

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

Efeito do glutamato, serotonina e fluoxetina sobre a secreção da proteína S100B e seu efeito sobre a captação de glutamato em cultura primária de astrócitos hipocampais

Francine Tramontina

Orientador: Prof. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre, junho de 2006

Efeito do glutamato, serotonina e fluoxetina sobre a secreção da proteína S100B e seu efeito sobre a captação de glutamato em cultura primária de astrócitos hipocampais

Francine Tramontina

O Milagre da Vida
(Albert Einstein)

Pode ser que um dia deixemos de nos falar...
Mas, enquanto houver amizade,
Faremos as pazes de novo.
Pode ser que um dia o tempo passe...
Mas, se a amizade permanecer,
Um de outro se há-de lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos...
Mas, se formos amigos de verdade,
A amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos...
Mas, se ainda sobrar amizade,
Nascemos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe...
Mas, com a amizade construiremos tudo novamente,
Cada vez de forma diferente.
Sendo único e inesquecível cada momento
Que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre.

Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pelo milagre da vida.

Ao CA, amigo, orientador, pai científico. Obrigada por tão valiosos ensinamentos, pela paciência e doação.

Carminha, sem a tua presença tudo teria sido mais difícil! Minha gratidão eterna pelos ensinamentos, pela amizade.

Juju, agradeço por todo ensinamento profissional e pessoal. Neste momento mais uma vez agradeço ao Criador pelo privilégio de tê-la como amiga para sempre!

Titi, irmã biológica, irmã de coração e também irmã científica! Obrigada pela colaboração 24 horas (no lab e em casa...), pela força nos momentos difíceis, pela amizade, parceria e paciência.

Dani, minha bolsista oficial. Obrigada pela doação e colaboração constante ao nosso trabalho, pela competência com a qual sempre realizou os experimentos, pelas caminhadas ao HCPA... e tudo mais.

Pati, minha amiga, comadre, parceira. Obrigada por ter colaborado com o trabalho e principalmente, obrigada por teu perdão.

Marina e Lúcia, obrigada pelas culturas do último ano.

Colegas do Lab 33: Letícia, Mariane, Ana Cristina (Tina), Alessandra, André, Lucas, Christopher... Obrigada pela amizade e agradável convivência!

Verlaine, Cecília e Alessandra: pessoas que pouco aparecem e muito contribuem. Obrigada por manterem sempre o nosso Lab 33 e sala de cultivo celular em ótimas condições de trabalho. Obrigada também pelo carinho e amizade.

Aos funcionários da secretaria e biotério, obrigada pelo trabalho e competência.

Mais uma vez (depois da graduação, ênfase e mestrado), obrigada à UFRGS, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

Aos meus pais, Valmor e Carmem, pelo incentivo constante, pelo amor e pelo orgulho que sempre demonstraram.

Matheus, amor da minha vida, obrigada por cada momento compartilhado. Obrigada pela paciência nos meus momentos de ausência, obrigada por teu amor, obrigada por existir.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, em algum momento, vierem a utilizar-se dele. A todos que darão continuidade a ele. A todos que colaboram com a ciência pensando no benefício à humanidade.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| PARTE I | 7 |
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| INTRODUÇÃO | 10 |
| 1. A CONSTITUIÇÃO CELULAR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) | 11 |
| 1.1. NEURÔNIOS | 12 |
| 1.2. CÉLULAS GLIAIS | 13 |
| 1.2.1. ASTRÓCITOS | 14 |
| 1.2.2. PROTEÍNAS MARCADORAS DE ASTRÓCITOS | 16 |
| 2. INTERAÇÃO NEURÔNIO-GLIA | 22 |
| 2.1. NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA | 23 |
| 2.2. CICLO GLUTAMATO-GLUTAMINA | 26 |
| 2.3. NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA | 27 |
| 3. OBJETIVOS GERAIS | 32 |
| PARTE II | 33 |
| CAPÍTULO I | 34 |
| A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO É ESTIMULADA POR S100B EXTRACELULAR EM ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS | 34 |
| CAPÍTULO II: | 41 |
| ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMATO REDUZ A SECREÇÃO DA S100B POR UM MECANISMO DEPENDENTE DE TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO | 41 |
| CAPÍTULO III | 48 |
| SEROTONINA REDUZ A SECREÇÃO DE S100B POR ATRAVÉS DO RECEPTOR 5HT _{-1A} E FLUOXERINA ESTIMULA ATRAVÉS DE MECANISMO QUE ENVOLVE PKA | 48 |
| CAPÍTULO IV: | 60 |
| ANTICORPO ANTI-GFAP DEMONSTROU AFINIDADE SELETIVA AO ESTADO DE FOSFORILAÇÃO DA GFAP NA PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE ELISA. | 60 |
| PARTE III | 79 |
| DISCUSSÃO | 80 |
| 1. SUMÁRIO DOS RESULTADOS | 80 |
| 2. A PROTEÍNA S100B ESTIMULA A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO | 80 |
| 3. O GLUTAMATO REDUZ A SECREÇÃO DE S100B POR UM MECANISMO DEPENDENTE DO TRANSPORTADOR DESSE NEUROTRANSMISSOR | 83 |
| 4. EFEITO DA SEROTONINA E FLUOXETINA SOBRE A SECREÇÃO DE S100B | 84 |
| 5. O ESTADO DE FOSFORILAÇÃO DA GFAP PODE AFETA SEU RECONHECIMENTO PELO ANTICORPO | 87 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |

Parte I

RESUMO

A S100B é uma proteína ligante de cálcio produzida e secretada por astrócitos e tem sido relacionada à interação neurônio-glia. Nosso primeiro objetivo foi investigar um possível efeito autócrino da S100B na captação de glutamato. A utilização do anticorpo anti-S100B reduziu a captação de glutamato após 30 minutos de incubação, sem afetar a integridade e viabilidade celular. Além disso, baixas concentrações de S100B (menos de 0,1 ng/mL) estimularam a captação de glutamato avaliada imediatamente após a troca de meio. Este dado reforça a importância dos astrócitos na transmissão glutamatérgica, particularmente, a função da S100B na neuroproteção contra dano excitotóxico. De fato, a S100B extracelular protege os neurônios quanto ao dano excitotóxico, enquanto concentrações tóxicas de glutamato têm demonstrado reduzir a secreção de S100B em astrócitos e fatias cerebrais, por mecanismos desconhecidos. Nosso segundo objetivo foi investigar os mecanismos possivelmente envolvidos neste efeito em cultura primária de astrócitos hipocâmpais utilizando agonistas glutamatérgicos e inibidores da captação de glutamato. Nossos resultados sugerem que a secreção de S100B está inversamente ligada à captação de glutamato. Além disso, a secreção da S100B parece ser estimulada por serotonina e estudos clínicos têm sugerido que a elevação da S100B está positivamente relacionada à resposta terapêutica dos antidepressivos, particularmente, os inibidores da recaptação da serotonina. Desta forma, nosso terceiro objetivo foi medir a secreção da S100B em culturas de astrócitos expostas à fluoxetina. Nós observamos um significativo aumento da secreção da S100B pela fluoxetina, efeito aparentemente dependente de PKA. Este dado reforça a importância da fluoxetina, independente da serotonina e receptores serotoninérgicos, para a atividade antidepressiva, bem como a função putativa da S100B nas doenças depressivas. Em paralelo, a padronização de uma técnica de ELISA para GFAP (a principal proteína marcadora de astrócitos), nós observamos que a fosforilação *in vitro* da GFAP purificada ou de amostras biológicas com PKA, indicam que a fosforilação aumenta o reconhecimento pelo anticorpo policlonal anti GFAP da DAKO. Estes resultados favorecem o entendimento de rápidas alterações na imunoreatividade da GFAP.

ABSTRACT

S100B is a calcium-binding protein expressed and secreted by astrocytes, which has been implicated in glial-neuronal communication. Our first aim was to investigate a possible autocrine role of S100B in glutamate uptake activity. Antibody anti-S100B addition decreased glutamate uptake measured 30 min after medium replacement, without affect cell integrity or viability. Moreover, low levels of S100B (less than 0.1 ng/mL) stimulated glutamate uptake measured immediately after medium replacement. This finding reinforces the importance of astrocytes in the glutamatergic transmission, particularly the role of S100B neuroprotection against excitotoxic damage. In fact, extracellular S100B protects hippocampal neurons from excitotoxic damage, whilst toxic levels of glutamate to neurons have been shown to reduce S100B secretion in astrocytes and brain slices, by unknown mechanisms. Our second aim was to investigate which mechanisms are possibly involved in this effect in primary cultures of hippocampal astrocytes using glutamate agonists and glutamate uptake inhibitors. Our findings suggest that S100B secretion is inversely coupled to glutamate uptake. Moreover, S100B secretion appears to be stimulated by serotonin and clinical studies have suggested that serum elevation of S100B is positively correlated with therapeutic antidepressant response, particularly selective serotonin reuptake inhibitors. Our third aim was to measure S100B secretion in astrocyte cultures exposed to fluoxetine. We observed a significant increment of S100B release by fluoxetine, apparently dependent on PKA. These data reinforce the importance of fluoxetine, independent of serotonin and serotonin receptors, for antidepressant activity, as well as the putative role of S100B in depressive disorders. In parallel, standardizing an ELISA for GFAP (the main protein marker for mature astrocytes) we found that *in vitro* phosphorylation of purified GFAP or biological samples with PKA indicate that GFAP phosphorylation improves the recognition by the polyclonal antibody anti-GFAP from DAKO. These results provide support to the understanding of fast changes in the GFAP-immunoreactivity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC – adenosina 3'5' monofosfato cíclica
SNC – sistema nervoso central
GABA – ácido gama-aminobutírico
GFAP – proteína ácida fibrilar glial
ATP – adenosina trifosfato
GS – glutamina sintetase
FI – filamento intermediário
PKA – proteína cinase dependente de AMPC
CaMKII - proteína cinase II dependente de Ca⁺/calmodulina
PKC - proteína cinase C
PPs - proteínas fosfatases
ELISA – enzima-linked immunoabsorbent assay
BDNF - brain-derived neurotrophic factor
RAGE - receptor for advanced glycation end products
IP₃ – inositol trifosfato
NMDA - N-metil-D-aspartato
AMPA - ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazolenopropionato
5-HT - 5-hidroxitriptamina, serotonina
5HT-1AA - ácido 5-hidroxiindol-3-acético
MAO-A - monoamina oxidase-A
MAO-B – monoamina oxidase B
ACPD – ácido 1-amino-1,3-ciclopentanodicarboxílico
DCG-IV - 2'3'-dicarboxiciclopropil glicina
L-AP-4 - ácido L-2-amino-4-fosfonopiónico
MTPG - RS- α -metil-4-tetrazolfenilglicina
DIDS – ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2-disulfônico
PDC - ácido L-trans-pirrolidina-2,4-dicarboxílico

