

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

**ESTUDO DA SECREÇÃO DE S100B EM FATIAS  
HIPOCAMPAIS: MODULAÇÃO POR  $Zn^{2+}$  E DOPAMINA**

**Patrícia Nardin**

Porto Alegre  
2010

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

**ESTUDO DA SECREÇÃO DE S100B EM FATIAS  
HIPOCAMPAIS: MODULAÇÃO POR  $Zn^{2+}$  E DOPAMINA**

**Patrícia Nardin**

Orientador: Prof. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre  
2010

"A diferença entre o possível e o impossível  
está na vontade humana."

(Louis Pasteur)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Lourival e Cecília, pelo amor incondicional, carinho, apoio, amizade e por SEMPRE estarem ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial ao meu orientador, Carlos Alberto, por sempre ter acreditado em mim, mesmo nos momentos mais difíceis, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Também gostaria de agradecer a Professora Carmem Gottfried por toda a ajuda, amizade e pelas dicas científicas. Às Professoras Christianne Salbego e Vera Tries Trindade pela amizade e por todos os ensinamentos didáticos e de vida acadêmica durante o período da bolsa Capes-Reuni.

Ao Professor Rosario Donato (Perugia-Itália) por ter concedido a chance de realizar meu doutorado sanduíche no seu laboratório o que me proporcionou um grande aprendizado e experiência de vida. Agradeço também aos colegas de laboratório: Roberta, Claudia, Sara, Francesca e aos Professores Aldo, Guglielmo e Ileana pela amizade, ensinamentos e atenção durante este período.

Agradeço a querida e grande amiga Andréia que foi muito importante para que eu ingressasse no departamento de Bioquímica, pela amizade e pelo carinho em todas as horas. À outra querida amiga, Francine, que foi essencial para que eu iniciasse no mundo da pesquisa e no laboratório 33, pela amizade, apoio e carinho. Obrigada Fran! Falando na Fran, não tenho como não falar da Ana Carolina...Obrigada Ana pela tua amizade, apoio, solidariedade, carinho e diálogos científicos.

Às minhas amigas Marina e Lúcia (não tem como pensar em uma e não lembrar da outra) pela amizade, carinho e ajuda na hora em que mais precisei, pela troca de idéias e discussões sempre visando a melhoria do lab.

Também agradeço ao meu amigo André e à minha amiga Larissa pela amizade, carinho, apoio, troca de idéias tanto científicas quanto “filosóficas” e pela companhia seja ela

em âmbito nacional ou internacional!

Tenho muito a agradecer aos meus dois bolsistas, Lucas e Paulo, pela amizade, carinho, apoio e por toda ajuda com todos os experimentos, especialmente os experimentos dominicais no final da tese e por tudo o que aprendemos juntos! Levando isto em conta, tenho muito que agradecer a minha amiga, colega e conselheira Paulinha que me ajuda/ajudou muito em todas as horas e situações, pelo apoio incondicional, inclusive na “finaleira” tanto com os experimentos como com a organização da tese.

Às grandes amigas Dani e Renatinha pela amizade, apoio, conselhos, risadas, dicas científicas enfim, por vocês fazerem parte do mesmo mundo de pesquisa que o meu!

Aos amigos e antigos colegas de laboratório Lets, Letícia Ribeiro, Alessandra Swarowski e Rodrigo Freitas pela convivência, grande amizade, dicas e apoio em todos os momentos. Aos demais colegas do laboratório 33: Nina, Jô, Caro, Cris, Maria, Caren, Adriana, Ana Paula, Beta, Fernanda, Tamara, Núbia, Maria da Graça, Katiane, Victório, Krista, Fafá, Elisa, Jú Rocha, Douglas, Márcio e Carol. Obrigada pela amizade, torcida e apoio! Aos demais amigos com os quais convivi durante estes sete anos no Departamento de Bioquímica e outros departamentos. À UFRGS por ser a base da minha formação desde a graduação até o Doutorado e ao departamento de Bioquímica, aos professores e funcionários que contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação como pesquisadora.

À Capes pelo auxílio financeiro durante meu Doutorado e Doutorado Sanduíche.

Aos meus irmãos, Wagner, Leandra e ao meu cunhado Érico por sempre estarem ao meu lado, pelo carinho e por fazerem parte da minha vida.

Aos meus pais, Lourival e Cecília, a quem dedico esta tese por serem tão especiais, pelo apoio e amor incondicional e por me ensinarem os verdadeiros valores desta vida! Obrigada!

# ÍNDICE GERAL

|                                                |             |
|------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                  | <b>VIII</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>              | <b>IX</b>   |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                     | <b>1</b>    |
| 1.1. A PROTEÍNA S100B .....                    | 1           |
| 1.2. SECREÇÃO DE S100B POR CÉLULAS GLIAIS..... | 4           |
| 1.3. MODELOS EXPERIMENTAIS .....               | 7           |
| 1.4. HIPOCAMPO .....                           | 9           |
| 1.5. NEUROTRANSMISSORES E S100B .....          | 11          |
| 1.6. ZINCO E GLUTAMATO.....                    | 14          |
| 1.7. DOPAMINA.....                             | 17          |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                      | <b>19</b>   |
| 2.1. OBJETIVO GERAL.....                       | 19          |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                | 19          |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>                      | <b>20</b>   |
| CAPÍTULO I .....                               | 20          |
| CAPÍTULO II .....                              | 30          |
| CAPÍTULO III .....                             | 51          |
| <b>4. DISCUSSÃO .....</b>                      | <b>75</b>   |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>                     | <b>93</b>   |
| 5.1. CONCLUSÃO GERAL.....                      | 93          |
| 5.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS .....              | 93          |
| <b>6. PERSPECTIVAS.....</b>                    | <b>95</b>   |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>      | <b>96</b>   |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1:</b> ESTRUTURA DA PROTEÍNA S100B ASSOCIADA AO ÍON $\text{Ca}^{2+}$ ESTRUTURA..... | 3  |
| <b>FIGURA 2:</b> OS PRINCIPAIS COMPONENTES NEURONAIS EXCITATÓRIOS DO HIPOCAMPO.....           | 11 |
| <b>FIGURA 3:</b> O TRÁFEGO DO ZINCO NOS NEURÔNIOS GLUZINÉRGICOS.....                          | 17 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|                      |                                                     |
|----------------------|-----------------------------------------------------|
| ACo                  | Acetilcolina                                        |
| ACoE                 | Acetilcolinesterase                                 |
| AGE                  | Produto final de glicação avançada                  |
| AMPc                 | Adenosina monofosfato cíclico                       |
| ATP                  | Adenosina trifosfato                                |
| AVC                  | Acidente vascular cerebral                          |
| CoAT                 | Colina acetiltransferase                            |
| COMT                 | Catecol-O-metiltransferase                          |
| COX-2                | Ciclooxigenase-2                                    |
| DA                   | Dopamina                                            |
| DAMP                 | Padrão molecular associado a dano                   |
| DAT                  | Transportador de dopamina                           |
| DCT                  | Transportador de cátions divalentes                 |
| DTT                  | Ditiotreitol                                        |
| ERO                  | Espécie Reativa de Oxigênio                         |
| 5-HT                 | 5-Hidroxitriptamina (serotonina)                    |
| 5-HTP                | 5-Hidroxitriptofano                                 |
| 5HT <sub>1A</sub> -R | Receptor de serotonina 1A                           |
| iNOS                 | Óxido nítrico sintase induzível                     |
| GABA                 | Ácido gama-aminobutírico                            |
| GFAP                 | Proteína Fibrilar Glial Ácida                       |
| GSH                  | Glutationa                                          |
| HEPES                | Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazine-1-etanosulfônico |

|               |                                                             |
|---------------|-------------------------------------------------------------|
| Il-1 $\beta$  | Interleucina-1 $\beta$                                      |
| LDH           | Lactato desidrogenase                                       |
| MAO           | Monoamino oxidase                                           |
| MTT           | [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo] |
| NAC           | N-acetilcisteína                                            |
| NMDA          | N-metil-D-aspartato                                         |
| NSE           | Enolase neurônio específica                                 |
| NT            | Neurotransmissor                                            |
| PARP-1        | Poli(ADP-ribose) polimerase 1                               |
| RAGE          | Receptor para produtos finais de glicação avançada          |
| RE            | Retículo endoplasmático                                     |
| SNC           | Sistema nervoso central                                     |
| SOCC          | Canal de Ca <sup>2+</sup> modulado por reservas/estoques    |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral- $\alpha$                          |
| TPEN          | N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil) etilenodiamina           |
| ZIP           | Proteínas tipo Zrt e Irt                                    |
| ZnT           | Transportador de zinco                                      |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A Proteína S100B

S100 é uma família de proteínas ligantes de cálcio do tipo *EF-hand* (hélice-loop-hélice) que compreende cerca de 25 membros. Foi denominada S100 por ser solúvel em uma solução 100% saturada de sulfato de amônio (Sedaghat & Notopoulos 2008).

As proteínas da família S100 exibem expressão célula/tecido específicos, diferentes localizações subcelulares, modificações pós-traducionais e afinidades de ligação a metais (Van Eldik & Wainwright 2003). Os membros desta família são proteínas sinalizadoras multifuncionais envolvidas na regulação de diversos processos celulares (Marenholz *et al.* 2004).

Em 1965, Moore isolou o primeiro membro desta família a partir de um extrato de cérebro bovino como uma mistura parcialmente purificada de duas proteínas, S100B e S100A1 (Moore 1965).

Estruturalmente, a S100B é um homodímero de 21kDa constituído por duas subunidades  $\beta$  unidas por ligações não-covalentes e arrançadas de modo antiparalelo. Entretanto, a subunidade  $\beta$  também pode formar heterodímeros (Donato 2001). Cada monômero da proteína apresenta dois sítios ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  interconectados por uma região central (*hinge*) e uma extensão C-terminal. O domínio C-terminal contém um *loop* ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  clássico com maior afinidade por este íon, enquanto que, o domínio N-terminal também contém um *loop* ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  não-convencional específico desta proteína e de menor afinidade (Fritz & Heizmann, 2004) (Figura 1). Além do  $\text{Ca}^{2+}$ , a S100B também liga  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Curiosamente, a ligação do  $\text{Zn}^{2+}$  a S100B resulta em uma maior afinidade da mesma por  $\text{Ca}^{2+}$  e por suas proteínas alvo (Leclerc *et al.* 2010).



**Figura 1: Estrutura da proteína S100B associada ao íon Ca<sup>2+</sup>.** Um monômero está em amarelo e o outro está em azul. A ligação do íon Ca<sup>2+</sup> (pontos em rosa) em cada monômero causa uma mudança conformacional na proteína (adaptado de Donato 2003).

Em humanos, o gene que codifica a S100B está localizado na região cromossomal 21q22.3 com conseqüente superexpressão da proteína na síndrome de Down (Rothermundt *et al.* 2003).

A S100B é produzida e secretada no sistema nervoso central (SNC) principalmente por astrócitos, mas também pode ser expressa por oligodendrócitos maduros e por determinadas populações neuronais. Entretanto outras fontes extracerebrais como, por exemplo, adipócitos (Goncalves *et al.* 2010), certas populações de linfócitos, células satélites musculares, também podem expressar S100B (Donato *et al.* 2009).

A S100B encontra-se predominantemente solúvel no citoplasma das células e uma pequena percentagem (5-7%) associada às membranas intracelulares (Sedaghat & Notopoulos 2008).

Em astrócitos, a S100B é encontrada no citoplasma e no núcleo, onde age como um sensor de Ca<sup>2+</sup> e exerce suas funções biológicas por interagir com outras proteínas

modificando suas atividades. Foi demonstrado que a S100B interage com elementos do citoesqueleto (microtúbulos, filamentos intermediários do tipo III), com enzimas da via glicolítica (frutose 1,6-bisfosfato aldolase, fosfoglicomutase) e com fatores de transcrição (p53); a S100B também está envolvida na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e na proliferação e diferenciação celular além de, inibir a fosforilação de proteínas (Donato et al. 2009, Leclerc et al. 2010).

Além de suas funções intracelulares, a S100B pode ser ativamente secretada por astrócitos onde pode agir como uma citocina. A S100B extracelular pode modular a atividade de neurônios, microglia, astrócitos e células endoteliais. (Rothermundt et al. 2003, Leclerc et al. 2010).

Os efeitos extracelulares da S100B em diferentes tipos celulares dependem de sua ligação ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). A S100B interage preferencialmente com o domínio V do RAGE e poderia envolver a multimerização do receptor. Entretanto, este pode não ser o único receptor para a S100B (Ponath *et al.* 2007, Leclerc *et al.* 2010, Sen & Belli 2007).

O RNAm e os níveis intra e extracelulares da proteína S100B são utilizados como parâmetro de ativação e/ou morte astrocítica em várias situações de injúria cerebral. Desordens do SNC associadas com aumentos periféricos de S100B incluem traumatismo craniano, isquemia cerebral, doenças neurodegenerativas e desordens psiquiátricas (Goncalves *et al.* 2008).

As múltiplas funções da proteína S100B sugerem que ela possa ser um importante mediador das interações neurônio-glia no SNC (Reeves *et al.* 1994).

## 1.2. Secreção de S100B por Células Gliais

Em 1846, Virchow descobriu a existência de outro grupo de células no SNC, além dos neurônios. Ele foi o primeiro a utilizar o termo neuroglia (Privat *et al.* 1995). Através de técnicas de coloração por impregnação pela prata, Santiago Ramón y Cajal, e Pio del Río-Hortega descreveram diferentes tipos celulares no SNC: os astrócitos, os oligodendrócitos, a microglia e as células ependimárias (Hof *et al.* 1999).

Diferentes preparações gliais têm sido utilizadas para estudar a secreção da proteína S100B. Apesar do fato de astrócitos primários e células de glioma C6 possuírem diferentes mecanismos regulatórios para a expressão do gene da S100B (Castets *et al.* 1997), estas células são comumente e indistintamente utilizadas para estudar muitos parâmetros bioquímicos e vias de transdução de sinal incluindo, expressão e secreção da S100B (Nardin *et al.* 2007). Vários estudos demonstraram a secreção da proteína S100B por astrócitos (Tramontina *et al.* 2006a, Leite *et al.* 2009, Vieira de Almeida *et al.* 2008) e por células de glioma C6 (Van Eldik & Zimmer 1987, Davey *et al.* 2001, Abib *et al.* 2008, Quincozes-Santos *et al.* 2010). Em 1984 foi descrita, pela primeira vez, a secreção da proteína S100B em fatias hipocâmpais de ratos (Shashoua *et al.* 1984).

Extracelularmente, a S100B parece ter muitos efeitos fisiológicos importantes, mas seu mecanismo de secreção permanece desconhecido. A literatura mostra que a S100B é secretada por um mecanismo independente da via retículo endoplasmático - Golgi. Isto é consistente com o fato de que a S100B não apresenta a sequência sinalizadora clássica para a secreção por esta via (Davey *et al.* 2001). Resultados recentes do nosso grupo demonstram que a secreção de S100B está relacionada a um aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular (Leite *et al.*, dados não publicados).

Um aumento na secreção de S100B por astrócitos pode ocorrer durante estimulação do receptor de serotonina 1A (5HT<sub>1A</sub>-R) (Whitaker-Azmitia *et al.* 1990), pelo tratamento com ácido lisofosfatídico (Pinto *et al.* 2000), glutamato (Ciccarelli *et al.* 1999), citocinas pró-inflamatórias como, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Edwards & Robinson 2006) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (de Souza *et al.* 2009) e durante estresse metabólico (Gerlach *et al.* 2006). Outros estimuladores da secreção de S100B por astrócitos incluem, altos níveis de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Davey *et al.* 2001), anti-oxidantes naturais (de Almeida *et al.* 2007, Abib *et al.* 2008),  $\alpha$ -cetoácidos de cadeia ramificada (Funchal *et al.* 2007), a neurotoxina MPTP (Iuvone *et al.* 2007), o neuroléptico risperidona (Quincozes-Santos *et al.* 2008) e o antidepressivo fluoxetina (Tramontina *et al.* 2008). A S100B também poderia extravasar de células danificadas acumulando no espaço extracelular e/ou entrando na corrente sanguínea, como por exemplo, em pacientes com melanoma (Harpio & Einarsson 2004), durante a fase aguda de injúria cerebral (Rothermundt *et al.* 2003), após exercício físico intenso (Dietrich *et al.* 2003), no curso de cardiomiopatias (Mazzini *et al.* 2007).

Foi demonstrado que a secreção de S100B reduz em astrócitos tratados com um alto conteúdo de glicose (Nardin *et al.* 2007), durante tratamento com altas doses de glutamato (Tramontina *et al.* 2006a) e quando as células atingem a confluência. Ao atingirem a confluência, culturas de células, como consequência da inibição por contato, talvez produzam um sinal para cessar a secreção de S100B e acumular intracelularmente (Davey *et al.* 2001).

Quando secretada por astrócitos a S100B pode exercer efeitos tróficos ou tóxicos, dependendo de sua concentração, podendo agir de maneira autócrina e/ou parácrina sobre neurônios e outras células gliais (Rothermundt *et al.* 2003).

Os efeitos da S100B sobre neurônios variam dependendo da concentração e do microambiente. Em concentrações nanomolares (nM), a S100B exerce efeitos neurotróficos:

1. aumentando a sobrevivência neuronal, durante o desenvolvimento e após injúria;
- 2.

induzindo o crescimento de neuritos; 3. estimulando a proliferação glial e a regeneração *in vitro* e *in vivo*. A S100B protege neurônios por causar uma superexpressão do fator antiapoptótico, Bcl-2 e ativação da via de sinalização Ras/MEK/ERK1/2/NF-kB. Por outro lado, em concentrações micromolares ( $\mu\text{M}$ ) a S100B exerce efeitos tóxicos. Altas concentrações de S100B podem induzir apoptose neuronal através da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), superexpressão da caspase 3 e excesso de ativação da via MEK/ERK1/2 (Van Eldik & Wainwright 2003, Donato et al. 2009).

Além dos efeitos observados sobre neurônios, a S100B age também sobre a microglia. Em doses nanomolares, a S100B bloqueia os efeitos da neurotoxina trimetiltina sobre a microglia (Reali et al, 2005). Em contraste, em doses mais altas, a S100B secretada ativa a microglia que aumenta a superexpressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), da enzima pró-inflamatória ciclooxigenase-2 (COX-2) e aumenta a produção de  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{TNF-}\alpha$ , sugerindo sua participação na neuroinflamação decorrente de processos neurodegenerativos, doenças auto-imunes, infecções e traumas (Adami *et al.* 2001).

A S100B age de maneira autócrina também sobre astrócitos. Em baixas doses (nM), a S100B estimula a proliferação de linhagem astrocítica (Selinfreund *et al.* 1991) e em doses maiores ( $\mu\text{M}$ ), a S100B aumenta os níveis de RNAm e a atividade da iNOS em astrócitos corticais de ratos através da ativação do NF-kB (Lam *et al.* 2001).



### 1.3. Modelos Experimentais

O uso de modelos experimentais adequados tem sido o objetivo principal de várias áreas da pesquisa científica. Em neurociências, encontrar uma metodologia simples que mantenha as propriedades do sistema o mais próximo do fisiológico é um tema relevante e desafiador.

Muitos estudos têm sido realizados em modelos *in vitro* (culturas ou linhagens de neurônios ou células gliais isoladas) para avaliar funções específicas destas células e pela facilidade de controlar a composição do meio extracelular. Entretanto, em pesquisas que avaliam a interação neurônio-glia, estes tipos de preparações tornam-se inadequadas (Lossi *et al.* 2009).

Preparações com fatias cerebrais foram primeiramente utilizadas por Warburg e colaboradores em 1920 (Lipton, 1985) e a utilização deste tipo de metodologia vem aumentando muito nos últimos anos.

Fatias de diferentes regiões do SNC são ferramentas muito importantes para estudar as propriedades estruturais, fisiológicas e farmacológicas dos circuitos neuronais. Como a metodologia de preparo é relativamente simples, as fatias vem sendo utilizadas por eletrofisiologistas, histologistas, farmacologistas e bioquímicos (Lossi *et al.* 2009).

Existem dois tipos principais de preparações de fatias atualmente em uso em neurociências; as fatias frescas (frequentemente referidas somente como fatias) que são preparações de viabilidade curta e, as culturas de fatias organotípicas, úteis para os estudos que exigem viabilidade mais longa (Lossi *et al.* 2009).

Dentre as vantagens do modelo de fatias podemos citar: a reprodução de muitos dos aspectos do contexto *in vivo*, a preservação da citoarquitetura do tecido do SNC de origem e a manutenção da atividade neuronal e da circuitaria sináptica funcionalmente intacta. Além

disso, este modelo permite um controle preciso do ambiente extracelular (Cho *et al.* 2007) e requer menor tempo e custo para sua execução.

Existem algumas limitações no uso de fatias (Aitken *et al.* 1995). As fatias sempre parecem ter uma região de alguns micrômetros no limite do corte na qual as células são danificadas. Conseqüentemente, as regiões mais externas da fatia deveriam ser consideradas como tecido morto. Entretanto, o mais importante é a preservação da ultra-estrutura do interior da fatia (Lipton, 1985). Além disso, as fatias cerebrais podem ser mantidas metabolicamente ativas por apenas algumas horas então, este modelo não pode ser utilizado para observações feitas em um maior período de tempo (Gong *et al.* 2001). Ao contrário de culturas de células, têm-se dificuldades para identificar o tipo celular em fatias frescas. Neurônios e células gliais não podem ser identificados por sua localização ou morfologia com segurança nestas preparações (Dallwig & Deitmer 2002).

