

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

**RESVERATROL MODULA A SECREÇÃO DA PROTEÍNA S100B  
EM CÉLULAS ASTROGLIAIS EXPOSTAS À AMÔNIA**

**Larissa Daniele Bobermin**

**Orientadora: Profa. Carmem Gottfried**

**Co-orientador: Prof. Flávio Pereira Kapczinski**

Porto Alegre

2011

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

**RESVERATROL MODULA A SECREÇÃO DA PROTEÍNA S100B EM  
CÉLULAS ASTROGLIAIS EXPOSTAS À AMÔNIA**

**Larissa Daniele Bobermin**

**Orientadora: Profa. Carmem Gottfried**

**Co-orientador: Prof. Flávio Pereira Kapczinski**

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

2011

*“Devemos medir o serviço não pelas coisas  
feitas, mas pelas dificuldades vencidas”.*

*John R. Mott*

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Cláudio e Nelci, meus maiores incentivadores.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Carmem, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e por ter me aberto as portas do laboratório e da pesquisa.

Ao CA, por sua atenção, disposição em ensinar e pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao André, meu eterno “chefe”, pelo exemplo de dedicação e competência. Por tudo que me ensinou nesses poucos, mas intensos, anos de trabalho. Agradeço imensamente por toda a ajuda, empenho e afeição ao meu mestrado, essenciais para que tudo fosse possível. Mas, acima de tudo, agradeço pela grande amizade, cumplicidade e companheirismo, na Bioquímica e pelo mundo!

Às queridas Marina e Maria Cristina, pela amizade, compreensão, apoio, colaboração neste trabalho e disposição para ajudar no laboratório.

A todos os colegas do Lab 33 pela amizade, coleguismo, auxílio e agradável convivência. Obrigada por tornarem os dias de trabalho muito mais divertidos!

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Aos meus colegas Biomédicos, pela amizade, mesmo com uma menor convivência após a formatura. Em especial ao Gabriel, pela companhia em almoços, conversas e grandes favores! Também à Bianca, por sua disposição em ajudar e pelos divertidos “happy hours”.

Aos meus familiares pela ajuda, carinho e bons momentos proporcionados.

Aos meus pais, Cláudio e Nelci, que nunca mediram esforços para que eu estudasse e buscasse meus objetivos, por serem meus maiores incentivadores e por acreditarem em mim. Obrigada pelo amor, carinho e doação, por estarem sempre presentes e me apoiarem em todos os momentos.

## SUMÁRIO

Parte I	1
Resumo	2
Abstract	3
Lista de Abreviaturas	4
Introdução	6
1. Astrócitos	6
2. Marcadores gliais em astrócitos	8
2.1 Proteína Glial Fibrilar Ácida	8
2.2 Proteína S100B	9
2.2.1 Atividades intracelulares	11
2.2.2 Atividades extracelulares	11
2.2.3 Secreção de S100B	12
3. Células Astrogliais C6	13
4. Amônia	14
4.1 Hiperamonemia e SNC	15
5. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	18
6. Resveratrol	19
Objetivos	24
Parte II	25
Manuscrito a ser submetido	26
Parte III	59
Discussão	60
Conclusões	71
Referências	72

# PARTE I

## RESUMO

A amônia é uma neurotoxina implicada em desordens metabólicas cerebrais associadas com hiperamonemia. A neurotoxicidade aguda da amônia pode ser mediada por mecanismos excitotóxicos envolvendo o sistema glutamatérgico, incluindo a ativação do receptor NMDA e o subsequente aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . O estresse oxidativo está relacionado à neurotoxicidade da amônia e o óxido nítrico parece estar envolvido nesta condição. Os astrócitos desempenham um papel essencial na proteção dos neurônios contra excitotoxicidade por captar o excesso de amônia e glutamato e convertê-los em glutamina, usando a enzima glutamina sintetase, e também protegendo contra o estresse oxidativo. A proteína S100B, particularmente a S100B extracelular, é usada como parâmetro de ativação ou comprometimento em várias situações de dano cerebral, incluindo hiperamonemia. Antioxidantes, como o resveratrol, apresentam muitos efeitos biológicos, incluindo a modulação de parâmetros gliais como a captação de glutamato, a atividade da glutamina sintetase e a secreção de S100B. Neste estudo, foi investigado o efeito de antioxidantes sobre a secreção de S100B induzida pela amônia em células astrogliais. O resveratrol foi capaz de prevenir o aumento da secreção de S100B, após 24 h de exposição à amônia, provavelmente via inibição de óxido nítrico e proteína cinase A (PKA). Então, o resveratrol pode ser um possível agente protetor contra a neurotoxicidade induzida pela amônia.



## **ABSTRACT**

Ammonia is a neurotoxin implicated in brain metabolic disorders associated with hyperammonemia. Acute ammonia neurotoxicity can be mediated by excitotoxic mechanism involving glutamatergic system, including NMDA receptor activation and subsequent increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Oxidative stress is related to ammonia neurotoxicity and nitric oxide can be involved in this condition. Astrocytes play an essential role in protecting neurons against excitotoxicity uptake excess ammonia and glutamate and converting it into glutamine, using enzyme glutamine synthetase and also protected against oxidative stress. S100B protein, particularly extracellular S100B, is used as a parameter of glial activation or commitment in several situations of brain injury, including hyperammonemia. Antioxidants, such as resveratrol, showed many biological effects, including modulation of glial parameters as glutamate uptake, glutamine synthetase activity and S100B secretion. In this study, we investigated the effect of antioxidants on S100B secretion induced by ammonia in astroglial cells. Resveratrol was able to prevent the increase of S100B secretion, after 24 h ammonia exposure, probably via nitric oxide and protein kinase A (PKA) inhibition. Then, resveratrol may be a possible protective agent against neurotoxicity induced by ammonia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EAAT	Transportadore de Aminoácidos Excitatórios
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GLAST	Transportador Glutamato-aspartato
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutathiona
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
L-NAME	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
NFκB	Fator Nuclear da Cadeia κ de Linfócitos B
NH <sub>3</sub>	Amônia
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íon amônio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PKA	Proteína Cinase A
RAGE	Receptor de Produtos Finais Avançados de Glicação

RL	Radicais Livres
SIRT	Sirtuínas
SNC	Sistema Nervoso Central

## **INTRODUÇÃO**

### **1. Astrócitos**

Rudolf Virchow, em 1846, descreveu pela primeira vez a neuroglia e a retratou como células pequenas e de forma arredondada, que preenchem o espaço extracelular e fazem parte do tecido conectivo (Somjen, 1988). As células gliais são divididas em três categorias principais: (1) astrócitos e oligodendrócitos, ambos de origem ectodérmica, constituindo a macroglia; (2) a microglia, de origem mesodérmica; e (3) células ependimais, de origem ectodérmica (Perea & Araque, 2005; Young, 1991).

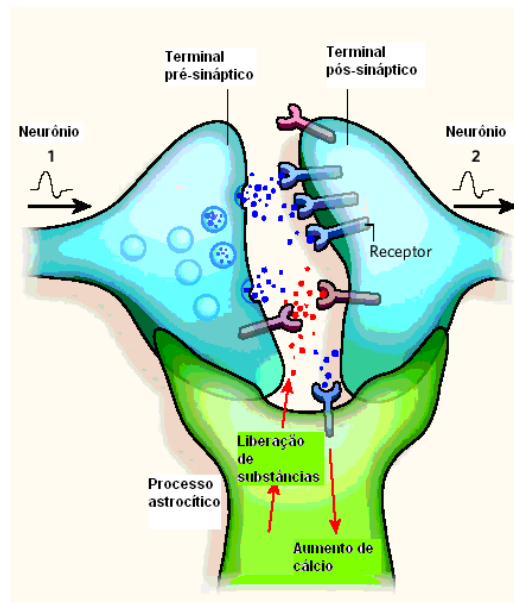
Os astrócitos são as células mais abundantes no Sistema Nervoso Central (SNC) e podem ser classificados em dois grupos: os astrócitos protoplasmáticos, que localizam-se na substância cinzenta e são caracterizados por processos curtos e ramificados, e os astrócitos fibrosos, que estão presentes na substância branca e emitem longos processos em muitas direções (Gee & Keller, 2005; Kimelberg & Norenberg, 1989; Pereira & Furlan, 2010).

Durante muito tempo os astrócitos foram considerados apenas como suporte estrutural para os neurônios. No entanto, estas células apresentam várias funções, dentre as quais se destacam:

- a. Síntese de proteínas da matriz extracelular, moléculas de adesão e fatores tróficos, que controlam a maturação neuronal e sinaptogênese (Jessen, 2004; Ransom et al, 2003; Van Eldik & Wainwright, 2003; Wang & Bordey, 2008)
- b. Formação e manutenção da barreira hematoencefálica (Nedergaard et al, 2003; Wang & Bordey, 2008);

- c. Tamponamento de íons extracelulares (Simard & Nedergaard, 2004);
- d. Captação de neurotransmissores, como glutamato e GABA (Danbolt, 2001; Gee & Keller, 2005; Jessen, 2004);
- e. Suporte metabólico pelo estoque de glicogênio, que quando necessário, pode ser degradado, fornecendo lactato aos neurônios (Brown & Ransom, 2007; Pellerin & Magistretti, 2004);
- f. Atuação na resposta imune cerebral, respondendo a danos por meio de respostas inflamatórias (Gee & Keller, 2005);
- g. Proteção contra agentes tóxicos para neurônios, como metais pesados e amônia (Rao et al, 2005; Struzynska et al, 2001).

Astrócitos podem fazer contato com sinapses de diferentes neurônios, e esta relação de proximidade levou ao termo sinapse *tripartite*, que reconhece o astrócito como o terceiro elemento da sinapse (Araque et al, 1999; Perea et al, 2009). Além disso, os astrócitos expressam receptores para neurotransmissores, que ativam cascatas de sinalização, fazendo com que haja liberação de substâncias neuroativas pelos astrócitos, sinalizando de volta para neurônios (Allen & Barres, 2009; Fellin & Carmignoto, 2004).



**Figura 1 – Sinapse *tripartite*.** Allen & Barres, 2009.

## 2. Marcadores gliais em astrócitos

Como anteriormente citado, os astrócitos participam de vários processos fisiológicos e metabólicos responsáveis pela manutenção da homeostase do SNC. O principal marcador astrocítico é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Um outro marcador bastante utilizado é a proteína S100B.

### 2.1. Proteína glial fibrilar ácida

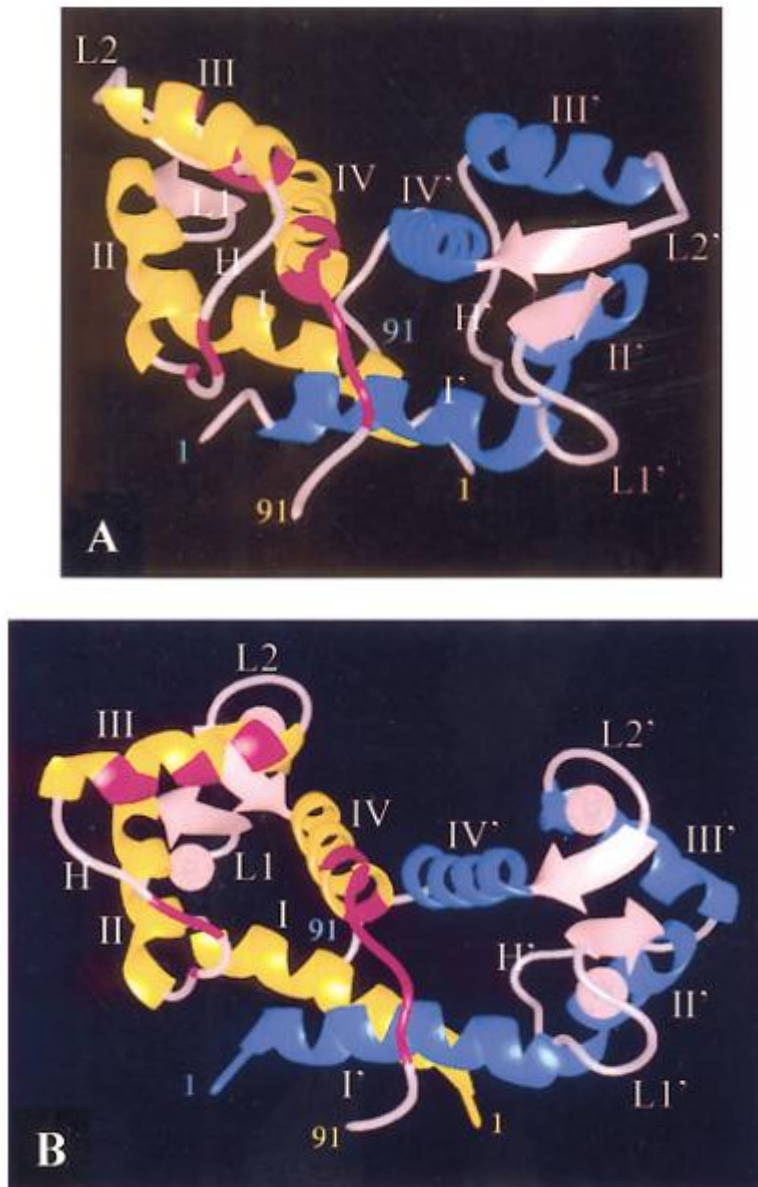
A GFAP é uma proteína de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial (Gomes et al, 1999; Liem & Messing, 2009; Rodnight et al, 1997). Inicialmente isolada de lesões cerebrais (placas) de pacientes com esclerose múltipla (Eng et al, 2000), a GFAP é reconhecida e amplamente utilizada como marcador de astrócitos e de tumores de linhagem astrocítica (Pekny & Pekna, 2004).

A GFAP possui peso molecular aparente de 50 kDa e, estruturalmente, apresenta uma cabeça amino-terminal (altamente básica), uma cauda carboxi-terminal (região responsável pela ligação entre os monômeros), ambas não-helicoidais, e uma porção central, composta por uma extensa  $\alpha$ -hélice, cuja sequência de aminoácidos é conservada em relação a outros tipos de proteínas componentes dos filamentos intermediários (Eng et al, 2000).

## **2.2. Proteína S100B**

A proteína S100B faz parte da família de proteínas ligantes de cálcio S100 (Donato, 2001). O primeiro membro identificado da família foi uma mistura não fracionada de S100B e S100A1, chamado “S100” devido a sua solubilidade em uma solução 100% saturada de sulfato de amônio (Moore, 1965). Atualmente, são conhecidos mais de 20 membros da família S100 nos mais diversos tipos celulares de vertebrados (Donato, 2003), os quais possuem aproximadamente 50% de homologia nas suas sequências de aminoácidos (Zimmer & Van Eldik, 1988).

A S100B é uma proteína do tipo EF-hand (*hélice-loop-hélice*), de 21 kDa. Estruturalmente, se apresenta como homodímeros constituídos por duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes dissulfeto, com dois sítos de ligação ao cálcio por monômero (Donato, 2003; Van Eldik & Wainwright, 2003).



**Figura 2 – Estrutura da proteína S100B.** (A) Dímero de S100B livre de cálcio. (B) Dímero de S100B ligado ao cálcio. Donato, 2003.

A S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos (Donato, 2001; Zimmer & Van Eldik, 1987). No entanto, sua expressão já foi identificada em outros tipos celulares, como em oligodendrócitos em maturação e certas populações neurais (Donato et al, 2009). Além de possuir alvos intracelulares,



a S100B exerce efeitos parácrinos, em neurônios e microglia, e autócrinos, em astrócitos (Donato et al, 2009; Ponath et al, 2007).