INTRODUÇÃO

1. A constituição celular do Sistema Nervoso Central (SNC)

Elucidar os mecanismos bioquímicos que modulam nosso comportamento, memória e aprendizado sempre representou um desafio para os cientistas, não só pela sua complexidade, mas pela importância que representa. Cada vez mais, busca-se explicar as bases biológicas do funcionamento do SNC, para que com isso, se possa explicar desordens e patologias que atingem este sistema. Os avanços tecnológicos mais recentes têm contribuído muito no sentido de esclarecer estas questões. Entretanto, o uso de modelos experimentais para estudar processos neurais tanto em nível celular quanto molecular, ainda nos impõe barreiras entre o que observamos *in vitro* e o que realmente ocorre neste tecido. O desenvolvimento de novas técnicas de estudos (cultura de células ou cultura organotípica, por exemplo) tem contribuído muito para o avanço das pesquisas na área das neurociências.

O SNC é composto por células neuronais e gliais. Apesar de desempenharem diferentes papéis, é a sua integração harmônica que determina o pleno funcionamento neural. Os neurônios, por sua vez, foram durante muito tempo, vistos como as unidades funcionais de maior importância do cérebro. Evidências de que as células gliais desempenham importante papel no funcionamento neuronal sustentam a idéia de que a interação neurônio-glia é um elemento fundamental no entendimento da dinâmica do SNC (Corvalan et al, 1990).

1.1 Neurônios

A passagem de correntes iônicas através de canais na sua membrana torna o neurônio capaz de gerar e transmitir sinais elétricos, dividindo esta propriedade somente com células musculares e de algumas células endócrinas. Outra característica importante e que o distingue das demais células do organismo é que após o nascimento, o neurônio perde a capacidade mitótica.

Quanto à estrutura, o neurônio possui um corpo, também chamado soma, que é o centro metabólico da célula. A ele conectam-se prolongamentos aferentes e eferentes. Os aferentes, uma extensa árvore de finos processos denominados dendritos, são responsáveis pela recepção de sinais elétricos e químicos de outras células. O axônio, longo prolongamento eferente do soma neuronal, é considerado a unidade condutora do neurônio. É através dele que moléculas produzidas no soma migram até o terminal pré-sináptico, local onde a transmissão do impulso elétrico ocorre para a(s) célula(s) adjacente(s).

O sistema nervoso central está organizado no que diz respeito à localização de corpos celulares neuronais e seus prolongamentos, de maneira a determinar a distinção entre uma substância tecidual cinzenta e outra branca, respectivamente. A substância branca praticamente não contém corpos celulares de neurônios, sendo constituída basicamente por seus prolongamentos envoltos por células gliais – astrócitos e oligodendrócitos - onde há alta concentração de mielina (responsável pela cor branca). Por sua vez, a substância cinzenta é formada principalmente de somas neuronais, embora também contenha prolongamentos aferentes de neurônios e algumas células gliais (Kierszenbaum, 2004).

1.2 Células gliais

As células da glia são divididas em dois grupos principais: a microglia e a macroglia, esta, composta por astrócitos e oligodendrócitos. As células gliais se diferenciam dos neurônios devido à sua incapacidade de gerar potencial de ação e a habilidade de dividir-se ao longo da vida (Raine, 1999).

Compondo cerca de 5 a 20% do volume cerebral, as células microgliais são consideradas como os macrófagos do SNC por causa da sua mobilidade. Por sua vez, os oligodendrócitos são as células responsáveis pela mielinização dos neurônios no SNC (Streit, 1995).

Na década de 50, estudos realizados em astrócitos demonstraram que estas células proporcionam, além de suporte estrutural, suporte metabólico aos neurônios, principalmente no metabolismo de neurotransmissores, como glutamato e GABA. Também participam do tamponamento de íons K^+ e no metabolismo energético, regulando a quantidade de glicose cerebral (Kimelberg e Norenberg, 1989).

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

1.2.1 Astrócitos

São as células gliais mais abundantes e com a maior diversidade funcional no cérebro, além de uma capacidade altamente dinâmica de alterar seu fenótipo (plasticidade) no decorrer da vida (Shao e McCarthy, 1994). Recebem esta denominação devido ao seu formato estrelar. No tecido, podem ser classificados em dois subtipos principais: astrócitos fibrosos (encontram-se principalmente distribuídos na substância branca do cérebro) e astrócitos protoplasmáticos (mais numerosos na substância cinzenta onde circundam o corpo neuronal, dendritos e sinapses). É observada também, embora em casos raros, a presença de formas intermediárias entre estes dois subtipos, os chamados astrócitos mistos. Eles ocorrem na interface entre as substâncias branca e a cinzenta (Raine, 1999).

Tanto astrócitos fibrosos como protoplasmáticos têm contato com capilares sanguíneos e neurônios, sendo que em cultura recebem a classificação de astrócito tipo 2 e 1, respectivamente (Kimelberg e Norenberg, 1989). As culturas primárias utilizadas em nosso laboratório são do tipo 1, apresentando formato achatado e poligonal, expressam GFAP e, diferentemente de astrócitos tipo 2, não possuem antigenicidade para marcador de gangliosídeo de superfície conhecido como A2B5 (Raff et al, 1983).

Algumas estruturas do sistema nervoso apresentam formas características de astrócitos, como a glia de Bergmann no cerebelo, células de Müller na retina e pituitócitos na glândula pituitária (Shao e McCarthy, 1994). Cabe salientar, que todos estes tipos celulares podem ter suas características alteradas após injúria cerebral.

Numerosos estudos têm demonstrado que os astrócitos participam de diversas atividades cerebrais dentre as quais podemos enumerar:

- 1) Os prolongamentos da glia radial que servem como guia de migração neuronal no cérebro em desenvolvimento (Hatten e Mason, 1990; Hunter e Hatten, 1995);
- 2) Fornecem fatores tróficos para neurônios antes que estes estabeleçam seus contatos sinápticos (Schwartz e Mishler, 1990);
- 3) Estocam glicogênio, sendo a principal reserva energética do cérebro (Hamprecht e Dringen, 1995)
- 4) Tamponam níveis iônicos extracelulares preservando a atividade excitatória neuronal (Walz, 1989; Newman, 1995);
- 5) Participam do metabolismo glutamatérgico, sendo o único tipo celular no cérebro que contém a enzima glutamina sintetase (Kimmelberg e Katz, 1985; Kimmelberg e Norenberg, 1989);
- 6) Participam da resposta imunológica cerebral (Giulian e Tapscott 1988);
- 7) Auxiliam a formação da barreira hemato-encefálica (Lattera et al, 1999);
- 8) Após injúrias ao SNC formam uma “cicatriz” nervosa, denominada astrogliose ou gliose reativa (Shao e McCarthy, 1994).

Recentemente, a função de modulador da transmissão sináptica foi atribuída aos astrócitos devido à sua capacidade de serem ativados e responderem a neurotransmissores como glutamato, GABA, adrenalina, ATP, serotonina e acetilcolina (Newman, 2003). Desta forma, os astrócitos estão sendo considerados o terceiro elemento da transmissão sináptica (o primeiro, o neurônio pré-sináptico e o segundo, o neurônio pós-sináptico). Cabe salientar aqui que a resposta astrocitária de captar glutamato frente à liberação deste neurotransmissor, bem como a regulação dos níveis extracelulares de K^+ e H^+ , já citadas anteriormente, deixaram de ser consideradas como de suporte metabólico

apenas, mas são agora reconhecidas como participantes da modulação da transmissão sináptica.

1.2.2 Proteínas marcadoras de astrócitos

Os astrócitos possuem, bem caracterizadas, três proteínas específicas – GFAP, S100B e Glutamina Sintetase (GS).

GFAP (proteína ácida fibrilar glial)

A GFAP é uma proteína de filamentos intermediários tipo III, com peso molecular de 47 kDa e é marcadora de astrócitos maduros. Como membro da família de proteínas do citoesqueleto, a GFAP modula a motilidade e forma dos astrócitos por fornecer estabilidade estrutural aos processos astrocíticos. Os níveis de GFAP são regulados a partir do desenvolvimento do SNC, no período pós-natal quando ocorre a gliogênese mais intensa, e sob condições patológicas (Eng et al, 2000 e Eng 1985).

Proteínas de filamento intermediário (FI) apresentam uma cabeça amino-terminal, uma cauda carboxi-terminal, região esta responsável pela ligação entre os monômeros (ambas não helicoidais), e uma porção central, formada por uma extensa α -hélice, cuja sequência de aminoácidos é conservada em relação a outros tipos de proteínas componentes de FI. Diferenças na estrutura destas proteínas são normalmente evidenciadas nos aminoácidos da porção amino-terminal (Alberts et al, 2001).