Vários fatores metodológicos influenciam na preservação da fatia para que ela se assemelhe o máximo possível, com a fisiologia *in vivo*. Entre eles podemos citar: espécie e idade do animal; temperatura e tempo de preparação e manutenção das fatias; manutenção da homeostase do ambiente externo e tempo de estabilidade metabólica que é obtido após algumas horas. Estudos bioquímicos têm demonstrado que a estabilidade metabólica em fatias é atingida entre duas e quatro horas (Sajikumar *et al.*, 2005). Este período é crucial para que os níveis metabólicos de atividade enzimática, segundos mensageiros, proteínas e outros componentes sejam estabilizados (Lossi *et al.* 2009).

Apesar das dificuldades e limitações, fatias frescas têm se tornado uma alternativa para a investigação detalhada de propriedades da membrana neuronal, mecanismos sinápticos, ações celulares de neurotransmissores e estudos sobre a homeostase do cálcio (Lossi *et al.* 2009).

## 1.4. Hipocampo

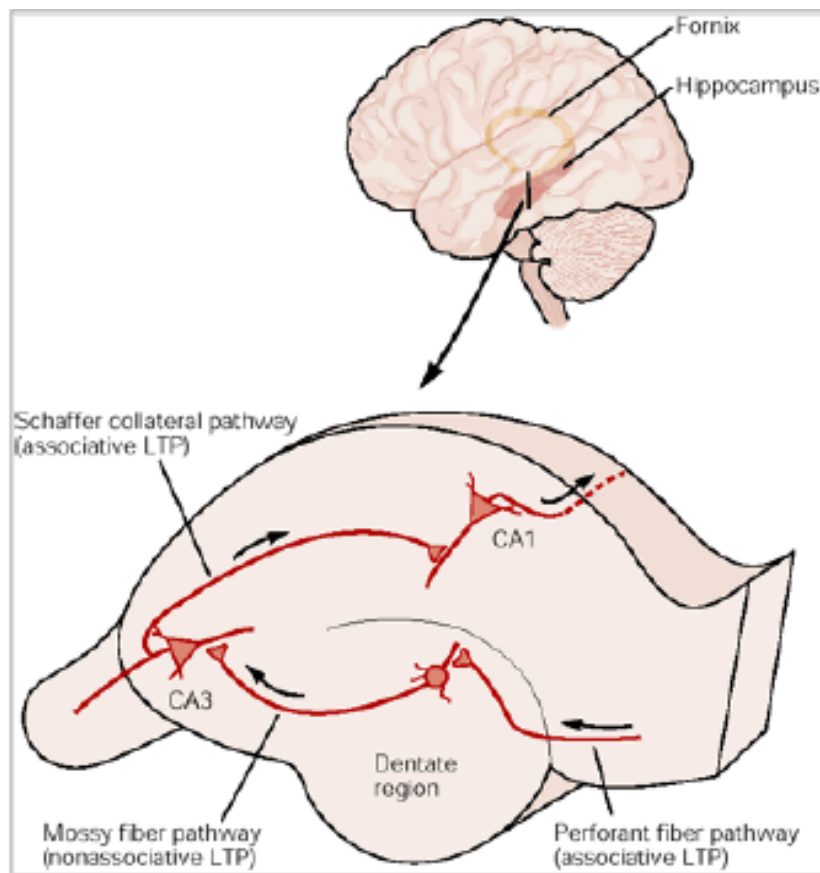
A palavra hipocampo deriva do grego *hippos* = cavalo e *kampi* = curva devido a seu formato curvado apresentado em secções coronais do cérebro humano assemelhando-se a um cavalo-marinho ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). O hipocampo tem sido associado ao processamento emocional e ao aprendizado (Bear *et al*, 2002).

O hipocampo humano é essencialmente uma faixa curva de córtex filogeneticamente primitivo (arqui-córtex), localizado na porção medial do lobo temporal. O hipocampo é dividido no sentido ântero-posterior em três porções: cabeça, corpo e cauda. A extremidade anterior da cabeça do hipocampo é dilatada e apresenta sulcos rasos com elevações, enquanto a extremidade posterior da cauda do hipocampo estende-se com o fórnix (Schwartz & Westbrook, 2000).

O termo hipocampo é comumente utilizado para descrever conjuntamente duas regiões interligadas: o giro denteado e o hipocampo propriamente dito. Ambos possuem uma organização interna trilaminada, composta por dois tipos de células principais: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do Corno de Amon (CA, do latim: *cornu ammonis*), sendo estas subdivididas nas áreas de CA1, CA2 e CA3 com base nas diferenças de morfologia celular, conectividade e desenvolvimento. Cada uma dessas áreas mantém um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas, sendo que a principal aferência para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal (Gazzaniga *et al*, 2006).

Os principais componentes neuronais excitatórios do hipocampo são: 1) a *via perforante* que forma conexões excitatórias entre o córtex para-hipocampal e as células granulares do giro denteado, 2) as *fibras musgosas* (axônios das células granulares) que conectam as células granulares do giro denteado às células piramidais CA3 e 3) as *colaterais*

de Schaffer, que conectam as células piramidais de CA3 às células piramidais de CA1 (Gazzaniga *et al*, 2006) (Figura 2).



**Figura 2: Os principais componentes neuronais excitatórios do hipocampo.** A via perforante do córtex entorrinal forma conexões excitatórias com as células granulares do giro dentado. As células granulares dão origem a axônios que formam as fibras musgosas que se conectam com as células piramidais na área CA3 do hipocampo. As células piramidais na região CA3 projetam-se para as células piramidais da região CA1 por meio da colateral de Schaffer (Schwartz & Westbrook, 2000).

Pinto e colaboradores demonstraram que astrócitos cultivados de diferentes regiões do SNC, incluindo do hipocampo, expressam e secretam a proteína S100B (Pinto *et al*. 2000).

## 1.5. Neurotransmissores e S100B

De um modo geral, podemos definir neurotransmissor (NT) como uma substância química endógena que é liberada por um neurônio, em uma sinapse, e que afeta a célula alvo de maneira específica. Um número limitado de substâncias são aceitas como NTs.

Entretanto, até mesmo para estas substâncias, é difícil demonstrar uma função transmissora em uma sinapse particular. Então, muitos neurocientistas propõem que uma substância deve ser considerada um NT se apresentar os quatro critérios abaixo relacionados:

1. Ser sintetizada e estocada no terminal nervoso pré-sináptico;
2. Ser liberada, sob estimulação, em quantidades suficientes para exercer uma ação definida no neurônio pós-sináptico ou órgão efector;
3. Mimetizar a ação do transmissor liberado endogenamente, quando administrada exogenamente em concentrações adequadas;
4. Ter um mecanismo específico para removê-la de seu sítio de ação (fenda sináptica). (Bear *et al*, 2002; Schwartz, 2000).

Sabe-se que alguns NTs modulam a secreção da proteína S100B. São eles:

1. **Acetilcolina (ACo):** é a única amina de baixo peso molecular que não é um aminoácido. A rota biossintética da ACo tem uma única reação enzimática catalisada pela colina acetiltransferase (CoAT). A ACo é sintetizada a partir da colina e da acetil-CoA, derivada da glicose. Neurônios que sintetizam ACo (neurônios colinérgicos) também produzem a enzima acetilcolinesterase (ACoE) que degrada rapidamente a ACo em colina e ácido acético. A ACo é utilizada em muitas sinapses em todo o SNC. Em particular, neurônios colinérgicos são numerosos no núcleo basal com muitas projeções para o córtex cerebral, hipocampo e bulbo olfatório (Schwartz, 2000; Bear *et al*, 2002; Taylor & Brown, 2006).

Estudos recentes do nosso grupo evidenciaram a possibilidade da secreção de S100B apresentar modulação colinérgica. O resultado mostrou, pela primeira vez, que a ativação colinérgica pode causar um aumento na secreção de S100B em cultura primária de astrócitos. Por outro lado, em fatias hipocampais a ativação colinérgica causou uma redução na secreção de S100B, ambos após 1 hora de tratamento (Lunardi *et al*, dados não publicados).

2. **Serotonina (Ser):** também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), é derivada do aminoácido triptofano. Neurônios serotoninérgicos são relativamente poucos, mas desempenham um importante papel na regulação da atenção, do humor, do comportamento emocional e do sono (Schwartz, 2000).

A síntese de serotonina é limitada pela disponibilidade de triptofano proveniente da dieta e ocorre em duas etapas. Primeiramente, o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase. O 5-HTP é então, convertido em 5-HT pela enzima 5-hidroxitriptofano descaboxilase. Após sua liberação do terminal pré-sináptico, a serotonina é removida da fenda sináptica pela ação de um transportador específico (Hensler, 2006).

Neurônios serotoninérgicos são encontrados no núcleo da rafe e enviam projeções para todo o SNC (Bear *et al*, 2002).

Foi descrito que agonistas do receptor de serotonina 1A (5HT<sub>1A</sub>-R) particularmente, ipsapirona e BayX3702, estimulam a secreção de S100B em cultura de astrócitos de ratos (Whitaker-Azmitia *et al*. 1990, Ahlemeyer *et al*. 2000). Estes e outros dados sustentam a hipótese de que a S100B é trófica para neurônios serotoninérgicos e que a serotonina (via 5HT<sub>1A</sub>-R) estimula a secreção de S100B. Por outro lado, dados do nosso grupo demonstraram que a serotonina induziu uma redução na secreção de S100B em cultura de astrócitos em 6 e 24 horas e fatias hipocampais, 1 hora após incubação. O mesmo efeito foi obtido com um

agonista do 5HT<sub>1A</sub>-R (8-hidróxi-DPAT) e foi bloqueado por um antagonista (NAN-190) específico do 5HT<sub>1A</sub>-R (Tramontina *et al.* 2008).

3. **Glutamato (Glu):** é o principal NT excitatório na maioria das sinapses do SNC. O glutamato é sintetizado a partir da glicose e de outros precursores utilizando enzimas existentes em todas as células. Após sua liberação, o glutamato é captado da fenda sináptica principalmente por astrócitos através do ciclo glutamina-glutamato que recupera o glutamato para ser reutilizado como NT (Schwartz, 2000; Hassel & Dingleline, 2006).

O glutamato é o principal mediador da informação sensorial, coordenação motora, emoções, cognição e memória (Hassel & Dingleline, 2006).

A S100B extracelular protege neurônios hipocâmpais do dano excitotóxico (Ahlemeyer *et al.* 2000, Kogel *et al.* 2004). Por outro lado, nosso grupo demonstrou o efeito inibitório do glutamato sobre a secreção da S100B. Níveis considerados tóxicos de glutamato (1 mM) para neurônios reduziram a secreção de S100B induzida pela privação de soro em cultura de astrócitos hipocâmpais após 1 hora de incubação (Goncalves *et al.* 2002). Outros autores corroboraram com nossos resultados em fatias cerebrais onde o glutamato também diminuiu a secreção de S100B (Buyukuysal 2005).

## 1.6. Zinco e Glutamato

Zinco é o segundo elemento mineral nutricionalmente essencial no corpo humano. Este metal é encontrado em vários tecidos corporais como, pele, ossos, fígado, músculo e encéfalo (Takeda 2001).

O zinco regula numerosos aspectos do metabolismo celular incluindo, divisão e diferenciação celular (Takeda 2001). Além de ser um constituinte essencial de um grande número de proteínas, incluindo enzimas, o zinco também é essencial para suas atividades biológicas. Por outro lado, níveis elevados de zinco podem ser neurotóxicos induzindo disfunção e morte neuronal. Portanto, a concentração de zinco deve ser precisamente regulada e equilibrada (Bitanhirwe & Cunningham 2009).

A concentração do zinco no encéfalo aumenta após o nascimento e se mantém constante na fase adulta. O sistema de barreiras encefálicas (barreira hemato-encefálica e barreira sangue-líquor) é importante para a homeostase do zinco no cérebro e, alterações neste sistema, podem estar associadas com disfunções cerebrais e doenças neurológicas. A homeostase do zinco no cérebro é bastante complexa e, proteínas ligantes de metais, as metalotioneínas, parecem estar envolvidas na homeostase do zinco intracelular (Takeda 2001).

O zinco foi identificado no encéfalo, pela primeira vez, por Maske utilizando um método histoquímico que poderia detectar somente o zinco livre. Maske observou bandas vermelhas brilhantes em fatias hipocámpais de ratos (Frederickson *et al.* 2005, Bitanhirwe & Cunningham 2009). Atualmente, sabe-se que no hipocampo e em outras regiões do encéfalo, o zinco vesicular é encontrado em vesículas pré-sinápticas de neurônios que utilizam o glutamato como NT. Estes neurônios são denominados neurônios gluzinérgicos. Todos os

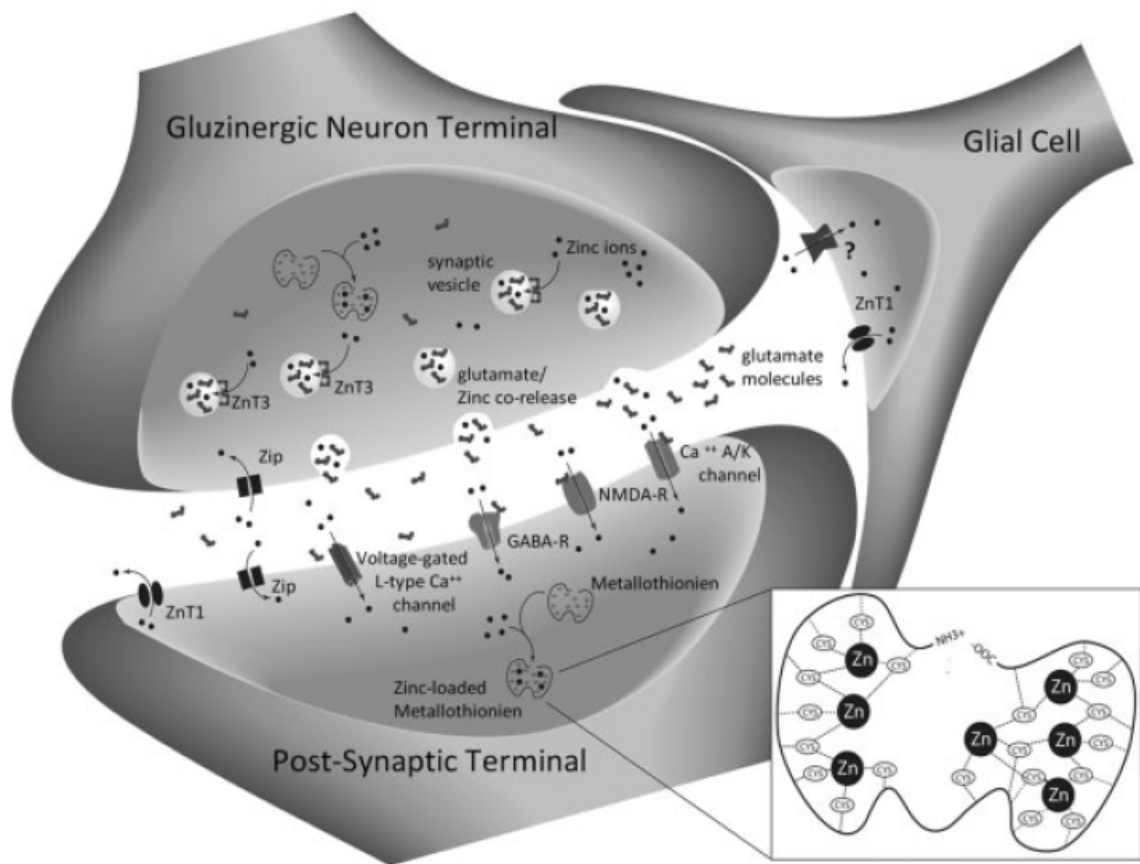


neurônios que contêm zinco são glutamatérgicos, entretanto, nem todos os neurônios glutamatérgicos contêm zinco (Takeda 2001).

A distribuição do zinco no encéfalo não é uniforme. Concentrações de zinco são mais elevadas na matéria cinzenta do que na branca e em determinadas regiões cerebrais como no hipocampo, na amígdala e neocórtex. No hipocampo, altas concentrações de zinco têm sido encontradas nas fibras musgosas de células granulares do giro denteado e em neurônios das áreas CA1 e CA3 (Frederickson et al. 2005).

O transporte do zinco para o parênquima cerebral ocorre através do sistema de barreiras encefálicas (Takeda 2001). As rotas de entrada, que regulam o influxo do zinco dos fluidos extracelulares para neurônios e células gliais, ainda não estão completamente elucidadas, mas transportadores da família de proteínas tipo Zrt e Irt (ZIP) parecem estar envolvidos neste processo. Entretanto, canais iônicos tais como, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes do tipo L, trocadores  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$ , receptores de glutamato do tipo NMDA e AMPA/cainato e receptores GABAérgicos também parecem mediar este processo (Mocchegiani et al. 2005).

Por outro lado, dois grupos de proteínas que regulam o efluxo de zinco de neurônios e células gliais bem como, a captação do zinco em vesículas pré-sinápticas, são conhecidos; a família de transportadores de cátions divalentes (DCT) e a família de transportadores de zinco (ZnT). Há pelo menos 10 membros da família de ZnT, a maioria dos quais são ubiquamente expressos embora, ZnT3 é encontrado somente no cérebro e é a única isoforma neurônio específica presente em vesículas sinápticas. O ZnT1 é expresso, sinápticamente e extrasinápticamente, na membrana plasmática de neurônios e glia. Outros membros da família de ZnT (ZnT2, ZnT4, ZnT5 e ZnT6) são também expressos em várias regiões cerebrais (Mocchegiani et al. 2005, Bitanhirwe & Cunningham 2009, Sensi et al. 2009) (Figura 3).



**Figura 3: O tráfego do zinco nos neurônios gluzinérgicos.** O zinco é captado para as vesículas sinápticas dos terminais gluzinérgicos através do transportador de zinco 3 (ZnT-3) e é estocado com o glutamato. Durante estimulação normal, o zinco é liberado junto com o glutamato para a fenda sináptica, onde ele pode agir em receptores GABA ou NMDA, canais voltagem-dependentes ou outros canais iônicos. As metalotioneínas são as principais proteínas tamponantes de zinco intracelular e elas regulam a biodisponibilidade de zinco em neurônios pré e pós-sinápticos (Bitanihirwe & Cunningham 2009).

## 1.7. Dopamina

A dopamina (DA) é um neurotransmissor da classe das catecolaminas. Todos os neurônios catecolaminérgicos contêm a enzima tirosina hidroxilase que catalisa a conversão de tirosina em um composto denominado dopa (L-di-hidroxifenilalanina). O dopa, por sua vez, é convertido em DA pela dopa descarboxilase (Bear *et al*, 2002; Kuhar *et al*, 2006). A conversão de tirosina em DA ocorre no citosol e, após, a DA é captada para as vesículas sinápticas (Kuhar *et al*, 2006). As enzimas monoamino oxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT) são responsáveis pela inativação da DA assim como, sua recaptação por um sistema de transportadores de dopamina (DAT) ou a difusão da DA para sítios longe dos receptores (Cousins *et al*. 2009).

Os neurônios dopaminérgicos são amplamente distribuídos no SNC. Quatro vias dopaminérgicas principais foram identificadas no cérebro humano: a tuberoinfundibular, envolvida na regulação endócrina, a nigroestriatal envolvida com o sistema motor e a doença de Parkinson, a mesolímbica e a mesocortical envolvidas na ação de antipsicóticos e drogas de abuso (Kuhar *et al*. 2006, Cousins *et al*. 2009) Estas vias modulam domínios como impulsividade e atenção, busca da recompensa, processamento emocional, memória de trabalho e funções executivas (planejamento e execução de atividades) (Cousins *et al*. 2009). Os receptores de DA são encontrados principalmente no encéfalo e são agrupados em duas famílias, geralmente referidas como tipo D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>) e tipo D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>). Os receptores tipo D<sub>1</sub> estimulam a atividade da adenilato ciclase e, conseqüentemente, estimulam a produção do segundo mensageiro, AMPc enquanto que, os receptores tipo D<sub>2</sub> inibem esta enzima e a produção de AMPc (Trantham-Davidson *et al*. 2004).

De acordo com a hipótese dopaminérgica para a esquizofrenia, os sintomas psicóticos podem estar relacionados a uma excessiva atividade dopaminérgica no sistema límbico

enquanto que, os sintomas negativos e déficits cognitivos podem estar relacionados, pelo menos em parte, com uma redução da atividade deste sistema no córtex pré-frontal (Ichikawa & Meltzer 1999). Receptores tipo D<sub>2</sub> parecem mediar a ação de drogas antipsicóticas típicas devido a hipótese que desordens psicóticas resultam da super-estimulação de receptores tipo D<sub>2</sub> e, então, a ação antipsicótica é mediada pelo bloqueio destes receptores (Stone *et al.* 2007).

Na esquizofrenia, os níveis séricos de S100B estão aumentados (Schroeter *et al.* 2009). Este aumento está associado à exacerbação aguda dos sintomas positivos e são frequentemente relacionados a uma ativação e/ou dano glial (Steiner *et al.* 2010b). Isto nos remete a dúvida: os níveis séricos aumentados de S100B em pacientes esquizofrênicos realmente refletem uma secreção ativa de S100B por astrócitos?

