção de S100B em fatias de hipocampo durante 1 h;

2.1.3. Medir o conteúdo intracelular das proteínas S100B e GFAP em astrócitos, tratados com HupA, tacrina e ATCh durante 24 h.

2.1.4. Avaliar morte e viabilidade celular nas duas preparações tratadas com HupA, tacrina e ATCh.

3. Metodologia

3.1. Cultura Primária de Astrócitos

Culturas primárias de astrócitos corticais de ratos Wistar foram preparadas com descrito previamente (Gottfried *et al.* 1999). Brevemente, córtices de ratos Wistar recém-nascidos (1-2 dias de idade) foram removidos e mecanicamente dissociados em uma solução salina tamponada e livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (HBSS), pH 7,4, contendo (em mM): 137 NaCl; 5,36 KCl; 7,9 NaHCO_3 ; 0,27 Na_2HPO_4 ; 1,1 KH_2PO_4 e 6,1 glicose. Do córtex retira-se as meninges e em seguida o córtex é mecanicamente dissociado por passagens seqüenciais através de uma pipeta Pasteur. Após centrifugação a 1000 rpm por 5 min, o *pellet* foi ressuscitado em DMEM (pH 7,6) suplementado com 8,39 mM HEPES, 23,8 mM NaHCO_3 , 0,1% fungizona, 0,032% garamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em DMEM contendo 10% de SFB em 5% $\text{CO}_2/95\%$ de ar a 37 °C, em placas de 24 poços previamente cobertas com poli-L-lisina, e permitido o crescimento até a confluência, quando puderam ser usadas (cerca de 15 dias *in vitro*).

3.2. Preparação das Fatias Hipocampais

As fatias hipocampais foram preparadas conforme descrito previamente (Buyukuysal 2005). Foram usados ratos Wistar machos (30 dias de idade) obtidos do Biotério no Departamento de Bioquímica – UFRGS, mantidos sobre controle de luz e condições ambientais (12 h/12 h ciclo claro/escuro a uma temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$) e com livre acesso a comida e bebida. Os animais foram mortos por decapitação, o encéfalo removido e colocado em uma solução salina resfriada com a seguinte composição (em mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 ; 25 HEPES; 1 KH_2PO_4 e 10 glicose, para o pH 7,4. Os hipocampus foram dissecados e fatias transversas de 0,3 mm foram obtidas utilizando um aparelho, McIlwain Tissue Chopper®. As fatias foram transferidas imediatamente a placas de cultura de 24 poços. Cada poço continha 0,3 mL da solução salina e somente uma fatia. Para estabilizar as fatias, o meio foi trocado a cada 15 min com meio salina fresco a temperatura ambiente (mantida a 25° C) durante 120 min.

3.3. Tratamento Farmacológico

Os astrócitos foram incubados por 1 e 24 h em DMEM (pH 7,4) sem soro na ausência ou presença de HupA nas concentrações 0,1, 1, 10 e 100 μM ; tacrina 10 e 100 μM e ATCh 10 e 100 μM . Depois o meio é coletado e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise posterior. As fatias hipocâmpais foram tratadas após os 120 min de estabilização, por 1 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ na ausência ou presença de HupA 0,1, 1, 10 e 100 μM ; tacrina 10 e 100 μM e ATCh 10 e 100 μM . Após este período coleta-se uma alíquota do meio que é estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4. Determinação de Dano Celular

Após o período de tratamento, tanto cultura de astrócitos (24 h de incubação) como fatias hipocâmpais (1 h de incubação) foram avaliadas quanto a morte e viabilidade celular.

A morte celular procede com monitoramento da vazão da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) para o meio de incubação. A atividade extracelular da LDH foi determinada por um kit colorimétrico comercial (Doles, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

A viabilidade celular foi analisada segundo dois ensaios: o primeiro conforme metodologia do vermelho neutro, que foi adicionado ao meio de incubação por 30 min. Após, o meio foi totalmente removido e cada poço foi lavado duas vezes com 0,3 ml de tampão PBS durante 5 min sob agitação leve. Em seguida, adicionou-se 0,3 ml de solução extratora (ácido acético), agitou-se vigorosamente até homogeneizar. Ao final transferiu-se 0,2 ml do meio a uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. O segundo ensaio consistia na avaliação das células quanto a capacidade da succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir MTT sal (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difeniltetrazolium bromide) a MTT formazan (Hansen *et al.* 1989). O corante foi incubado durante 30 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, então o meio foi retirado e adicionou-se solução de DMSO 100%. As placas ficaram sob agitação por cerca de 30 min ou mais. Finalmente, transferiu-se 0,2 ml para placa de 96 poços e a leitura foi realizada a 540 e 620 nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do controle.

3.5. Secreção e Imunoconteúdo Celular de S100B

A concentração de S100B foi determinada na alíquota do meio de cultivo dos astrócitos a 1 e 24 h e na alíquota do meio de incubação de fatias hipocâmpais a 1 h. O conteúdo intracelular de S100B foi analisado em astrócitos após 24 h, através da lise celular em uma solução de PBS que continha 1 mM de EGTA e 1 mM de PMSF. O ensaio por ELISA para S100B foi realizado como descrito previamente (Leite *et al.* 2008). Resumidamente, 50 uL de amostra mais 50 uL de Tampão Tris-Ca⁺² foram incubados por 2 h sobre a placa previamente coberta com anticorpo anti-S100B monoclonal. O anticorpo anti-S100 policlonal foi incubado por 30 min seguido de um anticorpo anti-IGg conjugado a peroxidase por mais 30 min. A reação de cor com o-phenylenediamina (OPD) foi medida a 492 nm. A curva padrão para S100B variou de 0,001 a 1 ng/mL.

3.6. Imunoconteúdo de GFAP

O ensaio por ELISA para GFAP foi realizado a partir da cobertura da placa com 100 mL das amostras contendo 200 ng de proteína, *overnight* a 4° C. A incubação com anticorpo policlonal anti-GFAP por 2 h foi seguida de incubação com um anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h, a temperatura ambiente. A reação de cor com OPD foi medida a 492 nm. A curva padrão de GFAP variou de 0,1 a 10 ng/mL.

3.7. Outras Medidas

O conteúdo de proteína foi medido pelo método de Lowry usando albumina bovina como padrão (Peterson 1977).

3.9. Análise Estatística

Os dados destes experimentos são apresentados como a média da porcentagem ± erro padrão e analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguida de Dunnet para curva de concentração da HupA e ANOVA de uma via, seguida de Duncan para os demais experimentos, considerando $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Perfil da secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e fatias hipocampais tratadas com HupA (0,1 a 100 μ M)

Dentre as concentrações testadas, apenas HupA na concentração de 100 μ M mostrou efeito significativo quanto à secreção de S100B comparada ao veículo (HCl 1 mM) por 1 h de tratamento. Para essa concentração de HupA, observamos um aumento na secreção de S100B em culturas de astrócitos (Figura 2), enquanto houve redução significativa da secreção em fatias hipocampais (Figura 3). É importante notar que HupA a 100 μ M, em 1 h, não compromete a viabilidade celular (dados não mostrados). Em todos os parâmetros analisados, os resultados obtidos com veículo da HupA (HCl a 1mM) não foram diferentes daqueles obtidos em condições basais sem HCl (dados não mostrados).