A polimerização da GFAP consiste inicialmente no pareamento de monômeros idênticos formando um dímero, onde os domínios centrais estão alinhados em paralelo. A seguir, dois dímeros são posicionados de maneira anti-

paralela, ou seja, de um mesmo lado encontramos um terminal carboxi e um amino formando um tetrâmero. Este posicionamento anula a polaridade existente no dímero e permite a união de diversos tetrâmeros na formação do polímero, o que pode ser observado na figura 1.

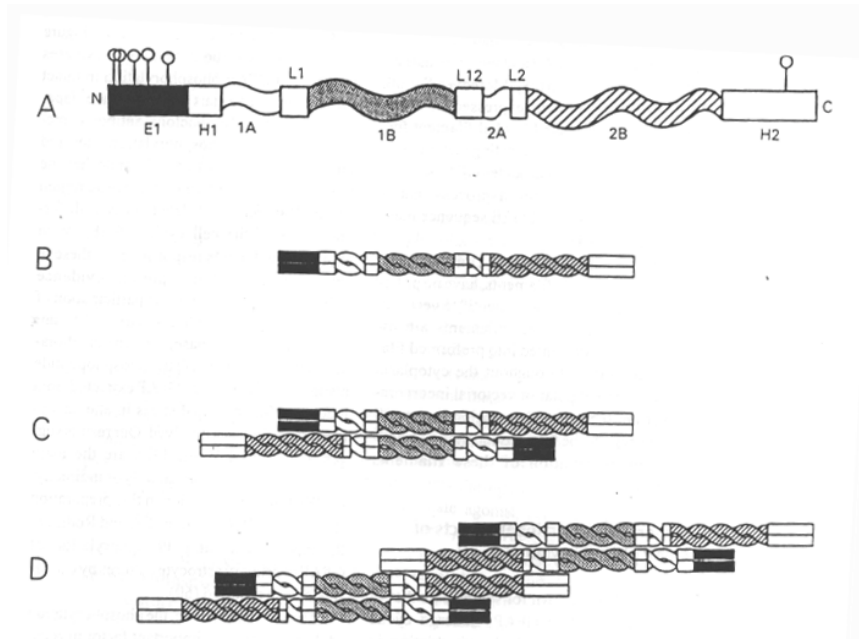


Figura 1. Estrutura dos filamentos intermediários do tipo III. O monômero (A) une-se paralelamente a outro formando um dímero (B). Os dímeros, por sua vez, complexam -se de forma anti-paralela formando um tetâmero (C) e a união destes resulta na formação do filamento. (Rodnight et al, 1997).

A fosforilação de sítios específicos de proteínas de FI como a GFAP regula o equilíbrio dinâmico entre seu estado polimerizado e despolimerizado, desempenhando importante papel na mitose (Rodnight et al, 1997). Fatores como a presença ou ausência de determinados cátions, pH, disponibilidade de ATP e força iônica do meio, podem influenciar na polimerização destas proteínas. No caso da GFAP de ratos, existem 5 sítios de fosforilação na porção N-terminal

Assim como outras proteínas de FI, a GFAP sofre um ciclo de fosforilação e desfosforilação em células intactas. Cinco sítios estão presentes na porção N-

terminal (Thr7, Ser8, Ser13, Ser17, Ser34) enquanto que apenas um na porção C-terminal (Ser389). A fosforilação ocorre através da proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA), proteína cinase II dependente de Ca⁺/calmodulina (CaMKII), proteína cinase C (PKC) e cdc-2 cinase (Tsujiura, 1994)

Proteínas fosfatases serina/treonina (PPs) estão envolvidas na desfosforilação da GFAP (Stemmer e Klee, 1991). Em preparações citoesqueléticas e fatias hipocâmpais de animais imaturos, a desfosforilação da GFAP é catalizada pela a PP1(Vinadè e Rodnigh, 1996) e PP2B (Rodnigh et al, 1997). De acordo com Takemura e colaboradores, 2002, o ciclo de fosforilação e desfosforilação da GFAP possui um equilíbrio entre a forma filamentosa (não fosforilada) e “pool” solúvel (fosforilado), sendo que a fosforilação desloca esse equilíbrio para o pool solúvel além de proteger a GFAP contra a proteólise (Figura 2).

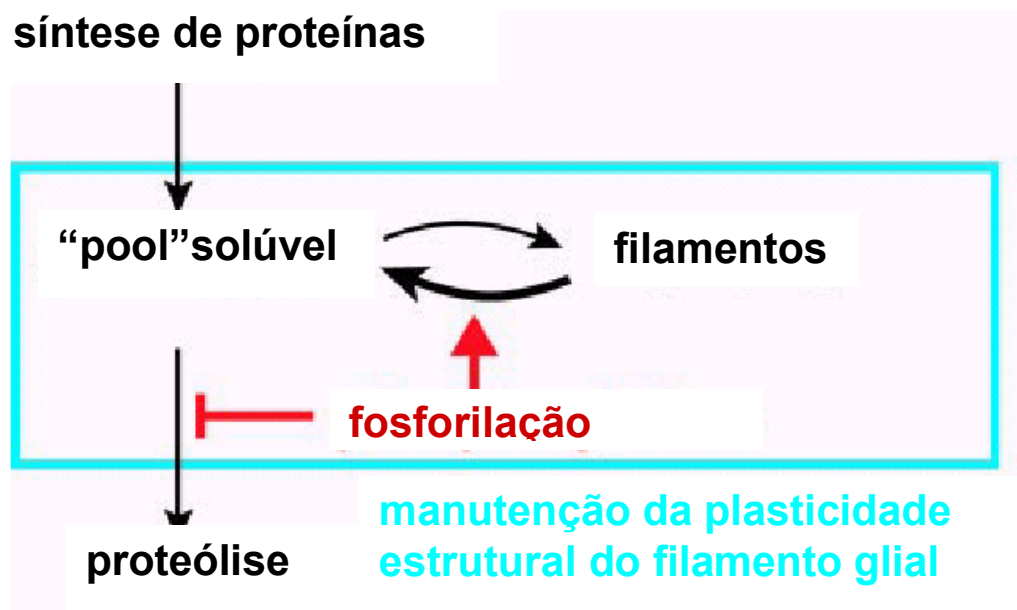


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de fosforilação e desfosforilação da GFAP atuando sobre a plasticidade celular. A fosforilação protege os filamentos não polimerizados da ação de proteases. Adaptado de Takemura et al, 2002.

Proteína S100B

Proteína neurotrófica produzida e secretada por astrócitos, compartilha com as demais proteínas da família S100 a propriedade de ligar Ca^{2+} . Ela tem o importante papel de mediador de sinais de Ca^{2+} no crescimento, diferenciação e mobilidade celular (Scotto et al, 1998, a). A S100B pode ser encontrada no citoplasma, associada à membrana plasmática ou outras membranas intracelulares e ao citoesqueleto, o que sugere seu envolvimento em diversas funções celulares (Sorci et al, 1998).

É um homodímero ($\beta\beta$) de 21 kDa, onde cada monômero caracteriza-se pela presença de dois sítios de ligação para o Ca^{2+} do tipo EF-hand, (Donato, 1999). As proteínas pertencentes à Família S100, entre as quais está a S100B, são assim chamadas por serem solúveis em uma solução de sulfato de amônio a 100%, e foram inicialmente purificadas a partir de cérebro bovino. Além do Ca^{2+} , esta proteína é capaz de ligar-se ao Zn^{2+} (Heizmann e Cox 1998), com uma afinidade relativamente alta, e ao Cu^{2+} (Nishikawa et al, 1997).

Funções intracelulares da S100B

A proteína S100B possui vários alvos protéicos sob investigação (Donato, 2001). A S100B reduz a fosforilação de algumas proteínas e esta inibição é devida à interação direta da proteína com substratos de cinases, bloqueando o acesso destas aos seus substratos (Donato, 2001). Dentre as proteínas cuja fosforilação está inibida, estão as marcadoras de astrócitos GFAP e vimentina e também a GAP-43, uma proteína específica de neurônios. A inibição da fosforilação de GFAP e vimentina deve refletir a interação da S100B com resíduos no domínio N-terminal destas proteínas (Ziegler et al, 1998). A fosforilação da GAP-43 pela

proteína cinase C (PKC) é reduzida na presença de S100B purificada, sugerindo que esta proteína possa desempenhar função na plasticidade sináptica e extensão de neuritos (Sheu et al, 1994).

Nenhuma atividade enzimática é atribuída à S100B, porém tem sido demonstrado que proteínas da família S100 são capazes de regular atividades enzimáticas. Acredita-se que a S100B exerça alguma função no metabolismo energético por interagir com a frutose-1,6-bifosfato aldolase e estimular a fosfoglicomutase (Landar et al, 1996). Outra enzima regulada pela S100B é a Ndr, uma proteína cinase nuclear importante na regulação da divisão celular e morfologia celular de forma cálcio dependente. Visto que a S100B tem sido implicada na regulação do ciclo celular, a interação S100B/Ndr deve ter importância fisiológica (Millward et al, 1998).

Outra enzima cuja atividade é modulada pela S100B é a calcineurina (PP2B, Proteína fosfatase 2B) (Leal et al, 2004). Sua atividade está aumentada de forma Ca^{+} dependente na presença de S100B. Estes resultados sugerem que a S100B exerce efeito amplo sobre o estado de fosforilação de diversas proteínas atuando na regulação da proliferação e na plasticidade celular.

Funções extracelulares da S100B

S100B é liberada constitutivamente por astrócitos e sua secreção é regulada por agonistas dos receptores 5HT1A (Whitaker-Azmitia et al, 1990), por glutamato, por adenosina (Ciccarelli et al, 1999) e por ácido lisofosfatídico (Pinto et al, 2000; Gonçalves et al, 2002). Foi observado que culturas primárias de

astrócitos tem a secreção estimulada em condições de ausência de soro (Pinto et al, 2000).