### **2.2.1. Atividades intracelulares**

A S100B se localiza no citoplasma, o que possibilita sua interação com diversas proteínas-alvo (Donato, 2003). Dentre as funções intracelulares exercidas pela S100B estão: modulação da polimerização do citoesqueleto (Donato, 1988; Garbuglia et al, 1999; Sorci et al, 2000), inibição da fosforilação de GFAP e vimentina, em cultura de astrócitos hipocampais (Frizzo et al, 2004), regulação da proliferação e diferenciação celular, homeostase do cálcio, fosforilação de proteínas, degradação de proteínas e a modulação de atividade enzimática e metabolismo (Donato et al, 2009).

### **2.2.2. Atividades extracelulares**

Extracelularmente, a proteína S100B pode ter efeitos tróficos ou tóxicos, dependendo de sua concentração. Níveis extracelulares de S100B na ordem nanomolar possuem efeitos neurotróficos, estimulando o crescimento e regeneração de neuritos, *in vitro* e *in vivo*, e aumentando a sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento e após dano (Donato et al, 2009; Van Eldik & Wainwright, 2003). Em baixas concentrações, a S100B também possui efeitos benéficos em astrócitos, estimulando sua proliferação, e em microglia, inibindo efeitos de neurotoxinas (Donato et al, 2009).

Em concentrações mais altas, variando entre altos valores nanomolar até micromolar, a S100B exerce efeitos tóxicos, tanto para a glia quanto para neurônios. Em astrócitos e microglia, estimula a produção e secreção de

citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e fator de necrose tumoral  $\alpha$ , além de estimular a produção de NO, através da indução da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esse conjunto de fatores pode levar à disfunção e até mesmo apoptose neuronal (Bianchi et al, 2010; Donato et al, 2009; Van Eldik & Wainwright, 2003).

Existem evidências de que os efeitos extracelulares da S100B sejam mediados por sua ligação ao RAGE (Donato, 2007; Hofmann et al, 1999), um receptor multiligante envolvido na transdução de estímulos inflamatórios e de diversos fatores tróficos e tóxicos (Donato, 2001).

### **2.2.3. Secreção de S100B**

Apesar de diversos papéis intra e extracelulares da S100B já terem sido descritos, o exato mecanismo pelo qual esta proteína é secretada ainda não foi elucidado. No entanto, vários moduladores da secreção de S100B são conhecidos, entre eles: glutamato, adenosina (Ciccarelli et al, 1999), estresse metabólico (Gerlach et al, 2006), neuroléptico risperidona (Quincozes-Santos et al, 2008), antioxidantes naturais (Abib et al, 2008; de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006) e amônia (Leite et al, 2006).

Existem evidências de que um aumento nos níveis intracelulares de AMPc (Goncalves et al, 2002) ou de cálcio intracelular (Davey et al, 2001) podem sinalizar para a liberação de S100B. Recentemente também foi demonstrado que a secreção de S100B, em culturas primárias de astrócitos e fatias hipocâmpais, é aumentada por bloqueadores de junções comunicantes (*gap junctions*) (Leite et al, 2009).

Sabe-se que o aumento da expressão de S100B não está diretamente relacionado com o aumento de sua secreção, pois nem toda S100B produzida é necessariamente exportada (Tramontina et al, 2002).

### **3. Células Astrogliais C6**

A linhagem C6 tem sua origem datada da década de 60, sendo uma das linhagens mais amplamente utilizadas em estudos neuroquímicos. Ela foi obtida após injeções em ratos do agente alquilante N-nitrosometilureia (Benda et al, 1968). A expressão das proteínas gliais GFAP e S100B atesta o seu caráter astrocítico (Benda et al, 1971).

Embora com algumas limitações, as células astrogliais C6 são um importante modelo de estudo para avaliação e regulação do crescimento celular, liberação de fatores tróficos, vias de transdução de sinal (Kim et al, 2006), e investigação de características bioquímicas e metabólicas que envolvam funções desempenhadas por astrócitos (Cechin et al, 2005; Feng & Zhang, 2004; Mangoura et al, 1989).

As células astrogliais C6 utilizadas nesta dissertação apresentam forte marcação para a proteína GFAP e vários trabalhos do nosso grupo mostram que elas exercem importantes funções astrocíticas como captação de glutamato, síntese de glutamina e expressão e secreção da proteína S100B (dos Santos et al, 2006; Funchal et al, 2005; 2007; Quincozes-Santos et al, 2008; 2009a).

#### 4. Amônia

A amônia é um metabólito normal de todos os tecidos, proveniente do metabolismo de aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Por ser um agente altamente neurotóxico, a remoção das quantidades excessivas de amônia torna-se crítica (Cooper & Plum, 1987; Felipo & Butterworth, 2002). Em solução aquosa, a amônia ( $\text{NH}_3$ ) está em equilíbrio com o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Em condições fisiológicas (pH 7,4), 98% está presente na forma protonada<sup>1</sup> (Bosoi & Rose, 2009; Bromberg et al, 1960; Felipo & Butterworth, 2002).

A concentração sérica de amônia é mantida baixa, na faixa de 0,05 a 0,1 mM, pelo fígado (Felipo & Butterworth, 2002). Nas células hepáticas, a amônia é convertida em uréia, através do ciclo da uréia, para posterior eliminação pelos rins (Morris, 2002) ou incorporada ao glutamato formando glutamina, por ação da enzima glutamina sintetase (GS) (Haussinger & Gerok, 1983; Stadlbauer et al, 2009).

A capacidade hepática reduzida para remoção da amônia associada com desordens inatas do ciclo da uréia ou doenças hepáticas adquiridas (hepatite, cirrose e doenças autoimunes) resultam em aumento da concentração sérica de amônia para até 0,2 mM (Felipo & Butterworth, 2002). A observação de que o estado hiperamonêmico está frequentemente acompanhado por disfunção neuropsicológica sugere que a amônia desempenha um papel patogênico principal no desenvolvimento desta disfunção, conhecida como encefalopatia hepática (Katayama, 2004). A encefalopatia hepática pode ser definida como um estado de perturbação da função do SNC associado a uma hepatopatia aguda ou crônica grave.

---

<sup>1</sup> O termo amônia é utilizado neste texto para se referir à amônia livre e protonada.

#### 4.1. Hiperamonemia e SNC

A amônia encontrada no SNC pode se originar de rotas enzimáticas cerebrais, principalmente da glutamato desidrogenase (que catalisa a desaminação oxidativa do glutamato) e também da glutaminase (que converte glutamato a glutamina, liberando amônia) (Felipo & Butterworth, 2002). Além disso, a amônia também pode ser proveniente da circulação. Considera-se que o transporte da amônia através da barreira hematoencefálica se deve à combinação da difusão passiva de  $\text{NH}_3$  e transporte de  $\text{NH}_4^+$  por canais de cátion (Ott et al, 2005) e por canais de aquaporina 8 (Saparov et al, 2007).

Em condições fisiológicas normais, a concentração de amônia no cérebro é aproximadamente 0,05 mM, podendo chegar até 5 mM em situações de hiperamonemia (Bosoi & Rose, 2009; Felipo & Butterworth, 2002). A amônia cerebral é metabolizada pela enzima GS, que é encontrada em astrócitos (Norenberg, 1979; Norenberg & Martinez-Hernandez, 1979). Esta enzima converte o glutamato e a amônia captados pelos astrócitos em glutamina. A glutamina é liberada pelos astrócitos e captada por neurônios para ser novamente convertida em glutamato, ciclo este conhecido como glutamina-glutamato. Uma adequada regulação entre astrócitos e neurônios através do ciclo glutamato-glutamina é essencial para a homeostasia glutamatérgica (Banerjee et al, 2008; Danbolt, 2001; Magistretti, 2006; Newsholme et al, 2003; Pellerin et al, 2002).

Assim, os astrócitos desempenham um papel central na detoxificação da amônia no SNC (Bjerring et al, 2009) e evidências apontam essas células como o principal alvo da neurotoxicidade provocada pela hiperamonemia (Norenberg et al, 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram inúmeras perturbações no funcionamento normal do cérebro que podem ser causadas direta ou indiretamente pelo aumento da concentração de amônia (Wilkinson et al, 2010). Entre as alterações celulares estão aumento do pH intracelular e alterações no potencial de membrana, já que o  $\text{NH}_4^+$  pode competir com o potássio (Bosoi & Rose, 2009). Além disso, a hiperamonemia está associada com edema astrocítico, que é provocado por diversos fatores, sendo que o acúmulo de glutamina, produto do metabolismo da amônia, possui um importante papel exercendo efeito osmótico (Haussinger & Schliess, 2008; Jayakumar et al, 2006; Norenberg et al, 2005).

Um importante efeito tóxico induzido pela hiperamonemia é o estresse oxidativo (Norenberg et al, 2009), ocasionado principalmente pela geração de radicais livres (Master et al, 1999; Murthy et al, 2001; Sinke et al, 2008), mas também pela redução da atividade de enzimas antioxidantes pela amônia (Kosenko et al, 1999; Kosenko et al, 1997b). A geração de radicais livres provocada pela amônia pode ser devido ao aumento transitório de cálcio intracelular (Norenberg, 2003; Rose et al, 2005; Schliess et al, 2002), provavelmente secundário à alcalinização intracelular (Rose et al, 2005), ou à inibição da cadeia transportadora de elétrons (Qureshi et al, 1998; Rao et al, 1997).

A amônia também provoca alterações no sistema glutamatérgico. Evidências apontam para um papel dos receptores de glutamato do tipo NMDA na neurotoxicidade da amônia, tanto em neurônios quanto em astrócitos (Schliess et al, 2002; Vaquero & Butterworth, 2006). Quando os receptores NMDA são ativados, ocorre um influxo de cálcio para na célula, provocando a

ativação de diversas enzimas, dentre elas a óxido nítrico sintase (NOS), causando, assim, um aumento na produção de NO (Rodrigo et al, 2009; Rodrigo & Felipo, 2006). O NO é um importante mensageiro intracelular, mas se produzido em excesso pode ser nocivo. Além disso, se a célula estiver em um estado pró-oxidante, o NO pode levar à formação de compostos tóxicos, como o peroxinitrito, gerando estresse nitrosativo e dano celular (Bemeur et al; Calabrese et al, 2007). Pode ocorrer, também, a nitração de proteínas como a enzima GS, essencial para a detoxificação da amônia, provocando uma redução de sua atividade (Rose & Felipo, 2005; Schliess et al, 2002)

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e a regulação de seus níveis extracelulares determina suas ações fisiológicas ou excitotóxicas. A remoção do glutamato da fenda sináptica é realizada principalmente pelos astrócitos, por sistemas de transporte EAAT (Amara & Fontana, 2002; Danbolt, 2001). Indícios *in vitro* e *in vivo* também sugerem que a exposição à amônia resulta em redução da expressão e atividade desses transportadores, levando a um acúmulo extracelular de glutamato (Butterworth, 2002; Norenberg et al, 2009; Vaquero & Butterworth, 2006).

.Em relação às proteínas astrocíticas, já foi demonstrado uma redução da expressão de GFAP em um modelo animal de hiperamonemia aguda (Belanger et al, 2002) e redução dos níveis dessa proteína em cultura primária de astrócitos expostas à amônia (Chastre et al, 2010; Leite et al, 2006; Neary et al, 1994; Norenberg et al, 1990). Referente à proteína S100B, nosso grupo já demonstrou, também em cultura primária de astrócitos, que a amônia provoca um aumento de sua secreção (Leite et al, 2006).

## 5. Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Radicais livres (RL) consistem numa estrutura química com um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso os torna muito instáveis, extremamente reativos e com uma enorme capacidade de se combinar inespecificamente a moléculas que fazem parte da estrutura celular (Halliwell, 2006b; Halliwell, 2007).

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) inclui RL de oxigênio como radicais superóxido e hidroxila, e também espécies que não são propriamente um RL, mas derivadas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, que são capazes de gerar RL (Halliwell, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o NO e o peroxinitrito os principais representantes (Halliwell & Whiteman, 2004).

O estresse oxidativo se refere a uma alteração no equilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes, favorecendo a geração de moléculas pró-oxidantes, o que pode provocar danos a lipídios, proteínas e DNA (Halliwell, 2006a; Halliwell, 2007; Sies, 1991).

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem importantes mecanismos de defesa antioxidante, que podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos. Entre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. O tripeptídeo glutathione (GSH) é uma importante defesa antioxidante não-enzimática, assim como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) (Gutteridge & Halliwell).

O ácido ascórbico possui uma ação antioxidante bem descrita, além de servir como cofator em diversas reações enzimáticas (Harrison & May, 2009). De maneira geral, o ácido ascórbico atua como agente redutor em processos



de oxidação mediados por radicais livres, agindo efetivamente como *scavenger* (sequestrador) de radicais peroxil e hidroxil, superóxido, oxigênio *singlet* e peroxinitrito (Rice, 2000). Como parte da rede de antioxidantes intracelulares, o ácido ascórbico atua em conjunto com outras substâncias de baixo peso molecular, incluindo a GSH e a vitamina E, assim como com enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutaciona peroxidase (Cohen, 1994).

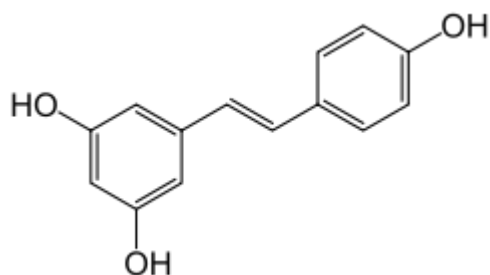
No entanto, o ácido ascórbico também pode agir como pró-oxidante. Isso ocorre na presença de metais de transição livres, como o cobre e o ferro, os quais são reduzidos pelo ácido ascórbico e, por sua vez, levam à formação de radicais altamente reativos e danosos (Buettner & Jurkiewicz, 1996; Osiecki et al; Stich et al, 1976).

O L-NAME (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster) é um análogo da L-arginina (substrato para a síntese de NO) que inibe, de maneira competitiva e não-específica, as diferentes isoformas de NOS (Hobbs et al, 1999; Salerno et al, 2002). O Trolox é um análogo hidrossolúvel do  $\alpha$ -tocoferol, que possui uma aumentada permeabilidade celular. É utilizado como um antioxidante padrão e possui efeitos benéficos em diversos tipos celulares (Lee et al, 2009).

## **6. Resveratrol**

O resveratrol (3,4',5-triidroxi-*trans*-estilbeno) é um composto polifenólico não-flavonóide da classe dos estilbenos, encontrado naturalmente em diversas espécies de plantas e possui importantes propriedades benéficas à saúde (Pervaiz, 2004). O resveratrol é encontrado nas isoformas *cis* e *trans*, sendo

que o isômero *trans* é o principal responsável pelos efeitos biológicos do resveratrol em mamíferos (Soleas et al, 1997).



**Figura 3 .** *Trans*-resveratrol.

Os polifenóis são divididos em duas categorias principais: flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides são encontrados em extratos de plantas e frutas, e são considerados os mais importantes polifenóis. Os estilbenos não-flavonóides são a menor classe, mas com muitos efeitos biológicos (Dore, 2005).

A função natural do resveratrol é proteger a planta contra infecções por fungos. Estresse ambiental, como radiação ultravioleta, também aumenta a concentração de resveratrol (de la Lastra & Villegas, 2005; Pervaiz, 2003; Shakibaei et al, 2009). Assim, o resveratrol pode ser incluído na classe dos antibióticos das plantas, ou seja, é uma fitoalexina (Baur & Sinclair, 2006; Langcake & Pryce, 1977).