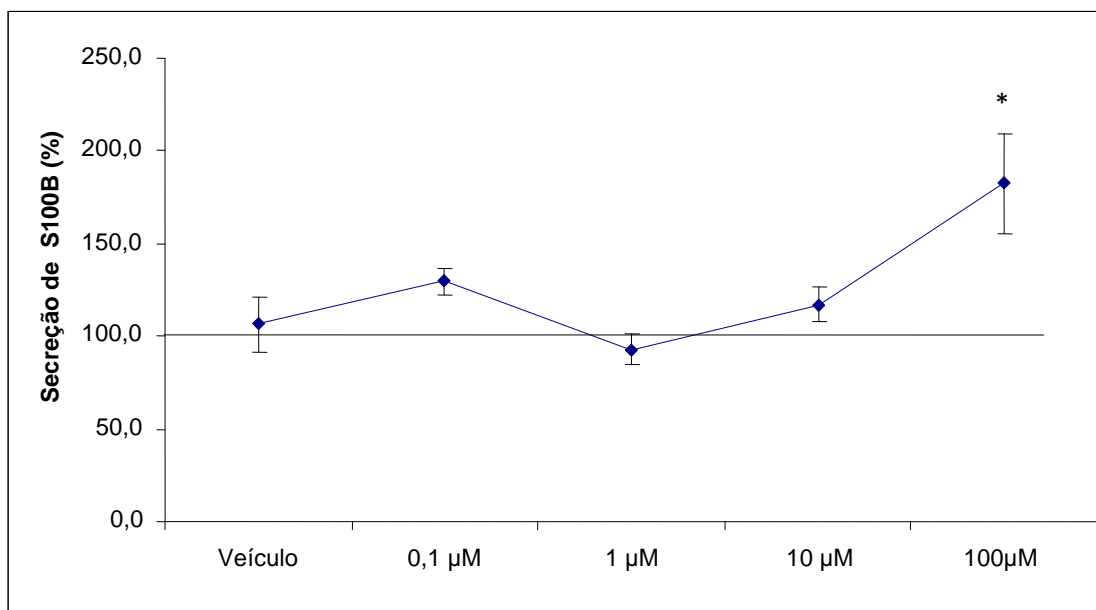


Figura 2. Efeito de veículo e HupA (0,1 – 100 μ M) sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos durante 1 h de tratamento. A secreção basal (considerada 100%) está representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 6 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Dunnet $P < 0,05$. $*$ = $P < 0,05$ em relação ao veículo.

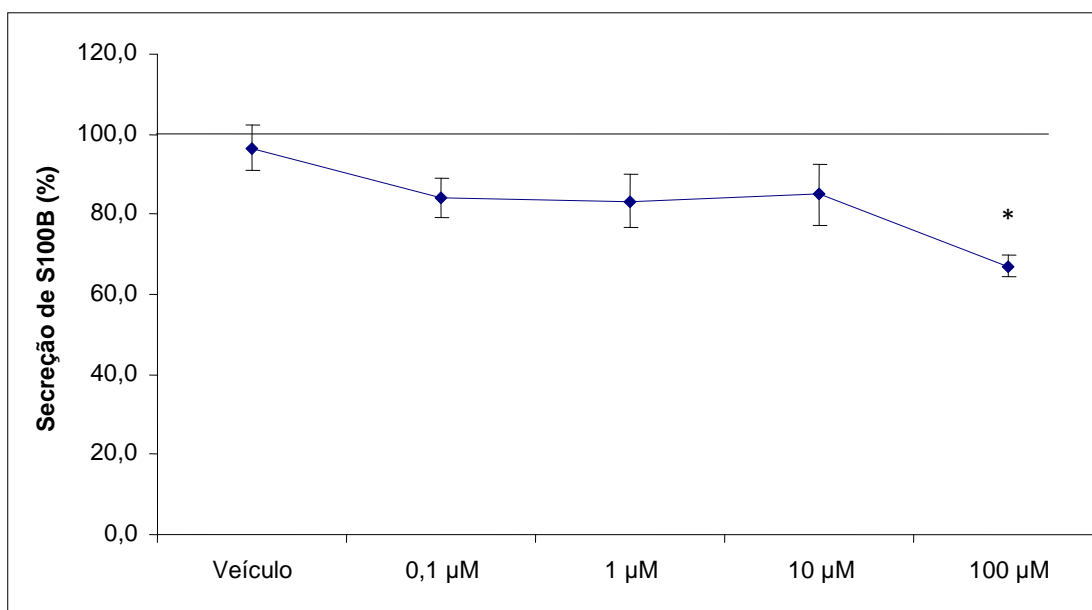


Figura 3. Efeito de veículo e HupA (0,1 – 100 µM) sobre a secreção de S100B em fatias de hipocampo durante 1 h de tratamento. A secreção basal (considerada 100%) está representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 9 a 14 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Dunnet $P < 0,05$. *= $P < 0,05$ em relação ao veículo.

4.2. Os tratamentos avaliados não causaram morte nem alteraram a viabilidade celular

Em culturas primárias de astrócitos é possível observar um aumento significativo quanto à redução do corante MTT (Tabela 1). Apesar deste ensaio avaliar a atividade de oxirredução da mitocôndria, não se pode dizer com certeza que este aumento é resultado de uma melhora na atividade metabólica mitocondrial.

Tabela 1. Efeitos da HupA, tacrina e ATCh sobre parâmetros bioquímicos de viabilidade e morte celular em culturas primárias de astrócitos

	Vermelho neutro (% do basal)	Redução do MTT (% do basal)	LDH extracelular (% do basal)
HupA 10 μ M	100 \pm 7,7	141,6 \pm 10,7*	114,2 \pm 9,3
HupA 100 μ M	110,3 \pm 9,5	148,6 \pm 11,8*	105,8 \pm 7,0
Tacrina 10 μ M	n.d.	n.d.	106,5 \pm 8,5
Tacrina 100 μ M	n.d.	n.d.	109,1 \pm 4,5
ATCh 10 μ M	n.d.	n.d.	97,9 \pm 7,2
ATCh 100 μ M	n.d.	n.d.	90,2 \pm 8,3

Tabela 2. Efeitos da HupA, tacrina e ATCh sobre parâmetros bioquímicos de viabilidade e morte celular em fatias hipocampais

	Vermelho neutro (% do basal)	Redução do MTT (% do basal)	LDH extracelular (% do basal)
HupA 10 μ M	119,2 \pm 1,3	86,9 \pm 16,5	99,0 \pm 6,0
HupA 100 μ M	123,1 \pm 4,8	109,8 \pm 4,2	94,1 \pm 9,3
Tacrina 10 μ M	n.d.	101,7 \pm 4,2	99,5 \pm 7,5
Tacrina 100 μ M	n.d.	103,9 \pm 3,7	100,5 \pm 4,3
ATCh 10 μ M	n.d.	104,6 \pm 5,6	94,5 \pm 7,3
ATCh 100 μ M	n.d.	98,8 \pm 5,8	106,9 \pm 7,5

Cultura primária de astrócitos (Tabela 1) e fatias hipocampais (Tabela 2) foram expostas a HupA, tacrina e ATCh (10 e 100 μ M) durante 24 h e 1h, respectivamente. Os valores foram expressos como porcentagem do basal, considerado 100%. Os dados representam as médias da porcentagem \pm EP de 3 a 6 experimentos independentes, cada qual em triplicata. Teste-t de Student para $P < 0,05$. * = $P < 0,05$ vs basal; n.d. (não determinado).