Pouco se conhece sobre o mecanismo pelo qual a secreção ocorre. Estudos recentes demonstraram que o BDNF poderia promover um processo de liberação através de vesículas, um mecanismo que não tinha sido proposto até então (Djalali et al, 2005). De fato, a secreção de S100B continua sendo até certo ponto um enigma pois no gene desta proteína não existe um domínio sinalizando secreção (Nishi et al, 2000).

Em concentrações nanomolar, ela tem efeito pró-sobrevivência de neurônios e estimula o crescimento dos neuritos. Em situações de injúria previne a degeneração do neurônio motor; estimula a fosforilação de ERK 1 e 2 em astrócitos (Gonçalves et al, 2000; Donato 2001, 2003;). Todas estas observações apontam para um papel fisiológico para S100B secretada, como um fator neurotrófico, que pode ser importante durante o desenvolvimento e regeneração nervosa. A atividade pró-sobrevivência da S100B extracelular e a habilidade desta proteína de estimular o crescimento do neurito dependem da translocação nuclear do NF- κ B e da super expressão do fator anti-apoptótico, Bcl-2, em neurônios alvo, que por sua vez depende da ligação da S100B com RAGE (Huttunen et al, 2000).

O RAGE é um receptor multiligante da família das imunoglobulinas, onde se liga, entre outras moléculas, o β -amilóide, a anfoterina e a S100A12. A anfoterina ao ligar-se no RAGE desencadeia uma série de sinalizações intracelulares. Entre as vias ativadas por esta molécula está a cascata Ras/MAPK, que induz a translocação nuclear do NF- κ B aumentando, assim, a sobrevivência de neurônios, e a via de sinalização Cdc42/Rac, envolvida no processo de extensão dos neuritos (Huttunem et al, 1999). Estas duas vias

podem também estar envolvidas na ativação do RAGE pela S100B em neuroblastos, uma vez que a S100B e a anfoterina exercem um efeito aditivo sobre estas células (Huttunen et al, 2000). Por outro lado, o desenvolvimento normal de fibras serotoninérgicas em animais geneticamente modificados que não expressam S100B indicam que esta proteína exerça uma função de modulação da plasticidade sináptica que se sobrepõe a sua participação no desenvolvimento cerebral (Nishiyama et al, 2002).

Concentrações em nível micromolar podem exercer efeitos neurotóxicos. Algumas doenças neurodegenerativas apresentam elevados níveis de S100B, como Síndrome de Down e Doença de Alzheimer (Griffin et al, 1989). Estes dados sugerem que a S100B pode ter alguma função na patogênese destas doenças, uma vez que o gene que codifica S100B encontra-se na região cromossomal 21q22.3 (Allore et al, 1988); e que a proteína β -amilóide estimula a síntese de S100B e seu mRNA em cultura de astrócitos (Pena et al, 1995). Além disso, a produção da proteína β -amilóide pode ser estimulada em cultura de neurônios expostos à S100B (Li et al, 1998).

2. Interação neurônio-glia

O funcionamento normal do SNC depende da manutenção adequada do microambiente neuronal. Isto requer a regulação da composição iônica extracelular, osmolaridade e pH, e prevenção do acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica. Deve haver também um contínuo suprimento de nutrientes para o metabolismo oxidativo neuronal. Numerosas evidências mostram que os astrócitos exercem funções críticas em todos esses processos.

A comunicação bidirecional entre neurônio e astrócitos é crucial para a sobrevivência e funcionamento normal do SNC. Neurônios e astrócitos interagem em duas redes estruturalmente separadas, mas, altamente conectadas funcionalmente: uma rede neuronal conectada via sinapses e uma rede astrocítica interconectada via junções gap (Rouach et al, 2004). Será abordada aqui especificamente a comunicação sináptica mediada por glutamato e serotonina.

2.1 Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos e exerce um importante papel na plasticidade neural e excitotoxicidade (Nakanishi, 1992). O glutamato medeia vários processos vitais: desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação e migração (McDonald e Johnston, 1990), modulação de mecanismos de aprendizado e memória (Izquierdo e Medina, 1997) e envelhecimento (Segovia et al, 2001). Os receptores glutamatérgicos (GluRs) têm papel fundamental na plasticidade e no desenvolvimento neural, bem como nos processos de neurodegeneração e transmissão sináptica. A ativação excessiva dos GluRs durante episódios de estresse cerebral tais como isquemia, traumatismo craniano e surtos epiléticos, leva à morte de neurônios.

2.1.1 Receptores de glutamato

Os receptores glutamatérgicos estão amplamente distribuídos no SNC, onde estão envolvidos em uma variedade de processos durante o desenvolvimento das células nervosas, incluindo proliferação, migração e plasticidade sináptica (Mc Donald e Johnston, 1990). Entretanto, a expressão dos

diferentes tipos destes receptores apresenta uma variação regional e de desenvolvimento bastante específica, indicando que estes podem exercer variadas funções quanto ao desenvolvimento e modulação do SNC. Os GluRs são divididos em duas classes: receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Conn e Pin, 1997; Ozawa et al, 1998).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) constituem um grupo de receptores ligados a proteínas G. O glutamato, ao ligar-se nestes receptores, ativa uma proteína G que pode ativar ou inibir a adenilato ciclase ou estimular a fosfolipase C, regulando, assim, a concentração de diferentes mediadores intracelulares (IP₃, AMPc ou Ca²⁺). Dentro deste grupo de receptores já se conhecem oito subtipos, os quais estão divididos em Grupo I, Grupo II e Grupo III (Pin e Duvoisin, 1995; Conn e Pin, 1997).

Por sua vez, os receptores ionotrópicos (iGluR) são canais que permitem a passagem de um cátion específico quando ativados por um agonista e foram subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato) e não NMDA, que compreendem os receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazolenopropionato) e kainato (Ozawa et al, 1998).

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

2.1.2 Captação de glutamato

Após ser produzido a partir da glutamina, o glutamato, é estocado, no neurônio, pelo sistema de transporte presente nas vesículas que se encontram no terminal pré-sináptico. Quando ocorre a despolarização dos terminais sinápticos glutamatérgicos, o glutamato que se encontra nas vesículas é liberado para o meio extracelular (fenda sináptica) para interagir com seus receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos que estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas e também nas membranas gliais (Gallo e Ghiani, 2000; Scannevin e Huganir, 2000). Este processo é dependente de cálcio citosólico (Nicholls e Atweel, 1990). Após a promoção de influxo iônico nestas células e a produção de segundos mensageiros, o glutamato é removido da fenda sináptica principalmente por sistemas de transporte que são dependentes de sódio, localizados nos neurônios e principalmente nas células gliais (Robinson e Down, 1997; Anderson e Swanson, 2000; Danboldt, 2001; Amara e Fontana, 2002). Esses sistemas de captação de glutamato são responsáveis pela inativação da transmissão glutamatérgica, pois não existem enzimas no meio extracelular que metabolizem o glutamato (Figura 4) (Danboldt, 2001).

Atualmente cinco tipos de transportadores de glutamato dependentes de sódio estão bem identificados e caracterizados: GLAST -1 (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4, EAAT5 (Amara e Fontana, 2002). GLT-1 e GLAST-1 estão distribuídos nas membranas plasmáticas astrocitárias (Chaudhry et al, 1995). Os demais estão predominantemente localizados nos neurônios (Amara e Fontana, 2002). Além disso, está bem estabelecido que os transportadores de glutamato localizados nas membranas das células gliais são de fato os responsáveis pela manutenção dos baixos níveis extracelulares de

glutamato e, desta maneira, garantem a homeostase celular (Anderson e Swanson, 2000; Tanaka, 2000; Gegelashvili et al, 2001; Amara e Fontana, 2002).

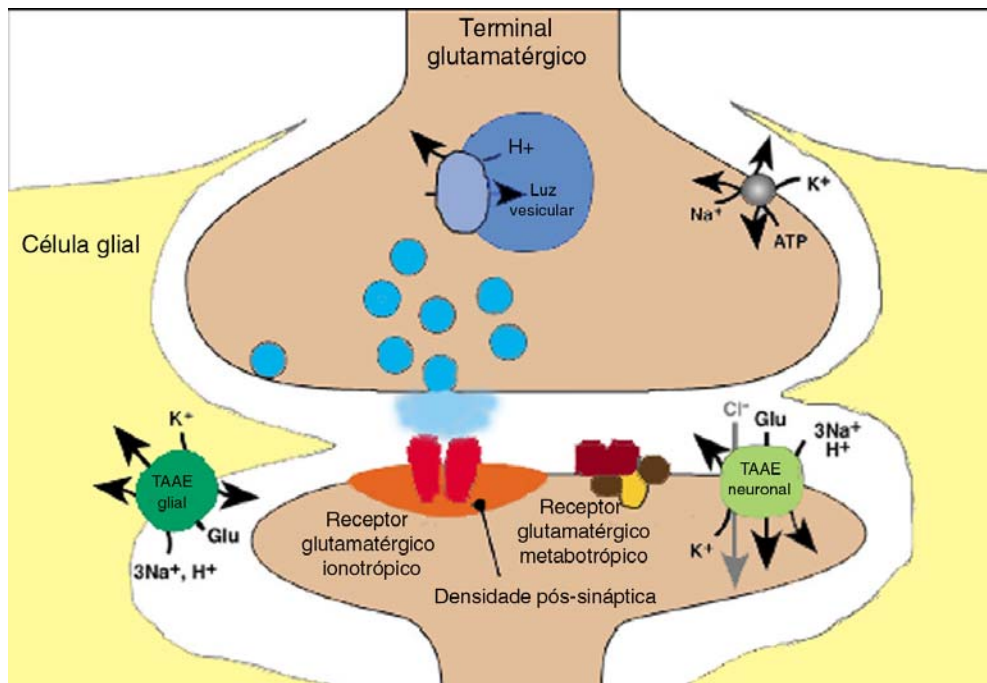


Figura 4. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica, onde TAAE - transportador de aminoácido excitatório. Adaptado de Amara e Fontana, 2002.