O resveratrol foi primeiramente isolado das raízes de *Veratrum grandiflorum* O. Loes em 1940 e, posteriormente, em 1963, das raízes de *Polygonum cuspidatum* (Nonomura et al, 1963), uma planta utilizada na tradicional medicina oriental (Baur & Sinclair, 2006).

Atualmente, sabe-se que o resveratrol está presente em mais de 70 espécies vegetais, dentre as quais componentes da nossa dieta como

amendoins, ameixas, frutas vermelhas (como morango, amora e framboesa) e, principalmente, em cascas e sementes de uvas (Baur & Sinclair, 2006; de la Lastra & Villegas, 2005; Markus & Morris, 2008; Soleas et al, 1997). Conseqüentemente, está presente também em vinhos, especialmente em vinhos tintos (de la Lastra & Villegas, 2007).

A partir de 1979, o vinho tinto, uma das principais fontes de resveratrol, vem ganhando destaque especial devido a um estudo que demonstrou que o consumo de vinho tinto estaria correlacionado negativamente com a incidência de doenças cardíacas isquêmicas (St Leger et al, 1979). Em 1992, outro estudo atribuiu ao vinho a baixa incidência de doenças cardiovasculares na população do sul da França, uma região onde tradicionalmente se consome uma dieta rica em gorduras saturadas. Esta controvérsia foi chamada de “Paradoxo Francês” (Renaud & de Lorgeril, 1992). Nesse mesmo ano, foi descoberta a presença do resveratrol no vinho. Desde então, inúmeros trabalhos têm mostrado os efeitos benéficos dessa molécula (Fremont, 2000).

Uma das principais atividades biológicas atribuídas ao resveratrol envolve seu potencial antioxidante. O resveratrol pode agir como seqüestrador de radicais hidroxil e de ânions superóxido (Leonard et al, 2003; Losa, 2003; Martinez & Moreno, 2000). Além disso, o resveratrol é capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona-S-transferase e glutathiona redutase (Mokni et al, 2007; Yen et al, 2003) e o conteúdo de glutathiona (Ates et al, 2007; Sharma & Gupta, 2002).

Outro efeito do resveratrol, e um dos primeiramente estudados, é sua atividade cardioprotetora. Este efeito é consequência de diversos fatores: a

diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Fremont et al, 1999); a vasodilatação através de um mecanismo envolvendo o NO (Das & Das, 2010; Lekakis et al, 2005); e a inibição da agregação plaquetária (Bertelli et al, 1995) através da ação inibitória sobre as ciclooxigenases (COX), preferencialmente a COX 1 (Szewczuk et al, 2004). A ação anti-inflamatória do resveratrol também deve-se à inibição de COX, reduzindo as inflamações agudas e crônicas e evitando todas as características do processo inflamatório (Chen et al, 2005).

O resveratrol também possui efeito antitumoral inibindo os três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão (Jang et al, 1997). Essa propriedade antitumoral do resveratrol envolve diversas ações: inibição de COX; inibição da angiogênese; alterações no ciclo celular e apoptose; e atividade antioxidante (Baur & Sinclair, 2006; Dong, 2003; Goswami & Das, 2009). Além disso, estudos demonstram que o resveratrol tem como alvo uma classe de proteínas chamadas sirtuínas. SIRT1 é a principal sirtuína ativada pelo resveratrol e medeia efeitos benéficos para a saúde e longevidade (Baur & Sinclair, 2006).

O SNC também é um alvo do resveratrol, já que ele pode atravessar a barreira hematoencefálica. Os efeitos neuroprotetores do resveratrol podem ser mediados por sua atividade antioxidante (Sharma & Gupta, 2002) ou por modulação de proteínas como heme oxigenase 1 (Sakata et al), NOS (Bastianetto et al, 2000) e SIRT1 (Della-Morte et al, 2009). Esse polifenol também modula fatores de transcrição como o NFκB (Lukiw et al, 2008; Sarkar et al, 2009) e vias de sinalização (de Almeida et al, 2008; Sarkar et al, 2009; Zamin et al, 2006). Além disso, o resveratrol possui um efeito protetor contra a

excitotoxicidade glutamatérgica, que é um fator comum de diversas doenças neurodegenerativas e também está associada ao estresse oxidativo (Coyle & Puttfarcken, 1993; Fukui et al; Gao et al, 2006; Virgili & Contestabile, 2000),

Nosso grupo tem mostrado que o resveratrol modula importantes funções gliais, como captação de glutamato, atividade da glutamina sintetase, níveis de glutathione e secreção da proteína S100B (de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos & Gottfried, 2011; Quincozes-Santos et al, 2009b) e também pode apresentar um perfil antioxidante frente a um modelo de dano oxidativo com peróxido de hidrogênio em células astrogliais C6 (Quincozes-Santos et al, 2009b). Sendo assim, o resveratrol surge como um potencial agente farmacológico relacionado ao estresse oxidativo, mediando importantes efeitos relacionados à atividade glial e representando uma nova estratégia terapêutica a fisiopatologias do SNC.

## **OBJETIVOS**

- Verificar o perfil de secreção da proteína S100B em células astrogliais na presença de amônia;
- Analisar o efeito de diferentes antioxidantes (resveratrol, ácido ascórbico, trolox e L-NAME) sobre a secreção de S100B em células astrogliais C6 e em culturas primárias de astrócitos;
- Avaliar o possível papel protetor dos antioxidantes, frente a um insulto com amônia, na linhagem C6 e em culturas primárias de astrócitos.

## **PARTE II**

**Manuscrito em preparação a ser submetido ao periódico *Neurochemistry International***

**RESVERATROL PREVENTS AMMONIA-INCREASED S100B SECRETION  
IN ASTROGLIAL CELLS**

Larissa D Bobermin, André Quincozes-Santos, Maria Cristina Barea Guerra,  
Marina Concli Leite, Carlos Alberto Gonçalves, Carmem Gottfried.



**RESVERATROL PREVENTS AMMONIA-INCREASED S100B SECRETION  
IN ASTROGLIAL CELLS**

Larissa D Bobermin\* <sup>^</sup>, André Quincozes-Santos\*, Maria Cristina Barea  
Guerra, Marina Concli Leite, Carlos Alberto Gonçalves, Carmem Gottfried.

Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science and Federal  
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

\*These authors contributed equally to this work

**<sup>^</sup>CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Larissa D Bobermin  
Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo  
90035003 - Porto Alegre, RS - BRAZIL  
Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5565  
E-mail: lari\_biomed@yahoo.com.br

## **ABSTRACT**

Ammonia is a neurotoxin implicated in brain metabolic disorders associated with hyperammonemia. Acute ammonia neurotoxicity can be mediated by excitotoxic mechanism involving glutamatergic neurotransmitter system, including NMDA receptor activation and subsequent increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Oxidative stress is related to ammonia neurotoxicity and NO can be involved in this condition. Astrocytes play an essential role in protecting the neurons against excitotoxicity by taking up excess ammonia and glutamate and converting it into glutamine, using enzyme glutamine synthetase and also protected against oxidative stress. S100B protein, particularly extracellular S100B, is used as a parameter of glial activation or commitment in several situations of brain injury, including hyperammonemia. Antioxidants, such as resveratrol, showed many biological effects, including modulation of glial parameters as glutamate uptake, glutamine synthetase activity and S100B secretion. In this study, we investigated the effect of antioxidants on S100B secretion induced by ammonia in astroglial cells. Resveratrol was able to prevent the increase of S100B secretion, after 24 h ammonia exposure, probably via NO and PKA inhibition. Then, resveratrol can be used in the protection against neurotoxicity induced by ammonia.

Keywords: Astroglial cells, S100B, hyperammonemia, oxidative stress, antioxidants, resveratrol.

## 1. INTRODUCTION

Ammonia is a neurotoxin implicated in brain metabolic disorders associated with hyperammonemia, including hepatic encephalopathy (HE) and urea cycle enzymes deficiencies (Albrecht & Jones, 1999; Buzanska et al, 2000). Augmentation of ammonia results from a reduced capacity for hepatic synthesis of urea and glutamate. In these conditions, ammonia concentrations reach as high as 5 mM in the brain tissue (Albrecht & Jones, 1999).

Acute ammonia neurotoxicity can be mediated by excitotoxic mechanism involving glutamatergic neurotransmitter system, including elevation of extracellular glutamate content, decrease in glutamate transporters, NMDA receptor activation and subsequent increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration (Felipo & Butterworth, 2002; Felipo et al, 1998; Monfort et al, 2002a; Monfort et al, 2002b). The metabolic effects of ammonia neurotoxicity include changes in cytoskeleton (Jayakumar et al, 2006b), reactive oxygen species (ROS) (Norenberg, 2003), NO metabolism (Buzanska et al, 2000), cAMP levels (Felipo & Butterworth, 2002; Zielinska et al, 2005), MAPK pathway (Jayakumar et al, 2006a) and astrocyte swelling (Haussinger & Gorg).

Astrocytes are the main class of glial cells, serving a wide range of adaptative functions in the mammalian nervous system. They interact with neurons, providing structural, metabolic and a trophic support for them. In pathological circumstances, astrocytes have the potential to induce neuronal dysfunction, but they can also play a protective role, by releasing neurotrophic factors (Barbeito et al, 2004; He & Sun, 2007; Markiewicz & Lukomska, 2006). Astrocytes play an essential role in protecting the neurons against excitotoxicity by taking up excess ammonia and glutamate and converting it into glutamine,

using enzyme glutamine synthetase (Mates et al, 2002; McKenna, 2007). C6 astroglial cells are widely used as an astrocyte-like cell line to study astrocytic functions (Benda & Davidson, 1971; Benda et al, 1968; dos Santos et al, 2006; Funchal et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2007; 2009a; 2009b; 2009c; 2010).

Exposure to ammonia results in alterations of astrocyte morphology and specific proteins, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), excitatory amino acid transporter 2 (GLAST) and enzyme glutamine synthetase. However, the mechanism(s) by which ammonia induces astrocyte swelling and glutamate uptake inhibition is unclear (Belanger et al, 2002; Felipo & Butterworth, 2002; Norenberg et al, 1997; Zhou & Norenberg, 1999). The major protein of intermediate filaments in astrocytes, GFAP, is reduced in cultured astrocytes in hyperammonemia conditions (Leite et al, 2006). The enzyme glutamine synthetase is also reduced under ammonia toxicity (Felipo & Butterworth, 2002; Leite et al, 2006). This enzyme is very sensitive to oxidative stress and it has been hypothesized to play an important role in the pathogenesis of ammonia neurotoxicity (Lemberg & Fernandez, 2009).

Antioxidants are substances that delays, prevents or removes oxidative damage to a target molecule (Gutteridge & Halliwell). Antioxidants can be enzymatic such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase (Droge, 2002) or non-enzymatic such as glutathione (GSH), ascorbic acid, L-NAME, trolox and polyphenols (Berger, 2005). Among polyphenols, we can cite the resveratrol, which are found in fruits, vegetables and red wine and it has a wide range of biological effects (Baur & Sinclair, 2006; Delmas et al, 2005). Resveratrol modulates important glial functions including glutamate uptake,

glutamine synthetase, GSH levels, the mainly antioxidant of central nervous system (CNS), and S100B secretion (de Almeida et al, 2008; de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009c; Vieira de Almeida et al, 2008).

S100B is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein of the EF-hand type that is predominantly expressed and secreted by astrocytes (Donato, 2001; Donato et al, 2009). Extracellular S100B is known to affect astrocytic, neuronal and microglial activities, with different effects depending on its concentration. Low concentrations of S100B exert neurotrophic effects and high concentrations induce apoptosis and activate astrocytes and microglia, thus potentially mediators related to neurotoxicity (Donato, 2003; Goncalves et al, 2008; Van Eldik & Wainwright, 2003). Moreover, the S100B release is used as a parameter of glial activation or death in several situations of brain injury (Rothermundt et al, 2003; Schroeter et al). In fact, an elevation of serum S100B was observed in HE (Wiltfang et al, 1999) and increase in S100B secretion was also observed in astrocytes under ammonia exposure (Leite et al, 2006).

In this context, we investigated the effects of ammonia exposure in C6 astroglial cells on ROS production and S100B secretion. We also studied the action of antioxidants (resveratrol, L-NAME, ascorbic acid and trolox) on S100B secretion *per se* and against ammonia toxicity and the probable mechanism involved in these effects.

## **2. EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **2.1 MATERIALS**

Poly-L-lysine, resveratrol, ascorbic acid, trolox, N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), monoclonal anti-S100B (SH-B1), H89, propidium iodide and methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide were purchased from Sigma. Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and other materials for cell culture were purchased from Gibco. Polyclonal anti-S100B and anti-rabbit peroxidase linked were purchased from Dako and GE, respectively. All other chemicals were purchased from common commercial suppliers.

### **2.2 C6 ASTROGLIAL CELL CULTURE**

The C6 astroglial cells line was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MA, USA) and was performed essentially according to the procedure previously described by (dos Santos et al, 2006). The cells were seeded in flasks and cultured in DMEM (pH 7.4) containing 5% FBS, 0.1% amphotericin B and 0.032% gentamicin. Cells were kept at a temperature of 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air. Exponentially growing cells were detached from the culture flasks using 0.05% trypsin/ethylene-diaminetetracetic acid (EDTA) and seeded ( $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) in 24-well plates.

### **2.3 PRIMARY ASTROCYTE CELL CULTURE**

Primary cortical astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described (Leite et al, 2009). Procedures were in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Briefly, the cerebral cortex of newborn Wistar rats (1–2 days old) were removed and mechanically dissociated in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>- free Hanks' balanced salt solution (HBSS), pH

7.4, containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 0.27 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 6.1 glucose. The cortex was cleaned of meninges and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1,000 rpm for 5 min, the pellet was resuspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.39 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% amphotericin B, 0.032% gentamicin, and 10% FBS. Approximately 300,000 cells were seeded in each well in 24-well plates and maintained in DMEM containing 10% FBS in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C, then allowed to grow to confluence and used around of 15 days in vitro.

## 2.4 DRUGS TREATMENTS

After confluence, the culture medium was removed by suction and the cells were treated with ammonia and antioxidants (resveratrol, L-NAME, ascorbic acid, trolox) at indicated concentrations. Cells also were pre-treated for 1 h with resveratrol (100 µM), ascorbic acid (100 µM), trolox (50 µM) or L-NAME (500 µM) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air in DMEM without serum. After, 5 mM ammonia (NH<sub>4</sub>Cl) was added in the presence or absence of resveratrol (100 µM), ascorbic acid (100 µM), trolox (50 µM) or L-NAME (500 µM) for 24 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air in DMEM without serum. For all parameters analyzed, the results obtained with vehicle were not different from those obtained under basal conditions.

## 2.5 MEMBRANE INTEGRITY AND METABOLIC ACTIVITY ASSAYS

*Propidium iodide incorporation assay:* Cells were treated concomitantly with propidium iodide (PI) 7.5 µM and incubated up to 24 h. Optical density from fluorescent nuclei (labeled with PI), indicative of cell death was determined with

the Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company). Density values obtained are expressed as percent of control.

*Lactate dehydrogenase assay:* The lactate dehydrogenase (LDH) assay was carried out in 50  $\mu$ L of extracellular medium with a commercial colorimetric assay from Doles (Brazil). Results are expressed as percentage of control.

*MTT reduction assay:* Cells were treated with methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 50  $\mu$ g/mL for 30 min in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. After, the media was removed and MTT crystals were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650 nm. Results are expressed as percentage of control.