## 2. OBJETIVOS

Considerando as limitações e possíveis vantagens de medir S100B em fatias cerebrais, bem como as lacunas de conhecimento existentes com relação ao efeito de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  e dopamina sobre a secreção de S100B estabelecemos os seguintes objetivos.

### 2.1. Objetivo Geral

Visa atingir a nossa hipótese de trabalho demonstrando que a secreção de S100B é modulada por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e dopamina em um modelo *ex vivo* de fatias hipocampais.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Padronização da secreção de S100B em fatias hipocampais, usando um procedimento simples e viável;
- b) Avaliar o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a secreção de S100B em fatias hipocampais;
- c) Estudar a secreção de S100B modulada por  $\text{Zn}^{2+}$  em fatias hipocampais;
- d) Investigar a secreção de S100B modulada por dopamina também em fatias hipocampais.

### 3. RESULTADOS

#### CAPÍTULO I

*S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>*

**Neurochemistry Research, 2009; 34: 1603-1611**

Patrícia Nardin, Lucas Tortorelli, André Quincozes-Santos, Lúcia Maria V. de Almeida, Marina Concli Leite, Ana Paula Thomazi, Carmem Gottfried, Susana T. Wofchuk, Rosário Donato, Carlos Alberto Gonçalves

# S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{K}^{+}$

Patrícia Nardin · Lucas Tortorelli · André Quincozes-Santos ·  
Lúcia Maria V. de Almeida · Marina C. Leite · Ana Paula Thomazi ·  
Carmem Gottfried · Susana T. Wofchuk · Rosario Donato · Carlos-Alberto Gonçalves

Accepted: 4 March 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

**Abstract** Hippocampal slices have been widely used to investigate electrophysiological and metabolic neuronal parameters, as well as parameters of astroglial activity including protein phosphorylation and glutamate uptake. S100B is an astroglial-derived protein, which extracellularly plays a neurotrophic activity during development and excitotoxic insult. Herein, we characterized S100B secretion in acute hippocampal slices exposed to different concentrations of  $\text{K}^{+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in the extracellular medium. Absence of  $\text{Ca}^{2+}$  and/or low  $\text{K}^{+}$  (0.2 mM KCl) caused an increase in S100B secretion, possibly by mobilization of internal stores of  $\text{Ca}^{2+}$ . In contrast, high  $\text{K}^{+}$  (30 mM KCl) or calcium channel blockers caused a decrease in S100B secretion. This study suggests that exposure of acute hippocampal slices to low- and high- $\text{K}^{+}$  could be used as an assay to evaluate astrocyte activity by S100B secretion: positively regulated by low  $\text{K}^{+}$  (possibly involving mobilization of internal stores of  $\text{Ca}^{2+}$ ) and negatively regulated by high- $\text{K}^{+}$  (likely secondary to influx of  $\text{K}^{+}$ ).

**Keywords** Astrocyte · Brain slice · Hippocampus ·  $\text{K}^{+}$ -Depolarisation · S100B Secretion

P. Nardin · L. Tortorelli · A. Quincozes-Santos ·  
L. M. V. de Almeida · M. C. Leite · A. P. Thomazi ·  
C. Gottfried · S. T. Wofchuk · C.-A. Gonçalves (✉)  
Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro  
Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil  
e-mail: casg@ufrgs.br

R. Donato  
Department of Experimental Medicine and Biochemical  
Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy

## Introduction

Acute brain slices, particularly hippocampal slices, have been widely used to investigate electrophysiological and metabolic neuronal parameters due to partially preserved neuronal circuitry and a suitable control of extracellular medium [1, 2]. These preparations have also been used to study some parameters of astrocyte activity, including protein phosphorylation [3], glutamate uptake [4] and S100B secretion [5, 6]. Morphological studies have confirmed the integrity of a large number of synaptic terminals accompanied by glial process swelling [7]. Moreover, data suggest the functional presence of gap junctions in acute brain slices [8]. All this information justifies the use of these preparations to complement studies, and sometimes to surpass limitations, inherent to use of isolated glial cultures.

S100B is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein that is expressed and secreted by astrocytes [9, 10]. This protein has many intracellular putative targets, involved in the regulation of proliferation, differentiation and cytoskeleton plasticity. Moreover, S100B is secreted by unknown mechanisms and has a neurotrophic effect on neurons, protecting against excitotoxicity, oxidative stress and  $\beta$ -amyloid toxicity [11–13] and modulating neurotransmission [14].

Brain S100 proteins and S100B secretion in brain slices were first described by Moore and coworkers [5, 15] and reports of S100B secretion in glial cultures doubtless confirmed its astrocyte origin [16]. Some years ago, we attempted to measure extracellular S100B in acute hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation [17]. Although the methodology was suitable to evaluate some parameters of cellular damage, no differences were observed in extracellular S100B content. However, 2 years later Buyukuysal observed variations in the extracellular levels of S100B in brain slices exposed to in vitro ischemia, using an

experimental procedure that involves multiple changes of the incubation medium before S100B release assay [6].

Using a similar experimental procedure, we measured S100B secretion in brain slices exposed to different S100B secretagogues such as fluoxetine [18], interleukin-1 $\beta$  [19] and gap junction inhibitors (M. C. Leite, unpublished data). Here, we characterized and standardized S100B secretion in acute hippocampal slices under basal conditions and in the presence of varying concentrations of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, commonly used to study neurotransmitter release and electrophysiology. It is important to emphasize that changes in K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations affect neurons and astrocytes in a differentiated manner [20, 21]. In contrast to neurons, which employ extracellular Ca<sup>2+</sup> as the main source for intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation, glial cells mobilize internal stores of Ca<sup>2+</sup> to elevate the intracellular levels of this cation. Hippocampal slice integrity and metabolic viability (including lactate release, glutamate uptake, glutathione content and reduction of MTT) were evaluated during 5 h of incubation.

## Experimental Procedure

### Animals

Male Wistar rats (30 days-old) were obtained from our breeding colony (in the Department of Biochemistry, UFRGS), maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of 22  $\pm$  1°C), and had free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, following the regulations of the local animal house authorities.

### Material

Trypan-blue, monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1), L-glutamate, 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), *o*-phenylenediamine (OPD), *o*-phthalaldehyde (OPA), meta-phosphoric acid, [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT), were purchased from Sigma. Polyclonal anti-GFAP and anti-S100 antibodies were obtained from DAKO. Peroxidase-conjugated anti-IgG and L-[2,3-<sup>3</sup>H] glutamate were obtained from Amersham, and Trypsin from Gibco.

### Preparation and Incubation of Hippocampal Slices

Animals were killed by decapitation, the brains were removed and placed in cold saline medium with the

following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgSO<sub>4</sub>; 25 HEPES; 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 glucose, adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O<sub>2</sub>. The hippocampi were dissected and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slices were then transferred immediately into 24-well culture plates, each well containing 0.3 ml of physiological medium and only one slice. The medium was changed every 15 min with fresh saline medium at room temperature (maintained at 25°C). Removed medium was stored (at -20°C) until S100B measurement. Following a 120-min equilibration period, the medium was removed and replaced with basal or specific modified media for 60, 120 or 180 min at 30°C in a warm plate. Note that measurements in the equilibration stage involve medium replacement, while the measurements in the post-equilibration stage do not. Modified media for S100B secretion after equilibration include: (1) addition of verapamil 50  $\mu$ M or 1 mM CoCl<sub>2</sub> to block calcium channels; (2) omission of CaCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub>; (3) 0.2 mM KCl (low K<sup>+</sup>) or 30 mM KCl (high K<sup>+</sup>). Media containing low and high K<sup>+</sup> had tonicity compensated by a decrease or increase in NaCl content, respectively. A set of experiments using high and low K<sup>+</sup> was carried out without the addition of Ca<sup>2+</sup>. Thirty microliters of media were collected at 15 and 60 min for S100B measurement.

### ELISA for S100B

ELISA for S100B was carried out, as described previously [22]. 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. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/ml.

### Metabolic Viability

Extracellular lactate content was measured using a lactate assay kit (Katal Biotecnologica, Brazil), according to the manufacturer's instructions and slice viability assay was performed by the colorimetric MTT method [23]. Briefly, slices were incubated with 0.5 mg/ml of MTT, followed by incubation at 30°C for 30 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide and measured at 560 and 630 nm. Results are expressed as a percentage of the control.

### Glutamate Uptake Assay

Glutamate uptake was performed as previously described [4]. Media were replaced by Hank's balanced salt solution



(HBSS) containing (in mM): 137 NaCl; 0.63 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4.17 NaHCO<sub>3</sub>; 5.36 KCl; 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.26 CaCl<sub>2</sub>; 0.41 MgSO<sub>4</sub>; 0.49 MgCl<sub>2</sub>, and 5.55 glucose, in pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.66  $\mu$ Ci/ml L-[2,3-<sup>3</sup>H] glutamate. Incubation was stopped after 5 min by removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. Slices were then lysed in a solution containing 0.1 M NaOH and 0.01% SDS. Sodium-independent uptake was determined using *N*-methyl-D-glucamine instead of sodium chloride. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the non-specific uptake from the specific uptake. Radioactivity was measured with a scintillation counter.

### Glutathione Content

GSH content was determined as described before [24]. Briefly, slices were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 0.005 M EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthaldialdehyde (1 mg/ml of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions (0–500  $\mu$ M). GSH concentrations were calculated as nmol/mg protein.

### Cell Integrity Assays

Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the incubation medium was determined by a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil), according to the manufacturer's instructions. Neuronal integrity also was evaluated by neuron-specific enolase (NSE). Extracellular NSE was measured using an electrochemiluminescent assay purchased from Roche Diagnostics, which is double sandwich assay that use an antibody anti-NSE bound with ruthenium (luminescent label). The reaction and quantification were performed by Elecsys-2010 (from Roche). Trypan blue exclusion assay was carried out as described previously [25]. Briefly, at the end of the incubation time, slices were mechanically dissociated by a sequential passage through a Pasteur pipette in a solution containing 400  $\mu$ l Trypsin/EDTA and fetal calf serum at 37°C, and allowed to settle during 10 min to remove residual intact tissue. An aliquot of the cell suspension was blended with 1.2% trypan blue solution. After 2 min, cells were counted in a hemocytometer by phase-contrast in an inverted light microscope at 100 $\times$  magnification. Each value indicates the percentage of stained cells obtained from a mean of the number of viable cells counted in four squares of the chamber. ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100  $\mu$ l samples (from slice homogenates), containing

200 ng of protein, overnight at 4°C [26]. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. The color reaction with OPD was measured at 492 nm. The standard GFAP curve ranged from 0.1 to 5 ng/ml.

### Statistical Analysis

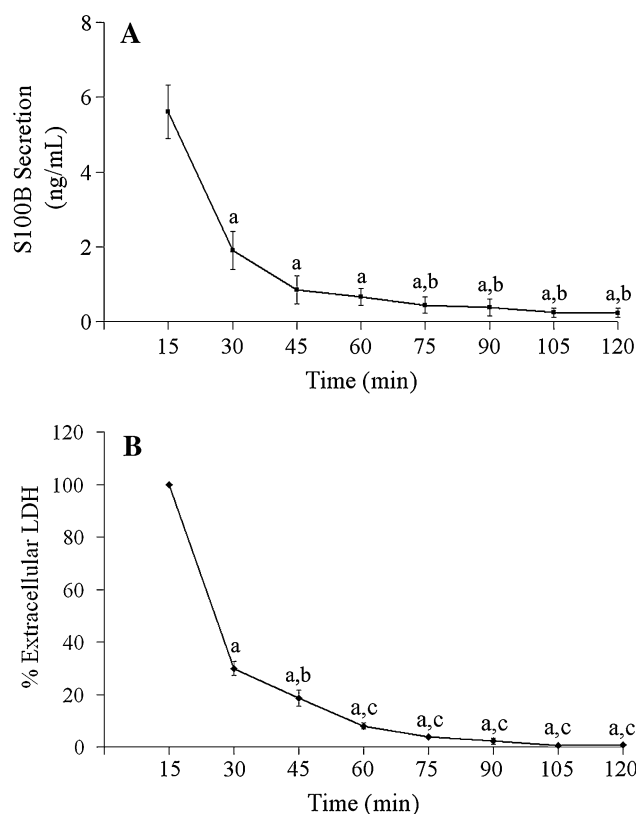
Data from the experiments are presented as mean  $\pm$  standard error and analyzed statistically by one-way analysis of variance followed by the Duncan's test or Student's *t*-test as indicated in the "Results", assuming *P* < 0.05.

## Results

As shown in Fig. 1a, S100B content in the saline medium dramatically decreased during the first 30 min of incubation and continued to decrease significantly until 75 min, when it reached a plateau from this time onwards (5th change of medium). From the initial measurement of basal S100B release (collected at the end of the first change) to the last measurement (collected at the end of the 8th change), S100B content dropped more than 20 times. Based on the cell integrity evaluation by measurement of extracellular LDH activity (Fig. 1b; see also Fig. 4), it would be adequate to refer to "S100B release" for the initial measurements (up to the 5th change of medium) and to "S100B secretion" for measurements from 5th change of medium onwards. However, we decided to consider secretion only after 120 min of equilibration (after eight changes of medium).

Basal values of S100B secretion at 15 and 60 min post-equilibration phase are shown in Fig. 2a. Two approaches were carried out to investigate the effect of external Ca<sup>2+</sup> on S100B secretion measured at 60 min post-equilibration; using Ca<sup>2+</sup> channel blockers or omitting Ca<sup>2+</sup> in the medium composition. When medium contained Ca<sup>2+</sup> channel blockers, either 50  $\mu$ M verapamil or 1 mM CoCl<sub>2</sub>, a significant decrease was observed in S100B secretion (Fig. 2b). Interestingly, absence of Ca<sup>2+</sup> caused an increase in S100B secretion, whereas absence of Mg<sup>2+</sup> in the incubation medium did not alter basal S100B secretion (Fig. 2c).

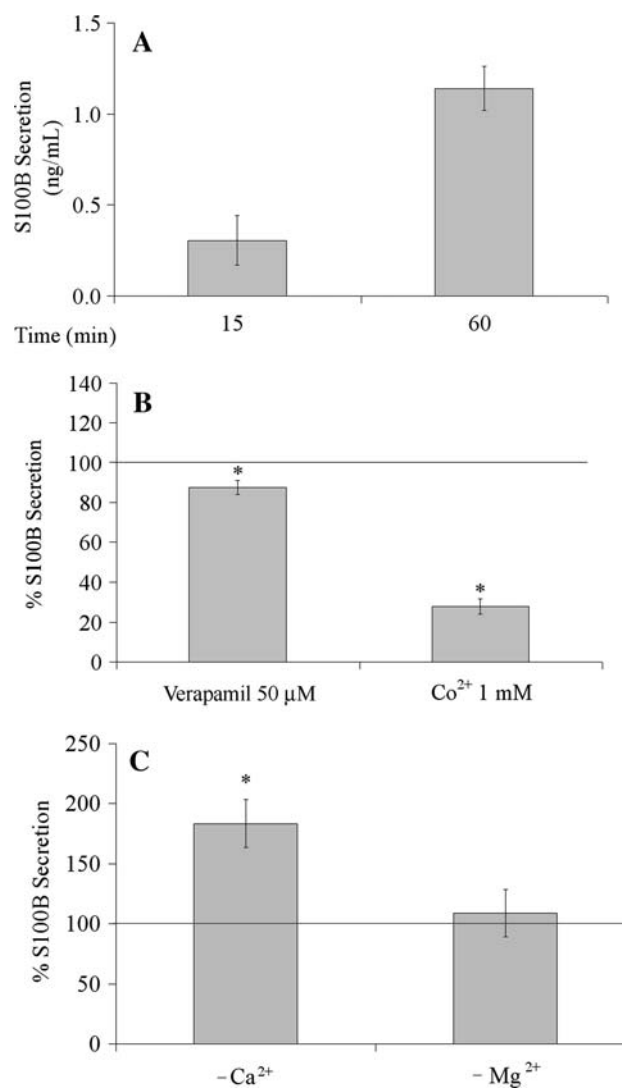
When slices were exposed to a medium containing low K<sup>+</sup> medium (0.2 mM KCl), an increase in S100B secretion was observed (Fig. 3a). On the other hand, high K<sup>+</sup> medium (30 mM) decreased S100B secretion. In addition, in a medium without Ca<sup>2+</sup>, which "per se" is able to cause an increment of intracellular Ca<sup>2+</sup> in astrocytes by mobilization of intracellular stores, low K<sup>+</sup> induced an intense increase in S100B secretion in acute hippocampal slices



**Fig. 1** S100B release curve during equilibration phase. Transversal hippocampal slices of 0.3 mm were incubated in a HEPES-buffered saline for 120 min. Medium was replaced every 15 min. **a** S100B was measured by ELISA. Values of S100B (in ng/ml) were expressed in mean  $\pm$  standard error, in 10 independent experiments performed in triplicate. *a* Significantly different from S100B release at 15 min and *b* significantly different from S100B release at 30 min (assuming  $P < 0.05$ ). **b** Extracellular LDH activity was measured in parallel by colorimetric assay. Values are expressed as percentage of the initial activity (at 15 min), assumed as 100% in each experiment. *a* Significantly different from LDH activity at 15 min; *b* significantly different from LDH activity at 30 min; and *c* significantly different from LDH activity at 30 and 45 min (assuming  $P < 0.05$ )

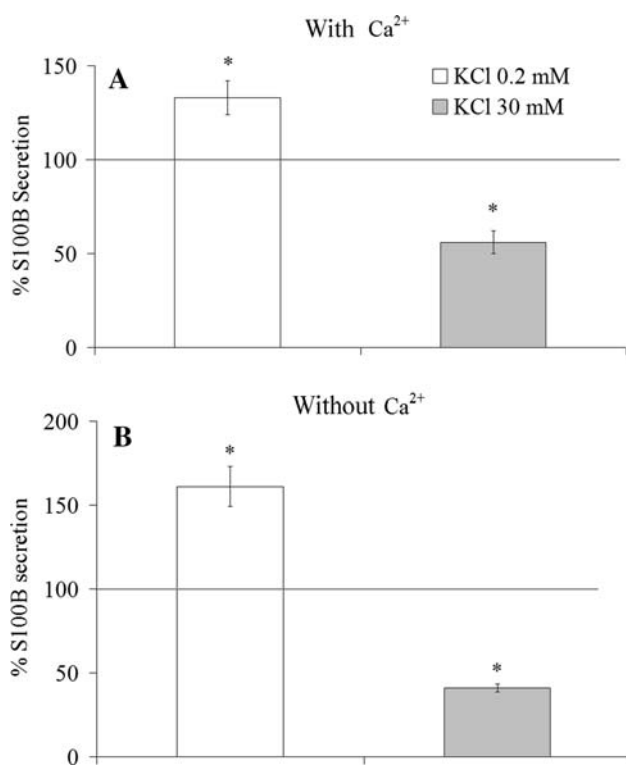
(Fig. 3b). High  $K^+$ , even in a medium without  $Ca^{2+}$ , caused a decrease in S100B secretion.

Three assays were performed to evaluate cell integrity. Assuming extracellular LDH activity as been 100% at first 15 min we observed a decrease during the first 2 h (see Fig. 1b). This activity (less than 5% of initial measurement) remained constant in the incubation medium from 2 to 5 h (Fig. 4a), indicating that no significant additional losses occurred during this time. Moreover, the content of neuron specific enolase (NSE), also exhibited a significant decrease only during the equilibration phase (Fig. 4b). About 30% of dissociated cells stained with Trypan-blue immediately after slice preparation. This value decreased to 15% after 1 h of equilibration and remained unaltered during the next 3 h of incubation, i.e., from 1 to 4 h (Fig. 4c).