2.2 Ciclo glutamato-glutamina

Uma das funções mais importantes dos astrócitos no SNC é proteger os neurônios contra excitotoxicidade através da captação do excesso de amônia e glutamato e convertendo-os em glutamina através da enzima glutamina sintetase (GS). A glutamina liberada no espaço extracelular é utilizada por neurônios como precursor de glutamato através da ação da enzima glutaminase. O glutamato liberado dos neurônios pode ser captado pelos astrócitos e reconvertido a glutamina (Hertz et al, 1978). Esta via é conhecida como ciclo da glutamina-

glutamato. Sua importância reside no fato de ser a única via capaz de eliminar íons de amônio, altamente tóxico ao SNC. A glutamina sintetase localiza-se principalmente em astrócitos e a glutaminase em terminações nervosas (MEDINA et al, 1992).

2.3 Neurotransmissão Serotoninérgica

Descoberta em 1937 por Vittorio Erspamer, a substância indólica, encontrada em células intestinais e que provocava contração muscular foi primeiramente chamada enteramina. Page e colaboradores, subseqüentemente, isolaram e caracterizaram em seus estudos de hipertensão (1948) uma substância endógena que causava vasoconstrição. Foi então chamada serotonina: um fator do soro (“serum”) que afeta o “tônus” vascular e mostrou-se idêntica ao indol anteriormente isolado por Erspamer. A ação neurotransmissora da serotonina foi descoberta por Betty Twarog no músculo retrator do mexilhão (1952) e depois (1953) no SNC de mamíferos (revisto em: Jacobs e Azmitia, 1992).

Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma amina biogênica que regula a contração de músculo liso no sistema cardiovascular e gastrointestinal, estimula a agregação plaquetária e, no SNC, atua como neurotransmissor (Sanders-Bush e Mayer, 2006). Está envolvida em uma variedade de comportamentos incluindo humor, sono, dor, apetite, agressão e comportamento sexual (Sjoerdsma e Palfreyman, 1990; Roberts, 1984; Murphy et al, 1998).

A serotonina é produzida a partir do aminoácido triptofano, no interior dos neurônios. Primeiramente, L-triptofano é convertido a 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase, que é então descarboxilado a 5-hidroxitriptamina (5-

HT) pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase. Após sua síntese, é estocada em grânulos secretórios através de um transportador vesicular e liberada para a fenda sináptica por exocitose dos neurônios serotoninérgicos (Sanders-Bush e Mayer, 2006).

Existem pelo menos quinze receptores para a serotonina exercer seus efeitos sobre a excitabilidade neuronal (Azmitia, 1999; Stahl, 1998; Murphy, 1998) e, no SNC, a ação da serotonina é finalizada através de captação mediada por um transportador altamente específico localizado na membrana do axônio terminal (Sanders-Bush e Mayer, 2006).

2.3.1 Receptores serotoninérgicos

Baseados nos recentes estudos da ação da serotonina sobre tecidos periféricos, os pesquisadores hipotetizaram que as variadas ações desta amina envolvem sua interação com múltiplos receptores. Técnicas de biologia molecular permitiram a descoberta de sete classes de receptores de serotonina (5-HT₁₋₇) compreendendo um total de quinze receptores estrutural e farmacologicamente distintos (Hoyer et al, 1994). As funções de apenas quatro destas classes são reconhecidas: 5-HT₁ até 5-HT₄ (Sanders-Bush e Mayer, 2006). A classificação é baseada em critérios como genética, fatores morfológicos, o sistema de segundo mensageiro envolvido e propriedades farmacológicas (Hoyer et al, 2002), o que pode ser observado na figura 4.

As classes de receptores 5-HT₁, 5-HT₂, e 5-HT₄₋₇ são membros da superfamília das GPCR (G Protein-Coupled Receptor – receptores acoplados à proteína G) e estão localizados pré e pós sinapticamente. Medeiam uma variedade de funções neuronais incluindo a inibição da liberação do

neurotransmissor por acoplamento e internalização de canais de potássio e modulação do estímulo pós-sináptico através de cascatas de sinalização que ativam adenilato ciclase e fosfolipase C β_2 (Murphy et al, 1998). O receptor 5-HT3 é um canal iônico que liga Na⁺ e K⁺ e estruturalmente é semelhante ao receptor colinérgico nicotínico (Sanders-Bush e Mayer, 2006).

Nas células gliais já foi observada a expressão dos receptores 5-HT1A, que nos neurônios funciona como um autoreceptor cuja ativação resulta na inibição da liberação de neurotransmissores (Azmitia e Whitaker-Azmitia, 1996). Além disso, os astrócitos também expressam os receptores 5-HT2A e 5-HT2C, envolvidos na regulação energética por estimularem a quebra do glicogênio (Poblete e Azmitia, 1995).

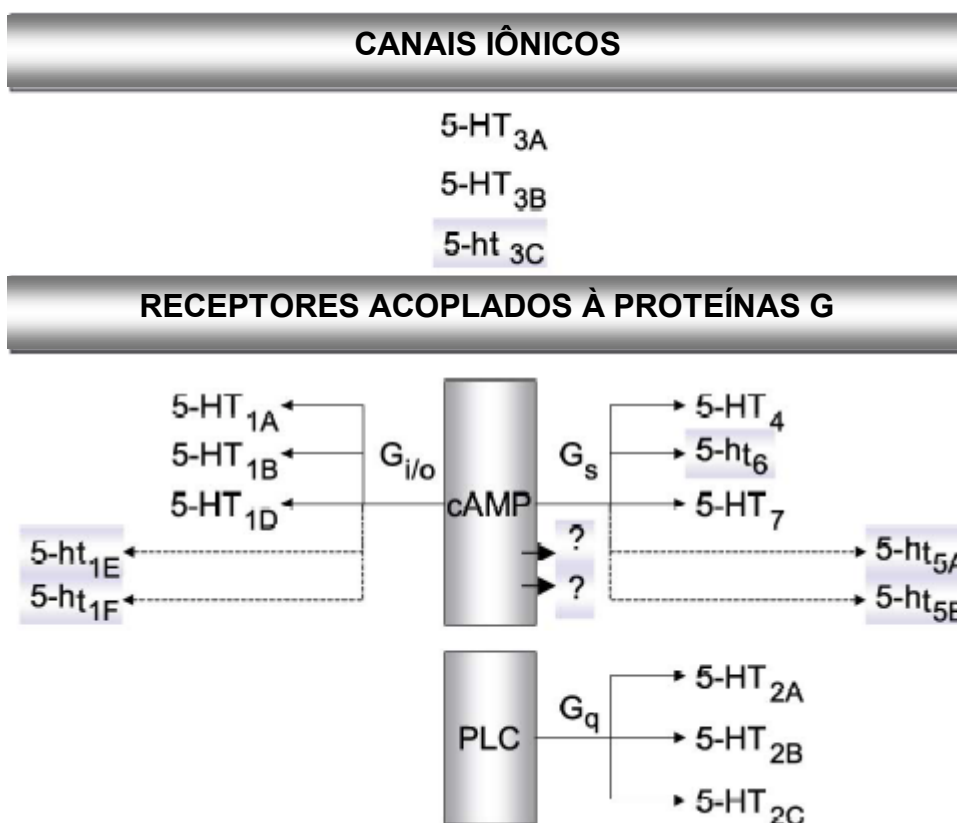


Figura 3. Representação gráfica da classificação atual dos receptores serotoninérgicos. Os subtipos representados em quadros coloridos e letras minúsculas ainda não possuem suas funções demonstradas no SNC. De acordo com Hoyer et al, 2002.

2.3.2 Captação e metabolismo da serotonina (ou re-captção)

A serotonina liberada na fenda sináptica é regulada por captação através de um transportador de membrana, Na⁺-dependente, conhecido por SerT (Serotonin Transporter; Persico et al, 2001). Estes transportadores são encontrados em uma grande variedade de células e, no SNC, têm sido localizados na membrana plasmática e citoplasma do soma neuronal, dendritos e terminais de neurônios serotoninérgicos (Zhou et al, 1998; Tao-Cheng e Zhou, 1999). O transportador de serotonina (SerT) também é expresso em neurônios não serotoninérgicos e células gliais (Pickel e Chan, 1999) e apresenta cerca de 50% de homologia com transportadores de catecolaminas. Entretanto, o SerT pode ser inibido especificamente por drogas como a fluxetina, sertralina e paroxetina (Hensler, 2006).

Após ser captada, a serotonina é transportada para o interior de vesículas sinápticas ou metabolizada a ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5HT-1AA) pela enzima MAO-A (monoamina oxidase-A; Shih et al, 1999). Em menor extensão, a serotonina pode ser reduzida formando o metabólito 5-hidroxitriptofol que difunde-se para o líquido através do espaço extracelular. A partir daí, eles são removidos por carreadores para a corrente sanguínea (Cumming et al, 1992; Garelis et al, 1974; Tabakoff et al, 1975).

A captação de serotonina tem sido descrita em cultura primária de astrócitos (Hösli e Hösli, 1995) juntamente com a presença de MAO-B (mais abundante) e A nestas células (Fitzgerald et al, 1990). Tais observações favorecem a idéia de que a captação e subsequente metabolismo da serotonina pelas células gliais exerce funções importantes na regulação da concentração extracelular deste neurotransmissor. Matsumiya e colaboradores (2001)

descrevem as características farmacológicas dos SERT indicando que o processo de captação é muito semelhante aos SERT neuronais. Os mesmos autores sugerem que este sistema deve ser caracterizado como uma segunda linha de defesa que inativa monoaminas que “escaparam” da recaptação neuronal, prevenindo, desta forma, a transmissão descontrolada do sinal.