## 2.6 S100B SECRETION ASSAY

S100B secretion was measured by enzyme-linked immunosorbent assay as previously described (Leite et al, 2008). Briefly, 50  $\mu$ L of sample plus 50  $\mu$ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min, and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. Results are expressed as percentage of control.

## 2.7 PROTEIN DETERMINATION

Protein content was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al, 1951).

## 2.8 STATISTIC ANALYSIS

Data from the experiments are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Each experiment was repeated at least three times. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with followed by the Tukey's test. Values of



$P < 0.05$  were considered to be significant. All analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

### **3. RESULTS**

Firstly, we evaluated integrity and metabolic activity in C6 astroglial cells with ammonia by measured PI incorporation, LDH extracellular content and MTT reduction. Table 1 showed the results after 24 h of incubation. No significant changes were observed in these parameters compared to control conditions. We also rely on data previous from our group and the recent literature.

We also examined the ROS production with DCFH oxidation. An increase about 22% in DCFH oxidation was observed when C6 cells were treated with 5 mM ammonia by 24 h, indicating in this concentration an increase of ROS production (Data not shown).

After, we investigated the effect of ammonia on S100B secretion in C6 astroglial cells (figure 1). Incubation for 1 h with 1, 5 and 10 mM of ammonia did not change S100B secretion. However, 10 mM of ammonia at 6 h of treatment increased about 20% S100B secretion. At 24 h of ammonia exposure, was observed significant increase in extracellular S100B about 55% and 48% at 5 mM and 10 mM ammonia, respectively. Measurement of extracellular S100B was referred to as secretion, since not observed changes in cell viability.

Next, we examined the effect of antioxidants (resveratrol, L-NAME, ascorbic acid and trolox) on cell viability (table 2). No significant changes were observed in these parameters compared to control conditions, except by trolox

100  $\mu$ M. Then, we choose the concentrations of antioxidants above cited. The effect of antioxidants on extracellular S100B at 24 h in C6 astroglial cells and primary astrocytes was tested, figure 2A and 2B, respectively. Resveratrol 100  $\mu$ M significant increases S100B secretion about 17% in C6 astroglial cells and 24% in astrocyte cultures, compared to control conditions. L-NAME (500  $\mu$ M) also increases S100B secretion about 20% in both types of cell culture. However, ascorbic acid 100  $\mu$ M and trolox 50  $\mu$ M did not change on S100B extracellular content.

We further tested the effects of antioxidants under oxidative damage with 5 mM ammonia on S100B secretion in C6 cells and primary astrocytes, demonstrated in figure 3A and 3B, respectively. Resveratrol showed more significant changes in S100B secretion from  $155 \pm 14\%$  to  $108 \pm 9\%$  in C6 cells and  $161 \pm 13\%$  to  $115 \pm 11\%$  compared ammonia conditions in astrocyte primary culture. L-NAME also decreases S100B secretion. Other antioxidants have maintained or not significantly reduced the increase in S100B secretion induced by ammonia. The addition of resveratrol and L-NAME concomitantly reduced S100B in C6 astroglial cells about 48% compared to oxidative conditions (figure 4).

Finally, we investigated whether protein kinase A (PKA) were involved in the enhanced secretion of S100B provoked by ammonia and resveratrol in C6 astroglial cells, figure 5. Cells were pre-incubated with the specific PKA inhibitor H-89 (10  $\mu$ M) (Funchal et al, 2007), followed by incubation of the cells with ammonia and resveratrol. Results shown that PKA inhibitor prevented the increased S100B release after 24 h incubation with ammonia and/or resveratrol, suggesting these effects are mediated by PKA.

#### 4. DISCUSSION

The astrocyte marker protein S100B is widely used as a parameter of glial activation and/or death in several conditions of brain injury. S100B has intra and extracellular activities (Donato, 2003). Intracellularly, S100B modulates cytoskeleton; regulates cell proliferation, differentiation and migration; enzymes and protein phosphorylation; and astrocyte energy metabolism (Brozzi et al, 2009; Donato et al, 2009; Frizzo et al, 2004a; Frizzo et al, 2004b). Extracellular S100B activity depends on its concentration. In vitro studies, at nanomolar concentrations of S100B, suggest trophic effects on glial cells and neurons. In contrast, micromolar concentrations of S100B exert toxic effects on neurons (Van Eldik & Wainwright, 2003).

S100B is released mainly by astrocytes. Many stimulating the release of S100B has been identified, including beta amyloid peptide (Pena et al, 1995), interleukin-1 $\beta$  (de Souza et al, 2009), serotonin (Whitaker-Azmitia et al, 1990), adenosine (Ciccarelli et al, 1999), glutamate (Ciccarelli et al, 1999), branched-chain  $\alpha$ -keto acids (Funchal et al, 2007), glutaric and 3-hydroxyglutaric acids (Quincozes-Santos et al, 2010), neuroleptic risperidone (Quincozes-Santos et al, 2008) and natural antioxidants (de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009c). Although, alterations in extracellular S100B content should affect activity and neural function, the mechanism of regulation of secretion still remain unclear. Therefore, in the present study we investigate the effect of ammonia on S100B release, from C6 astroglial cells. We verified that S100B secretion was markedly stimulated by ammonia in C6 astroglial cells, implying that these cells are activated in the presence of this compound. Increased extracellular concentrations of S100B are related to brain

damage and its persistent enhancement appears can be involved in neurodegenerative disorders (Rothermundt et al, 2003). These effects cannot be attributed to astroglial cell death because cell viability was not altered by ammonia.

Hyperammonemia in glial cells results in an increase in cell calcium and cAMP (Felipo & Butterworth, 2002; Rose et al, 2005; Zielinska et al, 2005). Both calcium and cAMP has been proposed as mediators in S100B release (Davey et al, 2001; Goncalves et al, 2002). The PKA inhibitor H-89 fully prevented the increment of extracellular S100B observed with ammonia incubation, indicating the involvement of cAMP and PKA in this effect.

Acute ammonia intoxication depending on its severity has been shown to lead to rapid failure or death involvement of CNS (Felipo & Butterworth, 2002; Kosenko et al, 1994). The glutamatergic neurotransmission impairment is involved in pathogenesis of hyperammonemia and HE (Monfort et al, 2002a; Monfort et al, 2002b). A previous study in patients with liver cirrhosis showed elevated serum S100B without a significant increase in arterial ammonia (Wiltfang et al, 1999). It is important to mention that normal ammonemia does not necessarily indicate an absence of brain commitment in HE (Reif et al, 2004). Moreover, experimental encephalopathy suggests that brain ammonia is about 5-10 times higher than corresponding blood ammonia (Swain et al, 1992). Probably, the increment in serum S100B in these cirrhotic patients was due to astrocyte activations. However, other sources of serum S100B cannot be rule out (Netto et al, 2006). Our data reinforce the possible usefulness of peripheral S100B as a marker for hyperammonemia conditions.

Oxidative stress and lipid peroxidation has been implicated in ammonia neurotoxicity (Jayakumar et al, 2006a) and we observed that ammonia increased DCFH oxidation (data not shown). Moreover, ammonia is primarily detoxified in astrocytes, mainly by the enzyme GS, which catalyses the amidation reaction of glutamate to form glutamine, which is then exported to neurons, allowing the synthesis of not only glutamate, but also gamma-aminobutyric acid (GABA) by the glutamate-glutamine cycle (Pellerin et al, 2002; Westergaard et al, 1995). This enzyme is very sensitive to oxidative stress and then their activity should be reduced in ammonia oxidative damage (Leite et al, 2006). Thus, in hyperammonemic conditions can be failure of energy metabolism, deficit of neurotransmitters and disturbances in neurotransmission (glutamatergic, GABAergic and serotonergic, all modulators of S100B secretion). The so far reported the hyperammonemia on the brain *in vivo* as well as in cultured cells include diminished activity of antioxidative enzymes such as glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and increased superoxide production (Kosenko et al, 1997a; 1997b).

It is widely known that S100B secretion is affected by redox conditions and metabolic stress (Donato et al, 2009; Nardin et al, 2007; Quincozes-Santos et al, 2009c). Our group has demonstrated that resveratrol and epicatechin gallate increase S100B secretion in C6 cells and primary astrocyte (Abib et al, 2008; de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009c). The same antioxidants also improve glutamatergic parameters such as, glutamate uptake, GS activity and glutathione content, the main antioxidant of the brain (de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009c). Thus, the increase of extracellular S100B content may represent

together with other glial parameters an improvement on functions of astroglial cells.

Resveratrol and L-NAME increase S100B secretion, however, ascorbic acid and trolox did not change. Resveratrol also modulates NO production and inhibits iNOS immunoprotein, showing synergistic effect when incubated concomitantly with L-NAME (a NOS inhibitor) – unpublished data, Quincozes-Santos et al. In relation to ascorbic acid, recently we demonstrated that it alters the micronuclei frequency (Quincozes-Santos et al, 2010), while resveratrol did not alter, and micronucleus is a well marker of genotoxicity. Among antioxidants tested, only trolox 100  $\mu$ M induced cell death. Furthermore, antioxidants increase glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase, the mainly enzymatic antioxidant defenses (Dringen & Hamprecht, 1997; Droge, 2002; Halliwell, 2001; Halliwell, 2006).

When incubated antioxidants and ammonia, only resveratrol and L-NAME protected against ammonia toxicity. Resveratrol against an oxidative insult protects glial cells, including S100B secretion. The result with L-NAME indicates that NO and/or its toxic derivative peroxynitrite are probably involved in such effects. The co-incubation with resveratrol and L-NAME presented more reducing in S100B secretion, indicating synergistic effect between two compounds. Moreover, effects of ammonia toxicity involve changes in NO metabolism and activation of NMDA receptors (Buzanska et al, 2000; Felipo & Butterworth, 2002; Monfort et al, 2002a), and this can be related to L-NAME effect observed in this work. The activation of NMDA receptors leads to the formation of NO in a calcium-dependent pathway by NOS (Coyle & Puttfarcken, 1993), in this context it is worth noting that resveratrol inhibits iNOS and

protects NMDA activation. Resveratrol has shown the best results against toxicity induced by ammonia and when co-incubated with H89 showed significant difference in S100B release, indicating that the effect of S100B release is probably mediated by PKA pathway. It has been demonstrated that cAMP are able to activate NOS via protein kinases and this activation occurs through PKA (Guix et al, 2005; Hashimoto et al, 2006) . Then, the probably mechanism by which resveratrol modulates S100B secretion may involves NOS and PKA.

Interestingly, creatine was not able to prevent the increment in S100B release caused by ammonia toxicity, as described by Leite et al, 2006. However, resveratrol protected this effect. The mechanisms implicated in creatine neuroprotection are controversial but appear to at least in part dependent on an increase in cellular phosphocreatine stores and energetic metabolism related to ATP levels (Brustovetsky et al, 2001). The mechanism of resveratrol is unclear, but this effect of resveratrol on ammonia toxicity can be more connected to events related to oxidative stress than energy metabolism, because our group already demonstrated that resveratrol improves glial important parameters that are dependent on the redox state.

In conclusion, this study suggests, for the first time, that resveratrol attenuates S100B secretion, an important marker for HE, in a model of ammonia toxicity in astroglial cells. Ammonia induced increases in S100B secretion after 24 h of exposure, in a mechanism dependent of PKA and resveratrol also acts via this pathway. Thus, S100B could be a useful brain marker for HE. Moreover, these observations suggest that resveratrol may be a clinically viable protective agent against conditions where there is oxidative

stress. In addition, resveratrol may have the potential to be used in the protection against hyperammonemia conditions.



## REFERENCES

- Abib RT, Quincozes-Santos A, Nardin P, Wofchuk ST, Perry ML, Goncalves CA, Gottfried C (2008) Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage. *Mol Cell Biochem* **310**(1-2): 153-158
- Albrecht J, Jones EA (1999) Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* **170**(2): 138-146
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* **47**(1-3): 263-274
- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**(6): 493-506
- Belanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF (2002) Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int* **41**(2-3): 155-160
- Benda P, Davidson RL (1971) Regulation of specific functions of glial cells in somatic hybrids. I. Control of S100 protein. *J Cell Physiol* **78**(2): 209-216
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**(839): 370-371
- Berger MM (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* **24**(2): 172-183
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2009) S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem* **284**(13): 8797-8811
- Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM (2001) On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem* **76**(2): 425-434
- Buzanska L, Zablocka B, Dybel A, Domanska-Janik K, Albrecht J (2000) Delayed induction of apoptosis by ammonia in C6 glioma cells. *Neurochem Int* **37**(2-3): 287-297
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Bruno V, Battaglia G, D'Alimonte I, D'Onofrio M, Nicoletti F, Caciagli F (1999) Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia* **27**(3): 275-281
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**(5134): 689-695

Davey GE, Murmann P, Heizmann CW (2001) Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* **276**(33): 30819-30826

de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, Battu C, Nardin P, Tortorelli LS, Zanotto C, Posser T, Wofchuk ST, Leal RB, Goncalves CA, Gottfried C (2008) Resveratrol protects against oxidative injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys* **480**(1): 27-32

de Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Tramontina F, Feoli AM, Gottfried C, Goncalves CA (2007) Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol* **27**(5): 661-668

de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB, Goncalves CA (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1 $\beta$  in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* **206**(1-2): 52-57

Delmas D, Jannin B, Latruffe N (2005) Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* **49**(5): 377-395

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**(7): 637-668

Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* **60**(6): 540-551

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* **1793**(6): 1008-1022

dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, de Almeida LM, Jacques-Silva MC, Wofchuk ST, Goncalves CA, Gottfried C (2006) Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* **453**(2): 161-167

Dringen R, Hamprecht B (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* **759**(1): 67-75

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**(1): 47-95

Felipo V, Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* **67**(4): 259-279

Felipo V, Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Minana MD (1998) Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology* **19**(4-5): 675-681

Frizzo JK, Tramontina AC, Tramontina F, Gottfried C, Leal RB, Donato R, Goncalves CA (2004a) Involvement of the S100B in cAMP-induced cytoskeleton remodeling in astrocytes: a study using TRTK-12 in digitonin-permeabilized cells. *Cell Mol Neurobiol* **24**(6): 833-840

Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Goncalves CA (2004b) S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res* **29**(4): 735-740

Funchal C, Latini A, Jacques-Silva MC, Dos Santos AQ, Buzin L, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2006) Morphological alterations and induction of oxidative stress in glial cells caused by the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Int* **49**(7): 640-650

Funchal C, Tramontina F, Quincozes dos Santos A, Fraga de Souza D, Goncalves CA, Pessoa-Pureur R, Wajner M (2007) Effect of the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease on S100B release from glial cells. *J Neurol Sci* **260**(1-2): 87-94

Goncalves CA, Concli Leite M, Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* **41**(10-11): 755-763

Goncalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E, Wofchuk S, Goncalves CA (2002) High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* **13**(12): 1533-1535

Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* **76**(2): 126-152

Gutteridge JM, Halliwell B (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* **393**(4): 561-564

Halliwell B (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**(9): 685-716

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**(6): 1634-1658

Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T (2006) Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis* **189**(2): 350-357

Haussinger D, Gorg B (2010) Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**(1): 87-92

He F, Sun YE (2007) Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol* **39**(4): 661-665

Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy Ch R, Norenberg MD (2006a) Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci* **26**(18): 4774-4784

Jayakumar AR, Rao KV, Murthy Ch R, Norenberg MD (2006b) Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* **48**(6-7): 623-628

Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolia S, Kaminsky Y (1997a) Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis* **12**(1): 69-82

Kosenko E, Kaminsky Y, Grau E, Minana MD, Marcaida G, Grisolia S, Felipo V (1994) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Neurochem* **63**(6): 2172-2178

Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V (1997b) Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res* **27**(6): 637-644