**Fig. 2** S100B secretion after equilibration phase in basal condition, presence of  $Ca^{2+}$ -blockers and absence of  $Ca^{2+}$ . **a** Basal S100B secretion was measured at 15 and 60 min in normal medium. Values of S100B (in ng/ml) were expressed in mean  $\pm$  standard error, in five independent experiments performed in triplicate; **b** S100B secretion at 60 min was measured in medium containing verapamil (50  $\mu$ M) or  $CoCl_2$  (1 mM); **c** S100B secretion at 60 min was measured in medium without  $CaCl_2$  ( $-Ca^{2+}$ ) or  $MgCl_2$  ( $-Mg^{2+}$ ). The line indicates basal secretion in **b** and **c**, assumed as 100% in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$ standard error) of five independent experiments performed in triplicate. \*Significantly different from basal secretion ( $P < 0.05$ )

Metabolic insult and recovery after decapitation were appropriately indicated by extracellular lactate content (Fig. 5a). The lactate curve shown in Fig. 5a mirrored the trypan-blue exclusion curve in Fig. 4c, pointing to significant cell damage up to 4 h after decapitation followed by metabolic recovery after this time point. However, no significant changes were observed in the MTT assay in this same time interval (Fig. 5b). In order to confirm functionality of astrocytes in slices and their recovery during

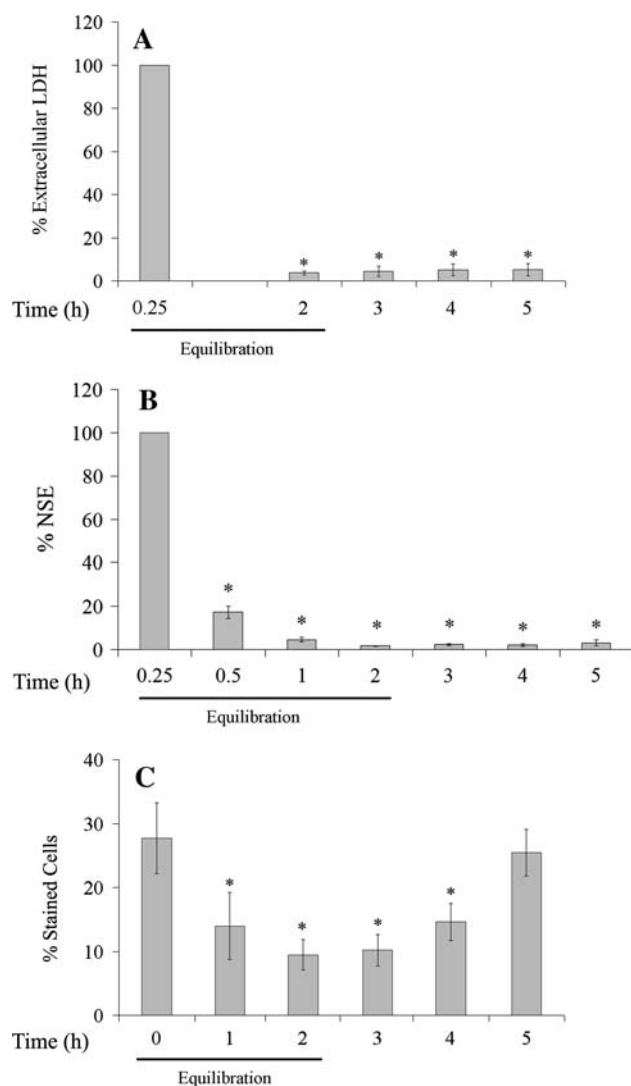


**Fig. 3** S100B secretion after equilibration modulated by K<sup>+</sup> in presence and absence of Ca<sup>2+</sup>. In **a**, S100B secretion at 60 min was measured in a medium containing 0.2 mM KCl (Low-K<sup>+</sup>) or 30 mM KCl (High-K<sup>+</sup>); in **b**, S100B secretion at 60 min was measured in a Ca<sup>2+</sup>-free medium containing 0.2 mM KCl (Low-K<sup>+</sup>) or 30 mM KCl (High-K<sup>+</sup>). The line indicates basal secretion (with and without Ca<sup>2+</sup> in **a** and **b**, respectively), assumed as 100% in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$ standard error) of five independent experiments performed in triplicate. \*Significantly different from basal secretion ( $P < 0.05$ )

incubation, we measured glutamate uptake and GSH content. Glutamate uptake, measured at 2 and 3 h, increased when compared to the activity immediately after decapitation (Fig. 6a). GSH content decreased during the first hour, but remained unaltered thereafter (Fig. 6b).

## Discussion

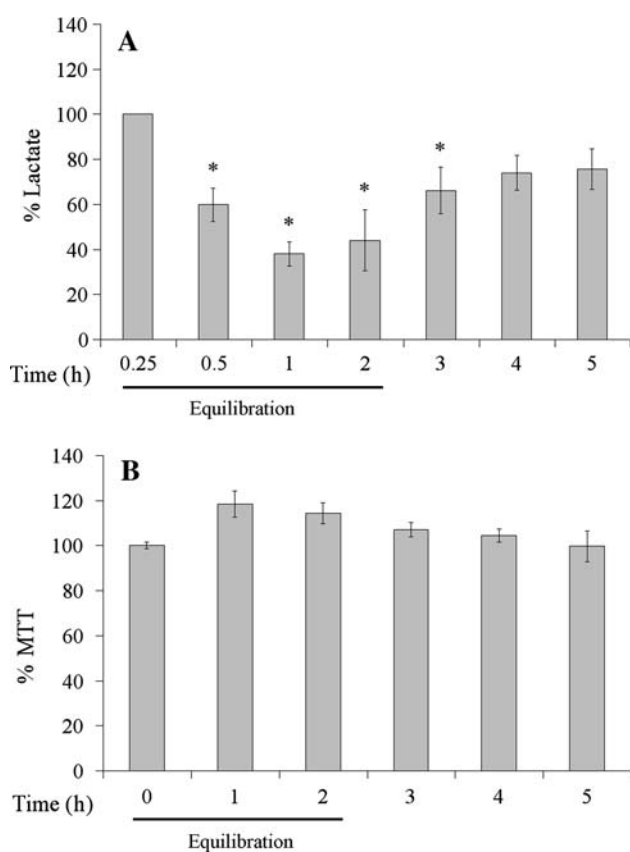
Brain slice equilibration or stabilization, which corresponds to a metabolic “recovery” of this preparation, commonly varies from 15 to 120 min, depending on the experimental assay. We used a procedure for stabilization with multiple changes of medium, as previously conducted [6], in order to eliminate extracellular S100B release as a result of altered membrane permeability. However, differently from this previous study, we performed changes of medium every 15 min (for 2 h, at 25°C) instead of 10 min (for 1.5 h at 30°C). Moreover, we used a HEPES-buffered medium aired with O<sub>2</sub> (instead of NaHCO<sub>3</sub>-buffered



**Fig. 4** Cellular integrity in hippocampal slices during 5 h of incubation. Transversal hippocampal slices of 0.3 mm were incubated in a HEPES-buffered saline for 5 h. During the first 2 h, medium was replaced every 15 min. Cellular integrity was measured by three different assays. **a** LDH activity in the medium. Values are expressed as percentage of the initial activity (at 15 min), assumed as 100% in each experiment; **b** NSE content measured by a commercial immunoassay from Roche and expressed as a percentage of the initial content, assumed as 100% in each experiment; **c** Trypan-blue exclusion assay of dissociated cells from hippocampal slices. Values are expressed as percentage of stained cells in each experiment. Each value represents mean ( $\pm$ standard error) of six independent experiments performed in triplicate. Times of equilibration stage are indicated. \*Significantly different from value measured at “0” min (or 15 min, in **a** and **b**;  $P < 0.05$ )

medium bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) and S100B secretion was assayed at 30°C (instead of 37°C).

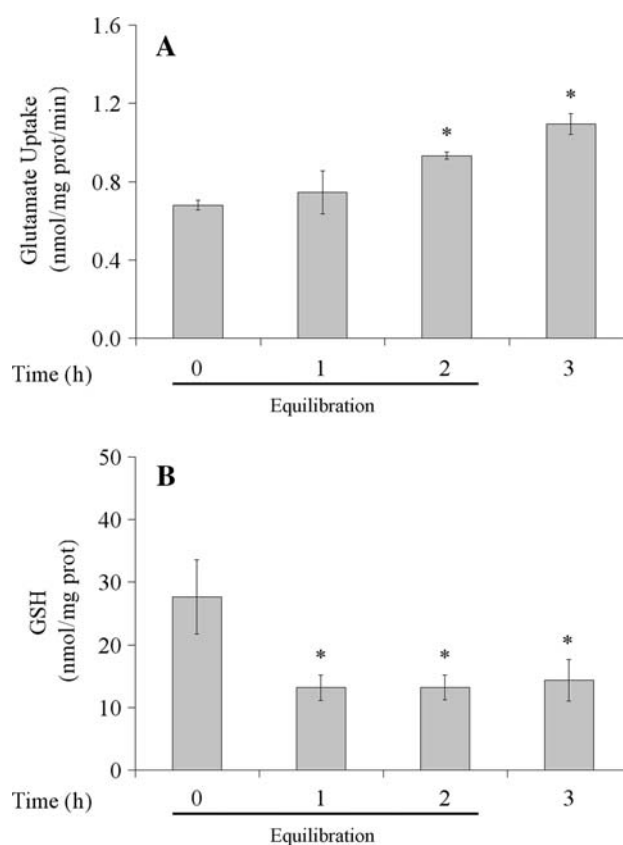
Under these conditions of equilibration, extracellular S100B decreased significantly during the first hour and reached a plateau from 75 min onwards (5th change of medium). As such, all subsequent experiments to



**Fig. 5** Metabolic viability of hippocampal slices during 5 h of incubation. Transversal hippocampal slices of 0.3 mm were incubated in a HEPES-buffered saline for 5 h. **a** Lactate content in the extracellular medium and expressed as percentage of the lactate at 15 min, assumed as 100%; **b** MTT reduction by hippocampal slices, assuming initial value as 100%. Each value represents mean ( $\pm$ standard error) of five independent experiments performed in triplicate. Times of equilibration stage are indicated. \*Significantly different from the initial measurement value ( $P < 0.05$ )

investigate S100B secretion were performed by stabilizing hippocampal slices for 120 min, also based on the other parameters used to evaluate integrity and metabolic viability of hippocampal slices, which will be discussed later.

Several secretagogues have been reported to be involved in S100B secretion in astroglial cultures, but the underlying mechanism remains unknown. Here, we investigated how extracellular ionic composition affects this secretion in slice preparations. Blocking  $\text{Ca}^{2+}$ -channels with  $\text{Co}^{2+}$  or verapamil, caused a decrease in basal S100B secretion at 1 h (about 50 and 15%, respectively). Verapamil is recognized as blocker of voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -channel, while  $\text{Co}^{2+}$  is widely considered to be a non-specific blocker of  $\text{Ca}^{2+}$ -channels, and additionally few studies have shown that receptor activation and depolarization could induce uptake this cation in neurons [27] and glial cells [28]. In glial cells,  $\text{Ca}^{2+}$  entry through plasmalemma  $\text{Ca}^{2+}$ -channels is mainly destined for replenishment of



**Fig. 6** Glutathione content and glutamate uptake in hippocampal slices during 5 h of incubation. Transversal hippocampal slices of 0.3 mm were incubated in a HEPES-buffered saline for 5 h. **a** Glutathione content (expressed in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  prot); **b** glutamate uptake (expressed in  $\text{nmol}/\text{mg}$  prot/min). Each value represents mean ( $\pm$ standard error) of five independent experiments. Times of equilibration stage are indicated. \*Significantly different from the initial measurement value ( $P < 0.05$ )

internal stores. Moreover, voltage-sensitive channels in glial cells, in contrast to neurons, tend to disappear during development [21]. Therefore, different molecular targets of these blockers could help to explain their differences of activity on basal S100B secretion.

Interestingly, absence of  $\text{Ca}^{2+}$  or exposure to 1 mM EGTA (data not shown) caused a significant increase in S100B secretion in agreement with previous observations in brain slices [5, 6], possibly due to the mobilization of internal stores of  $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Together, these data suggest a complex modulation of S100B secretion involving mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , as well as entry of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  for replenishment of internal stores.  $\text{Mg}^{2+}$ -free medium has been used to remove the  $\text{Mg}^{2+}$  blockade of NMDA receptors, inducing seizure-like events in brain slices [29, 30]. S100B secretion was not altered in  $\text{Mg}^{2+}$ -free medium, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  entry via NMDA receptors is not involved in the mechanism of S100B secretion. Accordingly, NMDA (or other glutamate ionotropic agonists) did

not affect S100B secretion in astrocytes in culture [31]. In addition, astrocyte NMDA receptors apparently were not affected by extracellular  $Mg^{2+}$  [32].

S100B secretion was increased in hippocampal slices exposed to 0.2 mM KCl. Decreased extracellular  $K^+$  (<1 mM) elicits a  $Ca^{2+}$  influx into rat astrocytes in culture [33]. Moreover, in hippocampal slices, most S100B-positive cells respond with cytosolic  $Ca^{2+}$  elevations when exposed to low concentrations of  $K^+$ , in contrast to neurons [20]. These data, again, reinforce the idea that S100B release is consequent to an increase in intracellular  $Ca^{2+}$ .

When slices were exposed to high  $K^+$ , however, a decrease in S100B secretion was observed. Importantly, whilst astrocytes are depolarised by increasing external  $K^+$ , this type of stimulation does not induce an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  or glutamate release [21, 34]. The mechanism underlying this decrease in S100B secretion could be mediated by an undetermined neuronal factor released during high  $K^+$  depolarization, such as by a neurotransmitter; for example, elevation of extracellular glutamate in cultured astrocytes [35] and brain slices [6] decreases S100B secretion. However, the involvement of neuronal depolarization is excluded based on data from Fig. 3b, where absence of  $Ca^{2+}$  (necessary to neuronal depolarization) does not prevent the decrease in S100B secretion, compared to basal secretion. Regardless of the mediator involved in this effect, these contrasting S100B secretory profiles in response to  $K^+$  suggest two different kinds of regulation of S100B secretion, one positive by low  $K^+$  (possibly involving mobilization of internal stores of  $Ca^{2+}$  in astrocytes [21]) and other negative by high  $K^+$  (possibly secondary to influx of  $K^+$  in astrocytes, which are responsible for  $K^+$  uptake and buffering under in this condition [36]).

Results of the LDH activity and NSE content indicate a significant loss of cell integrity during the first 2 h, but no additional losses occurred during the next 3 h. Moreover, no changes were observed in GFAP content (data not shown), possibly due to its insoluble character and/or methodological insensitivity to detected small variations. Interestingly, the Trypan-blue exclusion assay indicated a decrease in cell integrity at the beginning of the incubation, but in contrast to the LDH assay, Trypan blue also indicated a decrease in integrity at 5 h of incubation. It is important to mention that Trypan blue assay was performed with dissociated cells from slices and, therefore, differed from adhered cells in tissue, indicating susceptibility to mechanical injury caused by cell dissociation. As such, at 5 h of incubation, hippocampal slice cells are not more permeable to Trypan-blue, but likely more susceptible to mechanical injury.

Phosphocreatine and ATP levels in brain slices are ~50% those of intact brain, while  $O_2$  consumption

drops to at least 30%, indicating an anaerobic metabolism adaptation [7, 37]. Interestingly, ATP content in these preparations is apparently the same, either in HEPES- or in bicarbonate-buffered medium [38]. Based on extracellular lactate, it is possible to observe a significant energetic variation during the first hour and a recovery from 1 h on. The exact meaning of these changes is unclear because they involve production, release, uptake and consumption of lactate in different cell types. Based on glutamate uptake and GSH content measurements, it is possible that astrocytes are actively working in these preparations and, according to extracellular lactate measurements, it is possible observe a lower metabolic activity during the first hour *ex vivo*.

Our data suggest that, under these conditions, S100B secretion (and other parameters of astroglial activity) can be evaluated in acute hippocampal slices. This procedure, like others previously described [5, 6], allows S100B secretion data to be obtained from *ex-vivo* brain tissue, which may be extremely useful for the study of astroglial activity, in addition to other neurochemical parameters currently investigated in these preparations, such as GFAP phosphorylation [3], glutamate uptake [4], and glutamine synthetase activity [39].

Acute brain slices exhibit a partially preserved neuronal circuitry and active net of astrocytes [8]. S100B secretion in these preparations apparently preserves some characteristics observed in astrocyte cultures [5, 6, 35, 40]. Therefore, these slices may be used to complement studies of S100B secretion in culture, and sometimes to surpass the limitations, inherent to isolated glial cultures. In addition, this study suggests that exposure of acute hippocampal slices to low and high  $K^+$  could be used as an assay to evaluate astrocyte activity by S100B secretion: positively regulated by low  $K^+$  (maybe involving mobilization of internal stores of  $Ca^{2+}$ ) and negatively regulated by high- $K^+$  (maybe secondary to influx of  $K^+$ ).

**Acknowledgments** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection. We would like to thank Ms. Liz Marina Bueno dos Passos for technical support with NSE measurement.

## References

- Li CL, Mc IH (1957) Maintenance of resting membrane potentials in slices of mammalian cerebral cortex and other tissues *in vitro*. *J Physiol* 139:178–190
- Sajikumar S, Navakkode S, Frey JU (2005) Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques. *Curr Opin Neurobiol* 15:607–613. doi:10.1016/j.conb.2005.08.009

3. Leal RB, Goncalves CA, Rodnight R (1997) Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. *Brain Res Dev Brain Res* 104:1–10. doi:10.1016/S0165-3806(97)00113-2
4. Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk ST (2004) Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev* 125:475–481. doi:10.1016/j.mad.2004.04.005
5. Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW (1984) Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem* 42:1536–1541. doi:10.1111/j.1471-4159.1984.tb12739.x
6. Buyukyuysal RL (2005) Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int* 47:580–588. doi:10.1016/j.neuint.2005.06.009
7. Aitken PG, Breese GR, Dudek FF, Edwards F, Espanol MT, Larkman PM, Lipton P, Newman GC, Nowak TS Jr, Panizzon KL et al (1995) Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Methods* 59:139–149. doi:10.1016/0165-0270(94)00204-T
8. Nagy JI, Li WE (2000) A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: actions of ischemia, glutamate and elevated potassium. *Eur J NeuroSci* 12:4567–4572. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.01331.x
9. Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637–668. doi:10.1016/S1357-2725(01)00046-2
10. Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21:97–108
11. Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J (2000) S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the anti-apoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res* 858:121–128. doi:10.1016/S0006-8993(99)02438-5
12. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275:40096–40105. doi:10.1074/jbc.M006993200
13. Businaro R, Leone S, Fabrizi C, Sorci G, Donato R, Lauro GM, Fumagalli L (2006) S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res* 83:897–906. doi:10.1002/jnr.20785
14. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4037–4042. doi:10.1073/pnas.052020999
15. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739–744. doi:10.1016/0006-291X(65)90320-7
16. Van Eldik LJ, Zimmer DB (1987) Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res* 436:367–370. doi:10.1016/0006-8993(87)91681-7
17. Fontella FU, Cimarosti H, Crema LM, Thomazi AP, Leite MC, Salbego C, Goncalves CA, Wofchuk S, Dalmaz C, Netto CA (2005) Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 65:443–450. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.02.026
18. Tramontina AC, Tramontina F, Bobermin LD, Zanotto C, Souza DF, Leite MC, Nardin P, Gottfried C, Goncalves CA (2008) Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1580–1583. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.06.001
19. 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-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 206:52–57. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.10.012
20. Dallwig R, Deitmer JW (2002) Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 116:77–87. doi:10.1016/S0165-0270(02)00030-4
21. Verkhratsky A, Solovyeva N, Toescu EN (2002) Calcium excitability of glial cells. In: Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG (eds) *The tripartite synapse. Glia in synaptic transmission*, 1st edn. Oxford University Press, New York
22. 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* 169:93–99
23. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119:203–210. doi:10.1016/0022-1759(89)90397-9
24. Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–352
25. Moretto MB, Funchal C, Santos AQ, Gottfried C, Boff B, Zeni G, Pureur RP, Souza DO, Wofchuk S, Rocha JB (2005) Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg<sup>2+</sup>. *Toxicology* 214:57–66. doi:10.1016/j.tox.2005.05.022
26. Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andreazza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162:282–286. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.01.001
27. Williams LR, Pregonzer JF, Oostveen JA (1992) Induction of cobalt accumulation by excitatory amino acids within neurons of the hippocampal slice. *Brain Res* 581:181–189. doi:10.1016/0006-8993(92)90707-G
28. Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res* 833:142–149. doi:10.1016/S0006-8993(99)01503-6
29. Anderson WW, Lewis DV, Swartzwelder HS, Wilson WA (1986) Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 398:215–219. doi:10.1016/0006-8993(86)91274-6
30. Tancredi V, Hwa GG, Zona C, Brancati A, Avoli M (1990) Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. *Brain Res* 511:280–290. doi:10.1016/0006-8993(90)90173-9
31. Tramontina F, Leite MC, Goncalves D, Tramontina AC, Souza DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk ST, Goncalves CA (2006) High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res* 31:815–820. doi:10.1007/s11064-006-9085-z
32. Lalo U, Pankratov Y, Kirchoff F, North RA, Verkhratsky A (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in

- mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26:2673–2683. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006)
33. Dallwig R, Vitten H, Deitmer JW (2000) A novel barium-sensitive calcium influx into rat astrocytes at low external potassium. *Cell Calcium* 28:247–259. doi: [10.1054/ceca.2000.0153](https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0153)
34. Carmignoto G, Pasti L, Pozzan T (1998) On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *J Neurosci* 18:4637–4645
35. 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* 13:1533–1535. doi: [10.1097/00001756-200208270-00009](https://doi.org/10.1097/00001756-200208270-00009)
36. Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342–367
37. Whittingham TS, Lust WD, Christakis DA, Passonneau JV (1984) Metabolic stability of hippocampal slice preparations during prolonged incubation. *J Neurochem* 43:689–696. doi: [10.1111/j.1471-4159.1984.tb12788.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12788.x)
38. Robertson NJ, Bhakoo K, Puri BK, Edwards AD, Cox IJ (2005) Hypothermia and amiloride preserve energetics in a neonatal brain slice model. *Pediatr Res* 58:288–296. doi: [10.1203/01.PDR.0000170899.90479.1E](https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000170899.90479.1E)
39. Feoli AM, Siqueira I, Almeida LM, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, Gottfried C, Perry ML, Goncalves CA (2006) Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr* 136:2357–2361
40. Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Karl J, Goncalves CA, Wofchuk S, Rodnight R (2000) Immunoccontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett* 486:203–207. doi: [10.1016/S0014-5793\(00\)02301-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02301-2)

## **CAPÍTULO II**

### ***Zinc Negatively Modulates S100B Secretion in Hippocampal Slices***

#### **Manuscrito em Preparação**

Patrícia Nardin, Paula Lunardi, Lucas Tortorelli, Paulo Klein, Maria Cristina Guerra, Marina

Concli Leite, Rodrigo B. Leal, Carlos Alberto Gonçalves



## **Zinc negatively modulates S100B secretion in hippocampal slices**

Patrícia Nardin<sup>1</sup>, Paula Lunardi<sup>1</sup>, Lucas Silva Tortorelli<sup>1</sup>, Paulo R Klein<sup>1</sup>, Maria Cristina Guerra<sup>1</sup>, Marina C Leite<sup>1</sup>, Rodrigo B. Leal<sup>2</sup>, Carlos-Alberto Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

\* Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

[casg@ufrgs.br](mailto:casg@ufrgs.br)

## **Abstract**

In the brain,  $Zn^{2+}$  is selectively uptaken and stored in neurons and astrocytes. When released,  $Zn^{2+}$  interacts with several protein targets modulating synaptic plasticity, including neurotransmitter receptors, particularly glutamate and purinergic receptors, and store-operated calcium channels. A calcium and zinc-binding protein named S100B, which is predominantly produced and secreted by astrocytes in the gray matter of the brain, has been suggested to be a modulatory element in synaptic plasticity, as well as a protein marker of astroglial activation. In this study, we investigated whether S100B secretion is affected by extracellular zinc in acute slices of the hippocampus, an important gluzineric brain region, as well as to discuss which mechanistic elements are involved in this putative modulation. Our results show that micromolar levels of  $Zn^{2+}$ , equivalent to those found at physiological levels, were able to negatively modulate S100B secretion. In the absence of  $Ca^{2+}$ , or low levels of  $K^+$ , in the extracellular medium (which are able to induce an increment of intracellular calcium in astrocytes),  $Zn^{2+}$  still had the capacity to block S100B secretion. In addition, TPEN prevented these  $Zn^{2+}$ -mediated effects and *per se* induced an increase in S100B secretion. In addition, this study confirmed that high levels of glutamate (0.1-1 mM) inhibit S100B secretion and showed, for the first time to our knowledge, that ATP at 1 mM also inhibits this secretion. Our data contribute to understanding the role of  $Zn^{2+}$  in the hippocampus, particularly regarding the secretion of S100B, and suggest a regulatory role for this ion in astroglial activation.