2. OBJETIVOS GERAIS

- 1- Estudar os efeitos do glutamato sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos, avaliando o mecanismo envolvido;
- 2- Avaliar o possível efeito da S100B sobre a captação de glutamato em cultura primária de astrócitos;
- 3- Observar o efeito da serotonina sobre a secreção de S100B em cultura primária de astrócitos;
- 4- Padronizar uma técnica de ELISA para GFAP, visando correlacionar a secreção de S100B às possíveis variações intracelulares GFAP.

Parte II

CAPÍTULO I

A captação de glutamato é estimulada por S100B extracelular em astrócitos hipocampais

Título: Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes
Periódico: Cellular and Molecular Neurobiology
Status: publicado

CAPÍTULO II

Elevada concentração de glutamato reduz a secreção da S100B por um mecanismo dependente de transportador de glutamato

Título: High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter
Periódico: Neurochemistry Research
Status: publicado

CAPÍTULO III

Serotonina reduz a secreção de S100B através do receptor 5HT_{-1A} e fluoxerina estimula através de mecanismo que envolve PKA.

Título: S100B secretion is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin
Periódico: Biological Psychiatry
Status: Submetido

CAPÍTULO IV:

Anticorpo anti-GFAP demonstrou afinidade seletiva ao estado de fosforilação da GFAP na padronização de técnica de ELISA.

Título: Immunoassay for glial fibrillary acidic protein:
Antigen recognition is affected by its phosphorylation state
Periódico: Journal of Neuroscience Methods
Status: submetido

Parte III

DISCUSSÃO

1. Sumário dos resultados

- 1- A proteína S100B, em concentrações fisiológicas, estimula a captação de glutamato em cultura primária de astrócitos hipocampais através de mecanismo que não envolve a porção c-terminal desta proteína.
- 2- O glutamato, em concentrações tóxicas, reduz a secreção da proteína S100B em culturas primárias de astrócitos por meio de um mecanismo que envolve a captação deste neurotransmissor.
- 3- A serotonina, após 24 horas de incubação, promove redução na secreção da proteína S100B e este efeito pode estar relacionado ao receptor 5HT-1A.
- 4- A fluoxetina estimula a secreção da proteína S100B e este efeito está desvinculado da serotonina e, por sua vez, depende do AMPc.
- 5- O reconhecimento do anticorpo anti-GFAP pode depender do estado de fosforilação da GFAP.

2. A proteína S100B estimula a captação de glutamato

Cada vez mais se busca informações que possam esclarecer os eventos bioquímicos que ocorrem entre células gliais e neuronais. Um grande número de trabalhos tem demonstrado o astrócito como elemento fundamental para a sobrevivência do neurônio (Ahlemeyer et al, 2000; Blanc et al, 1998; Desagher et al, 1996; Ye e Sontheimer, 1999), incluindo sua função crítica na regulação da

concentração de glutamato na fenda sináptica (Hertz e Zielke, 2004; Amara e Fontana, 2002; Sonnewald et al, 2002) além da atividade sobre a captação de serotonina (Fitzgerald et al, 1990). A ativação excessiva dos receptores de glutamato pode levar à morte neuronal, um processo referido como excitotoxicidade. Além disso, muitas doenças associadas à depleção energética e estresse oxidativo prejudicam a captação de glutamato (Danbolt, 2001), somando-se a isso, os astrócitos podem contribuir com a excitotoxicidade glutamatérgica liberando glutamato na fenda sináptica – como ocorre na isquemia cerebral (Swanson, 2004).

Através da utilização de fatias cerebrais foi possível confirmar que o astrócito *in vivo*, assim como *in vitro*, responde aos neurotransmissores liberados pelos neurônios, uma questão anteriormente levantada através das observações em cultura de astrócitos: as células gliais respondem com aumento de cálcio intracelular a uma variedade de neurotransmissores incluindo glutamato, GABA, adrenalina, ATP, serotonina e alguns peptídeos (Finkbeiner, 1993; Porter e McCarthy, 1997).

Os astrócitos, através da captação de glutamato e do ciclo glutamina-glutamato, contribuem para a manutenção de baixas concentrações de glutamato na fenda sináptica, o que garante a sobrevivência neuronal além de fornecerem glutamina para a síntese do glutamato. Da mesma forma, a liberação da proteína S100B pelo astrócito contribui para o desenvolvimento neuronal e também protege os neurônios contra injúria provocada pela excitotoxicidade glutamatérgica (Ahlemeyer et al, 2000) bem como contra a toxicidade causada por agonistas NMDA (Kogel et al, 2004). O estímulo provocado pela S100B extracelular sobre a captação do glutamato pode estar envolvido neste efeito neuroprotetor, uma vez

que a captação do glutamato pelos astrócitos foi favorecida pela presença de S100B e reduzida pela presença de anticorpo anti-S100B.

A forma pela qual a S100B atua sobre a captação de glutamato não está clara, mas as observações de que o peptídeo TRTK-12 não provocou alteração sobre a captação de glutamato, indicam que a S100B não atua através da porção c-terminal; já que tal peptídeo bloqueia as funções da proteína mediadas pelo C-terminal. Desta forma, outro domínio estaria envolvido nesta ação da S100B, como ocorre a sua ligação aos RAGE (Donato, 2003).

Além disso, algumas ações da S100B estão relacionadas ao seu estado redox: proliferação glial (Scotto et al, 1998, b) e ativação da ERK (Gonçalves et al, 2000) são favorecidas pela S100B oxidada. Não seria surpreendente a observação de que o efeito da S100B poderia ser favorecido pela oxidação. Torna-se necessário refletir sobre os transportadores de glutamato que são sensíveis a oxidação. Desta forma, a S100B poderia compensar a perda da atividade dos transportadores de glutamato. Entretanto, no momento, isto permanece como uma especulação, bem como a ação da S100B sobre transportadores de glutamato neuronais.

O efeito positivo da S100B modulando a transmissão glutamatérgica observado neste trabalho, corrobora com a ação anti-epileptogênica recentemente sugerida para os astrócitos: camundongos geneticamente modificados para não expressar S100B apresentaram um perfil de crises mais severas de epilepsia após eventos excitatórios (Dyck et al, 2002). Porém, ainda não existem evidências a respeito dos níveis extracelulares de S100B ou sobre a atividade de captação de glutamato nesses animais.

As observações de que a S100B contribui para transmissão glutamatérgica constitui mais um fato somando as observações de que os astrócitos participam da transmissão sináptica como o terceiro elemento da sinapse: o elemento regulador da sinapse. Os resultados apontam para o fato de esta proteína participar da captação em concentração sub-nanomolar. Além disto, a S100B em concentrações consideradas tóxicas (milimolar), não prejudicou a captação de glutamato.

3. O glutamato reduz a secreção de S100B por um mecanismo dependente do transportador desse neurotransmissor

Já está bem estabelecido na literatura que a S100B extracelular, em concentração nanomolar, protege neurônios hipocámpais contra excitotoxicidade provocada por glutamato e agonista NMDA (Ahlemeyer et al, 2000). O fato de o glutamato reduzir a secreção de S100B em astrócitos (Gonçalves et al, 2002) e em fatias cerebrais (Buyukuysal, 2005), pode ser considerado como parte do evento excitotóxico mediado por este quando em concentrações tóxicas. O mecanismo através do qual o glutamato, em concentração tóxica (1 mM), reduz a secreção de S100B foi alvo de nossos estudos. Para tanto, lançamos mão da utilização de agonistas e antagonistas de receptores glutamatérgicos bem como de inibidores de transportadores glutamatérgicos.

Na tentativa de avaliar qual o mecanismo envolvido neste efeito, utilizamos agonistas de receptores glutamatérgicos: ACPD (agonista de mGluR grupo I), DCG-IV (agonista de mGluR grupo II), L-AP-4 (agonista de mGluR grupo III), na presença ou ausência de glutamato.

DCG-IV promoveu uma redução, embora parcial, na secreção de S100B, sugerindo que este efeito poderia ser mediado por mGluR tipo II. Para confirmar este efeito, utilizamos um antagonista de mGluR tipo I e II, MTPG. Este foi incapaz de reverter o efeito do glutamato sobre a redução da secreção de S100B, indicando que o efeito do glutamato observado não ocorre predominantemente através da ativação de receptores glutamatérgicos tipo II.

Contrariamente à nossa observação há um dado na literatura mostrando que o DCG-IV promove um aumento na secreção de S100B em astrócitos corticais (Cicarelli et al, 1999). Entretanto, considerando que o receptor desse agonista mGluR II, está negativamente acoplado a adenilil ciclase, seria mais razoável supor que ocorreria uma redução na secreção de S100B, como nós encontramos, já que o aumento da concentração intracelular de AMPc estimula a secreção de S100B (Pinto et al, 2000).

Observamos que D-aspartato (inibidor competitivo do transporte de glutamato) inibiu parcialmente o efeito do glutamato sobre a secreção de S100B e que PDC (um inibidor do transporte de glutamato mediado por GLAST e GLT-1) e DIDS (um bloqueador geral do transporte iônico) reverteram completamente. Este efeito nos leva a sugerir que a redução da secreção de S100B através do glutamato está vinculada ao influxo deste neurotransmissor, que provoca uma redução na concentração intracelular de AMPc (Gonçalves et al, 2002) e, desta forma, reduz a secreção de S100B.

4. Efeito da serotonina e fluoxetina sobre a secreção de S100B

Os astrócitos participam ativamente do metabolismo da serotonina uma vez que possuem em sua estrutura toda a maquinaria necessária para tanto:

receptores (Azmitia et al, 1996), transportadores (Inazu et al, 2001) e enzimas de degradação (Carlo et al, 1996). Porém, o efeito da serotonina sobre a secreção de S100B somente foi demonstrado através da utilização de agonistas do tipo 1A (Whitaker-Azmitia et al, 1990). Por sua vez, o efeito da fluoxetina somente foi demonstrado sobre a expressão de S100B (Akhisaroglu et al, 2003), não havendo dados na literatura a respeito de seus efeitos sobre a secreção de S100B.