Leite MC, Brolese G, de Almeida LM, Pinero CC, Gottfried C, Goncalves CA (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull* **70**(2): 179-185

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* **169**(1): 93-99

Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Goncalves CA (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* **87**(11): 2439-2446

Lemberg A, Fernandez MA (2009) Hepatic encephalopathy, ammonia, glutamate, glutamine and oxidative stress. *Ann Hepatol* **8**(2): 95-102

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1): 265-275

Markiewicz I, Lukomska B (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **66**(4): 343-358

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I, Asenjo M, Marquez J (2002) Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(5): 439-458

McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* **85**(15): 3347-3358

Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipe V (2002a) Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem Int* **41**(2-3): 95-102

Monfort P, Munoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipe V (2002b) Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis* **17**(4): 237-250

Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Goncalves CA (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* **50**(5): 774-782

Netto CB, Portela LV, Felix TM, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R (2006) Serum S100B levels in patients with neural tube defects. *Clin Chim Acta* **364**(1-2): 275-278

Norenberg MD (2003) Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* **37**(2): 245-248

Norenberg MD, Huo Z, Neary JT, Roig-Cantesano A (1997) The glial glutamate transporter in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: relation to energy metabolism and glutamatergic neurotransmission. *Glia* **21**(1): 124-133

Pellerin L, Bonvento G, Chatton JY, Pierre K, Magistretti PJ (2002) Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization. *Diabetes Nutr Metab* **15**(5): 268-273; discussion 273

Pena LA, Brecher CW, Marshak DR (1995) beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res* **34**(1): 118-126

Quincozes-Santos A, Abib RT, Leite MC, Bobermin D, Bambini-Junior V, Goncalves CA, Riesgo R, Gottfried C (2008) Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol Cell Biochem* **314**(1-2): 59-63

Quincozes-Santos A, Andrezza AC, Goncalves CA, Gottfried C (2010) Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. *Toxicol In Vitro* **24**(3): 916-920

Quincozes-Santos A, Andrezza AC, Nardin P, Funchal C, Goncalves CA, Gottfried C (2007) Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells. *Neurotoxicology* **28**(4): 886-891

Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Kleinkauf-Rocha J, Souza DO, Riesgo R, Goncalves CA, Gottfried C (2009a) Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**(1): 11-15

Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Tonial RP, Bambini-Junior V, Riesgo R, Gottfried C (2009b) Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*

Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, Goncalves CA, Gottfried C (2009c) The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* **16**(1): 30-41

Quincozes-Santos A, Rosa RB, Leipnitz G, de Souza DF, Seminotti B, Wajner M, Goncalves CA (2010) Induction of S100B secretion in C6 astroglial cells by the major metabolites accumulating in glutaric acidemia type I. *Metab Brain Dis* **25**(2): 191-198

Reif A, Leonhard C, Mossner R, Lesch KP, Fallgatter AJ (2004) Encephalopathy and myoclonus triggered by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**(6): 1061-1063

Rose C, Kresse W, Kettenmann H (2005) Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* **280**(22): 20937-20944

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* **60**(6): 614-632

Schroeter ML, Steiner J, Mueller K (2010) Glial pathology is modified by age in mood disorders - A systematic meta-analysis of serum S100B in vivo studies. *J Affect Disord*

Swain M, Butterworth RF, Blei AT (1992) Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* **15**(3): 449-453

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* **21**(3-4): 97-108

Vieira de Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Leal RB, Gottfried C, Goncalves CA (2008) Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res* **33**(1): 8-15

Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A (1995) Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci* **17**(4): 203-211

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1990) Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* **528**(1): 155-158

Wiltfang J, Nolte W, Otto M, Wildberg J, Bahn E, Figulla HR, Pralle L, Hartmann H, Ruther E, Ramadori G (1999) Elevated serum levels of astroglial S100beta in patients with liver cirrhosis indicate early and subclinical portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **14**(4): 239-251

Zhou BG, Norenberg MD (1999) Ammonia downregulates GLAST mRNA glutamate transporter in rat astrocyte cultures. *Neurosci Lett* **276**(3): 145-148

Zielinska M, Zablocka B, Dybel A, Albrecht J (2005) The role of protein kinase C and cyclic AMP in the ammonia-induced shift of the taurine uptake/efflux balance towards efflux in C6 cells. *Neurochem Res* **30**(3): 349-354

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Effect of ammonia on S100B secretion in C6 astroglial cells.** Cells were incubated for 1, 6 and 24 h with ammonia (1, 5 and 10 mM) and S100B secretion was measured as described in Experimental Procedures section. Basal secretion, assumed as 100%, is indicated by line. Data represent means  $\pm$  S.E.M of three experimental determinations performed in triplicate, analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. (a) Indicates significant differences from control ( $P < 0.05$ ).

**Figure 2. Effect of antioxidants on S100B secretion in C6 astroglial cells and primary astrocyte culture.** Cells were incubated for 24 h in presence of 100  $\mu$ M resveratrol (RSV), 500  $\mu$ M L-NAME, 100  $\mu$ M ascorbic acid (AA) or 50  $\mu$ M trolox (TRL). Basal secretion, assumed as 100%, is indicated by line. Data represent means  $\pm$  S.E.M of three experimental determinations performed in triplicate, analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. (a) Indicates significant differences from control ( $P < 0.05$ ).

**Figure 3. Effects of antioxidants against ammonia-induced damage on S100B secretion in C6 astroglial cells and primary astrocyte culture.** Cells were pre-treated for 1 h with 100  $\mu$ M resveratrol (RSV), 500  $\mu$ M L-NAME, 100  $\mu$ M ascorbic acid (AA) or 50  $\mu$ M trolox (TRL). After pre-treatment, ammonia (5 mM) was added in the presence or absence of these antioxidants. Basal secretion, assumed as 100%, is indicated by line. Data represent means  $\pm$  S.E.M of three experimental determinations performed in triplicate, analyzed statistically by two-way ANOVA followed by Tukey's test. (a) Indicates



significant differences from control ( $P < 0.05$ ). (b) Indicates significant differences from ammonia ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4. Effect of resveratrol and L-NAME concomitantly against ammonia-induced damage on S100B secretion in C6 astroglial cells.** Cells were pre-treated with 100  $\mu$ M resveratrol and 500  $\mu$ M L-NAME concomitantly in the presence of 5 mM ammonia for 24 h (C). Basal secretion, assumed as 100%, is indicated by line. Data represent means  $\pm$  S.E.M of three experimental determinations performed in triplicate, analyzed statistically by two-way ANOVA followed by Tukey's test. (a) Indicates significant differences from control ( $P < 0.05$ ). (b) Indicates significant differences from ammonia ( $P < 0.05$ ).

**Figure 5. Effect of PKA on ammonia-induced S100B secretion.** C6 astroglial cells were pre-incubated with the PKA inhibitor H-89 (10  $\mu$ M), after the cells were pre-treated with resveratrol (100  $\mu$ M) followed by incubation with ammonia (5 mM) for 24 h. Basal secretion, assumed as 100%, is indicated by line. Data represent means  $\pm$  S.E.M of three experimental determinations performed in duplicate, analyzed statistically by two-way ANOVA followed by Tukey's test. (a) Indicates significant differences from control ( $P < 0.05$ ). (b) Indicates significant differences from ammonia ( $P < 0.05$ ). (c) Indicates significant difference from resveratrol ( $117 \pm 9$ ) ( $P < 0.05$ ). (d) Indicates significant difference from ammonia plus resveratrol ( $108 \pm 9$ ) ( $P < 0.05$ ).

**Table 1. Effect of ammonia on membrane integrity and metabolic activity in C6 astroglial cells.**

Ammonia (mM)	PI	LDH	MTT
1	99 ± 5	100 ± 12	97 ± 5
5	98 ± 5	96 ± 11	96 ± 4
10	98 ± 5	97 ± 12	95 ± 6

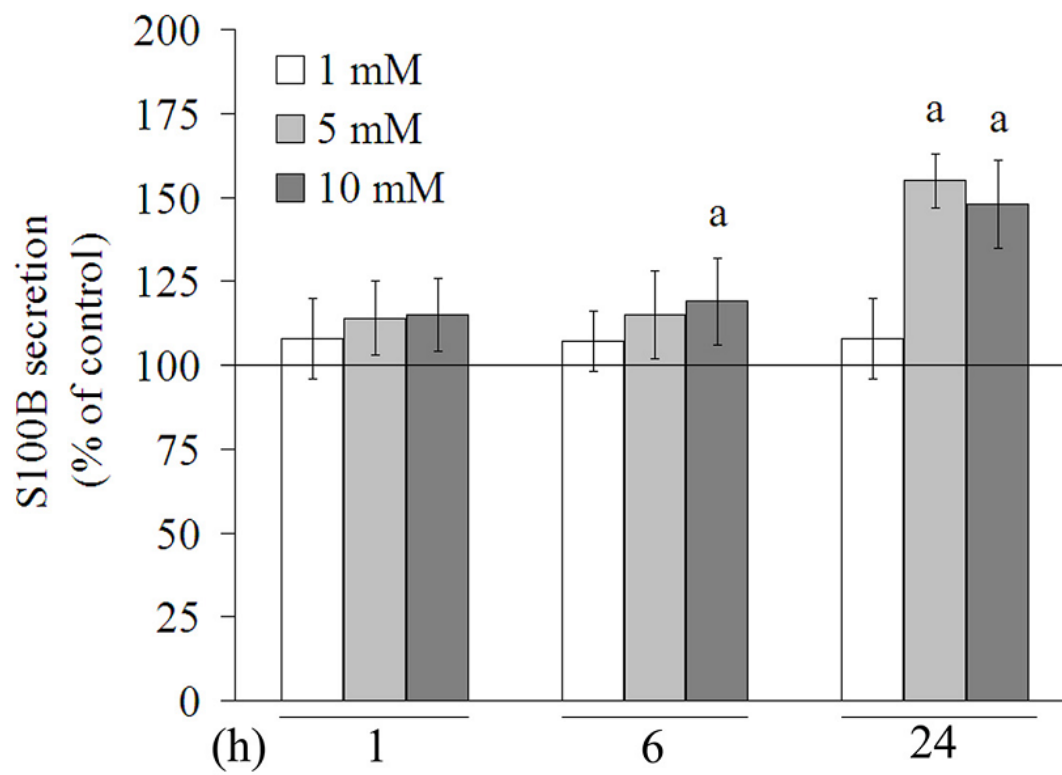
Cells were incubated up to 24 h in the presence of 1, 5 and 10 mM of ammonia. The assays were performed as described in Experimental Procedures section. Data represent means ± S.E.M of three experimental determinations performed in triplicate, analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Table 2. Effect of antioxidants on membrane integrity and metabolic activity in C6 astroglial cells and primary astrocytes culture.**

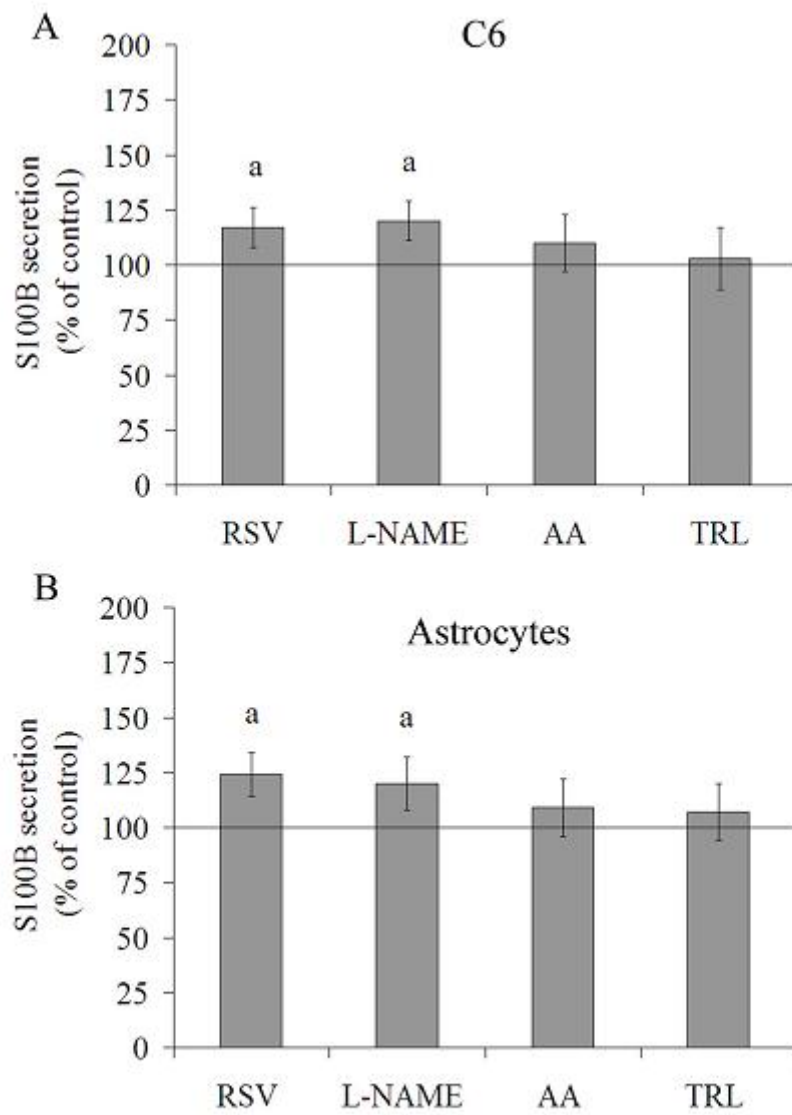
Cell Viability Assays (% of control)						
Treatments	C6			Astrócitós		
	PI	LDH	MTT	PI	LDH	MTT
RSV (100 $\mu$ M)	102 $\pm$ 5	98 $\pm$ 12	110 $\pm$ 4	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 13	108 $\pm$ 5
L-NAME (500 $\mu$ M)	100 $\pm$ 5	97 $\pm$ 11	107 $\pm$ 5	101 $\pm$ 5	96 $\pm$ 11	103 $\pm$ 6
AA (100 $\mu$ M)	101 $\pm$ 5	95 $\pm$ 13	102 $\pm$ 4	98 $\pm$ 5	97 $\pm$ 12	101 $\pm$ 6
AA (500 $\mu$ M)	96 $\pm$ 5	95 $\pm$ 12	99 $\pm$ 5	94 $\pm$ 5	95 $\pm$ 11	98 $\pm$ 5
TRL (50 $\mu$ M)	97 $\pm$ 5	94 $\pm$ 10	98 $\pm$ 5	97 $\pm$ 4	95 $\pm$ 10	98 $\pm$ 7
TRL (100 $\mu$ M)	87 $\pm$ 5 (a)	88 $\pm$ 10	89 $\pm$ 5 (a)	90 $\pm$ 5 (a)	87 $\pm$ 11	90 $\pm$ 5 (a)

Cells were incubated for 24 h in the presence of antioxidants in the indicated concentrations. PI incorporation, LDH release and MTT reduction were performed as described in Experimental Procedures section. Data (% of control) represent means  $\pm$  S.E.M of three experimental determinations performed in triplicate, analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey's test. (a) Indicates significant differences from control ( $P < 0.05$ ).