4.3. HupA e ATCh 100 μ M aumentaram a secreção de S100B após 1 h de tratamento em cultura Primária de astrócitos, bem como reduziram a secreção em fatias de hipocampo.

Interessantemente, ATCh na concentração de 100 μ M comportou-se de modo semelhante a HupA a 100 μ M após 1h de incubação em cultura primária de astrócitos. Ambos os tratamentos aumentaram a secreção de S100B quando comparadas à secreção basal e foram significativamente diferentes de suas concentrações a 10 μ M. Por outro lado, em fatias hipocampais, observamos que HupA a 100 μ M, tacrina a 10 μ M e ATCh a 100 μ M reduziram a secreção de S100B, em 1 h. De fato, apenas ATCh na concentração de 10 μ M aumentou a secreção da S100B.

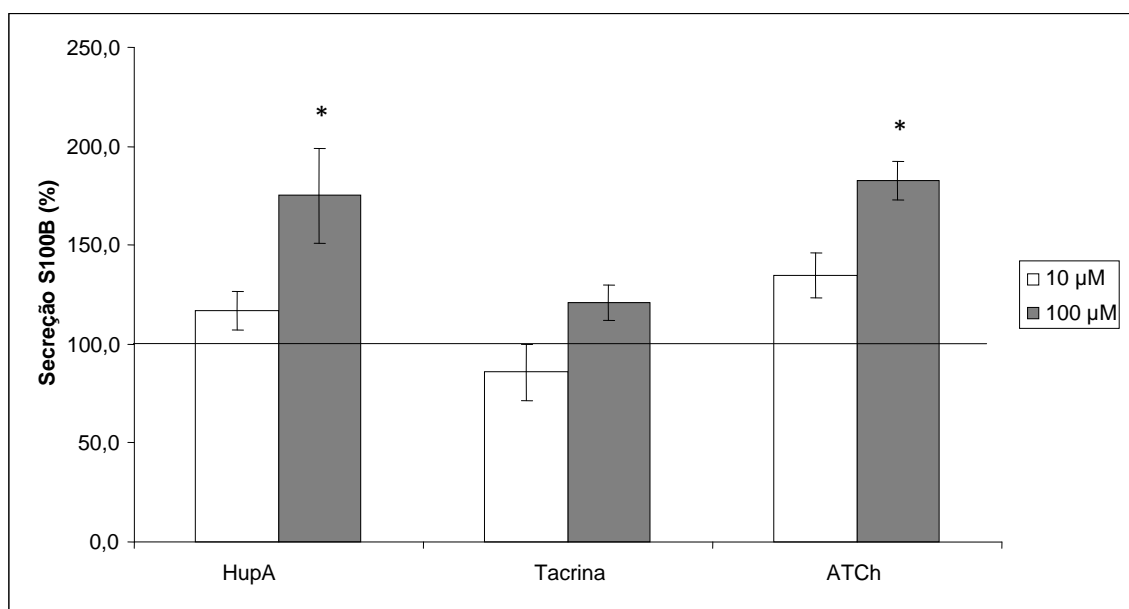


Figura 4. Efeito da HupA, tacrina e ATCh (10 e 100 μ M) sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos durante 1 h de incubação. A secreção basal (considerada 100%) é representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 4 a 10 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Duncan $P < 0,05$. * = $P < 0,05$ comparado a linha basal.

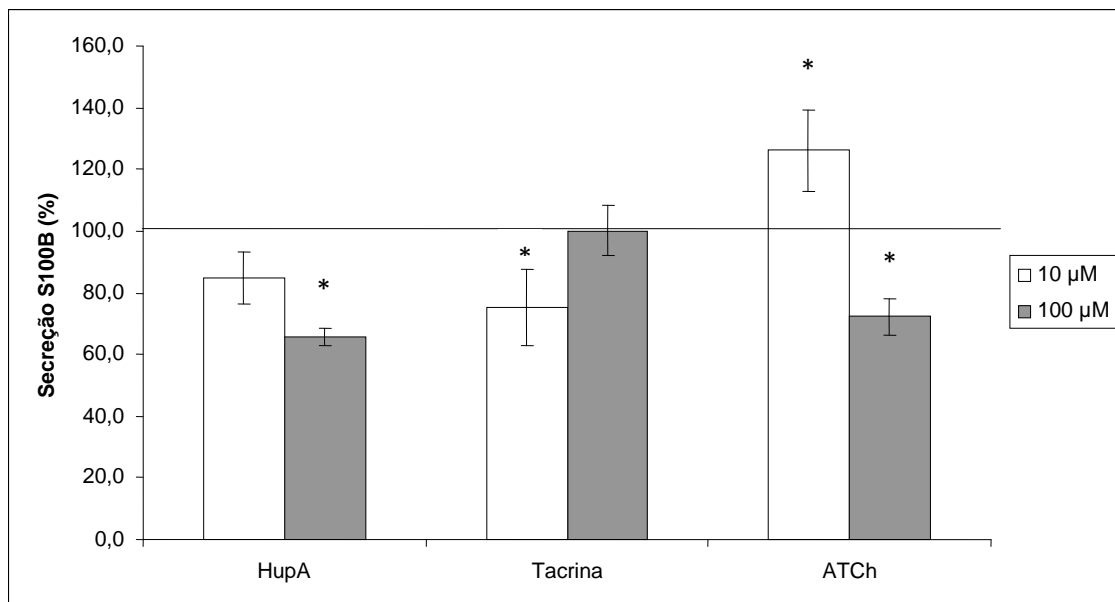


Figura 5. Efeito da HupA, tacrina e ATCh (10 e 100 μ M), sobre secreção de S100B em fatias hipocâmpais durante 1 h. A secreção basal (considerada 100%) é representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 4 a 13 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Duncan $P < 0,05$. * = $P < 0,05$ comparado a linha basal.

4.4. Quanto à secreção e expressão de S100B e GFAP em astrócitos

Após 24 h de tratamento, a secreção de S100B em cultura de astrócitos parece estabilizar-se. Apesar do efeito de tacrina a 10 μM aparentemente reduzir a secreção de S100B, este dado não foi significativo ($P = 0,149$). Ainda após 24 h observamos que apenas tacrina a 100 μM causou efeito, reduzindo o conteúdo intracelular de S100B.

Nenhum dos compostos alterou o conteúdo de GFAP em astrócitos, após 24 h de incubação.