**Key words:** astroglial activation, calcium, hippocampus, S100B, zinc

## Introduction

In the central nervous system (CNS),  $Zn^{2+}$  is selectively uptaken and stored in neurons and astrocytes. In presynaptic glutamatergic neurons,  $Zn^{2+}$  is transported to vesicles and released together with glutamate (Frederickson *et al.* 2005). During physiological glutamatergic transmission, the  $Zn^{2+}$  concentration in the synaptic cleft can reach 300  $\mu$ M. These  $Zn^{2+}$ -glutamate releasing neurons have been named “gluzinergetic” neurons. In addition to glutamate vesicles in neurons,  $Zn^{2+}$  is stored in the cytoplasm of astrocytes and binds to metallothioneins (mainly type 2, MT-2), which are small proteins containing cysteine residues that allow them to bind  $Zn^{2+}$  and other metals (Sensi *et al.* 2009) .

When released in the synapses,  $Zn^{2+}$  interacts with various protein targets, modulating synaptic plasticity. In fact, zinc is able to affect cell communication by acting on NMDA, GABA and adenosine receptors (Cohen-Kfir *et al.* 2005, Smart *et al.* 2004); on glutamate transport (Vandenberg *et al.* 1998); on a metabotropic  $Zn^{2+}$ -sensing receptor (Besser *et al.* 2009); and store-operated calcium channels (SOCC) (Kresse *et al.* 2005). These last targets are ubiquitous, but are very important in non-excitabile cells and particularly, in the CNS, in astrocytes. Moreover, zinc is able to interfere in the secretion and/or activity of inflammatory cytokines [e.g.(Bao *et al.*) ] and modulate TrkB neurotrophine receptors (Huang *et al.* 2008), which could also affect synaptic plasticity. A calcium and zinc-binding protein named S100B, which is predominantly produced and secreted by astrocytes in the CNS, has been suggested to be a modulatory element in synaptic plasticity (Nishiyama *et al.* 2002) and Alzheimer’s disease (Griffin *et al.* 1998). However, there is little information about the manner by which  $Zn^{2+}$  affects S100B secretion from astrocytes (Davey *et al.* 2001).

In pathological conditions, such as ischemia, seizures and traumatic brain injury, the amount of released  $Zn^{2+}$ , together with glutamate, is able to impair brain activity (Bitanhirwe & Cunningham 2009). Under these conditions, S100B has been reported as to be a marker of

astroglial activation, particularly at extracellular levels (Goncalves *et al.* 2008). In support of this finding, *in vitro* results with S100B suggest that it has neurotrophic or neurotoxic activity, depending on its concentration (Donato *et al.* 2009). For example, nM levels of S100B could protect neurons against glutamate excitotoxicity (Ahlemeyer *et al.* 2000), but  $\mu$ M levels could induce neuronal death mediated by NO release (Hu *et al.* 1997).

In a similar way,  $Zn^{2+}$  has beneficial and detrimental activity in brain tissue (Frederickson *et al.* 2005, Sensi *et al.* 2009). In fact,  $Zn^{2+}$  has been associated with several brain diseases (including Alzheimer's disease, epilepsy and stroke), and also plays a protective role in the CNS in some conditions (Bitanhirwe & Cunningham 2009). It is important to mention that the observation of  $Zn^{2+}$  accumulation in degenerating neurons of *Znt3*-null mice suggests that there are other zinc sources, besides those found in synaptic vesicles (Lee *et al.* 2000). Potentially,  $Zn^{2+}$  can be rapidly released by nitrosylation or oxidation of the thiol groups from astrocytic MT-2 (Frederickson *et al.* 2005). In this study, we aimed to investigate whether S100B secretion is affected by extracellular zinc in acute slices of hippocampus, an important glutaminergic brain region, as well as to discuss which mechanistic elements could be involved in this putative modulation.

## **Material and methods**

*Animals.* Male Wistar rats (30-days old) were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, UFRGS), maintained under controlled light and environmental conditions (12 hour light/12 hour dark cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and had free access to a commercial chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, following the regulations of the local animal house authorities.

*Material.* Monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1), L-glutamate, 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), Zinc chloride ( $ZnCl_2$ ), Adenosine 5'-triphosphate (ATP), N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN), Dithiothreitol (DTT), O-phenylenediamine (OPD), [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT), were purchased from Sigma. Polyclonal Rabbit Anti-S100 was obtained from Dako. Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase was obtained from Amersham.

*Preparation and incubation of hippocampal slices.* This procedure was carried out, as described previously (Nardin *et al.* 2009). Briefly, rats were decapitated and their hippocampi quickly dissected out. Transverse sections (300  $\mu$ m) were rapidly obtained with a McIlwain tissue chopper. One slice was placed into each well of a 24-well culture plate. Slices were incubated, at room temperature, in a HEPES-buffered saline solution (HBSS) containing (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1  $CaCl_2$ ; 1  $MgSO_4$ ; 1  $KH_2PO_4$ ; 10 glucose and 25 HEPES, pH 7.4. The medium was exchanged every 15 min for fresh medium. After a 120-min equilibration period, slices were incubated for 1 h, at 30°C, in the HBSS medium (for basal S100B secretion) or  $Ca^{2+}$ -free HBSS (in which  $Ca^{2+}$  was not included) or Low- $K^+$  (in which KCl was added to a final concentration of 0.3 mM).  $ZnCl_2$ , TPEN, DTT, glutamate and ATP were added to the incubation medium (at concentrations indicated in the Results section).

*S100B measurement.* The S100B concentration was measured as described previously (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. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

*MTT Reduction Assay.* A slice viability assay was performed using the colorimetric MTT method (Hansen *et al.* 1989). Briefly, slices were incubated with 0.5 mg/mL of MTT,

followed by incubation at 30°C for 30 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide and measured at 560 and 630 nm. Results are expressed as a percentage of the control.

*Statistical Analysis.* Data are reported as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test in the SPSS-16.0. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

The effect of  $Zn^{2+}$  on S100B secretion by acute hippocampal slices is shown in Fig 1A.  $Zn^{2+}$  varied from 1 to 300  $\mu$ M and was able to induce a decrease in S100B secretion, measured in 1 h, for all concentrations, apparently in a concentration-dependent manner ( $R^2 = 0.91$ ). The highest concentration is the concentration that  $Zn^{2+}$  is estimated to reach in the synaptic cleft (Frederickson et al. 2005). However, based on the MTT reduction assay (Fig 1B),  $Zn^{2+}$  at 100 and 300  $\mu$ M could impair cell viability in hippocampal slices. For this reason, we used  $Zn^{2+}$  at 10  $\mu$ M in the following experiments.

Assuming that TPEN is a specific  $Zn^{2+}$  chelating agent and that DTT offers competitive sulphydryl groups that prevent some  $Zn^{2+}$  effects, we investigated the effects of these compounds on basal S100B secretion (Fig 2). Both compounds (at 10  $\mu$ M) increased basal S100B secretion *per se* and no inhibitory effect of  $Zn^{2+}$  was observed when they were added.

Subsequently, we investigated two conditions that are specifically associated with the increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in astrocytes, putatively involved in S100B secretion: low extracellular levels of  $K^+$  (Dallwig & Deitmer 2002) and absence of extracellular  $Ca^{2+}$  (Zanotti & Charles 1997), which could be affected by the presence of  $Zn^{2+}$ . At low levels of potassium (0.2 mM KCl), S100B secretion increased when compared to basal secretion, assumed as being 100% (measured in a medium containing 2 mM KCl) (Fig 3).  $Zn^{2+}$  was able to prevent

this increase and even to decrease S100B secretion, when compared with basal secretion. TPEN did not increase the stimulated S100B secretion that was induced by low  $K^+$ . However, TPEN, together with  $Zn^{2+}$ , prevented the effect induced by  $Zn^{2+}$  and, apparently, even increased S100B secretion.

We then investigated S100B secretion in a  $Ca^{2+}$ -free medium (no  $CaCl_2$  was added to this medium) (Fig 4). S100B secretion was stimulated in this condition and  $Zn^{2+}$  was able to prevent this increase. TPEN, in the  $Ca^{2+}$ -free medium, also increased S100B secretion, when compared to basal secretion, but the stimulated secretion was not different from that induced by  $Ca^{2+}$ -free medium *per se*. Moreover, TPEN together with  $Zn^{2+}$  prevented the effect induced by  $Zn^{2+}$ .

Recently we suggested that S100B secretion is positively modulated by gap junction inhibitors. Thus, the effects of two neurotransmitters, glutamate and ATP (suggested to be gap junction modulators), on S100B secretion were determined, as well as their effects in the presence of  $Zn^{2+}$ . Glutamate at 0.1 and 1 mM reduced S100B secretion (Fig 5A); this effect was not quantitatively different when  $Zn^{2+}$  was added (Fig 5B). ATP at 1 mM was also able to reduce S100B secretion (Fig 6A) and, similarly to the result with glutamate, no additive effect was observed when  $Zn^{2+}$  was present (Fig 6B).

## **Discussion**

Previous studies mention that, in the synaptic cleft, the  $Zn^{2+}$  concentration can reach 0.3 mM (Frederickson et al. 2005). However, these high levels could be an overestimation (Kay 2006). Nevertheless, elevated levels of  $Zn^{2+}$  have been characterized in pathological conditions including stroke, epilepsy and degenerative diseases (Bitanhirwe & Cunningham 2009). In fact, elevated levels of  $Zn^{2+}$  (0.1 mM) are able to inhibit glutamate uptake and could compromise neural survival (Suh *et al.* 2007). We found that  $Zn^{2+}$ , from 1 to 300  $\mu$ M, inhibited S100B secretion, but that 100 and 300  $\mu$ M impaired cell viability in hippocampal

slices (based on the MTT reduction assay). Moreover,  $Zn^{2+}$ , at concentrations from 1 to 10  $\mu M$ , are able to modulate ionic permeability and alter astrocyte response (Kresse et al. 2005), and elevated levels ( $> 100 \mu M$ ) can induce the opposite response in hemichannels (Chappell et al. 2003).

After finding that  $Zn^{2+}$  was able to inhibit basal S100B secretion, we investigated whether TPEN or DTT were able to prevent this effect. TPEN is a chelator with a high affinity for  $Zn^{2+}$  and was able, *per se*, to stimulate basal S100B secretion, possibly by chelating some of the endogenous  $Zn^{2+}$  involved in the inhibition of S100B secretion. Moreover, DTT was also able to stimulate S100B secretion, suggesting an involvement of cysteine residues in the zinc-mediated inhibition of S100B secretion. However, the *per se* effect of these compounds on S100B secretion makes it difficult to prove that they prevented the inhibitory effect of  $Zn^{2+}$ . Some S100B secretagogues have been identified, including forskolin (Pinto et al. 2000), kainate (Sakatani et al. 2008) and carbenoxolone (Leite et al. 2009). However, the underlying mechanism of secretion remains unknown and involves a non-classic vesicular export, where  $Ca^{2+}$  is a possible mediator (Davey et al. 2001, Goncalves et al. 2008). In order to investigate the effect of  $Zn^{2+}$  on S100B secretion, we incubated hippocampal slices under two specific conditions associated with the increase of intracellular  $Ca^{2+}$  in astrocytes: low extracellular levels of  $K^+$  (Dallwig & Deitmer 2002) or absence of extracellular  $Ca^{2+}$  (Zanotti & Charles 1997), which have been accompanied by S100B secretion (Nardin et al. 2009).

In astroglial cells, the absence of extracellular calcium induces an increase in intracellular calcium, possibly involving mobilization of the  $Ca^{2+}$  stored in the endoplasmic reticulum (Zanotti & Charles 1997). This effect is blocked by thapsigargin and by the replacement of  $Ca^{2+}$  with some other divalent cations, including  $Zn^{2+}$ . This mechanism possibly involves a calcium-sensing receptor in astrocytes (Yano et al. 2004). In our study,  $Zn^{2+}$ , at micromolar levels, blocked the S100B secretion induced by the absence of  $Ca^{2+}$ . It would be possible to



conceive that this calcium-sensing receptor, in astrocytes, is as sensitive to  $Zn^{2+}$  as SOCC, which is involved in the replenishment of internal  $Ca^{2+}$  stores (Gore *et al.* 2004, Kresse *et al.* 2005). Therefore 1-10  $\mu M$   $Zn^{2+}$  could block the release of  $Ca^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and reduce S100B secretion. However, at this moment, we can not rule out another target of  $Zn^{2+}$  downstream from the calcium-sensing receptor involved in the internal  $Ca^{2+}$  release or in the machinery of S100B secretion. As expected, TPEN *per se* does not modify the S100B secretion induced in a  $Ca^{2+}$ -free medium, but prevented the inhibitory effect of  $Zn^{2+}$ .

When  $K^+$  was reduced in the external medium, S100B secretion increased (about 60%), in agreement with our previous result (Nardin *et al.* 2009). This increase in S100B may be associated with an elevation of intracellular  $Ca^{2+}$ , which is due to the influx of the external medium through  $K^+$  inward rectifier channels, which are  $Ca^{2+}$ -permeable at low levels of  $K^+$  and highly sensitive to  $Ba^{2+}$  (Dallwig *et al.* 2000). Addition of  $Zn^{2+}$  decreased S100B secretion to a value lower than basal secretion. TPEN *per se* did not modify the low  $K^+$ -stimulated S100B secretion, but TPEN prevented the inhibition caused by  $Zn^{2+}$ . In fact, TPEN with  $Zn^{2+}$  even increased S100B secretion, but the reason for this is unclear at this moment.

Elevated concentrations of glutamate (as observed in pathological conditions) induce a decrease in S100B secretion, in primary astrocyte cultures and acute brain slices (Goncalves *et al.* 2002, Buyukuysal 2005). Here, we confirm that this effect at 1 mM glutamate. The underlying mechanism for this finding is unclear but appears to involve glutamate transporters (Tramontina *et al.* 2006a). However, in contrast to primary astrocyte cultures, 0.1 mM glutamate was enough to decrease S100B secretion in hippocampal slices. It may be noted that the  $Zn^{2+}$  effect on S100B secretion was not additive to the effect of glutamate. Elevated levels of ATP, also observed in pathological conditions, decreased the S100B secretion, as observed with glutamate. The purinergic receptors or other ATP targets involved in this effect

probably require further characterization. Again the effect of  $Zn^{2+}$  was not additive in ATP-induced S100B decrease.

Extracellular S100B is assumed to be a neurotrophic factor, but persistent elevation could cause damage to neurons and other cells (Donato et al. 2009, Van Eldik & Wainwright 2003). In addition, S100B, like other S100 proteins, has been considered to be a damage-associated molecular pattern (DAMP) or alarmin (Bianchi 2007). Therefore,  $Zn^{2+}$  at physiological levels could function by repressing S100B secretion. This decrease did not impair trophic activities, such as glutamate uptake stimulation (Tramontina *et al.* 2006b). On the other hand, a failure to repress S100B release may result in a persistent elevation and trigger neuronal death. These results in hippocampal slices confirm a regulatory role of  $Zn^{2+}$  in S100B secretion, as suggested previously in glioblastoma cells (Davey et al. 2001).

In summary, these results demonstrate that low levels of  $Zn^{2+}$ , equivalent to those found at physiological levels, are able to negatively modulate S100B secretion in hippocampal slices. In two extreme conditions, absence of  $Ca^{2+}$  or low levels of  $K^{+}$  in the extracellular medium, which are able to induce an increased intracellular calcium,  $Zn^{2+}$  still demonstrated the capacity to block S100B secretion. In addition, TPEN prevented the effects of  $Zn^{2+}$  and *per se* induced an increase in S100B secretion. Moreover, our data confirm that high levels of glutamate (0.1-1 mM) inhibit S100B secretion and show, for the first time to our knowledge, that ATP at 1 mM also inhibits this secretion. These data contribute to the understanding of the role of  $Zn^{2+}$  in the hippocampus, particularly with regard to the secretion of S100B, a protein widely used as marker of astroglial activation in several conditions of brain injury.

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

## Figure legends

**Figure 1. *S100B secretion is negatively modulated by Zn<sup>2+</sup> in acute hippocampal slices.*** In A, S100B released from hippocampal slices incubated with Zn<sup>2+</sup> (at indicated concentrations) for 60 min. S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal S100B secretion (without Zn<sup>2+</sup>), assumed as being 100% (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ). In B, MTT reduction assay in hippocampal slices incubated with Zn<sup>2+</sup> (at concentrations indicated) for 60 min. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from slices incubated in the absence of Zn<sup>2+</sup>, assumed as being 100% (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ).

**Figure 2. *The effect of Zn<sup>2+</sup> on S100B secretion was prevented by TPEN and DTT.***

S100B secretion from hippocampal slices incubated with TPEN or DTT (at 10  $\mu$ M) in the presence or absence of Zn<sup>2+</sup> (at 10  $\mu$ M) for 60 min. S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 4 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal S100B secretion (without Zn<sup>2+</sup>) (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ).

**Figure 3. *Low-K<sup>+</sup> stimulated S100B secretion was prevented by Zn<sup>2+</sup>.*** S100B secretion at 60 min from acute hippocampal slices was measured in a HEPES-buffered saline medium containing 3 mM KCl (basal S100B secretion, assumed as being 100% and represented by a line) or 0.2 mM KCl (Low-K<sup>+</sup> stimulated S100B secretion, represented by an open bar). Zn<sup>2+</sup> and/or TPEN were added at a concentration of 10  $\mu$ M. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal S100B secretion (without Zn<sup>2+</sup>) (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ).

**Figure 4.  $Ca^{2+}$ -free stimulated S100B secretion was prevented by  $Zn^{2+}$ .** S100B secretion at 60 min from acute hippocampal slices was measured in a HEPES-buffered saline medium containing 2 mM (basal S100B secretion, assumed as being 100% and represented by a line) or without  $CaCl_2$  ( $Ca^{2+}$ -free stimulated S100B secretion, represented by an open bar).  $Zn^{2+}$  and/or TPEN were added at a concentration of 10  $\mu$ M. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal S100B secretion (without  $Zn^{2+}$ ) (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ).

**Figure 5. S100B secretion is negatively modulated by glutamate.** In A, S100B secretion at 60 min was measured in medium containing glutamate at indicated concentrations; In B, S100B secretion at 60 min was measured in the presence of glutamate (at 100  $\mu$ M) and  $Zn^{2+}$  (at 10  $\mu$ M). Line indicates basal secretion (without glutamate or  $Zn^{2+}$ ) assumed as 100% in each experiment. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ).

**Figure 6. S100B secretion is negatively modulated by ATP.** In A, S100B secretion at 60 min was measured in a medium containing ATP at indicated concentrations; In B, S100B secretion at 60 min was measured in the presence of ATP (at 1 mM) and  $Zn^{2+}$  (at 10  $\mu$ M). Line indicates basal secretion (without glutamate or  $Zn^{2+}$ ), assumed as 100% in each experiment. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion (One way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ).