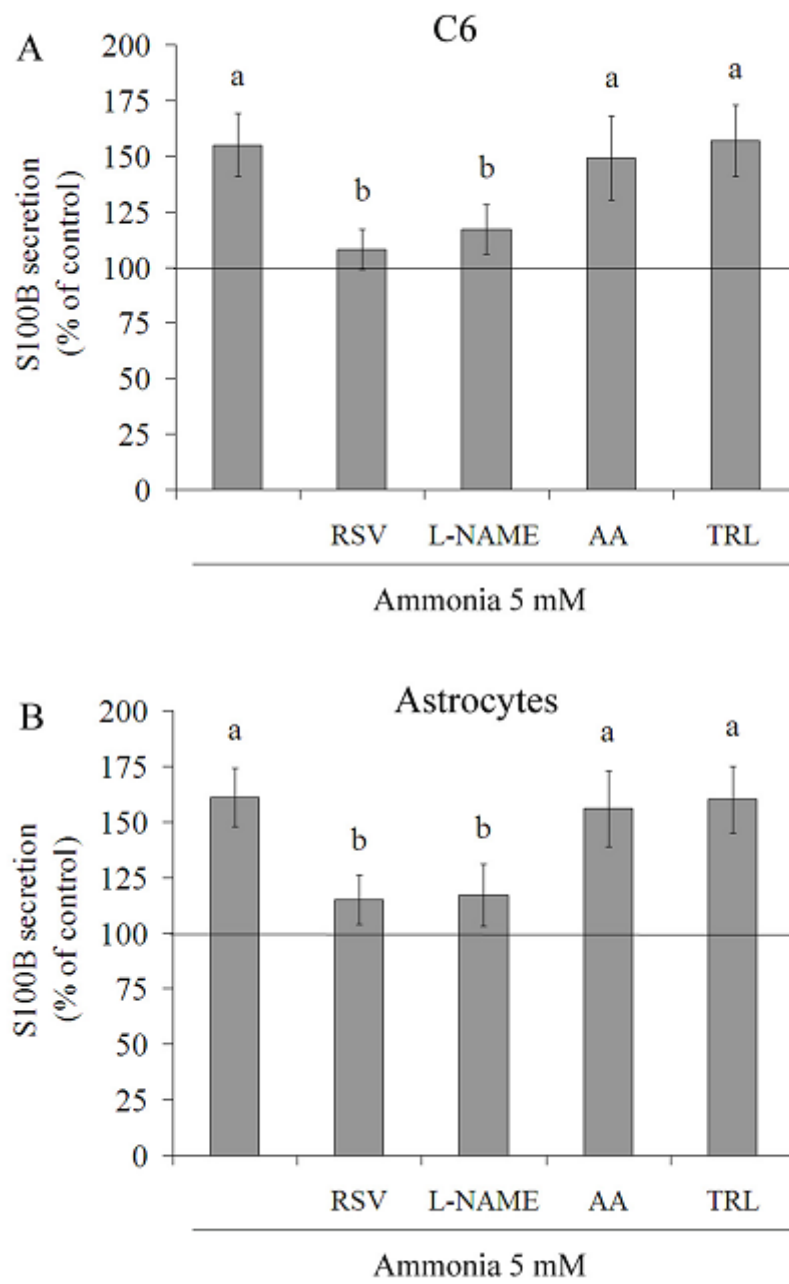
**FIGURE 1**



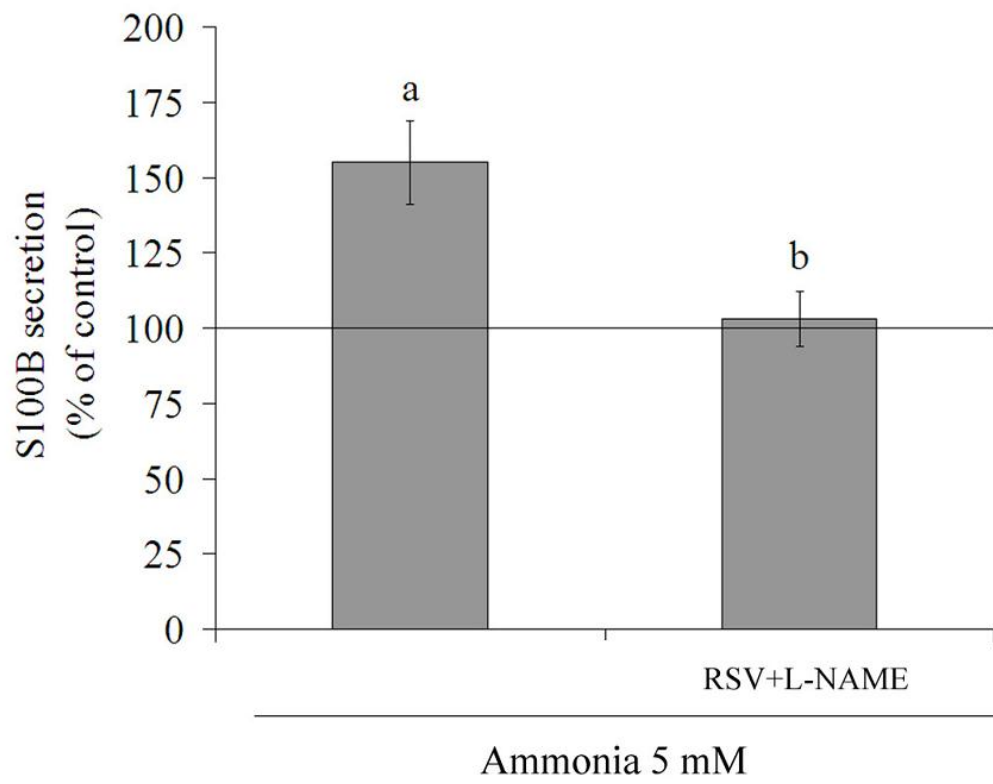
**FIGURE 2**



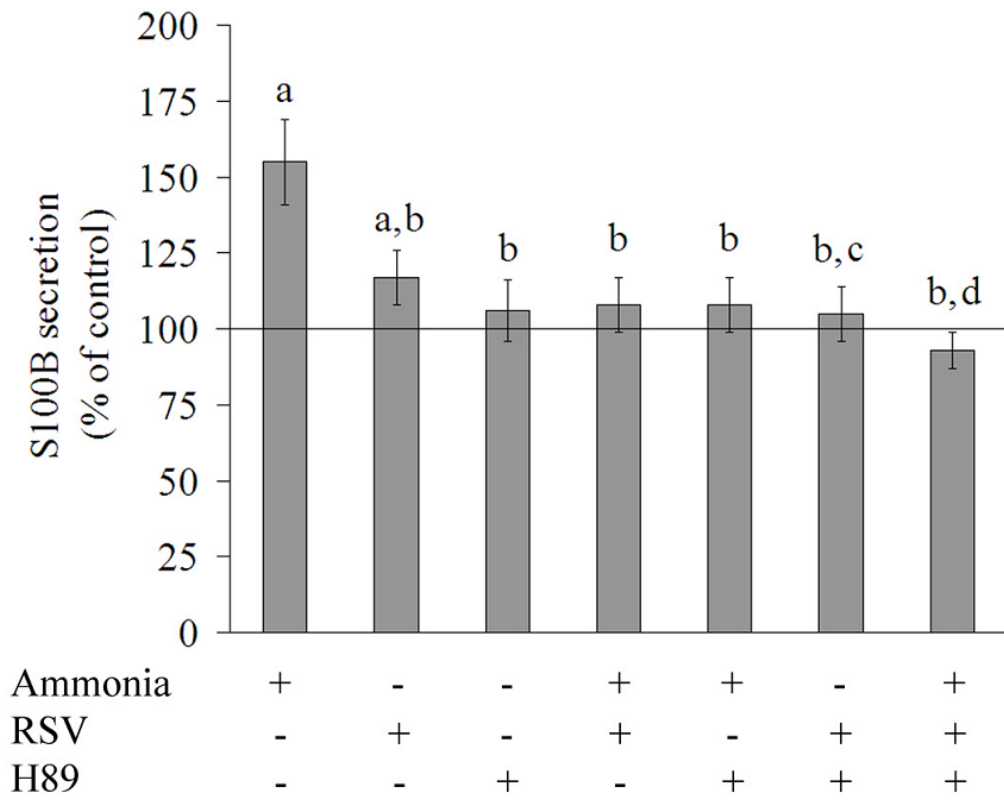
**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**





## **PARTE III**

## DISCUSSÃO

A S100B é uma proteína ligante de cálcio pertencente à família de proteínas S100. O primeiro membro das proteínas S100 foi isolado a partir de um extrato de cérebro bovino e estas proteínas foram por algum tempo consideradas como cérebro-específicas (Donato, 2001).

Atualmente, sabe-se que a proteína S100B é expressa em níveis variados em um número restrito de tipos celulares, tais como: astrócitos, oligodendrócitos em maturação, células epiteliais renais, células progenitoras neurais, pituícitos, endotélio, certas populações neuronais, condrócitos, adipócitos, melanócitos, células de Langerhans, células dendríticas, certas subpopulações de linfócitos, miofibras esqueléticas, mioblastos e células satélites musculares (Donato et al, 2009).

A proteína S100B é expressa abundantemente em astrócitos, podendo ser considerada, juntamente com a GFAP, como um marcador desse tipo celular. É também amplamente utilizada como um parâmetro de ativação glial e/ou morte celular em diversas condições de dano cerebral (Donato, 2003). A S100B possui atividades intra e extracelulares. Intracelularmente, a S100B se liga a diversas proteínas-alvo, modulando o citoesqueleto, a proliferação celular e o metabolismo energético dos astrócitos. A atividade extracelular da proteína S100B, tanto em neurônios quanto em células gliais, é dependente de sua concentração, podendo ser trófica (em concentrações nanomolar) ou tóxica (em concentrações micromolar) (Donato et al, 2009; Van Eldik & Wainwright, 2003).

A proteína S100B pode ser liberada pelos astrócitos. Muitos estimuladores da liberação de S100B têm sido identificados, incluindo o

peptídeo beta-amilóide (Pena et al, 1995), interleucina-1 $\beta$  (de Souza et al, 2009), serotonina (Whitaker-Azmitia et al, 1990), glutamato (Ciccarelli et al, 1999), adenosina (Ciccarelli et al, 1999),  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (Funchal et al, 2007), ácidos glutárico e 3-hidroxiglutárico (Quincozes-Santos et al, 2010b), neuroléptico risperidona (Quincozes-Santos et al, 2008) e antioxidantes naturais (de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009b). Embora já se conheça vários moduladores da secreção de S100B, bem como seus efeitos no meio extracelular sobre a atividade e a função neural, o mecanismo da regulação da secreção não foi totalmente elucidado.

Uma das respostas bioquímicas dos astrócitos em condições de danos cerebrais agudos e crônicos é um aumento do nível da proteína S100B no soro e no fluido cerebrospinal (Van Eldik & Wainwright, 2003). Algumas desordens que estão associadas com aumentos periféricos de S100B incluem dano cerebral traumático (Ingebrigtsen et al, 1999; McKeating et al, 1998), isquemia cerebral (Kim et al, 1996; Missler et al, 1997; Wunderlich et al, 1999), doenças neurodegenerativas (Netto et al, 2006; Netto et al, 2005; Otto et al, 1997; Peskind et al, 2001) e desordens psiquiátricas (Andreazza et al, 2007; Lara et al, 2001; Rothermundt et al, 2001).

A hiperamonemia é o principal elemento na patogênese da encefalopatia hepática e em outras desordens metabólicas cerebrais. Dentre as causas da hiperamonemia estão as deficiências inatas das enzimas do ciclo da uréia, resultando em uma capacidade reduzida para síntese hepática de uréia e glutamato. Nestas condições, as concentrações de amônia no tecido cerebral podem atingir 5 mM (Felipo & Butterworth, 2002).

Uma das maneiras pelas quais a amônia exerce neurotoxicidade é através dos seus efeitos no sistema glutamatérgico, incluindo elevação do conteúdo extracelular de glutamato (Monfort et al, 2002b), diminuição nos transportadores de glutamato (Felipo & Butterworth, 2002) e hiperativação dos receptores NMDA (Marcaida et al, 1992; Monfort et al, 2002a). Os astrócitos desempenham um papel essencial na proteção dos neurônios contra a excitotoxicidade através da captação da amônia e do glutamato e conversão a glutamina, através da enzima GS (Brookes, 2000).

A exposição à amônia, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, resulta em alterações na morfologia e em proteínas específicas dos astrócitos como GFAP, transportador glutamato-aspartato (GLAST) e GS. A GFAP, principal proteína dos filamentos intermediários de astrócitos maduros, está reduzida em cultura de astrócitos expostas à concentração milimolar de amônia (Belanger et al, 2002; Leite et al, 2006). Uma significativa perda no conteúdo de GLAST tem sido observada em astrócitos corticais (Chan et al, 2000). A atividade da enzima GS também encontra-se reduzida em condições de hiperamonemia, em cultura primária de astrócitos (Leite et al, 2006).

No presente estudo, nós inicialmente investigamos o efeito da amônia sobre a secreção da proteína S100B em cultura primária de astrócitos (de acordo com Leite et al, 2006) e, pela primeira vez, em células astrogliais C6. A secreção de S100B não foi alterada com 1 h de exposição a diferentes concentrações de amônia (1, 5 e 10 mM) em células C6. Em 6 h de tratamento, 10 mM de amônia aumentou a secreção em cerca de 20%. Já em 24 h de exposição, ocorreu o maior aumento na secreção de S100B com a concentração de 5 mM em células astrogliais C6. Os resultados obtidos em

cultura primária de astrócitos foram semelhantes (dados não mostrados, e em acordo com Leite et al, 2006). Os resultados obtidos mostram que estas células são ativadas na presença deste composto. Estes efeitos não podem ser atribuídos à morte celular astrogial, pois a viabilidade não foi alterada pela amônia. A partir disso, escolhemos a concentração de 5 mM e o tempo de 24 h para os tratamentos posteriores.

Em células gliais, a hiperamonemia resulta em um aumento de cálcio intracelular e AMPc. Existem evidências de que o cálcio intracelular possa sinalizar para a liberação de S100B (Davey et al, 2001). Também acredita-se que a secreção de S100B seja regulada por AMPc, pois o tratamento de culturas primárias de astrócitos com forscolina, que aumenta a concentração desse segundo mensageiro, provoca um aumento na secreção de S100B (Goncalves et al, 2002). O AMPc, que é sintetizado a partir de ATP pela enzima adenilato ciclase, ativa a proteína cinase A (PKA), a qual fosforila diversas proteínas e enzimas. Neste trabalho nós observamos que o H89, um inibidor da PKA, preveniu totalmente o aumento da S100B extracelular observado com o tratamento com amônia, indicando o envolvimento do AMPc e da PKA neste efeito.

Tem sido demonstrado que, dependendo de sua gravidade, a intoxicação aguda por amônia leva à rápida falência de órgãos ou morte com envolvimento do SNC. Um estudo prévio em pacientes com cirrose hepática indicou um aumento da concentração sérica da proteína S100B, que não foi acompanhado por um aumento significativo da concentração de amônia arterial, em um quadro de encefalopatia subclínica (Wiltfang et al, 1999). É importante mencionar que a amonemia normal não indica necessariamente a

ausência de comprometimento cerebral na encefalopatia hepática (Reif et al, 2004). Além disso, modelos de encefalopatia experimental sugerem que a concentração de amônia cerebral é cerca de 5-10 vezes maior que a concentração de amônia no sangue (Swain et al, 1992). Provavelmente, o aumento de S100B sérica nestes pacientes cirróticos foi devido à ativação dos astrócitos. No entanto, outras fontes de S100B não devem ser desconsideradas. Nossos dados reforçam o possível uso da S100B periférica como um marcador em condições de hiperamonemia.