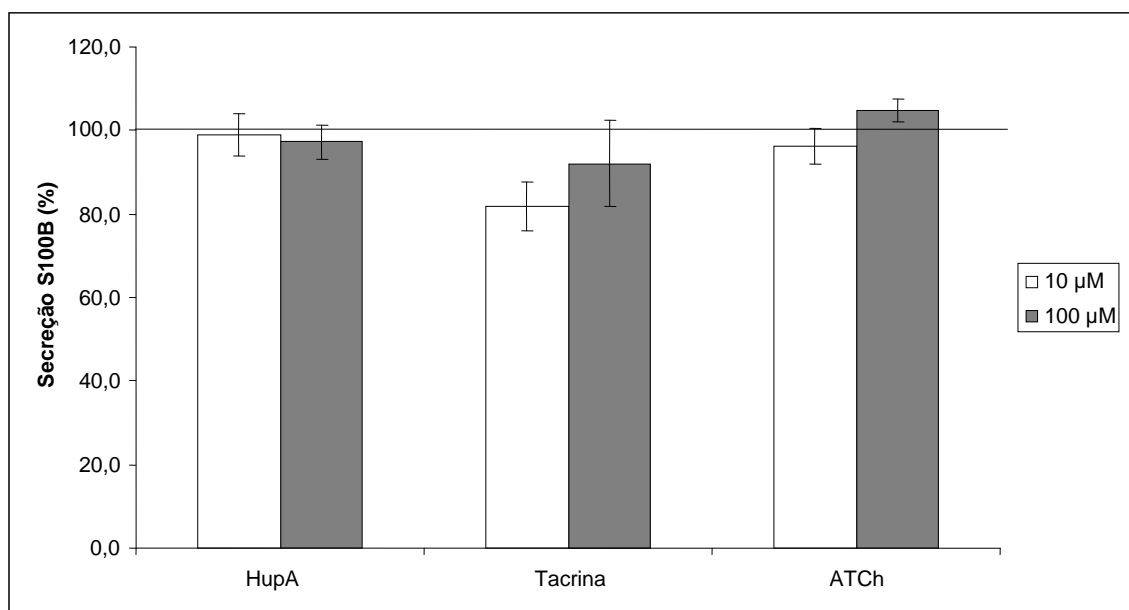


Figura 6. Efeito da HupA, tacrina e ATCh (10 e 100 μM), sobre secreção de S100B em cultura primária de astrócitos durante 24 h. A secreção basal (considerada 100%) é representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 5 a 11 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Duncan para $P < 0,05$.

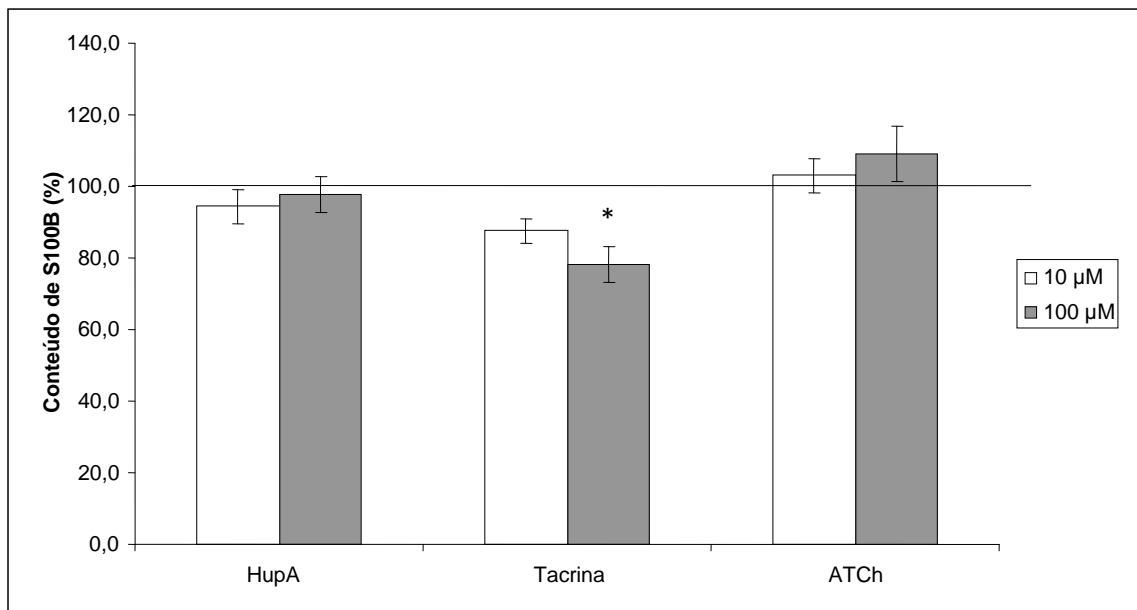


Figura 7. Efeito da HupA, tacrina e ATCh (10 e 100 μ M), sobre conteúdo de S100B em cultura primária de astrócitos, durante 24 h. A secreção basal (considerada 100%) é representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 5 a 11 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Duncan para $P < 0,05$. * = $P < 0,05$ comparado a linha basal.

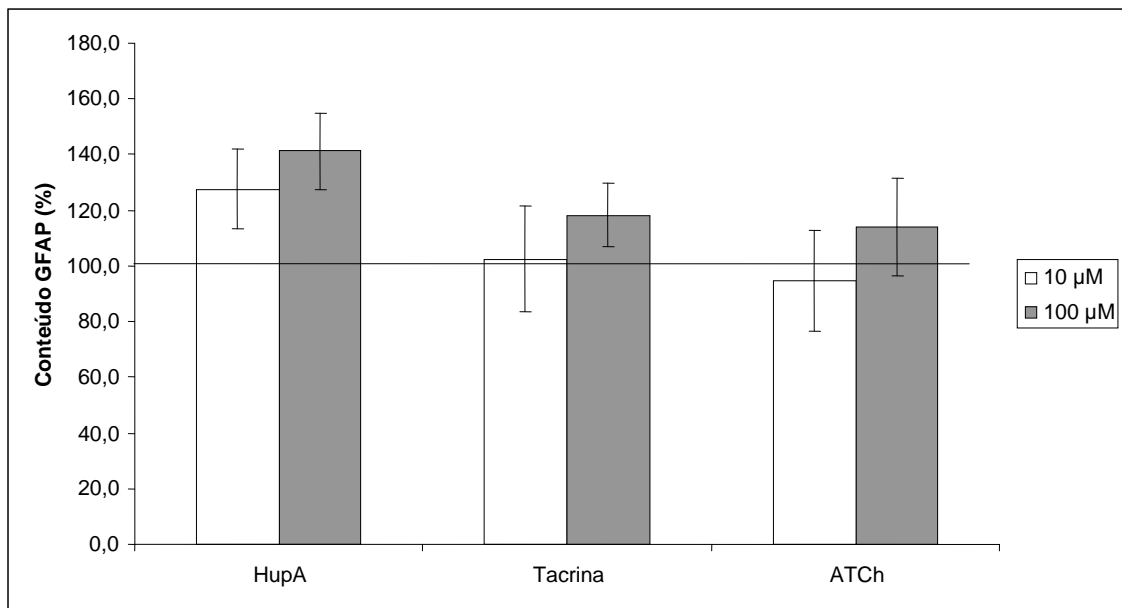


Figura 8. Efeito da HupA, tacrina e ATCh (10 e 100 μ M), sobre conteúdo de GFAP em cultura primária de astrócitos durante 24 h. A secreção basal (considerada 100%) é representada pela linha contínua. Os dados representam a média da porcentagem \pm EP de 5 a 11 experimentos independentes cada qual em triplicata; ANOVA/Duncan para $P < 0,05$.