Figure 1

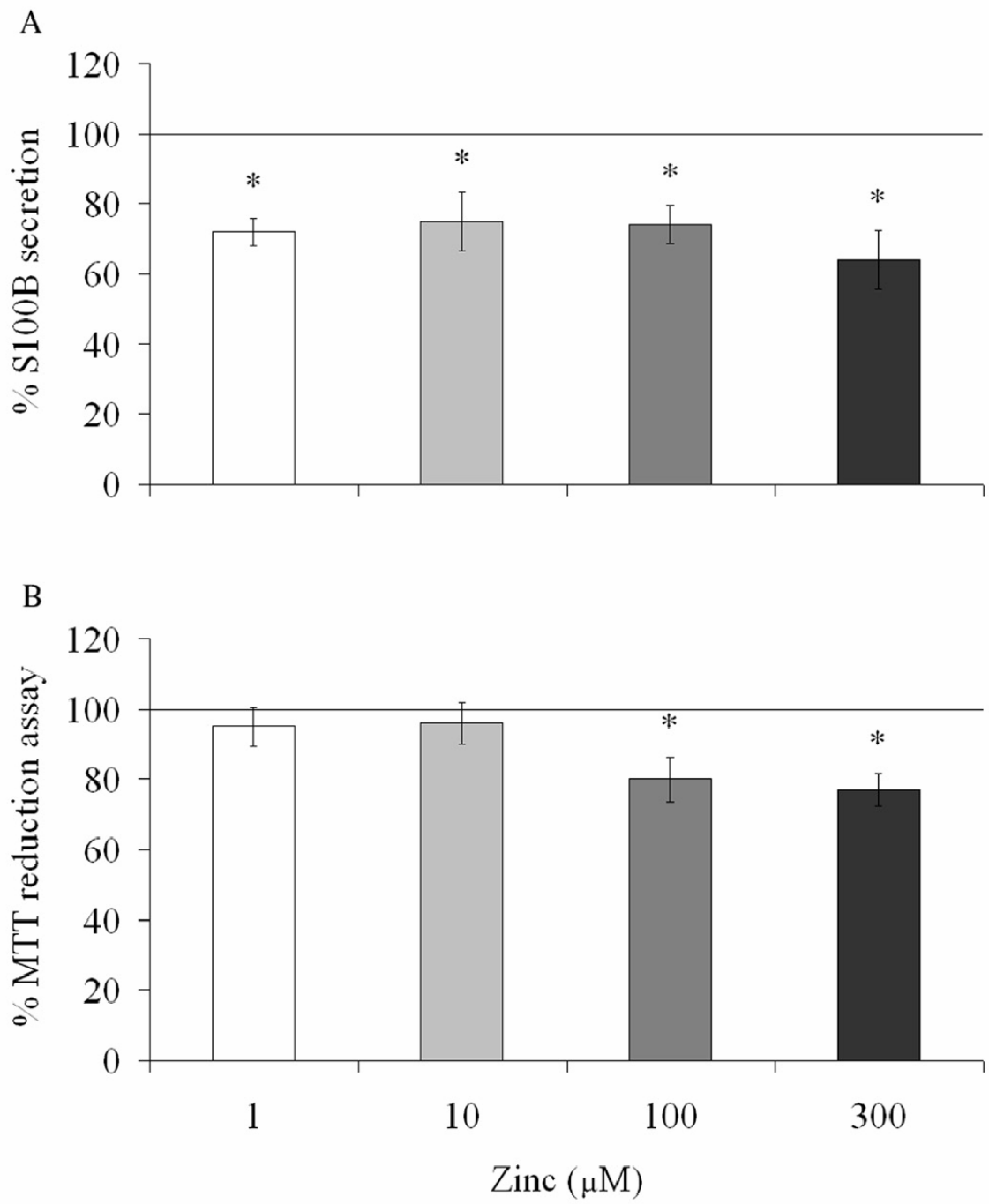


Figure 2

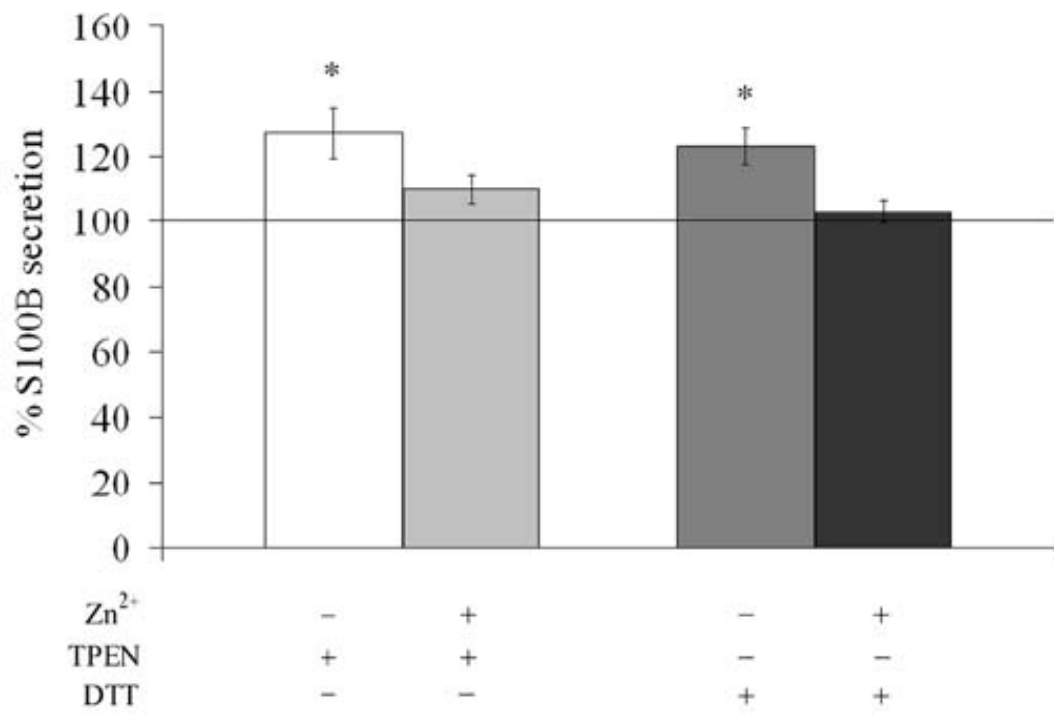


Figure 3

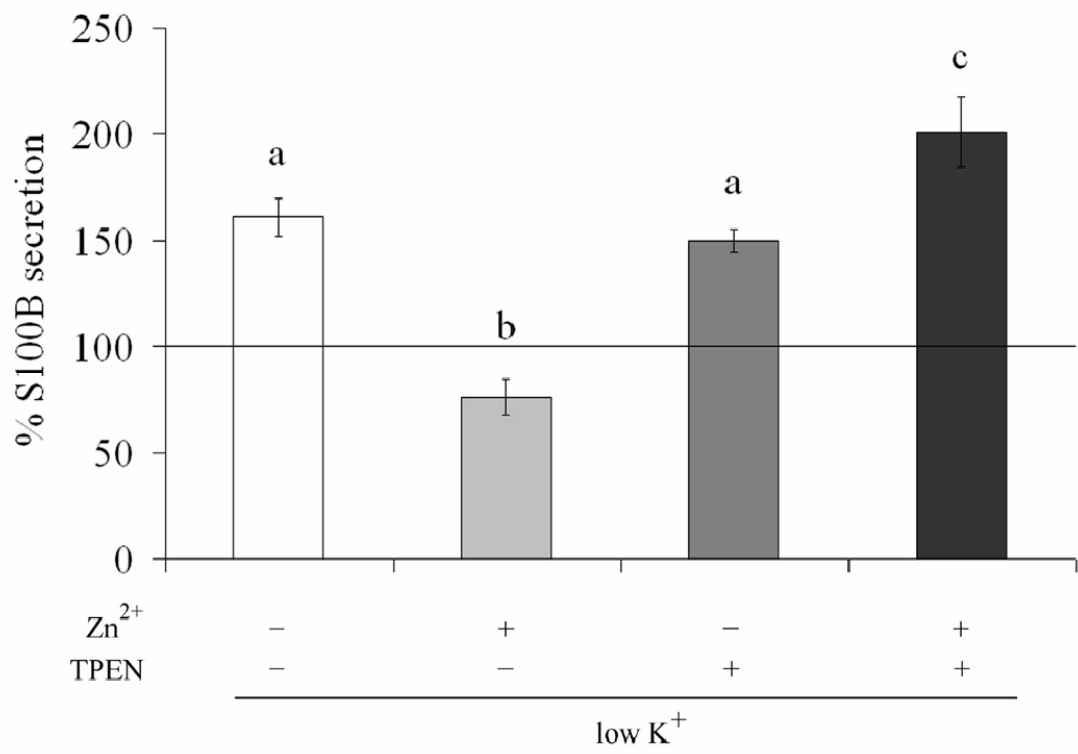


Figure 4

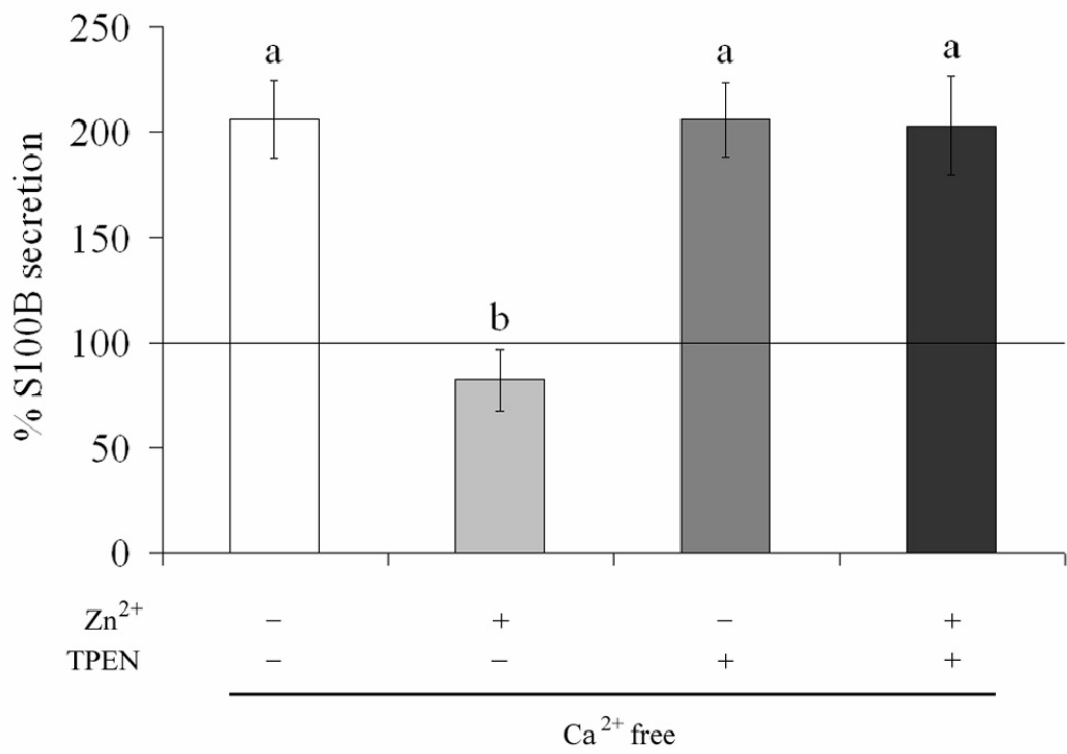




Figure 5

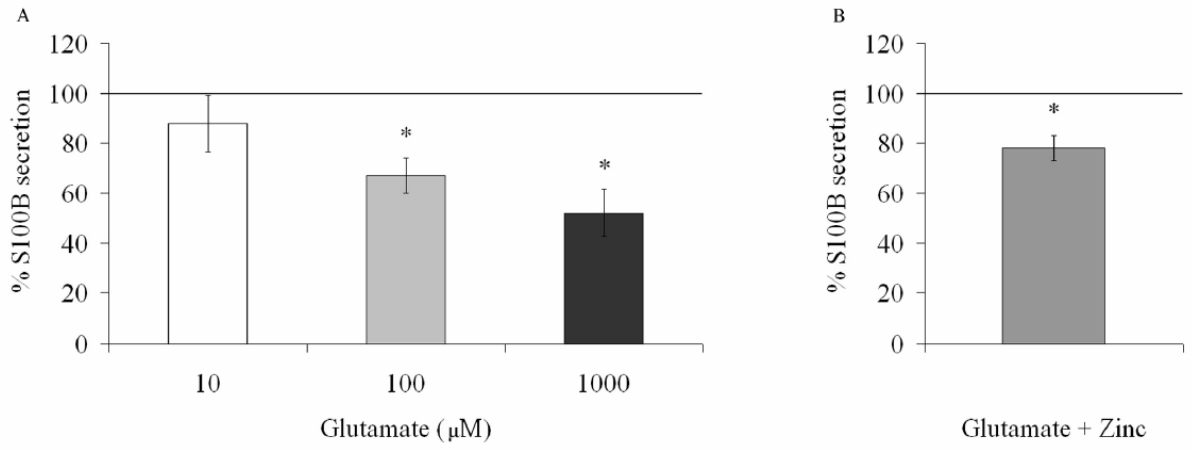
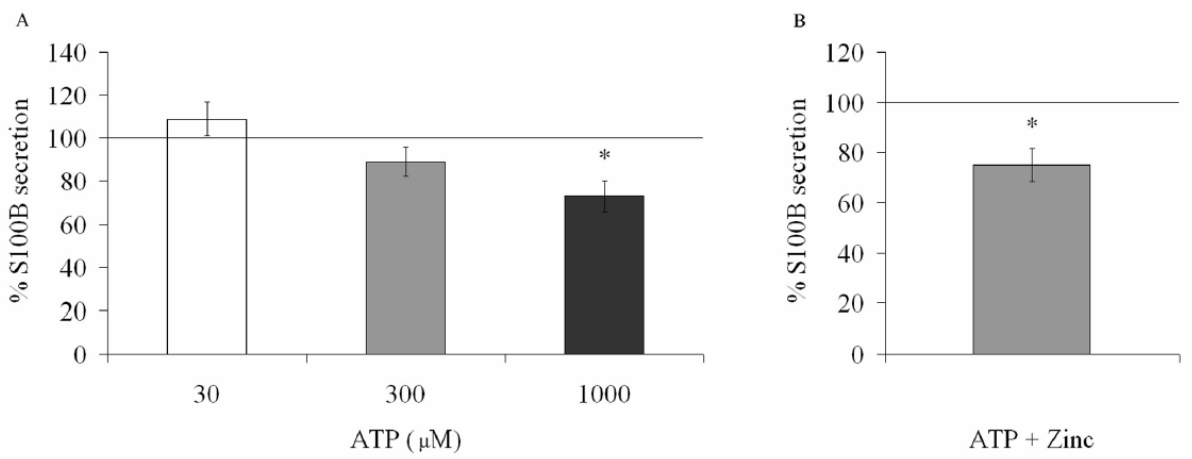


Figure 6



## References

- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C. and Krieglstein, J. (2000) S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*, **858**, 121-128.
- Bao, B., Prasad, A. S., Beck, F. W., Fitzgerald, J. T., Snell, D., Bao, G. W., Singh, T. and Cardozo, L. J. Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. *Am J Clin Nutr*, **91**, 1634-1641.
- Besser, L., Chorin, E., Sekler, I., Silverman, W. F., Atkin, S., Russell, J. T. and Hershfinkel, M. (2009) Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J Neurosci*, **29**, 2890-2901.
- Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**, 1-5.
- Bitanhirwe, B. K. and Cunningham, M. G. (2009) Zinc: the brain's dark horse. *Synapse*, **63**, 1029-1049.
- Buyukuysal, R. L. (2005) Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*, **47**, 580-588.
- Chappell, R. L., Zakevicius, J. and Ripps, H. (2003) Zinc modulation of hemichannel currents in *Xenopus* oocytes. *Biol Bull*, **205**, 209-211.
- Cohen-Kfir, E., Lee, W., Eskandari, S. and Nelson, N. (2005) Zinc inhibition of gamma-aminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6154-6159.
- Dallwig, R. and Deitmer, J. W. (2002) Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods*, **116**, 77-87.
- Dallwig, R., Vitten, H. and Deitmer, J. W. (2000) A novel barium-sensitive calcium influx into rat astrocytes at low external potassium. *Cell Calcium*, **28**, 247-259.
- Davey, G. E., Murmann, P. and Heizmann, C. W. (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**, 30819-30826.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 1008-1022.
- Frederickson, C. J., Koh, J. Y. and Bush, A. I. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 449-462.
- Goncalves, C. A., Concli Leite, M. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, **41**, 755-763.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S. and Goncalves, C. A. (2002) High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport*, **13**, 1533-1535.
- Gore, A., Moran, A., Hershfinkel, M. and Sekler, I. (2004) Inhibitory mechanism of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels by zinc. *J Biol Chem*, **279**, 11106-11111.
- Griffin, W. S., Sheng, J. G., Royston, M. C., Gentleman, S. M., McKenzie, J. E., Graham, D. I., Roberts, G. W. and Mrak, R. E. (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol*, **8**, 65-72.

- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, **119**, 203-210.
- Hu, J., Ferreira, A. and Van Eldik, L. J. (1997) S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, **69**, 2294-2301.
- Huang, Y. Z., Pan, E., Xiong, Z. Q. and McNamara, J. O. (2008) Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron*, **57**, 546-558.
- Kay, A. R. (2006) Imaging synaptic zinc: promises and perils. *Trends Neurosci*, **29**, 200-206.
- Kresse, W., Sekler, I., Hoffmann, A., Peters, O., Nolte, C., Moran, A. and Kettenmann, H. (2005) Zinc ions are endogenous modulators of neurotransmitter-stimulated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in both cultured and in situ mouse astrocytes. *Eur J Neurosci*, **21**, 1626-1634.
- Lee, J. Y., Cole, T. B., Palmiter, R. D. and Koh, J. Y. (2000) Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: evidence against synaptic vesicle origin. *J Neurosci*, **20**, RC79.
- Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*, **169**, 93-99.
- Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*.
- Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A. et al. (2009) S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res*.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S. and Itohara, S. (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4037-4042.
- Pinto, S. S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C. A., Wofchuk, S. and Rodnight, R. (2000) Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett*, **486**, 203-207.
- Sakatani, S., Seto-Ohshima, A., Shinohara, Y., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Itohara, S. and Hirase, H. (2008) Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci*, **28**, 10928-10936.
- Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I. and Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 780-791.
- Smart, T. G., Hosie, A. M. and Miller, P. S. (2004) Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist*, **10**, 432-442.
- Suh, S. W., Aoyama, K., Alano, C. C., Anderson, C. M., Hamby, A. M. and Swanson, R. A. (2007) Zinc inhibits astrocyte glutamate uptake by activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mol Med*, **13**, 344-349.
- Tramontina, F., Leite, M. C., Goncalves, D. et al. (2006a) High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*, **31**, 815-820.
- Tramontina, F., Tramontina, A. C., Souza, D. F., Leite, M. C., Gottfried, C., Souza, D. O., Wofchuk, S. T. and Goncalves, C. A. (2006b) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*, **26**, 81-86.
- Van Eldik, L. J. and Wainwright, M. S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, **21**, 97-108.

- Vandenberg, R. J., Mitrovic, A. D. and Johnston, G. A. (1998) Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions. *Mol Pharmacol*, **54**, 189-196.
- Yano, S., Brown, E. M. and Chattopadhyay, N. (2004) Calcium-sensing receptor in the brain. *Cell Calcium*, **35**, 257-264.
- Zanotti, S. and Charles, A. (1997) Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J Neurochem*, **69**, 594-602.

### **CAPÍTULO III**

*In vitro S100B secretion is decreased by apomorphine: effect of antipsychotics and antioxidants*

**Manuscrito submetido a Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**

Patrícia Nardin, Ana Carolina Tramontina, André Quincozes-Santos, Lucas Silva Tortorelli,  
Paula Lunardi, Paulo R Klein, Carmem Gottfried, Elaine Elisabetsky Carlos-Alberto  
Gonçalves

## **In vitro S100B secretion is reduced by apomorphine: effects of antipsychotics and antioxidants**

Patrícia Nardin, Ana Carolina Tramontina, André Quincozes-Santos, Lucas Silva Tortorelli, Paula Lunardi, Paulo R Klein, Carmem Gottfried, Elaine Elisabetsky and Carlos-Alberto Gonçalves\*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\* Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

[casg@ufrgs.br](mailto:casg@ufrgs.br)

**Abbreviations:** **AA**, ascorbic acid; **D1/D2**, types 1 and 2 dopamine receptor, respectively; **ELISA**, enzyme-linked immunosorbent assay; **GSH**, reduced glutathione monoethylester; **LDH**, lactate dehydrogenase; **MTT**, 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; **NAC**, N-acetylcysteine.

## **Abstract**

Astrocytes express dopamine receptors and respond to dopamine stimulation. However, the role of astrocytes in psychiatric disorders and the effects of antipsychotics on astroglial cells have only been investigated recently. S100B is a glia-derived protein commonly used as a marker of astroglial activation in psychiatric disorders, particularly schizophrenia. We investigated S100B secretion in three different rat brain preparations (fresh hippocampal slices, C6 glioma cells and primary astrocyte cultures) exposed to apomorphine and antipsychotics (haloperidol and risperidone), aiming to evaluate *ex vivo* and *in vitro* whether dopamine activation and dopaminergic antagonists modulate astroglial activation as measured by changes in the extracellular levels of S100B. The serum S100B elevation observed in schizophrenic patients does not fit with the *in vitro* decrease of S100B secretion we observed in hippocampal slices, cortical astrocytes and C6 glioma cells treated with apomorphine, which mimics dopaminergic hyperactivation. This decrease of S100B secretion can be explained by a stimulation of D2 receptors negatively coupled to adenylyl cyclase. Antipsychotic medications and antioxidant supplementation were able to prevent the decline in S100B secretion. This reinforces the benefits of antioxidant therapy in psychiatric disorders. Moreover, our data suggest more caution in the interpretation of changes in peripheral S100B levels as a sign of astroglial activation, particularly considering the extra-cerebral sources of this protein.