Outros efeitos tóxicos importantes induzidos pela hiperamonemia são o estresse oxidativo e nitrosativo (Norenberg, 2003; Norenberg et al, 2009). Já foi observado, em cultura primária de astrócitos, que a amônia aumenta a produção de radicais livres (Murthy et al, 2001) e a permeabilidade mitocondrial (Rao & Norenberg, 2001), e estes efeitos são revertidos com a adição de antioxidantes (Norenberg et al, 2004). Também existem relatos de que a hiperamonemia no cérebro *in vivo* bem como em cultura de células diminui a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase, e aumenta a produção de superóxido (Kosenko et al, 1997a; Kosenko et al, 1997b).

Além disso, como já mencionado anteriormente, a amônia é primariamente detoxificada em astrócitos, principalmente pela enzima GS, que catalisa a reação de amidação do glutamato para formar glutamina. A glutamina é exportada para os neurônios, permitindo a síntese não somente de glutamato, mas também de GABA, pelo ciclo glutamato-glutamina (Pellerin et al, 2002; Westergaard et al, 1995). A GS é uma enzima sensível ao estresse oxidativo e sua atividade pode ser reduzida pelo dano oxidativo provocado pela

amônia (Leite et al, 2006). Assim, em condições hiperamonêmicas, podem ocorrer falhas no metabolismo energético, deficiência de neurotransmissores e distúrbios na neurotransmissão glutamatérgica, GABAérgica e serotoninérgica – todos moduladores da secreção de S100B.

Sabe-se que a secreção de S100B é afetada por condições redox e estresse metabólico (Donato et al, 2009; Nardin et al, 2007; Quincozes-Santos et al, 2009b). Nosso grupo tem demonstrado que o resveratrol e a epicatequina galato aumentam a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos e células C6 (Abib et al, 2008; de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009b). Os mesmos antioxidantes também melhoram parâmetros como a captação de glutamato, a atividade da GS e o conteúdo de GSH, o principal antioxidante do cérebro (de Almeida et al, 2007; dos Santos et al, 2006; Quincozes-Santos et al, 2009b). Logo, neste caso, o aumento do conteúdo extracelular de S100B, juntamente com a melhora de outros parâmetros gliais, pode ser benéfico para as funções das células astrogliais.

As defesas antioxidantes consistem de enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, e também de pequenas moléculas como a GSH e as vitaminas C e E (ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol, respectivamente). A função dos antioxidantes é agir como um sistema coordenado e balanceado para proteger tecidos e fluidos corporais do dano provocado por espécies reativas (Evans & Halliwell, 2001). Muitas defesas antioxidantes dependem de micronutrientes ou são por si próprias micronutrientes como, por exemplo, o  $\alpha$ -tocoferol e o ácido ascórbico. Além destes, existem outras moléculas encontradas na nossa alimentação, como os polifenóis, que também podem atuar como antioxidantes (Berger, 2005).

O resveratrol é um polifenol não-flavonóide encontrado naturalmente em frutas e vegetais, que possui importantes propriedades benéficas à saúde (Pervaiz, 2004). Entre os inúmeros efeitos biológicos do resveratrol destaca-se sua capacidade antioxidante, diminuindo a lipoperoxidação e atuando como seqüestrador de ERO (Leonard et al, 2003; Losa, 2003; Martinez & Moreno, 2000). Além disso, nosso grupo tem demonstrado que o resveratrol modula importantes funções gliais, como citado acima. Porém, o mecanismo pelo qual o resveratrol age ainda não foi totalmente elucidado.

Tendo em vista o aumento da secreção da proteína S100B induzido pelo tratamento com 5 mM de amônia por 24 h, também avaliamos neste trabalho o efeito de antioxidantes como o resveratrol, L-NAME - um inibidor da NOS, ácido ascórbico e trolox - um análogo hidrossolúvel da vitamina E, na secreção da proteína S100B. É importante destacar que dentre os antioxidantes testados, somente o trolox na concentração de 100  $\mu$ M induziu morte celular. A escolha das doses utilizadas (100  $\mu$ M para resveratrol e ácido ascórbico, 500  $\mu$ M para L-NAME e 50  $\mu$ M para trolox) foi baseada nos testes de viabilidade realizados, em dados prévios do nosso laboratório e na literatura recente. A medida de S100B extracelular se refere à secreção, visto que não foi observada morte celular. A secreção de S100B foi aumentada pelo resveratrol e pelo L-NAME, enquanto o ácido ascórbico e o trolox não provocaram alterações, em 24 h de tratamento, tanto em células C6 quanto em culturas primárias de astrócitos.

Anteriormente, dos Santos et al. havia encontrado que o resveratrol, na mesma concentração utilizada neste trabalho (100  $\mu$ M), aumentava significativamente a secreção de S100B somente a partir de 48 h de incubação,



em células astrogliais C6 (dos Santos et al, 2006). No entanto, demonstramos aqui que o resveratrol foi capaz de aumentar a secreção já em 24 h. Isto pode ser devido a mudanças do protocolo de ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) utilizado para a quantificação da proteína, já que o protocolo utilizado atualmente (Leite et al, 2008) possui uma maior sensibilidade em relação ao anterior (Tramontina et al, 2000).

O resveratrol também modula a produção de NO e diminui o imunoc conteúdo de iNOS – dados não publicados, Quincozes-Santos et al – mostrando efeito sinérgico quando incubado concomitantemente com L-NAME. Em relação ao ácido ascórbico, recentemente nós demonstramos que ele altera a frequência de micronúcleos, enquanto o resveratrol não altera (Quincozes-Santos et al, 2010a). Micronúcleos são um bom marcador de genotoxicidade, sendo uma das metodologias preferidas na determinação da perda ou quebra cromossomal (Fenech, 2000). Este efeito pode ser devido ao fato do ácido ascórbico poder apresentar também um comportamento pró-oxidante, aumentando a produção de ERO e gerando dano ao DNA (Halliwell, 2007).

Quando avaliamos a secreção de S100B incubando os antioxidantes e amônia, somente o resveratrol e o L-NAME protegeram as células contra a toxicidade da amônia. O resveratrol protege as células gliais contra um insulto oxidativo, incluindo a secreção de S100B. O resultado com L-NAME indica que o NO e/ou peroxinitrito, seu derivado altamente tóxico, estão provavelmente envolvidos em tal efeito. A coincubação com resveratrol e L-NAME apresentou maior redução na secreção de S100B, indicando um efeito sinérgico entre estes compostos. Além disso, os efeitos da toxicidade da amônia envolvem

mudanças no metabolismo do NO e ativação de receptores NMDA (Buzanska et al, 2000; Felipo & Butterworth, 2002; Monfort et al, 2002a), e isto pode estar relacionado ao efeito do L-NAME observado neste trabalho. A ativação de receptores NMDA leva à formação de NO em uma via dependente de cálcio através da NOS (Coyle & Puttfarcken, 1993). Neste contexto, é importante notar que o resveratrol inibe a iNOS e protege da ativação do receptor NMDA.

A NOS existe em três isoformas: nNOS (neuronal, tipo I), iNOS (induzível, tipo II) e eNOS (endotelial, tipo III). Enquanto NOS I e III são expressas constitutivamente em diversos tipos celulares do SNC, incluindo astrócitos, a NOS II é uma enzima induzível por diversos fatores, incluindo o estresse oxidativo, e sua superexpressão parece estar associada aos efeitos tóxicos do NO (Calabrese et al, 2007). Como citado anteriormente, observamos que o L-NAME e o resveratrol protegem as células contra a toxicidade induzida pela amônia. Cabe ressaltar que enquanto o L-NAME é um inibidor de NOS não-seletivo (Salerno et al, 2002), o resveratrol age reduzindo a expressão de iNOS, podendo oferecer uma melhor proteção contra a toxicidade induzida pela amônia.

Já foi demonstrado, em células C6, que a amônia (5 e 10 mM) induz apoptose a partir de 72 h de tratamento, e esta indução é revertida por L-NAME (Buzanska et al, 2000). Um dos efeitos extracelulares da proteína S100B, não somente em neurônios, mas também em células gliais, é a indução de apoptose (Donato et al, 2009). Em nosso estudo, observamos um aumento de S100B extracelular provocada por amônia e a prevenção desse aumento pelo L-NAME. Logo, a proteína S100B pode estar relacionada à indução de apoptose observada por Buzanska e colaboradores.

O resveratrol mostrou o melhor resultado contra a toxicidade induzida pela amônia e, quando co-incubado com H89, mostrou diferença significativa na liberação de S100B, indicando que o efeito da liberação de S100B é provavelmente mediado pela via da PKA. Tem sido demonstrado que o AMPc é capaz de ativar NOS através de proteínas cinases e esta ativação ocorre através da PKA (Guix et al, 2005; Hashimoto et al, 2006). Então, o provável mecanismo pelo qual o resveratrol modula a secreção de S100B envolve NOS e PKA.

Como descrito por Leite et al, 2006, ao contrário do esperado, a creatina não foi capaz de prevenir o aumento na liberação de S100B causada pela amônia (Leite et al, 2006). Porém, neste trabalho, o resveratrol protegeu este efeito. Os mecanismos implicados na neuroproteção exercida pela creatina são controversos, mas parecem depender, pelo menos em parte, do aumento nos estoques de fosfocreatina e no metabolismo energético relacionados aos níveis de ATP (Brustovetsky et al, 2001). O mecanismo de neuroproteção do resveratrol ainda não está claro, mas o efeito do resveratrol na toxicidade da amônia pode estar mais ligado a eventos relacionados ao estresse oxidativo que ao metabolismo energético, pois nosso grupo já demonstrou que o resveratrol melhora importantes parâmetros gliais que são dependentes do estado redox celular.

É importante mencionar que as culturas primárias de astrócitos e as células astrogliais C6 apresentaram o mesmo perfil em todos os parâmetros analisados, mostrando a similaridade entre estas células. Em outros estudos, foram observadas diferenças quando comparados astrócitos primários e

células C6 (Nardin et al, 2007), mas as células da linhagem C6 usadas neste trabalho apresentam mais de 100 passagens e forte característica astrocítica.

O efeito sobre a secreção de S100B observado com o resveratrol frente ao insulto com amônia, juntamente com dados prévios do nosso grupo que demonstram que o resveratrol é capaz de modular importantes parâmetros gliais como a atividade da enzima glutamina sintetase e a captação de glutamato (Quincozes-Santos & Gottfried), afetados em situações de hiperamonemia (Felipo & Butterworth, 2002), indicam um possível potencial deste composto na proteção dos danos em condições de hiperamonemia.

## **CONCLUSÃO**

Este estudo sugere, num primeiro momento, que o resveratrol atenua a secreção de S100B, em um modelo de dano induzido por amônia em astrócitos. A amônia induziu aumento na secreção de S100B após 24 h de exposição, num mecanismo dependente de PKA, e o resveratrol também agiu através desta via. Assim, a S100B pode ser um marcador útil para a encefalopatia hepática. Além disso, essas observações sugerem que o resveratrol pode ser agente protetor clinicamente viável contra condições nas quais ocorram estresse oxidativo. O resveratrol também pode ter um potencial para ser usado na proteção dos danos em condições de hiperamonemia.

## REFERÊNCIAS

- Abib RT, Quincozes-Santos A, Nardin P, Wofchuk ST, Perry ML, Goncalves CA, Gottfried C (2008) Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage. *Mol Cell Biochem* **310**(1-2): 153-158
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* **457**(7230): 675-677
- Amara SG, Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* **41**(5): 313-318
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Cereser KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Goncalves CA (2007) Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* **41**(6): 523-529
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**(5): 208-215
- Ates O, Cayli S, Altinoz E, Gurses I, Yucel N, Sener M, Kocak A, Yologlu S (2007) Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. *Mol Cell Biochem* **294**(1-2): 137-144
- Banerjee R, Vitvitsky V, Garg SK (2008) The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission. *Trends Biochem Sci* **33**(9): 413-419
- Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R (2000) Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol* **131**(4): 711-720
- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**(6): 493-506
- Belanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF (2002) Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int* **41**(2-3): 155-160
- Bemeur C, Desjardins P, Butterworth RF (2010) Evidence for oxidative/nitrosative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **25**(1): 3-9
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**(839): 370-371
- Benda P, Someda K, Messer J, Sweet WH (1971) Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* **34**(3): 310-323
- Berger MM (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr* **24**(2): 172-183
- Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A (1995) Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* **17**(1): 1-3

- Bianchi R, Giambanco I, Donato R (2010) S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging* **31**(4): 665-677
- Bjerring PN, Eefsen M, Hansen BA, Larsen FS (2009) The brain in acute liver failure. A tortuous path from hyperammonemia to cerebral edema. *Metab Brain Dis* **24**(1): 5-14
- Bosoi CR, Rose CF (2009) Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis* **24**(1): 95-102
- Bromberg PA, Robin ED, Forkner CE, Jr. (1960) The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH<sub>4</sub> plus minus NH<sub>3</sub> system. *J Clin Invest* **39**: 332-341
- Brookes N (2000) Functional integration of the transport of ammonium, glutamate and glutamine in astrocytes. *Neurochem Int* **37**(2-3): 121-129
- Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* **55**(12): 1263-1271
- Brustovetsky N, Brustovetsky T, Dubinsky JM (2001) On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. *J Neurochem* **76**(2): 425-434
- Buettner GR, Jurkiewicz BA (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* **145**(5): 532-541
- Butterworth RF (2002) Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int* **41**(2-3): 81-85
- Buzanska L, Zablocka B, Dybel A, Domanska-Janik K, Albrecht J (2000) Delayed induction of apoptosis by ammonia in C6 glioma cells. *Neurochem Int* **37**(2-3): 287-297
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM (2007) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* **8**(10): 766-775
- Cechin SR, Dunkley PR, Rodnight R (2005) Signal transduction mechanisms involved in the proliferation of C6 glioma cells induced by lysophosphatidic acid. *Neurochem Res* **30**(5): 603-611
- Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF (2000) Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* **37**(2-3): 243-248
- Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF (2010) Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis* **25**(1): 17-21
- Chen G, Shan W, Wu Y, Ren L, Dong J, Ji Z (2005) Synthesis and anti-inflammatory activity of resveratrol analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **53**(12): 1587-1590
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Bruno V, Battaglia G, D'Alimonte I, D'Onofrio M, Nicoletti F, Caciagli F (1999) Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia* **27**(3): 275-281

- Cohen G (1994) Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* **738**: 8-14
- Cooper AJ, Plum F (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* **67**(2): 440-519
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**(5134): 689-695
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**(1): 1-105
- Das M, Das DK (2010) Resveratrol and cardiovascular health. *Mol Aspects Med* **31**(6): 503-512
- Davey GE, Murmann P, Heizmann CW (2001) Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* **276**(33): 30819-30826
- de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, Battu C, Nardin P, Tortorelli LS, Zanotto C, Posser T, Wofchuk ST, Leal RB, Goncalves CA, Gottfried C (2008) Resveratrol protects against oxidative injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys* **480**(1): 27-32
- de Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Tramontina F, Feoli AM, Gottfried C, Goncalves CA (2007) Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol* **27**(5): 661-668
- de la Lastra CA, Villegas I (2005) Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* **49**(5): 405-430
- de la Lastra CA, Villegas I (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1156-1160
- de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB, Goncalves CA (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1 $\beta$  in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* **206**(1-2): 52-57
- Della-Morte D, Dave KR, DeFazio RA, Bao YC, Raval AP, Perez-Pinzon MA (2009) Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. *Neuroscience* **159**(3): 993-1002
- Donato R (1988) Calcium-independent, pH-regulated effects of S-100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubule protein in vitro. *J Biol Chem* **263**(1): 106-110
- 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**(7): 637-668
- Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* **60**(6): 540-551