5. Discussão

5.1 A HupA em concentração de 100 μ M afeta a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e fatias de hipocampo de maneira diferente

Este trabalho mostrou pela primeira vez os efeitos do alcalóide HupA sobre a secreção da proteína S100B em cultura primária de astrócitos e fatias de hipocampo. A HupA já foi testada em outros modelos biológicos *in vitro*, em estudos com diferentes abordagens. Grande parte destes estudos foram desenvolvidos em culturas de linhagens neuronais tais como células feocromocitoma PC12 (Xiao *et al.* 1999, Wang *et al.* 2001), neuroblastoma NG108-15 (Zhang *et al.* 2002a), células SK-N-SH (Peng *et al.* 2007) e células SHSY5Y (Tang *et al.* 2005b), entre outras. Apenas um trabalho relacionou os efeitos da HupA em cultura primária de astrócitos, relacionando seu efeito sobre a secreção do fator de crescimento neuronal (NGF, do inglês “neuronal growth factor”). Neste trabalho, a HupA aumentou tanto a proteína quanto o RNAm do NGF (Tang *et al.* 2005a).

Apesar de sua função básica como inibidores de AChE, estudos vêm mostrando efeitos alternativos desses fármacos os quais não estão necessariamente relacionados com o mecanismo colinérgico (Pepeu & Giovannini 2009). Células astrogliais apresentam a maquinaria colinérgica diferente da neuronal, particularmente com relação aos subtipos de receptores (nicotínicos e muscarínicos) (Xiu *et al.* 2005, Shelton & McCarthy 2000, Guizzetti *et al.* 2008) e possíveis isoformas da AChE, as quais não apresenta atividade catalítica relevante mesmo se comparada a outros tipos celulares não-neuronais (Thullbery *et al.* 2005).

O efeito da HupA a 100 μ M mostrou aumento da secreção da proteína S100B em cultura primária de astrócitos e redução em fatias hipocámpais durante tratamento por 1 h em relação à concentração basal. Porém, não se sabe se este efeito nestas preparações é dependente de sua atividade anticolinesterásica. Possivelmente não, já que a tacrina na mesma concentração e por também apresentar uma atividade anticolinesterásica não estimulou a secreção de S100B. A diferença no perfil de secreção de S100B nestas duas preparações já foi observada em outros trabalhos desenvolvidos no nosso grupo com lipopolissacarídeo (LPS) (Guerra M.C., Dissertação de Mestrado) e endotelina-1 (Leite *et al.* 2009).

É importante destacar que essa alta concentração da HupA em 1 h não

compromete a viabilidade celular e já foi testada anteriormente em outros trabalhos, destacando seu efeito neuroprotetor nos quais provou inibir de modo dose-dependente a produção de óxido nítrico (NO) (Zhao & Li 1999) e também protegeu células neuronais da toxicidade induzida por glutamato (Wang *et al.* 1999, Zhang *et al.* 2002b).

5.2 Acetilcolina (ATCh) aumenta a secreção de S100B

Curiosamente, a ATCh usada como substrato para medir a atividade da AChE foi capaz de causar a secreção de S100B em cultura de astrócitos de maneira similar à HupA. Este dado mostra pela primeira vez que a ativação colinérgica pode causar um aumento da secreção de S100B diferentemente da ativação por receptores serotoninérgicos (Tramontina *et al.* 2008) ou da estimulação com altas concentrações de glutamato que leva à redução da secreção de S100B (Goncalves *et al.* 2002). No entanto, esta possibilidade merece ser mais investigada com acetilcolina (ACh) e detalhada com agonistas e antagonistas específicos em trabalhos futuros.

O efeito da ATCh poderia envolver ambos receptores cuja transdução envolva aumento do AMPc ou mobilização do cálcio intracelular apontados como mecanismos envolvidos na secreção de S100B (Davey *et al.* 2001, Pinto *et al.* 2000). A mobilização colinérgica de Ca^{2+} citoplasmático, tanto muscarínica quanto nicotínica, tem sido observada em astrócitos (Xiu *et al.* 2005, Pap *et al.* 2009).

5.4 A diferença entre secreção e expressão de S100B em astrócitos

Após 24 h de tratamento, as culturas de astrócitos foram analisadas quanto a secreção e expressão de S100B sob ação de HupA, ATCh e tacrina, nas concentrações de 10 e 100 μ M. É válido notar que após este período de tratamento não detectamos efeito relevante na secreção com nenhum dos compostos testados. Todavia, tacrina na concentração de 100 μ M reduziu o conteúdo intracelular de S100B. Este efeito não foi observado com HupA e ATCh. O significado funcional deste achado com tacrina merece mais investigação. Cabe enfatizar que um composto denominado ácido arúndico, o qual reduz a expressão de S100B também tem sido proposto como neuroprotetor do SNC (Asano *et al.* 2005).

Outro aspecto interessante a ser destacado é de que as mudanças na secreção de S100B com HupA e ATCh não foram acompanhadas de mudanças no conteúdo

intracelular de S100B e ainda, a mudança de conteúdo da S100B com tacrina não seguiu a mudança na secreção. Estes dados reforçam a idéia de que a variação do conteúdo intracelular e a secreção de S100B não estejam necessariamente associados (Leite *et al.* 2006, Nardin *et al.* 2007, Goncalves *et al.* 2008).

5.5 HupA, ATCh e tacrina não provocaram mudança no conteúdo de GFAP

A GFAP é comumente usada como marcador de astrogliose e/ou ativação astrogliar (Jesse *et al.* 2009, Tilleux *et al.* 2007, Wharton *et al.* 2009). Culturas primárias de astrócitos tratadas com HupA, ATCh e tacrina por 24 h não mostraram mudanças no conteúdo de GFAP, indicando que a ativação glial não está ocorrendo. No entanto, tem sido observado que muitos outros marcadores específicos da atividade astrogliar, como por exemplo a captação de glutamato ou a síntese de glutathione, podem também indicar uma resposta glial e não necessariamente precisam estar acompanhado de uma mudança no conteúdo de GFAP (Liberto *et al.* 2004). Portanto, outros parâmetros poderão nos dizer se houve ou não uma ativação ou resposta glial. Cabe mencionar que a secreção de S100B claramente pode indicar esta resposta ou ativação deste tipo celular. Além disso, é importante mencionar que preliminarmente observamos uma aumento da captação de glutamato com HupA em fatias hipocâmpais (dados não mostrados).

5.6 As concentrações usadas não causaram morte nem alteraram a viabilidade celular

Dois procedimentos foram usados para avaliar a integridade e viabilidade das preparações. A medida de LDH é comumente usada como marcador de integridade celular justamente por ser uma proteína de alto peso molecular e sua saída ao meio extracelular depende de uma perda na integridade de membrana. De fato, nas concentrações usadas com HupA, tacrina e ATCh, não observamos mudança na integridade. Além disso, o ensaio de redução do MTT usado como marcador de viabilidade celular mostrou que ambas as preparações não eram afetadas pelos compostos testados.