Ao contrário do que esperávamos, observamos que a adição de serotonina causou uma redução na secreção de S100B a partir de 6h. Os receptores serotoninérgicos do tipo 1 são acoplados negativamente a adenilil ciclase e sua ativação poderia justificar esse efeito, embora a literatura aponte que a ativação de receptores 5HT-1A promove aumento da secreção de S100B.

A reversão do efeito citado acima foi observada quando Nan-190 (um antagonista de receptor 5HT-1A) foi utilizado, indicando que a serotonina poderia estar atuando através do receptor 5HT-1A. Porém, uma investigação mais detalhada a respeito da expressão destes receptores em nossas condições de cultivo é necessária, uma vez que estudos recentes indicam que este receptor possui expressão transitória em astrócitos e cuja reatividade é observada apenas até o sétimo dia pós-natal (Azmitia, 2001).

Alguns estudos têm sugerido a participação da glia no mecanismo de ação dos antidepressivos (Manev et al, 2003) indicando que a S100B pode ser um dos fatores tróficos mobilizados no tratamento com antidepressivos (Manev et al, 2001) e que participa ativamente nos processos de remodelamento para neurônios e astrócitos na depressão maior.

A fluoxetina aumenta o conteúdo hipocampal de S100B em ratos tratados cronicamente (Akhisaroglu, 2003) sugerindo que este efeito do antidepressivo

poderia estar diretamente relacionado com a elevação da concentração de serotonina na fenda sináptica. Porém, nossos resultados indicam que a fluoxetina atua independentemente da serotonina ao estimular a secreção de S100B, uma vez que, na presença de serotonina, o efeito da fluoxetina foi menor.

Além disso, nossos resultados indicam que a fluoxetina atua através da ativação da PKA, já que o H89, um inibidor desta cinase, reduziu a secreção de S100B na presença de fluoxetina. Resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório reforçam esta idéia, uma vez que a secreção de S100B é estimulada por elevação do AMPc intracelular (Gonçalves et al, 2002 e Pinto et al, 2000).

Desta forma, demonstramos que a serotonina, assim como o glutamato (discutido anteriormente), modula negativamente a secreção de S100B, e a utilização de inibidor de sua captação promove aumento na secreção de S100B (figura 5). Para os dois neurotransmissores, a secreção de S100B está negativamente relacionada à sua captação.

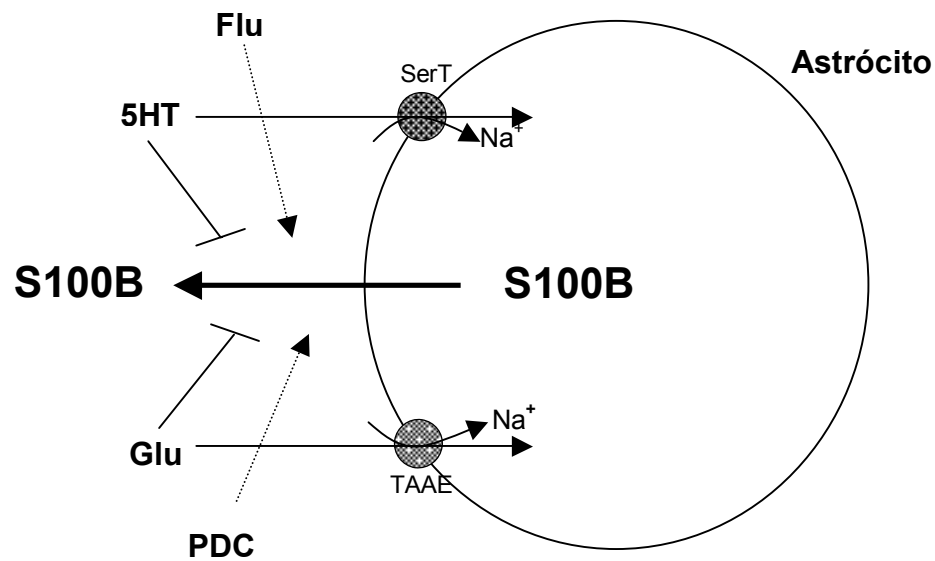


Figura 5: Esquema da secreção de S100B reduzida por glutamato (Glu) e serotonina (5HT), e estimulada por bloqueadores da captação destes. SerT, transportador de serotonina; TAAE, transportador de aminoácido excitatório.

5. O estado de fosforilação da GFAP pode afetar seu reconhecimento pelo anticorpo

A interação antígeno-anticorpo pode ser afetada por alterações pós-translacionais ou ligantes não-covalentes (Gonçalves et al, 1997). Contudo, essas modificações frequentemente deixam de ser consideradas na elaboração das técnicas. A GFAP é um alvo para fosforilação mediada por cinases importantes (PKA, CaMK II e PKC) e proteólise mediada por calpaína. Um estudo interessante, que também utilizou o anticorpo policlonal da DAKO, demonstrou que a imunoreatividade para GFAP foi aumentada por proteólise mediada por influxo de cálcio (Lee et al, 2000). Nós observamos um aumento rápido e transitório na GFAP hipocampal após eletro choque convulsivo em ratos (Cereser et al, 2006). Este aumento pode ser devido à proteólise induzida por calpaína

seguido de influxo de cálcio. Porém, nós não observamos alterações proteolíticas por “imunoblotting” nesses animais.

A GFAP é fosforilada em sítios específicos na cauda N-terminal e esta modificação modula a plasticidade de filamentos intermediários gliais (Inagaki et al, 1994; Rodnight, 1997). A fosforilação N-terminal parece regular a proteólise mediada por calpaína (Takemura et al, 2002). Muitos sítios são alvos em potencial para a PKA. Nosso trabalho demonstrou que a fosforilação induzida por PKA aumentou o reconhecimento do anticorpo tanto em amostras biológicas como em GFAP purificada. Tal dado confirma a importância da modificação pós-translacional para o reconhecimento do anticorpo, pelo menos, para o anticorpo utilizado.

Esses resultados, juntamente com a informação sobre imunoreconhecimento alterado por proteólise mediada por calpaína, sustentam o entendimento de que rápidas alterações na imunoreatividade para GFAP e sugerem que é necessário ter cautela na interpretação dos resultados quando este anticorpo é utilizado. Além disso, esses dados indicam a necessidade de considerar o efeito de modificações pós-translacionais na padronização de imunoensaios com outros anticorpos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados vêm reforçar a importância dos astrócitos na fisiologia e patologia do SNC bem como no possível papel da S100B na plasticidade neural, de forma que: A S100B exerce um papel neurotrófico sobre a captação de glutamato. O mecanismo deste efeito merece posterior investigação, bem como o papel desta proteína sobre a captação neuronal de glutamato. A secreção de S100B foi diminuída pelo glutamato, sugerindo ser a secreção desta proteína um alvo da excitotoxicidade, ou mais apropriadamente da gliotoxicidade. Esta redução poderia, em situações crônicas e em regiões cerebrais específicas, comprometer a sobrevivência e atividade neuronal. Outro dado original deste trabalho é que a fluoxetina, independentemente da serotonina, poderia aumentar a secreção de S100B. Desta forma a S100B, como o BDNF, poderia estar envolvido na neurogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858:121-8, 2000.

Akhisaroglu M, Manev R, Akhisaroglu E, Uz T, Manev H. Both aging and chronic fluoxetine increase S100B content in the mouse hippocampus. *Neuroreport.* 14:1471-3, 2003.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* In *Molecular Biology of the Cell*, capítulo 16, 4ª edição, Garlandscience editora, 2001.

Allore R, O'Hanlon D, Price R, Neilson K, Willard HF, Cox DR, Marks A, Dunn RJ. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science.* 239:1311-3, 1988.

Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int.* 41:313-8, 2002.

Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM. Cellular localization of the 5-HT1A receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology.* 14:35-46, 1996.

Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM, Kheck N, Gannon P. The cellular localization of the 5-HT1A receptor in primate cortex, hippocampus and brainstem neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology.* 14:35-46, 1996.

Azmitia EC. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull.* 56:413-24, 2001.

Azmitia, E. C. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21: 33-45, 1999.

Bianchi R, Garbuglia M, Verzini M, Giambanco I, Ivanenkov VV, Dimlich RV, Jamieson GA Jr, Donato R. S-100 (alpha and beta) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim Biophys Acta.* 1313:258-67, 1996.

Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurochem.* 70:958-70, 1998.

Buyukuysal RL. Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int.* 47:580-8, 2005.

Carlo P, Del Rio M, Violani E, Sciaba L, Picotti GB. Influence of culture conditions on monoamine oxidase A and B activity in rat astrocytes. *Cell Biochem Funct.* 14:19-25, 1996.

Cereser KM, Frey BN, Bernardes FB, Costa SC, Andrezza AC, Feier G, Souza D, Tramontina F, Goncalves CA, Kapczinski F, Quevedo J. Glial fibrillary acidic protein expression after electroconvulsive shocks in rat brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 30:663-7, 2006.

Ciccarelli R, Di Iorio P, Bruno V, Battaglia G, D'Alimonte I, D'Onofrio M, Nicoletti F, Caciagli F. 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.* 27:275-81, 1999.

Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 80:259-68, 1995.

Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 37:205-37, 1997.

Corvalan V, Cole R, de Vellis J, Hagiwara S. Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 87:4345-8, 1990.

Cumming P, Brown E, Damsma G, Fibiger H. Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* 59:1905-14, 1992.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65:1-105, 2001.

Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *Neurosci.* 16:2553-62, 1996.

Djalali S, Hölting M, Große G, Rothe T, Stroh T, Große J, Deng D R, Hellweg R, Grantyn R, Hörtnagl H, Ahnert-Hilger G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem.* 92:616-627, 2005.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 60:540-51, 2003.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33:637-68, 2001.

Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta.* 1450:191-231, 1999.

Dringen R, Peters H, Wiesinger H, Hamprecht B. Lactate transport in cultured glial cells. *Dev Neurosci.* 17:63-9, 1995.

Dyck RH, Bogoch II, Marks A, Melvin NR, Teskey GC. Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res*.106:22-9. 2002.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Eurochem Res*.25:1439-51, 2000.

Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Neuroimmunol*. 8:203-14, 1985.

Finkbeiner SM. Glial calcium. *Glia*. 9:83-104, 1993.

Fitzgerald LW, Kaplinsky L, Kimelberg HK. Serotonin metabolism by monoamine oxidase in rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem*. 55:2008-14, 1990.

Garelis E, Young SN, Lal S, Sourkes TL. Monoamine metabolites in lumbar CSF: the question of their origin in relation to clinical studies. *Brain Res*. 79:1-8, 1974.

Giulian D, Tapscott MJ. Immunoregulation of cells within the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2:352-8, 1988.

Goncalves CA, Gottfried C, Kommers T, Rodnight R. Calcium-modulated proteins change their immunoreactivity in the presence of Ca²⁺: a study of antibody recognition in a dot immunoassay for calmodulin, calcineurin (beta-subunit), and S100B. *Anal. Biochem*. 253:127-30, 1997.

Goncalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E, Wofchuk S, Goncalves CA. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport*. 13:1533-5, 2002.

Goncalves DS, Lenz G, Karl J, Goncalves CA, Rodnight R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport*. 11:807-9, 2000.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:7611-5, 1989.

Hatten ME, Mason CA. Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia*. 46:907-16, 1990.

Hensler, JG. Serotonin *In Basic neurochemistry, Molecular, cellular, and medical aspects, capítulo 13, Academic Press editora, 2006.*

Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*. 27:735-43, 2004.

Hosli E, Hosli L. Autoradiographic studies on the uptake of 3H-noradrenaline and 3H-serotonin by neurones and astrocytes in explant and

primary cultures of rat CNS: effects of antidepressants. *Int J Dev Neurosci*.13:897-908, 1995.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International union of pharmacological classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 46:157-203, 1994.

Hunter KE, Hatten ME. Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci*. 92:2061-5, 1995.

Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem*. 274:19919-24, 1999.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*. 275:40096-105, 2000.

Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol*. 4:239-43, 1994.

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

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*. 68:285-316, 1997.

Kierszenbaum, AL. *Histologia e Biologia Celular, Uma introdução à Patologia*. Capítulo 8, p. 213 (2004). Elsevier Editora Ltda.

Kimelberg HK, Katz DM. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science*. 228:889-91, 1985.

Kimelberg HK, Norenberg MD. Astrocytes. *Sci Am*. 260:66-72, 1989.

Kogel D, Peters M, König HG, Hashemi SM, Bui NT, Arolt V, Rothermundt M, Prehn JH. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*. 127:913-20, 2004.

Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Müller C, Roots B, Ng K. Neuronal-glial interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*. 24:295-340, 2000.

Landar A, Caddell G, Chessher J, Zimmer DB. Identification of an S100A1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium*. 20:279-85, 1996.

Laterra J, Keep R, Betz L A, Goldstein G W. 32. Blood—Brain—Cerebrospinal Fluid. *In* Basic Neurochemistry, Molecular cellular and medical aspects, capítulo 32, 6ª edição, Lippincott Williams e Wilkins editora, 1999.

Leal R B, Frizzo J K, Tramontina F, Fieuw-Makaroff S, Bobrovskaya S, Dunkley P R, Goncalves C-A. S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport*. 15:317-320, 2004.

Lee YB, Du S, Rhim H, Lee EB, Markelonis GJ, Oh TH. Rapid increase in immunoreactivity to GFAP in astrocytes in vitro induced by acidic pH is mediated by calcium influx and calpain I. *Brain Res*. 864:220-9, 2000.

Li Y, Wang J, Sheng JG, Liu L, Barger SW, Jones RA, Van Eldik LJ, Mrak RE, Griffin WS. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem*. 71:1421-8, 1998.

Manev H, Manev R. S100B: an old neurotrophic factor with putative new roles in psychiatric illnesses. *J Psychiatr Res*. 35:347-50, 2001.

Manev H, Uz T, Manev R. Glia as a putative target for antidepressant treatments. *J Affect Disord*. 75:59-64, 2003.

McDonald JW, Johnston MV, Young AB. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp Neurol*. 110:237-47, 1990.

Millward TA, Heizmann CW, Schafer BW, Hemmings BA. Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO J*. 17:5913-22, 1998.

Murphy, D. L., Andrews, A. M., Wichems, C. H., Li, Q., Tohda, M., and Greenberg, B. Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *J Clin Psy*. 59: 4-12, 1998.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*. 258:597-603, 1992.

Newman DB. Anatomy and neurotransmitters of brainstem motor systems. *Adv Neurol*. 67:219-44, 1995.

Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 26:536-42, 2003.

Nishi M, Kawata M, Azmitia EC. Trophic interactions between brain-derived neurotrophic factor and s100beta on cultured serotonergic neurons. *Brain Res.* 868:113-8, 2000.

Nishikawa T, Lee IS, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem.* 272:23037-41, 1997.

Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4037-42, 2002.

Pena LA, Brecher CW, Marshak DR. beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 34:118-26, 1995.

Persico AM, Mengual E, Moessner R, Hall FS, Revay RS, Sora I, Arellano J, DeFelipe J, Gimenez-Amaya JM, Conciatori M, Marino R, Baldi A, Cabib S, Pascucci T, Uhl GR, Murphy DL, Lesch KP, Keller F. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J Neurosci.* 21:6862-73, 2001 Erratum in: *J Neurosci* 21:1a. Hall SF [corrected to Hall FS], 2001.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *europarmacology.* 34:1-26, 1995.

Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Karl J, Goncalves CA, Wofchuk S, Rodnight R. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486:203-7, 2000.

Poblete JC, Azmitia EC . Activation of glycogen phosphorylase by serotonin and 3,4-methylenemethamphetamine in astroglial-rich primary cultures: involvement of the 5-HT2A receptor. *Brain Res.* 680:9-15, 1995.

Porter JT, McCarthy KD. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol.* 51:439-55, 1997.

Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J Neurosci.* 3:1289-1300, 1983.

Raine C S. Neurocellular Anatomy. *In* Basic Neurochemistry, Molecular cellular and medical aspects, capítulo 1, 6ª edição, Lippincott Williams e Wilkins editora, 1999.

Roberts, M. H. (1984). 5-Hydroxytryptamine and antinociception. *Neuropharmacol.* 23:1529-1536, 1984.

Rodnight R, Gonçalves CA, Wofchuk ST, Leal R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity .Braz. J. Med. Biol. Res. 30:325-338, 1997.

Rouach N, Koulakoff A, Giaume C. Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks. *Neurochem Int.* 45:265-72, 2004.

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

Schwartz JP, Mishler K. Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 10:447-57, 1990.

Scotto C, Deloulme JC, Rousseau D, Chambaz E, Baudier J. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol.* 18:4272-81, 1998. (a).

Scotto C, Mely Y, Ohshima H, Garin J, Cochet C, Chambaz E, Baudier J. Cysteine oxidation in the mitogenic S100B protein leads to changes in phosphorylation by catalytic CKII-alpha subunit. *J Biol Chem.* 273:3901-8, 1998. (b).

Segovia G, Porrás A, Del Arco A, Mora F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev.* 122:1-29, 2001.

Shao Y, McCarthy KD. Plasticity of astrocytes. *Glia.* 11:147-55, 1994.

Sheu FS, Azmitia EC, Marshak DR, Parker PJ, Routtenberg A. Glial-derived S100b protein selectively inhibits recombinant beta protein kinase C (PKC) phosphorylation of neuron-specific protein F1/GAP43. *Brain Res Mol Brain Res.* 21:62-6, 1994.

Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Role of MAO A and B in neurotransmitter metabolism and behavior. *Pol J Pharmacol.* 51:25-9, 1999.

Sjoerdsma, A. and Palfreyman, M. G. History of serotonin and serotonin disorders. *Ann. NY Acad. Sci.* 600: 1-7, 1990.

Sonnenwald U, Qu H, Aschner M. Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling. *J Pharmacol Exp Ther.* 301:1-6,2002.

Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1448:277-89, 1998.

Stahl, S. M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Aff Dis.* 51: 215-235.

Stemmer P, Klee CB. Serine/threonine phosphatases in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 1:53-64, 1991.

Streit WJ. The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology.* Fall-Winter;17:671-8, 1996.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* 4:193-205, 2004.

Tabakoff B, Bulat M, Anderson RA. Ethanol inhibition of transport of 5-hydroxyindoleacetic acid from cerebrospinal fluid. *Nature.* 254:708-10, 1975.

Takemura M, Gomi H, Colucci-Guyon E, Itohara S. Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. *J Neurosci.* 22:6972-9, 2002.

Tao-Cheng JH, Zhou FC. Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. *Neuroscience.* 94:821-30, 1999.

Tsujimura K, Tanaka J, Ando S, Matsuoka Y, Kusubata M, Sugiura H, Yamauchi T, Inagaki M. Identification of phosphorylation sites on glial fibrillary acidic protein for cdc2 kinase and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biochem (Tokyo).* 116:426-34, 1994.

Vinade L, Rodnight R. The dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus is catalyzed mainly by a type 1 protein phosphatase. *Brain Res.* 732:195-200, 1996.

Walz W. Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol.* 33:309-33, 1989.

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

Ye ZC, Sontheimer H. Metabotropic glutamate receptor agonists reduce glutamate release from cultured astrocytes. *Glia.* 25:270-81, 1999.

Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, Patel T, Wang Y. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res.* 805:241-54, 1998.