- Donato R (2007) RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* **7**(8): 711-724
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* **1793**(6): 1008-1022
- Dong Z (2003) Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res* **523-524**: 145-150
- Dore S (2005) Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. *Neurosignals* **14**(1-2): 61-70
- dos Santos AQ, Nardin P, Funchal C, de Almeida LM, Jacques-Silva MC, Wofchuk ST, Goncalves CA, Gottfried C (2006) Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* **453**(2): 161-167
- Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* **25**(9-10): 1439-1451
- Evans P, Halliwell B (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* **85 Suppl 2**: S67-74
- Felipo V, Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* **67**(4): 259-279
- Fellin T, Carmignoto G (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* **559**(Pt 1): 3-15
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**(1-2): 81-95
- Feng Z, Zhang JT (2004) Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* **37**(11): 1790-1801
- Fremont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* **66**(8): 663-673
- Fremont L, Belguendouz L, Delpal S (1999) Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* **64**(26): 2511-2521
- Frizzo JK, Tramontina AC, Tramontina F, Gottfried C, Leal RB, Donato R, Goncalves CA (2004) Involvement of the S100B in cAMP-induced cytoskeleton remodeling in astrocytes: a study using TRTK-12 in digitonin-permeabilized cells. *Cell Mol Neurobiol* **24**(6): 833-840
- Fukui M, Choi HJ, Zhu BT (2010) Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med* **49**(5): 800-813
- Funchal C, Dos Santos AQ, Jacques-Silva MC, Zamoner A, Gottfried C, Wajner M, Pessoa-Pureur R (2005) Branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis* **20**(3): 205-217

- Funchal C, Tramontina F, Quincozes dos Santos A, Fraga de Souza D, Goncalves CA, Pessoa-Pureur R, Wajner M (2007) Effect of the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease on S100B release from glial cells. *J Neurol Sci* **260**(1-2): 87-94
- Gao ZB, Chen XQ, Hu GY (2006) Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. *Brain Res* **1111**(1): 41-47
- Garbuglia M, Verzini M, Sorci G, Bianchi R, Giambanco I, Agneletti AL, Donato R (1999) The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res* **32**(10): 1177-1185
- Gee JR, Keller JN (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(6): 1145-1150
- Gerlach R, Demel G, Konig HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kogel D (2006) Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience* **141**(4): 1697-1701
- Gomes FC, Paulin D, 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**(5): 619-631
- Goncalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E, Wofchuk S, Goncalves CA (2002) High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* **13**(12): 1533-1535
- Goswami SK, Das DK (2009) Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett* **284**(1): 1-6
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* **76**(2): 126-152
- Gutteridge JM, Halliwell B (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* **393**(4): 561-564
- Halliwell B (2006a) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**(6): 1634-1658
- Halliwell B (2006b) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* **141**(2): 312-322
- Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1147-1150
- Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**(2): 231-255
- Harrison FE, May JM (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* **46**(6): 719-730
- Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T (2006) Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis* **189**(2): 350-357

Haussinger D, Gerok W (1983) Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. *Eur J Biochem* **136**(2): 421-425

Haussinger D, Schliess F (2008) Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* **57**(8): 1156-1165

Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 191-220

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slattery T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97**(7): 889-901

Ingebrigtsen T, Waterloo K, Jacobsen EA, Langbakk B, Romner B (1999) Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery* **45**(3): 468-475; discussion 475-466

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**(5297): 218-220

Jayakumar AR, Rao KV, Murthy Ch R, Norenberg MD (2006) Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* **48**(6-7): 623-628

Jessen KR (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(10): 1861-1867

Katayama K (2004) Ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. *Hepatol Res* **30S**: 73-80

Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS (1996) Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke* **27**(9): 1553-1557

Kim YJ, Hwang SY, Oh ES, Oh S, Han IO (2006) IL-1beta, an immediate early protein secreted by activated microglia, induces iNOS/NO in C6 astrocytoma cells through p38 MAPK and NF-kappaB pathways. *J Neurosci Res* **84**(5): 1037-1046

Kimelberg HK, Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Sci Am* **260**(4): 66-72, 74, 76

Kosenko E, Felipo V, Montoliu C, Grisolia S, Kaminsky Y (1997a) Effects of acute hyperammonemia in vivo on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria. *Metab Brain Dis* **12**(1): 69-82

Kosenko E, Kaminski Y, Lopata O, Muravyov N, Felipo V (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication. *Free Radic Biol Med* **26**(11-12): 1369-1374

Kosenko E, Kaminsky Y, Kaminsky A, Valencia M, Lee L, Hermenegildo C, Felipo V (1997b) Superoxide production and antioxidant enzymes in ammonia intoxication in rats. *Free Radic Res* **27**(6): 637-644

- Langcake P, Pryce RJ (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**(2): 151-152
- Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO (2001) Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* **35**(1): 11-14
- Lee JH, Kim HN, Yang D, Jung K, Kim HM, Kim HH, Ha H, Lee ZH (2009) Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. *J Biol Chem* **284**(20): 13725-13734
- Leite MC, Brolese G, de Almeida LM, Pinero CC, Gottfried C, Goncalves CA (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull* **70**(2): 179-185
- Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* **169**(1): 93-99
- Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Goncalves CA (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* **87**(11): 2439-2446
- Lekakis J, Rallidis LS, Andreadou I, Vamvakou G, Kazantzoglou G, Magiatis P, Skaltsounis AL, Kremastinos DT (2005) Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **12**(6): 596-600
- Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* **309**(4): 1017-1026
- Liem RK, Messing A (2009) Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* **119**(7): 1814-1824
- Losa GA (2003) Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest* **33**(9): 818-823
- Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG (2008) An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem* **283**(46): 31315-31322
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* **209**(Pt 12): 2304-2311
- Mangoura D, Sakellaridis N, Jones J, Vernadakis A (1989) Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. *Neurochem Res* **14**(10): 941-947
- Marcaida G, Felipe V, Hermenegildo C, Minana MD, Grisolia S (1992) Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett* **296**(1): 67-68
- Markus MA, Morris BJ (2008) Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging* **3**(2): 331-339

- Martinez J, Moreno JJ (2000) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* **59**(7): 865-870
- Master S, Gottstein J, Blei AT (1999) Cerebral blood flow and the development of ammonia-induced brain edema in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* **30**(4): 876-880
- McKeating EG, Andrews PJ, Mascia L (1998) Relationship of neuron specific enolase and protein S-100 concentrations in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* **71**: 117-119
- Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* **28**(10): 1956-1960
- Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E (2007) Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem Res* **32**(6): 981-987
- Monfort P, Kosenko E, Erceg S, Canales JJ, Felipo V (2002a) Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors. *Neurochem Int* **41**(2-3): 95-102
- Monfort P, Munoz MD, ElAyadi A, Kosenko E, Felipo V (2002b) Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab Brain Dis* **17**(4): 237-250
- Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **19**(6): 739-744
- Morris SM, Jr. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* **22**: 87-105
- Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD (2001) Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* **66**(2): 282-288
- Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Goncalves CA (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int* **50**(5): 774-782
- Neary JT, Whitemore SR, Zhu Q, Norenberg MD (1994) Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J Neurochem* **63**(6): 2021-2027
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**(10): 523-530
- Netto CB, Portela LV, Felix TM, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R (2006) Serum S100B levels in patients with neural tube defects. *Clin Chim Acta* **364**(1-2): 275-278
- Netto CB, Portela LV, Ferreira CT, Kieling C, Matte U, Felix T, da Silveira TR, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R (2005) Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem* **38**(5): 433-435

- Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R (2003) Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* **21**(1): 1-9
- Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A (1963) [Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc.)]. *Yakugaku Zasshi* **83**: 988-990
- Norenberg MD (1979) Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem* **27**(3): 756-762
- Norenberg MD (2003) Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* **37**(2): 245-248
- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **19**(3-4): 313-329
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A (1979) Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* **161**(2): 303-310
- Norenberg MD, Neary JT, Norenberg LO, McCarthy M (1990) Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* **49**(4): 399-405
- Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2009) Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* **24**(1): 103-117
- Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR (2005) Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* **20**(4): 303-318
- Osiecki M, Ghanavi P, Atkinson K, Nielsen LK, Doran MR (2010) The ascorbic acid paradox. *Biochem Biophys Res Commun* **400**(4): 466-470
- Ott P, Clemmesen O, Larsen FS (2005) Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis. *Neurochem Int* **47**(1-2): 13-18
- Otto M, Stein H, Szudra A, Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Poser S, Kretschmar HA, Mader M, Weber T (1997) S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* **244**(9): 566-570
- Pekny M, Pekna M (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* **204**(4): 428-437
- Pellerin L, Bonvento G, Chatton JY, Pierre K, Magistretti PJ (2002) Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization. *Diabetes Nutr Metab* **15**(5): 268-273; discussion 273
- Pellerin L, Magistretti PJ (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* **10**(1): 53-62
- Pena LA, Brecher CW, Marshak DR (1995) beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res* **34**(1): 118-126

- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* **38**(3-4): 375-382
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* **32**(8): 421-431
- Pereira A, Jr., Furlan FA (2010) Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Prog Neurobiol* **92**(3): 405-420
- Pervaiz S (2003) Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J* **17**(14): 1975-1985
- Pervaiz S (2004) Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Updat* **7**(6): 333-344
- Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **39**(5-6): 409-413
- Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M (2007) Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol* **184**(1-2): 214-222
- Quincozes-Santos A, Abib RT, Leite MC, Bobermin D, Bambini-Junior V, Goncalves CA, Riesgo R, Gottfried C (2008) Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol Cell Biochem* **314**(1-2): 59-63
- Quincozes-Santos A, Andreazza AC, Goncalves CA, Gottfried C (2010a) Actions of redox-active compound resveratrol under hydrogen peroxide insult in C6 astroglial cells. *Toxicol In Vitro* **24**(3): 916-920
- Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Kleinkauf-Rocha J, Souza DO, Riesgo R, Goncalves CA, Gottfried C (2009a) Atypical neuroleptic risperidone modulates glial functions in C6 astroglial cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**(1): 11-15
- Quincozes-Santos A, Gottfried C (2011) Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* **1215**(1): 72-78
- Quincozes-Santos A, Nardin P, de Souza DF, Gelain DP, Moreira JC, Latini A, Goncalves CA, Gottfried C (2009b) The janus face of resveratrol in astroglial cells. *Neurotox Res* **16**(1): 30-41
- Quincozes-Santos A, Rosa RB, Leipnitz G, de Souza DF, Seminotti B, Wajner M, Goncalves CA (2010b) Induction of S100B secretion in C6 astroglial cells by the major metabolites accumulating in glutaric acidemia type I. *Metab Brain Dis* **25**(2): 191-198
- Qureshi K, Rao KV, Qureshi IA (1998) Differential inhibition by hyperammonemia of the electron transport chain enzymes in synaptosomes and non-synaptic mitochondria in ornithine transcarbamylase-deficient spf-mice: restoration by acetyl-L-carnitine. *Neurochem Res* **23**(6): 855-861

- Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* **26**(10): 520-522
- Rao KV, Mawal YR, Qureshi IA (1997) Progressive decrease of cerebral cytochrome C oxidase activity in sparse-fur mice: role of acetyl-L-carnitine in restoring the ammonia-induced cerebral energy depletion. *Neurosci Lett* **224**(2): 83-86
- Rao KV, Norenberg MD (2001) Cerebral energy metabolism in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis* **16**(1-2): 67-78
- Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD (2005) Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res* **30**(10): 1311-1318
- Reif A, Leonhard C, Mossner R, Lesch KP, Fallgatter AJ (2004) Encephalopathy and myoclonus triggered by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**(6): 1061-1063
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**(8808): 1523-1526
- Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* **23**(5): 209-216
- Rodnight R, Goncalves CA, Wofchuk ST, 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**(3): 325-338
- Rodrigo R, Cauli O, Boix J, EIMili N, Agusti A, Felipo V (2009) Role of NMDA receptors in acute liver failure and ammonia toxicity: therapeutical implications. *Neurochem Int* **55**(1-3): 113-118
- Rodrigo R, Felipo V (2006) Brain regional alterations in the modulation of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in liver cirrhosis. Role of hyperammonemia and cell types involved. *Neurochem Int* **48**(6-7): 472-477
- Rose C, Felipo V (2005) Limited capacity for ammonia removal by brain in chronic liver failure: potential role of nitric oxide. *Metab Brain Dis* **20**(4): 275-283
- Rose C, Kresse W, Kettenmann H (2005) Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* **280**(22): 20937-20944
- Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, Missler U, Peters M, Rudolf S, Kirchner H (2001) S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord* **66**(1): 89-93
- Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC, Dore S (2010) Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* **224**(1): 325-329
- Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA (2002) Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des* **8**(3): 177-200



- Saparov SM, Liu K, Agre P, Pohl P (2007) Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J Biol Chem* **282**(8): 5296-5301
- Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D (2009) Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell Signal* **21**(11): 1541-1547
- Schliess F, Gorg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Haussinger D (2002) Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* **16**(7): 739-741
- Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB (2009) Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res* **53**(1): 115-128
- Sharma M, Gupta YK (2002) Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci* **71**(21): 2489-2498
- Sies H (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* **69**(21-23): 965-968
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* **129**(4): 877-896
- Sinke AP, Jayakumar AR, Panickar KS, Moriyama M, Reddy PV, Norenberg MD (2008) NFkappaB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J Neurochem* **106**(6): 2302-2311
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* **30**(2): 91-113
- Somjen GG (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* **1**(1): 2-9
- Sorci G, Agneletti AL, Donato R (2000) Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An in vitro study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neuroscience* **99**(4): 773-783
- St Leger AS, Cochrane AL, Moore F (1979) Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* **1**(8124): 1017-1020
- Stadlbauer V, Wright GA, Jalan R (2009) Role of artificial liver support in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **24**(1): 15-26
- Stich HF, Karim J, Koropatnick J, Lo L (1976) Mutogenic action of ascorbic acid. *Nature* **260**(5553): 722-724
- Struzynska L, Bubko I, Walski M, Rafalowska U (2001) Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicology* **165**(2-3): 121-131
- Swain M, Butterworth RF, Blei AT (1992) Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* **15**(3): 449-453

Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM (2004) Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem* **279**(21): 22727-22737

Tramontina F, Conte S, Goncalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Goncalves CA (2002) Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol* **22**(3): 373-378

Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Portela LV, Goncalves CA (2000) Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Brain Res Protoc* **6**(1-2): 86-90

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* **21**(3-4): 97-108

Vaquero J, Butterworth RF (2006) The brain glutamate system in liver failure. *J Neurochem* **98**(3): 661-669

Virgili M, Contestabile A (2000) Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neurosci Lett* **281**(2-3): 123-126

Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* **86**(4): 342-367

Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A (1995) Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited. *Dev Neurosci* **17**(4): 203-211

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1990) Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* **528**(1): 155-158

Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW (2010) Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol* **91**(3): 200-219

Wiltfang J, Nolte W, Otto M, Wildberg J, Bahn E, Figulla HR, Pralle L, Hartmann H, Ruther E, Ramadori G (1999) Elevated serum levels of astroglial S100beta in patients with liver cirrhosis indicate early and subclinical portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **14**(4): 239-251

Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M (1999) Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* **30**(6): 1190-1195

Yen GC, Duh PD, Lin CW (2003) Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res* **37**(5): 509-514

Young JZ (1991) The concept of neuroglia. *Ann N Y Acad Sci* **633**: 1-18

Zamin LL, Dillenburg-Pilla P, Argenta-Comiran R, Horn AP, Simao F, Nassif M, Gerhardt D, Frozza RL, Salbego C (2006) Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis* **24**(1): 170-182

Zimmer DB, Van Eldik LJ (1987) Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. *Am J Physiol* **252**(3 Pt 1): C285-289

Zimmer DB, Van Eldik LJ (1988) Levels and distribution of the calcium-modulated proteins S100 and calmodulin in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* **50**(2): 572-579