**Key words:** apomorphine, astrocyte, antioxidant, antipsychotic, S100B, schizophrenia

## **1. Introduction**

Schizophrenia is a chronic psychiatric disorder that affects approximately 1% of the population, and its positive symptoms (e.g., hallucinations and delusions) are correlated with elevated dopaminergic activity (Guillin et al., 2007). The disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle response by the dopamine agonist apomorphine in rats has been used in the last two decades as a model of schizophrenia-related disorders, and this disruption is reversed by both typical and atypical antipsychotic agents [e.g., (Mitchell and Neumaier, 2008, Swerdlow et al., 1994)].

It is well known that astrocytes express dopamine receptors and respond to dopamine stimulation (Hertz et al., 1984). However, the role of astrocytes in psychiatric disorders (De Keyser et al., 2008) and the effects of antipsychotics on astroglial cells have only been investigated recently (Quincozes-Santos et al., 2008, Roh et al., 2008).

S100B is a calcium-binding protein synthesized and secreted by astrocytes, and it is frequently used as a marker of astroglial activation (Donato et al., 2009, Goncalves et al., 2008). However, its expression is not restricted to astrocytes in the brain (Steiner et al., 2007) or even to brain tissue (Goncalves et al., 2010). Many groups (including ours) have reported S100B serum elevation in schizophrenic and bipolar patients (Andreazza et al., 2007, Lara et al., 2001). In fact, a meta-analysis showed that serum S100B elevation is related to the exacerbation phase in schizophrenic patients (Schroeter et al., 2009). Despite this evidence, it is not clear whether S100B serum reflects astroglial activation (Goncalves et al., 2010), particularly in schizophrenic patients (Steiner et al., 2010c).

Some S100B secretagogues have been identified, including fluoxetine (Tramontina et al., 2008), kainate (Sakatani et al., 2008) and carbenoxolone, an inhibitor of gap junctions (Leite et al., 2009). In addition, two reports suggest a regulatory effect of antipsychotics on S100B



secretion in C6 glioma cells and oligodendrocytic OLN-93 cells (Quincozes-Santos et al., 2008, Steiner et al., 2010b), possibly mediated by dopamine receptors. Here we investigated S100B secretion in three different rat brain preparations (fresh hippocampal slices, C6 glioma cells and primary astrocyte cultures) exposed to apomorphine and antipsychotics (haloperidol and risperidone), aiming to evaluate *ex vivo* and *in vitro* whether dopamine activation and dopaminergic antagonists modulate astroglial activation measured as changes in the extracellular levels of S100B. S100B secretion is also affected by antioxidant compounds (Donato et al., 2009), and apomorphine has protective effects on oxidative stress-induced cell death (Hara et al., 2006). Therefore, we also investigated the effect of apomorphine together with other antioxidants on S100B secretion.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Animals*

Male Wistar rats (30 days old) were obtained from our breeding colony (Department of Biochemistry, UFRGS), were maintained under controlled light and environmental conditions (12 hour light/12 hour dark cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and had free access to commercial chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised in 1996 and followed the regulations of the local animal housing authorities.

### *2.2 Chemicals*

Poly-L-lysine, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), flasks and other material for cell culture, monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), O-phenylenediamine (OPD), [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT), apomorphine, N-acetylcysteine (NAC), and ascorbic acid (AA) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Glutathione monoethylester (GSH) was obtained from Calbiochem. Polyclonal Rabbit Anti-S100 was obtained from Dako. Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase was obtained from Amersham. Fetal calf serum (FCS) was purchased from Gibco. Risperidone (Risperdal®) and haloperidol (Haldol®) were a gift from Janssen-Cilag (São Paulo, SP, Brazil), a Brazilian division of Johnson & Johnson.

### *2.3 Hippocampal slice preparation*

This procedure was carried out as described previously (Nardin et al., 2009). Briefly, rats were decapitated, and their hippocampi quickly dissected out. Transverse sections (300  $\mu\text{m}$ ) were rapidly obtained with a McIlwain tissue chopper. One slice was placed into each well of a 24-well culture plate. Slices were incubated at room temperature in a HEPES-buffered saline solution (HBSS) containing (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgSO<sub>4</sub>; 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

10 glucose and 25 HEPES, pH 7.4. The medium was changed every 15 min with fresh medium. After a 120-min equilibration period, the slices were incubated for 1 h at 30°C in the HBSS medium in the absence or presence of apomorphine (1, 10 or 100  $\mu$ M); Haloperidol, Risperidone, N-acetylcysteine (NAC), glutathione monoethylester (GSH), and ascorbic acid were added to the incubation medium at the concentrations indicated in the Results section.

#### *2.4 Astrocyte culture*

Primary cortical astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described (Gottfried et al., 2003). All procedures were in accordance with the NIH guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the ethical committee from the University (UFRGS, Porto Alegre). Briefly, cortices of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and mechanically dissociated in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  -free balanced salt solution. 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  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1% Fungizone®, 0.032% garamicine and 10% FCS. Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5%  $\text{CO}_2$ /95% air at 37°C and allowed to grow to confluence. The medium was replaced by DMEM without serum in the absence or presence of apomorphine, haloperidol, risperidone, N-acetylcysteine (NAC), glutathione monoethylester (GSH), and/or ascorbic acid (at concentrations indicated in the Results section).

#### *2.5 C6 glioma cells*

A rat glioblastoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Late passage cells (i.e., after at least 100 passages) were seeded in 24-well plates at densities of  $10^4$  cells/well and cultured in DMEM (pH 7.4) supplemented with 5% FCS, 2.5 mg/mL amphotericin B and 100 U/L gentamicin in 5%  $\text{CO}_2$ /95% air at 37 °C (de Souza et al., 2009). After the cells reached confluence, the culture medium was

replaced by DMEM without serum in the absence or presence of apomorphine, haloperidol, risperidone, N-acetylcysteine (NAC), glutathione monoethylester (GSH), and/or ascorbic acid (at concentrations indicated in the Results section).

### *2.6 ELISA for S100B*

The S100B concentration was measured as described previously (Leite et al., 2008). Briefly, 50  $\mu$ L of sample plus 50  $\mu$ L of Tris buffer were incubated for 2 h in a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min, and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

### *2.7 MTT reduction assay*

Viability was assayed via the colorimetric MTT method (Hansen et al., 1989). Briefly, the cells and slices were incubated with 0.5 mg/mL MTT followed by incubation in 5%CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C and then at 30°C for 30 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance values were measured at 560 and 630 nm. The results are expressed as a percentage of the control.

### *2.8 Lactate dehydrogenase (LDH) release*

LDH activity in the incubation medium was determined by a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil) according to the manufacturer's instructions.

### *2.9 Statistical analysis*

Data are reported as the mean  $\pm$  SEM and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test or by Student's t test when indicated in SPSS-16.0. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

A curve of the effect of apomorphine from 1 to 100  $\mu\text{M}$  on S100B release is shown in Fig. 1A. We found that apomorphine at 100  $\mu\text{M}$  was able to decrease S100B release in acute hippocampal slices. A decreasing trend was observed with apomorphine at 10  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.10$ ). Two assays were performed in parallel to evaluate cell integrity and viability: LDH release (data not shown) and MTT reduction (Fig. 1B), respectively; these results allow S100B release to be referred to more appropriately as S100B secretion.

At 100  $\mu\text{M}$  apomorphine was also able to reduce S100B secretion by primary astrocytes and C6 glioma cells (Fig. 2). In astrocyte cultures, this effect was observed at 1 h and 24 h after apomorphine addition (Fig. 2A and 2B, respectively). Unfortunately, in our C6 cell preparations, we only found measurable extracellular levels of S100B at 24 h (Fig. 2B).

The effects of antipsychotics on S100B secretion were evaluated in acute hippocampal slices (Fig. 3A). At 10  $\mu\text{M}$ , neither haloperidol nor risperidone were able to alter basal S100B secretion *per se*. However, in the presence of apomorphine (at 100  $\mu\text{M}$ ), risperidone (but not haloperidol) increased S100B secretion when compared to risperidone alone, but the level was not different from basal S100B secretion. The effects of the antipsychotics were also investigated in astrocyte and C6 cell cultures (Fig. 3B). In primary astrocytes, no effect of either haloperidol or risperidone was observed on S100B secretion at 24 h. However, haloperidol (but not risperidone) decreased S100B secretion at 1 h (data not shown;  $p = 0.02$ ). Conversely, risperidone (but not haloperidol) was able to induce an increase of S100B secretion in C6 cell cultures.

To investigate whether the S100B decrease induced by apomorphine was related to its ability to counteract oxidative stress, we investigated this effect in acute hippocampal slices treated with other antioxidant compounds: glutathione (GSH), N-acetyl-cysteine (NAC) and ascorbic acid (AA) (Fig. 4A). Interestingly, GSH (but not NAC or AA) induced an increase in S100B

secretion. However, all of the compounds (in the presence of 100  $\mu$ M apomorphine) were able to restore basal levels of S100B secretion. Moreover, because some antipsychotics appear to block certain oxidative stress signals, we performed co-incubations of the antipsychotics with glutathione (Fig. 4B). Haloperidol switched off GSH-induced S100B secretion, but Risperidone had no effect.

#### **4. Discussion**

Apomorphine is able to activate both D1- and D2-like receptors. These receptors apparently have opposing effects on signaling molecules such as cAMP (i.e., D1 activation increases cAMP while D2 decreases cAMP). An electrophysiological study on cortical slices suggested that D1 and D2 are activated at dopamine concentrations higher than 0.5  $\mu$ M, and that D2 activation overrides D1 activation (Trantham-Davidson et al., 2004). Moreover, D2 receptors are strongly expressed in astrocytes (Khan et al., 2001). Therefore, astrocytes could be important targets of D2 antagonists and typical antipsychotics, and they may be involved in the pathogenesis of schizophrenia.

Here we found that apomorphine at 100  $\mu$ M was able to reduce S100B secretion in hippocampal slices, primary cortical astrocytes and C6 glioma cells. Assuming that D2 receptors in astrocytes of these preparations are negatively coupled to adenylyl cyclase, a decrease in S100B secretion would be an expected result. Other results with forskolin, fluoxetine and serotonin suggest a connection between cAMP and S100B secretion (Goncalves et al., 2002, Tramontina et al., 2008).

In schizophrenic patients, dopaminergic hyperactivation has been proposed to underlie the exacerbation of positive symptoms, which is where typical antipsychotics are most effective. Therefore, ignoring the effects of other S100B secretagogues on astrocytes, a decrease of S100B secretion would be expected from these cells in schizophrenic patients. Conversely, increased serum S100B has been observed in schizophrenic patients in multiple studies (Lara

et al., 2001, Rothermundt et al., 2004, Schroeter et al., 2009). However, it remains unclear whether elevated serum S100B specifically reflects astroglial activation. In fact, extra-cerebral sources can contribute to serum S100B, particularly adipocytes (Goncalves et al., 2010). Moreover, recent findings strongly suggest that S100B levels in the blood correlate with adipose tissue in normal individuals (Steiner et al., 2010a) and with insulin resistance in schizophrenic patients (Steiner et al., 2010c). Our data therefore suggest that the serum S100B elevation observed in schizophrenic patients is not necessarily due to astroglial activation by dopaminergic hyperactivation. Other cell sources of S100B and/or other S100B secretagogues must be involved in that elevation.

Moreover, the effect of antipsychotics on peripheral S100B in schizophrenic patients is also a matter of controversy. In fact, clinical studies have shown both increases (Qi et al., 2009, Schmitt et al., 2005, Schroeter et al., 2003, Wiesmann et al., 1999) and decreases (Gattaz et al., 2000, Ling et al., 2007, Steiner et al., 2009) of blood S100B that could be related to antipsychotic medication. Two previous studies addressed this question by investigating the *in vitro* effect of antipsychotics on S100B secretion in glial cells. C6 glioma cells treated with risperidone (10-40  $\mu\text{M}$ ) exhibited an increase of S100B secretion (Quincozes-Santos et al., 2008), whereas C6 glioma cells and oligodendrocytic OLN-93 cells treated with haloperidol (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or clozapine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) exhibited a decrease in S100B secretion (Steiner et al., 2010b). This apparent discrepancy could be due to differences in multiple conditions (drugs, concentrations, serum-containing medium, cell types and metabolic conditions). Under our conditions, neither haloperidol nor risperidone (both at 10  $\mu\text{M}$ ) affected basal S100B secretion in two investigated preparations, hippocampal slices (1 h) and cortical astrocyte cultures (24 h), but we observed an increase in S100B secretion (24 h) in C6 glioma cells treated with risperidone. Interestingly, a transitory decrease of S100B secretion (1 h) was observed in astrocyte cultures exposed to haloperidol. Although C6 cells and astrocytes have

been assumed indistinctly to be astroglial cells, many discrepancies between them have been observed [e.g., (Nardin et al., 2007)], and these could partially explain our results. For instance, concerning dopaminergic communication, dopamine stimulation is able to up-regulate glutathione in astrocytes but not in C6 glioma cells (Han et al., 1996).

It is quite difficult to project our *in vitro* S100B secretion results with astrocyte preparations and brain slices onto the changes in peripheral S100B that occur in schizophrenic patients under long-term medication. However, based on our results in hippocampal slices exposed to apomorphine, it is possible to speculate that antipsychotics help to normalize S100B secretion by astrocytes. However, it is not clear whether this is mediated by dopamine or another neurotransmitter receptor.

Due to the protective effect of antipsychotic medications against oxidative stress, we decided to investigate the effect of classical antioxidants (NAC, glutathione and ascorbic acid) on the S100B secretion decrease induced by apomorphine in hippocampal slices. All of the antioxidants were able to normalize S100B secretion, but glutathione was also able to induce an increase of S100B secretion. This aspect is very interesting because glutathione is not only a free radical scavenger but is also exported by astrocytes. This compound has extracellular activity on some ion channels and G protein-coupled receptors (Wang et al., 2006), and this could directly or indirectly modulate S100B secretion, the mechanism of which remains unknown (Donato et al., 2009). Note that haloperidol, but not risperidone, somehow affected this glutathione-induced S100B secretion. This reinforces the idea that typical antipsychotics such as haloperidol might aggravate the oxidative stress observed in schizophrenic patients (Ng et al., 2008, Pillai et al., 2007). Nevertheless, our data support the idea that antioxidant therapy is useful for preventing some neurochemical alterations in schizophrenia, particularly astroglial S100B secretion, even taking into account all of the limitations of this *in vitro* study associated with using apomorphine to induce dopaminergic hyperactivation.



### *Conclusions*

Our data on astroglial S100B secretion were analyzed in light of the potential use of S100B as a marker of astroglial activation in psychiatric disorders, particularly schizophrenia. However, the serum S100B elevation observed in schizophrenic patients does not fit with the *in vitro* decrease of S100B secretion we observed in hippocampal slices, cortical astrocytes and C6 glioma cells treated with apomorphine, which mimics dopaminergic hyperactivation. This decrease of S100B secretion can be explained by the stimulation of D2 receptors negatively coupled to adenylyl cyclase. Antipsychotic medication and antioxidant supplementation were able to prevent the decline in S100B secretion. This reinforces the benefits of antioxidant therapy in psychiatric disorders. Moreover, our data suggest that more caution should be exercised when interpreting changes in peripheral S100B levels as a sign of astroglial activation, particularly considering the extra-cerebral sources of this protein.

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

## Figure legends

**Figure 1. *S100B secretion is negatively modulated by apomorphine in acute hippocampal slices.*** In A, S100B was released from hippocampal slices incubated with apomorphine (at indicated concentrations) for 60 min. S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from respective basal S100B secretion, taken as 100% (one-way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ). In B, an MTT reduction assay in hippocampal slices incubated with apomorphine (at the indicated concentrations) for 60 min. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate.

**Figure 2. *Apomorphine decreases S100B secretion in astrocytes and C6 glioma cells.*** S100B secretion at 1 h (in panel A) and 24 h (in panel B) in primary astrocyte cultures (open bars) and in C6 glioma cells (grey bars) incubated in serum-free medium containing 100  $\mu$ M apomorphine. S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from respective basal S100B secretion (without apomorphine) (Student's t test;  $p < 0.05$ ). ND (not detected) means that neither basal nor apomorphine-modulated S100B secretion was detected at 1 h in C6 cell preparations.

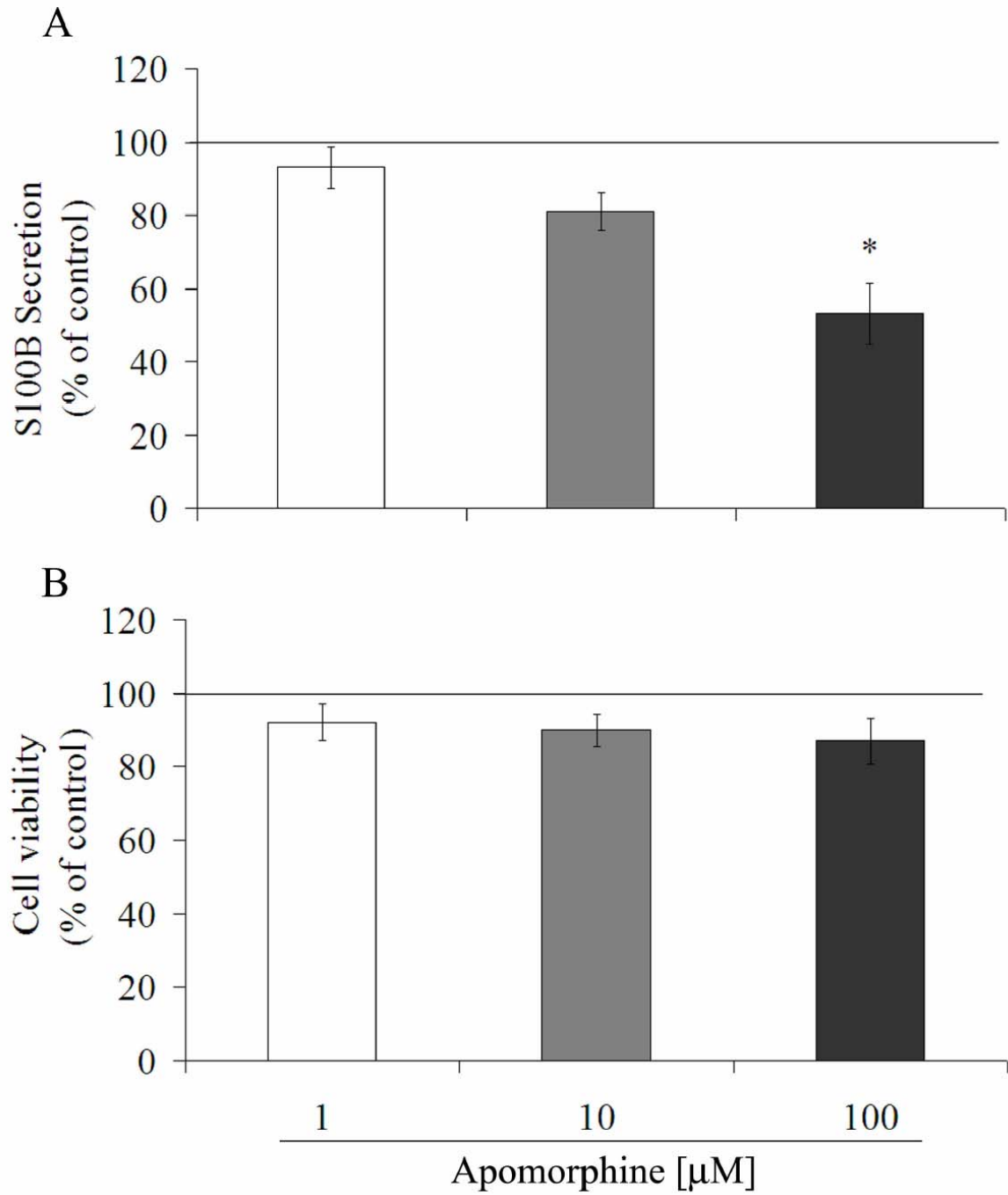
**Figure 3. *Antipsychotics prevent the apomorphine-induced decrease of S100B secretion.*** In A, S100B secretion at 1 h in acute hippocampal slices in the presence or absence of apomorphine (at 100  $\mu$ M) and exposed to antipsychotics (haloperidol or risperidone at 10  $\mu$ M). S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate. # Significant difference between risperidone groups in the presence and absence of apomorphine (one-way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ). However, none of the antipsychotics differed from basal secretion. In B, primary astrocyte cultures (open bars) or C6 glioma cells (grey bars) incubated in serum-free

medium containing haloperidol or risperidone at 10  $\mu$ M. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate. Extracellular S100B at 24 h was measured by ELISA \* Significantly different from respective basal S100B secretion (Student's t test;  $p < 0.05$ ).