6. Conclusões

Os dados deste trabalho indicam que a HupA modula a secreção de S100B e permite especular que talvez isto esteja envolvido em um possível mecanismo neuroprotetor deste composto. A secreção de S100B avaliada nas duas preparações (cultura primária de astrócitos e fatias de hipocampo) mostrou adequada integridade e viabilidade celular. Além disso, os dados evidenciam, pela primeira vez, a possibilidade de modulação colinérgica na secreção de S100B.

7. Perspectivas

Este trabalho abre oportunidade para muitas perspectivas. As mais imediatas seriam:

- detalhar o efeito de agonistas e antagonistas colinérgicos sobre a secreção S100B nas preparações estudadas;
- realizar captação de glutamato e quantificação de glutathiona reduzida (GSH) como medida da ativação astrogliar.

8. Referências bibliográficas

- Abramov, A. Y., Canevari, L. and Duchen, M. R. (2003) Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci*, **23**, 5088-5095.
- Abramov, A. Y. and Duchen, M. R. (2005) The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **360**, 2309-2314.
- Adami, C., Sorci, G., Blasi, E., Agneletti, A. L., Bistoni, F. and Donato, R. (2001) S100B expression in and effects on microglia. *Glia*, **33**, 131-142.
- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C. and Kriegstein, J. (2000) S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*, **858**, 121-128.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raft, M., Roberts, K. and Walter, P., (2002) The cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell*, edited by Garland Publishing, New York, p. 780-820.
- Amara, G., Saada, W., Ben Nasr, S. and Ben Hadj Ali, B. (2010) [Cholinesterase inhibitors and depression in the elderly.]. *Encephale*, **36**, 77-81.
- Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F. and Donato, R. (2005) S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation. *J Biol Chem*, **280**, 4402-4414.
- Arushanian, E. B. and Beier, E. V. (2008) [Ginkgo Biloba as a cognitive enhancer]. *Eksp Klin Farmakol*, **71**, 57-63.
- Asano, T., Mori, T., Shimoda, T. et al. (2005) Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **4**, 127-142.
- Bartus, R. T., Dean, R. L. and Beer, B. (1982) Neuropeptide effects on memory in aged monkeys. *Neurobiol Aging*, **3**, 61-68.
- Belanger, M. and Magistretti, P. J. (2009) The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci*, **11**, 281-295.
- Berger-Sweeney, J., Stearns, N. A., Murg, S. L., Floerke-Nashner, L. R., Lappi, D. A. and Baxter, M. G. (2001) Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J Neurosci*, **21**, 8164-8173.
- Birks, J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005593.
- Bleich, S., Romer, K., Wiltfang, J. and Kornhuber, J. (2003) Glutamate and the

- glutamate receptor system: a target for drug action. *Int J Geriatr Psychiatry*, **18**, S33-40.
- Buyukuysal, R. L. (2005) Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*, **47**, 580-588.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J. M. et al. (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol*, **165**, 1289-1300.
- Chen, J. and Regan, R. F. (2004) Heme oxygenase-2 gene deletion increases astrocyte vulnerability to hemin. *Biochem Biophys Res Commun*, **318**, 88-94.
- Cheng, D. H., Ren, H. and Tang, X. C. (1996) Huperzine A, a novel promising acetylcholinesterase inhibitor. *Neuroreport*, **8**, 97-101.
- Chow, S., Yu, D., MacDonald, C.L., Buibas, M. and Silva, G. (2010). Amyloid β -peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes. *ASN NEURO* 2(I):art:e00026.doi:10.1042/AN20090035.
- Condorelli, D. F., Conti, F., Gallo, V., Kirchhoff, F., Seifert, G., Steinhauser, C., Verkhratsky, A. and Yuan, X. (1999) Expression and functional analysis of glutamate receptors in glial cells. *Adv Exp Med Biol*, **468**, 49-67.
- Curtis-Prior, P., Vere, D. and Fray, P. (1999) Therapeutic value of Ginkgo biloba in reducing symptoms of decline in mental function. *J Pharm Pharmacol*, **51**, 535-541.
- Davey, G. E., Murmann, P. and Heizmann, C. W. (2001) Intracellular Ca^{2+} and Zn^{2+} levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*, **276**, 30819-30826.
- Davies, P. and Maloney, A. J. (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, **2**, 1403.
- Delacourte, A. and Defossez, A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci*, **76**, 173-186.
- DeWitt, D. A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C. and Silver, J. (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, **149**, 329-340.
- Dickson, D. W. (2009) Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders. *Int J Clin Exp Pathol*, **3**, 1-23.
- Donato, H., Jr., Mani, R. S. and Kay, C. M. (1991) Spectral [corrected] studies on the cadmium-ion-binding properties of bovine brain S-100b protein. *Biochem J*, **276**

(Pt 1), 13-18.

- Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 637-668.
- Donato, R. (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, **60**, 540-551.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 1008-1022.
- Dotigny, F., Ben Amor, A. Y., Burke, M. and Vaucher, E. (2008) Neuromodulatory role of acetylcholine in visually-induced cortical activation: behavioral and neuroanatomical correlates. *Neuroscience*, **154**, 1607-1618.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. and Lee, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*, **25**, 1439-1451.
- Erkinjuntti, T., Gauthier, S., Bullock, R., Kurz, A., Hammond, G., Schwalen, S., Zhu, Y. and Brashear, R. (2008) Galantamine treatment in Alzheimer's disease with cerebrovascular disease: responder analyses from a randomized, controlled trial (GAL-INT-6). *J Psychopharmacol*, **22**, 761-768.
- Fellin, T. (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem*, **108**, 533-544.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C. et al. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, **366**, 2112-2117.
- Francis, P. T., Nordberg, A. and Arnold, S. E. (2005) A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 104-111.
- Francis, P. T., Ramirez, M. J. and Lai, M. K. (2010) Neurochemical basis for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*.
- Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A. and Verkhratsky, A. (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ*, **14**, 1324-1335.
- Glenner, G. G., Wong, C. W., Quaranta, V. and Eanes, E. D. (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol*, **2**, 357-369.
- Gomes, F. C., Paulin, D. and Moura Neto, V. (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*, **32**, 619-631.

- Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, **41**, 755-763.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S. and Goncalves, C. A. (2002) High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport*, **13**, 1533-1535.
- Gottfried, C. (1996) Dissociação celular e cultura de astrócitos de hipocampo: padronização metodológica e análise eletroforética do perfil fosfoprotéico. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre.
- Gottfried, C., Valentim, L., Salbego, C., Karl, J., Wofchuk, S. T. and Rodnight, R. (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res*, **833**, 142-149.
- Griffin, W. S., Sheng, J. G., Gentleman, S. M., Graham, D. I., Mrak, R. E. and Roberts, G. W. (1994) Microglial interleukin-1 alpha expression in human head injury: correlations with neuronal and neuritic beta-amyloid precursor protein expression. *Neurosci Lett*, **176**, 133-136.
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., White, C. L., 3rd and Araoz, C. (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7611-7615.
- Guizzetti, M., Moore, N. H., Giordano, G. and Costa, L. G. (2008) Modulation of neurogenesis by astrocyte muscarinic receptors. *J Biol Chem*, **283**, 31884-31897.
- Halassa, M. M., Fellin, T. and Haydon, P. G. (2009) Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology*, **57**, 343-346.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, **119**, 203-210.
- Hansen, R. A., Gartlehner, G., Webb, A. P., Morgan, L. C., Moore, C. G. and Jonas, D. E. (2008) Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*, **3**, 211-225.
- Hansson, E. and Ronnback, L. (2003) Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J*, **17**, 341-348.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K. and Ihara,

- Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*, **267**, 17047-17054.
- Heizmann, C. W. (1999) Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res*, **24**, 1097-1100.
- Heizmann, C. W. (2002) The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol*, **172**, 69-80.
- Hughes, E. G., Elmariah, S. B. and Balice-Gordon, R. J. (2010) Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci*, **43**, 136-145.
- Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R. and Rauvala, H. (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*, **275**, 40096-40105.
- Hynd, M. R., Scott, H. L. and Dodd, P. R. (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, **45**, 583-595.
- Isobe, T. and Okuyama, T. (1978) The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem*, **89**, 379-388.
- Jellinger, K. A. (2006) Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly--an update. *J Alzheimers Dis*, **9**, 61-70.
- Jesse, S., Steinacker, P., Cepek, L., von Arnim, C. A., Tumani, H., Lehnert, S., Kretschmar, H. A., Baier, M. and Otto, M. (2009) Glial fibrillary acidic protein and protein S-100B: different concentration pattern of glial proteins in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Alzheimers Dis*, **17**, 541-551.
- Knapp, M. J., Knopman, D. S., Solomon, P. R., Pendlebury, W. W., Davis, C. S. and Gracon, S. I. (1994) A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *JAMA*, **271**, 985-991.
- Knopman, D., Schneider, L., Davis, K., Talwalker, S., Smith, F., Hoover, T. and Gracon, S. (1996) Long-term tacrine (Cognex) treatment: effects on nursing home placement and mortality, Tacrine Study Group. *Neurology*, **47**, 166-177.
- Kogel, D., Peters, M., König, H. G., Hashemi, S. M., Bui, N. T., Arolt, V., Rothermundt, M. and Prehn, J. H. (2004) S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*, **127**, 913-920.

- LaFerla, F. M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 862-872.
- Lee, S. T., Chu, K., Sim, J. Y., Heo, J. H. and Kim, M. (2008) Panax ginseng enhances cognitive performance in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **22**, 222-226.
- Leite, M. C., Brolese, G., de Almeida, L. M., Pinero, C. C., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull*, **70**, 179-185.
- Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*, **169**, 93-99.
- Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*, **87**, 2439-2446.
- Li, W. M., Kan, K. K., Carlier, P. R., Pang, Y. P. and Han, Y. F. (2007) East meets West in the search for Alzheimer's therapeutics - novel dimeric inhibitors from tacrine and huperzine A. *Curr Alzheimer Res*, **4**, 386-396.
- Liberto, C. M., Albrecht, P. J., Herx, L. M., Yong, V. W. and Levison, S. W. (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem*, **89**, 1092-1100.
- Lindner, M. D., Hogan, J. B., Hodges, D. B., Jr. et al. (2006) Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. *Psychopharmacology (Berl)*, **188**, 629-640.
- Marshak, D. R., Pesce, S. A., Stanley, L. C. and Griffin, W. S. (1992) Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging*, **13**, 1-7.
- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N. and Beyreuther, K. (1985) Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J*, **4**, 2757-2763.
- Michaelis, M. L. (2003) Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. *J Pharmacol Exp Ther*, **304**, 897-904.
- Mohs, R. C. and Davis, K. L. (1982) A signal detectability analysis of the effect of physostigmine on memory in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **3**, 105-110.
- Morrison, J. H. and Hof, P. R. (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science*, **278**, 412-419.

- Mrak, R. E., Sheng, J. G. and Griffin, W. S. (1996) Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, **55**, 273-279.
- Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V. and Wang, H. Y. (2003) Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res*, **971**, 197-209.
- Nagele, R. G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H. and Wang, K. C. (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **25**, 663-674.
- Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M. C., Tramontina, A. C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L. M., Battastini, A. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int*, **50**, 774-782.
- Nishikawa, T., Lee, I. S., Shiraishi, N., Ishikawa, T., Ohta, Y. and Nishikimi, M. (1997) Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem*, **272**, 23037-23041.
- Nussbaum, R. L. and Ellis, C. E. (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med*, **348**, 1356-1364.
- Onor, M. L., Trevisiol, M. and Aguglia, E. (2007) Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clin Interv Aging*, **2**, 17-32.
- Pamplona, R., Dalfo, E., Ayala, V., Bellmunt, M. J., Prat, J., Ferrer, I. and Portero-Otin, M. (2005) Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem*, **280**, 21522-21530.
- Pap, P., Koszeghy, A., Szucs, G. and Rusznak, Z. (2009) Cytoplasmic Ca(2+) concentration changes evoked by cholinergic stimulation in primary astrocyte cultures prepared from the rat cochlear nucleus. *Hear Res*, **255**, 73-83.
- Parri, H. R., Gould, T. M. and Crunelli, V. (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci*, **4**, 803-812.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T. and Carmignoto, G. (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*, **17**, 7817-7830.
- Pekny, M. and Pekna, M. (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, **204**, 428-437.
- Peng, Y., Lee, D. Y., Jiang, L., Ma, Z., Schachter, S. C. and Lemere, C. A. (2007) Huperzine A regulates amyloid precursor protein processing via protein kinase C and mitogen-activated protein kinase pathways in neuroblastoma SK-N-SH cells over-expressing wild type human amyloid precursor protein 695.

Neuroscience, **150**, 386-395.

- Pepeu, G. and Giovannini, M. G. (2009) Cholinesterase inhibitors and beyond. *Curr Alzheimer Res*, **6**, 86-96.
- Perea, G., Navarrete, M. and Araque, A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, **32**, 421-431.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J. and Perry, R. (1999) Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci*, **22**, 273-280.
- Perry, E. K., Perry, R. H., Gibson, P. H., Blessed, G. and Tomlinson, B. E. (1977) A cholinergic connection between normal aging and senile dementia in the human hippocampus. *Neurosci Lett*, **6**, 85-89.
- Peskind, E. R., Griffin, W. S., Akama, K. T., Raskind, M. A. and Van Eldik, L. J. (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, **39**, 409-413.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, **83**, 346-356.
- Pinto, S. S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C. A., Wofchuk, S. and Rodnight, R. (2000) Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett*, **486**, 203-207.
- Raves, M. L., Harel, M., Pang, Y. P., Silman, I., Kozikowski, A. P. and Sussman, J. L. (1997) Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat Struct Biol*, **4**, 57-63.
- Rodnight, R., Goncalves, C. A., Wofchuk, S. T. and Leal, R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*, **30**, 325-338.
- Rodriguez, J. J., Olabarria, M., Chvatal, A. and Verkhratsky, A. (2009) Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*, **16**, 378-385.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H. and Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*, **60**, 614-632.
- Scemes, E. and Giaume, C. (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, **54**, 716-725.
- Schafer, B. W. and Heizmann, C. W. (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, **21**, 134-140.
- Shelton, M. K. and McCarthy, K. D. (2000) Hippocampal astrocytes exhibit Ca²⁺-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J*

Neurochem, **74**, 555-563.

- Sheng, J. G., Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (1994) S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J Neurosci Res*, **39**, 398-404.
- Sheng, J. G., Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (1997) Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages. *J Neuropathol Exp Neurol*, **56**, 285-290.
- Strong, R., Huang, J. S., Huang, S. S., Chung, H. D., Hale, C. and Burke, W. J. (1991) Degeneration of the cholinergic innervation of the locus ceruleus in Alzheimer's disease. *Brain Res*, **542**, 23-28.
- Struzynska, L. (2009) A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochem Int*, **55**, 151-156.
- Summers, W. K., Majovski, L. V., Marsh, G. M., Tachiki, K. and Kling, A. (1986) Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med*, **315**, 1241-1245.
- Takano, T., Tian, G. F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X. and Nedergaard, M. (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*, **9**, 260-267.
- Tang, L. L., Wang, R. and Tang, X. C. (2005a) Effects of huperzine A on secretion of nerve growth factor in cultured rat cortical astrocytes and neurite outgrowth in rat PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin*, **26**, 673-678.
- Tang, L. L., Wang, R. and Tang, X. C. (2005b) Huperzine A protects SHSY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress damage via nerve growth factor production. *Eur J Pharmacol*, **519**, 9-15.
- Tang, X. C., De Sarno, P., Sugaya, K. and Giacobini, E. (1989) Effect of huperzine A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat. *J Neurosci Res*, **24**, 276-285.
- Tang, X. C., Han, Y. F., Chen, X. P. and Zhu, X. D. (1986) [Effects of huperzine A on learning and the retrieval process of discrimination performance in rats]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **7**, 507-511.
- Tang, X. C., Kindel, G. H., Kozikowski, A. P. and Hanin, I. (1994) Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine-A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*, **44**, 147-155.
- Terry, A. V., Jr. and Buccafusco, J. J. (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther*, **306**, 821-827.
- Thullbery, M. D., Cox, H. D., Schule, T., Thompson, C. M. and George, K. M. (2005)

- Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells. *J Cell Biochem*, **96**, 599-610.
- Tilleux, S., Berger, J. and Hermans, E. (2007) Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. *J Neuroimmunol*, **189**, 23-30.
- Toyota, Y., Ikeda, M., Shinagawa, S. et al. (2007) Comparison of behavioral and psychological symptoms in early-onset and late-onset Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, **22**, 896-901.
- Tramontina, A. C., Tramontina, F., Bobermin, L. D., Zanotto, C., Souza, D. F., Leite, M. C., Nardin, P., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **32**, 1580-1583.
- Van Eldik, L. J. and Wainwright, M. S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, **21**, 97-108.
- Ved, H. S., Koenig, M. L., Dave, J. R. and Doctor, B. P. (1997) Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. *Neuroreport*, **8**, 963-968.
- Verkhatsky, A. and Toescu, E. C. (2006) Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration. *J Cell Mol Med*, **10**, 826-836.
- Wang, H. and Tang, X. C. (1998) Anticholinesterase effects of huperzine A, E2020, and tacrine in rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **19**, 27-30.
- Wang, L., Harms, M. P., Staggs, J. M., Xiong, C., Morris, J. C., Csernansky, J. G. and Galvin, J. E. (2010) Donepezil treatment and changes in hippocampal structure in very mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*, **67**, 99-106.
- Wang, R., Xiao, X. Q. and Tang, X. C. (2001) Huperzine A attenuates hydrogen peroxide-induced apoptosis by regulating expression of apoptosis-related genes in rat PC12 cells. *Neuroreport*, **12**, 2629-2634.
- Wang, X. D., Zhang, J. M., Yang, H. H. and Hu, G. Y. (1999) Modulation of NMDA receptor by huperzine A in rat cerebral cortex. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **20**, 31-35.
- Wang, Y. E., Feng, J., Lu, W. H. and Tang, X. C. (1988) [Pharmacokinetics of huperzine A in rats and mice]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **9**, 193-196.
- Wang, Y. E., Yue, D. X. and Tang, X. C. (1986) [Anti-cholinesterase activity of huperzine A]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **7**, 110-113.

- Wharton, S. B., O'Callaghan, J. P., Savva, G. M. et al. (2009) Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **27**, 465-473.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Murphy, R. and Azmitia, E. C. (1990) Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res*, **528**, 155-158.
- Wisniewski, H. M. and Wegiel, J. (1991) Spatial relationships between astrocytes and classical plaque components. *Neurobiol Aging*, **12**, 593-600.
- Wofchuk, S. T. and Rodnight, R. (1995) Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, **85**, 181-186.
- Xiao, X. Q., Yang, J. W. and Tang, X. C. (1999) Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neurosci Lett*, **275**, 73-76.
- Xiu, J., Nordberg, A., Zhang, J. T. and Guan, Z. Z. (2005) Expression of nicotinic receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the alpha7, alpha4 and beta2 subunits in response to nanomolar concentrations of the beta-amyloid peptide(1-42). *Neurochem Int*, **47**, 281-290.
- Yamaguchi, Y., Higashi, M. and Kobayashi, H. (1997) Effects of ginsenosides on maze performance and brain choline acetyltransferase activity in scopolamine-treated young rats and aged rats. *Eur J Pharmacol*, **329**, 37-41.
- Zangara, A. (2003) The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, **75**, 675-686.
- Zarrindast, M. R., Eidi, M., Eidi, A. and Oryan, S. (2002) Effects of histamine and opioid systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Eur J Pharmacol*, **452**, 193-197.
- Zhang, H. Y., Liang, Y. Q., Tang, X. C., He, X. C. and Bai, D. L. (2002a) Stereoselectivities of enantiomers of huperzine A in protection against beta-amyloid(25-35)-induced injury in PC12 and NG108-15 cells and cholinesterase inhibition in mice. *Neurosci Lett*, **317**, 143-146.
- Zhang, H. Y. and Tang, X. C. (2006) Neuroprotective effects of huperzine A: new therapeutic targets for neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 619-625.
- Zhang, H. Y., Zheng, C. Y., Yan, H., Wang, Z. F., Tang, L. L., Gao, X. and Tang, X. C. (2008) Potential therapeutic targets of huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chem Biol Interact*, **175**, 396-402.
- Zhang, J. M. and Hu, G. Y. (2001) Huperzine A, a nootropic alkaloid, inhibits N-methyl-D-aspartate-induced current in rat dissociated hippocampal neurons.

Neuroscience, **105**, 663-669.

Zhang, Y. H., Zhao, X. Y., Chen, X. Q., Wang, Y., Yang, H. H. and Hu, G. Y. (2002b) Spermidine antagonizes the inhibitory effect of huperzine A on [3H]dizocilpine (MK-801) binding in synaptic membrane of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*, **319**, 107-110.

Zhao, H. W. and Li, X. Y. (1999) Ginkgolide A, B, and huperzine A inhibit nitric oxide production from rat C6 and human BT325 glioma cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **20**, 941-943.

Zhong, Y. M., Nishijo, H., Uwano, T., Tamura, R., Kawanishi, K. and Ono, T. (2000) Red ginseng ameliorated place navigation deficits in young rats with hippocampal lesions and aged rats. *Physiol Behav*, **69**, 511-525.

Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A. and Song, W. (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*, **37**, 417-429.