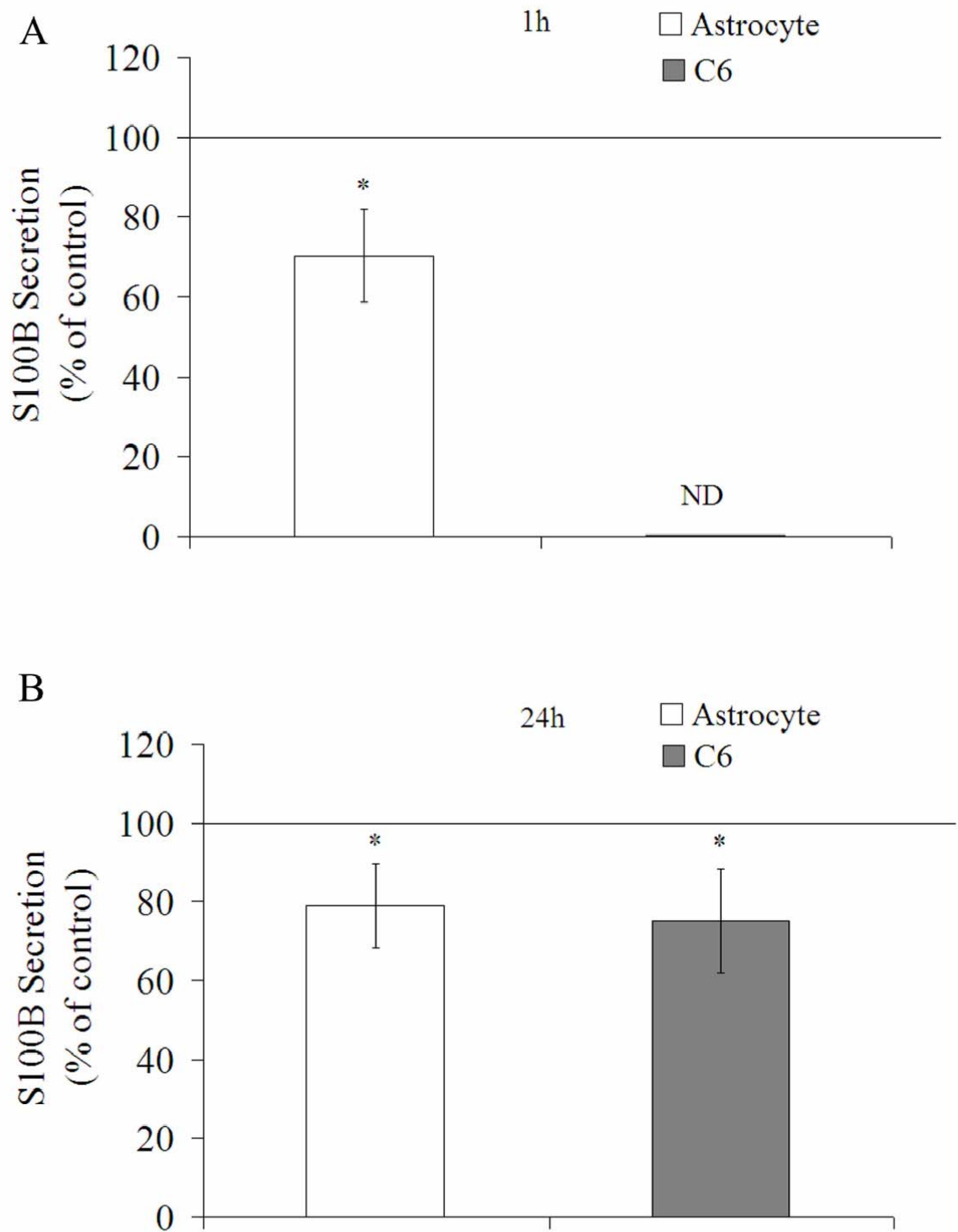
**Figure 4 Antioxidants also prevent the apomorphine-induced decrease of S100B secretion.**

In A, S100B secretion at 1 h in acute hippocampal slices in the presence or absence of apomorphine (at 100  $\mu$ M) and exposed to antioxidants (NAC, N-acetyl-cysteine; GSH, glutathione monoethylester; or AA, ascorbic acid, all at 100  $\mu$ M). Extracellular S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate. \*Significantly different from basal S100B secretion (one-way ANOVA followed by Duncan's test;  $p < 0.05$ ). In B, S100B secretion at 1 h in acute hippocampal slices in the presence of GSH (at 100  $\mu$ M) and haloperidol or risperidone (at 10  $\mu$ M). Extracellular S100B was measured by ELISA. Each value is the mean ( $\pm$  standard error) of six independent experiments performed in triplicate. \*Significantly different from basal S100B secretion (Student's t test;  $p < 0.05$ ).

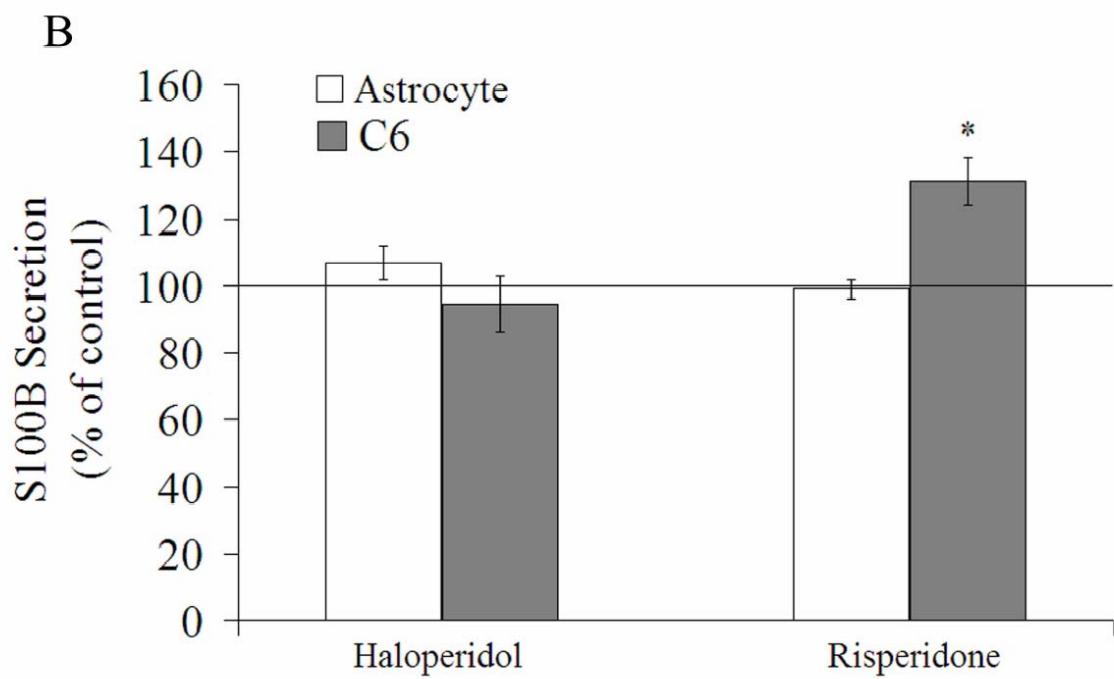
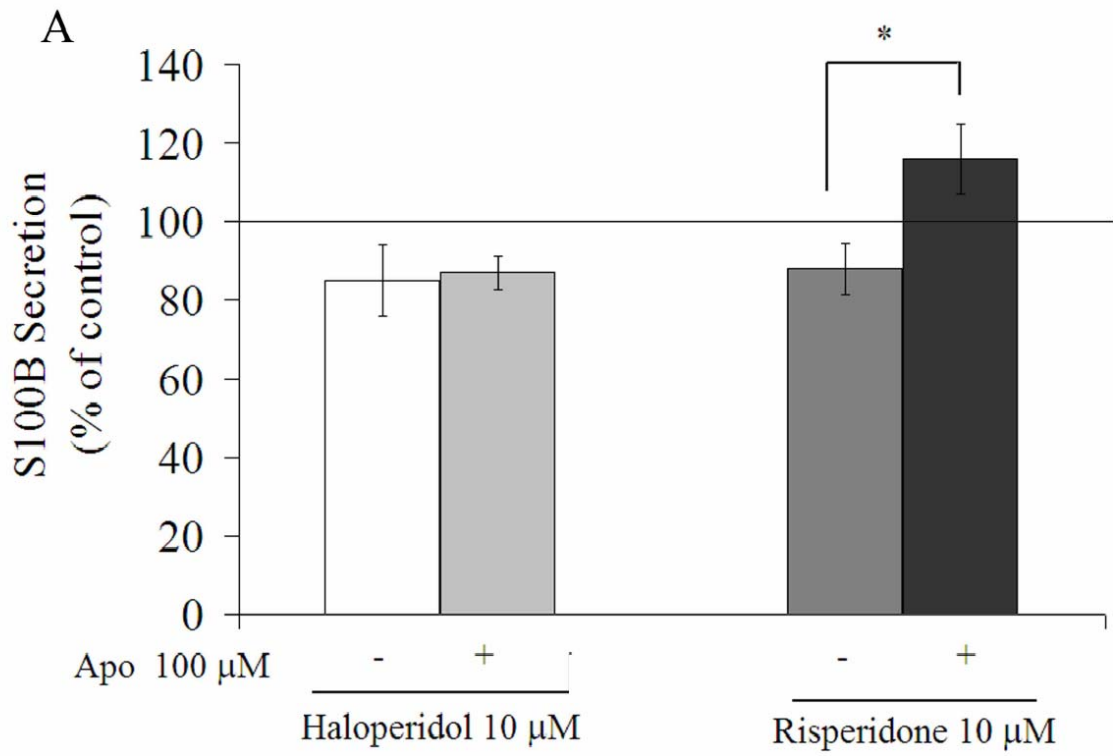
**Figure 1**



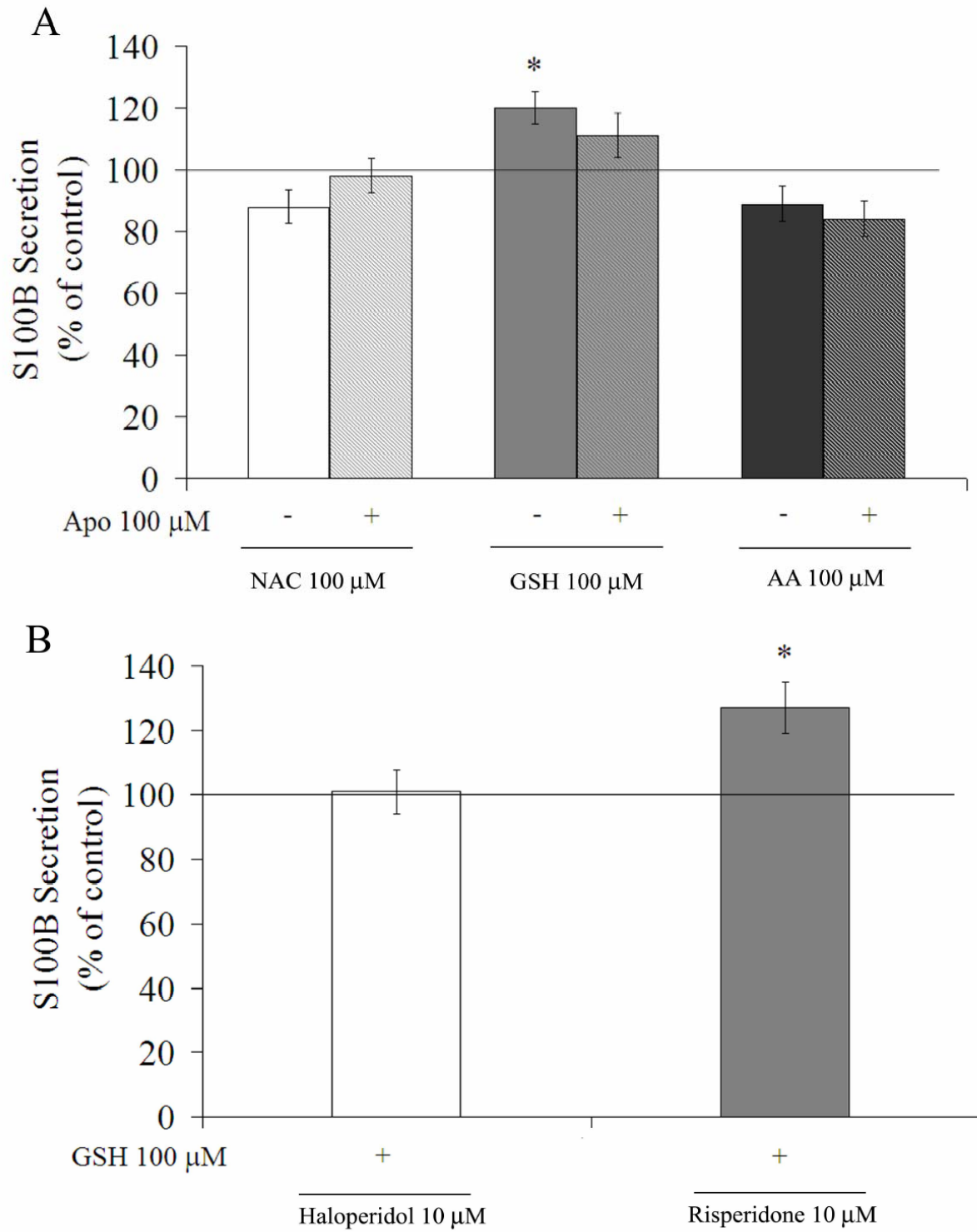
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



## References

- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2007;41:523-9.
- De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci.* 2008;267:3-16.
- de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, et al. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol.* 2009;206:52-7.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793:1008-22.
- Gattaz WF, Lara DR, Elkis H, Portela LV, Goncalves CA, Tort AB, et al. Decreased S100-beta protein in schizophrenia: preliminary evidence. *Schizophr Res.* 2000;43:91-5.
- Goncalves CA, Leite MC, Guerra MC. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010:790431.
- Goncalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 2008;41:755-63.
- Goncalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E, et al. High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport.* 2002;13:1533-5.
- Gottfried C, Cechin SR, Gonzalez MA, Vaccaro TS, Rodnight R. The influence of the extracellular matrix on the morphology and intracellular pH of cultured astrocytes exposed to media lacking bicarbonate. *Neuroscience.* 2003;121:553-62.
- Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol.* 2007;78:1-39.



Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem.* 1996;66:501-10.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989;119:203-10.

Hara H, Ohta M, Adachi T. Apomorphine protects against 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway. *J Neurosci Res.* 2006;84:860-6.

Hertz L, Schousboe I, Schousboe A. Receptor expression in primary cultures of neurons or astrocytes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1984;8:521-7.

Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, Goldman-Rakic PS. An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1964-9.

Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, et al. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res.* 2001;35:11-4.

Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 2008;169:93-9.

Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, et al. Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res.* 2009;87:2439-46.

Ling SH, Tang YL, Jiang F, Wiste A, Guo SS, Weng YZ, et al. Plasma S-100B protein in Chinese patients with schizophrenia: comparison with healthy controls and effect of antipsychotics treatment. *J Psychiatr Res.* 2007;41:36-42.

Mitchell ES, Neumaier JF. 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist reversal of emotional learning and prepulse inhibition deficits induced by apomorphine or scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;88:291-8.

Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, et al. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. *Neurochem Res.* 2009;34:1603-11.

Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, et al. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int.* 2007;50:774-82.

Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11:851-76.

Pillai A, Parikh V, Terry AV, Jr., Mahadik SP. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res.* 2007;41:372-86.

Qi LY, Xiu MH, Chen da C, Wang F, Kosten TA, Kosten TR, et al. Increased serum S100B levels in chronic schizophrenic patients on long-term clozapine or typical antipsychotics. *Neurosci Lett.* 2009;462:113-7.

Quincozes-Santos A, Abib RT, Leite MC, Bobermin D, Bambini-Junior V, Goncalves CA, et al. Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;314:59-63.

Roh K, Roh S, Yang BH, Lee JS, Chai YG, Choi MR, et al. Effects of haloperidol and risperidone on the expression of heat shock protein 70 in MK-801-treated rat C6 glioma cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32:1793-7.

- Rothermundt M, Ponath G, Arolt V. S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol.* 2004;59:445-70.
- Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S, et al. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci.* 2008;28:10928-36.
- Schmitt A, Bertsch T, Henning U, Tost H, Klimke A, Henn FA, et al. Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr Res.* 2005;80:305-13.
- Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Fruhauf S, Hohne R, Schick G, Diefenbacher A, et al. Serum S100B is increased during early treatment with antipsychotics and in deficit schizophrenia. *Schizophr Res.* 2003;62:231-6.
- Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Krebs M, Diefenbacher A, Blasig IE. Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia--original research and meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2009;167:66-72.
- Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, et al. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci.* 2007;8:2.
- Steiner J, Schiltz K, Walter M, Wunderlich MT, Keilhoff G, Brisch R, et al. S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. *Psychoneuroendocrinology.* 2010a;35:321-4.
- Steiner J, Schroeter ML, Schiltz K, Bernstein HG, Muller UJ, Richter-Landsberg C, et al. Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. *Neuroscience.* 2010b;167:1025-31.
- Steiner J, Walter M, Guest P, Myint AM, Schiltz K, Panteli B, et al. Elevated S100B levels in schizophrenia are associated with insulin resistance. *Mol Psychiatry.* 2010c;15:3-4.

Steiner J, Walter M, Wunderlich MT, Bernstein HG, Panteli B, Brauner M, et al. A new pathophysiological aspect of S100B in schizophrenia: potential regulation of S100B by its scavenger soluble RAGE. *Biol Psychiatry*. 2009;65:1107-10.

Swerdlow NR, Braff DL, Taaid N, Geyer MA. Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51:139-54.

Tramontina AC, Tramontina F, Bobermin LD, Zanotto C, Souza DF, Leite MC, et al. Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32:1580-3.

Trantham-Davidson H, Neely LC, Lavin A, Seamans JK. Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2004;24:10652-9.

Wang M, Yao Y, Kuang D, Hampson DR. Activation of family C G-protein-coupled receptors by the tripeptide glutathione. *J Biol Chem*. 2006;281:8864-70.

Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt V, et al. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 1999;45:1508-11.

## 4. DISCUSSÃO

Um número crescente de pesquisas tem buscado o desenvolvimento e a otimização de modelos experimentais adequados que levam a implementação de protocolos válidos para o estudo de atividades cerebrais normais e/ ou patológicas.

Muitas pesquisas fazem uso de modelos *in vitro* (cultura ou linhagem de neurônios ou células gliais isoladas) para avaliar funções específicas destas células. Muitos trabalhos recentes do nosso grupo demonstraram o estudo da expressão e/ou da secreção da proteína S100B em modelos *in vitro* (Quincozes-Santos et al. 2010, Leite et al. 2009, de Souza et al. 2009, Abib et al. 2008). Entretanto, as preparações *in vitro* com células isoladas tornam-se inviáveis para a avaliação da secreção de S100B quando se visa avaliar as interações celulares como ocorre *in vivo*, entretanto, oferecem outras vantagens como, por exemplo, o preciso controle do ambiente extracelular.

Neste trabalho, a nossa hipótese é que a secreção de S100B também pode ser avaliada em um modelo *ex vivo* de fatias hipocâmpais frescas complementando ou, muitas vezes, sobrepondo-se a outros modelos.

Fatias frescas, particularmente, fatias hipocâmpais têm sido amplamente utilizadas para estudos farmacológicos e para investigar parâmetros bioquímicos e eletrofisiológicos (Gong et al. 2001) devido a: (1) circuitaria neuronal parcialmente preservada (Lipton, 1985), (2) interação neurônio-glia que permite a investigação de mecanismos de sinalização específicos (Nagy & Li 2000); e (3) um adequado controle do meio extracelular (Li & Mc 1957, Sajikumar *et al.* 2005).

Além disso, estas preparações também estão sendo utilizadas para estudar alguns parâmetros de atividade astrocítica como, fosforilação de proteínas (Leal *et al.* 1997, Gong et al. 2001), captação de glutamato (Thomazi *et al.* 2004) e secreção da proteína S100B

(Buyukuysal 2005). Alguns estudos morfológicos confirmam a integridade de um grande número de terminais sinápticos em fatias hipocâmpais frescas (Lipton, 1985) acompanhados por um “inchaço” dos processos gliais (Aitken et al. 1995) como também, sugerem a presença de junções *gap* (Nagy & Li 2000).

O período de estabilização ou equilibração, que corresponde à recuperação metabólica das fatias frescas, comumente varia de 15 a 120 minutos, dependendo da técnica experimental utilizada. No nosso caso, foi utilizado um protocolo para estabilização com múltiplas trocas de meio para eliminar a liberação de S100B extracelular resultante da permeabilidade alterada da membrana. A troca do meio foi realizada a cada 15 minutos durante 2 horas a temperatura de 25°C. Além disso, nós utilizamos um meio tamponado com HEPES previamente aerado com O<sub>2</sub> e a incubação das fatias para a secreção de S100B foi realizada a 30°C.

Sob estas condições de equilibração, a S100B extracelular diminuiu significativamente durante a primeira hora e atingiu um platô a partir dos 75 minutos em diante (quinta troca de meio) (Capítulo I, Figura 1A, p. 23) Entretanto, foi padronizado, em virtude de outros parâmetros analisados (integridade e viabilidade metabólica das fatias hipocâmpais) que a secreção de S100B seria analisada após 120 minutos de equilibração.

Analisando a viabilidade das fatias hipocâmpais através da atividade da lactato desidrogenase (LDH) (Capítulo I, Figura 1B e 4A, p. 23 e 24) e do conteúdo da enolase neurônio-específica (NSE) (Capítulo I, Figura 4B, p. 24) há indicação de uma perda significativa da integridade celular durante as duas primeiras horas, mas nenhuma perda adicional ocorreu durante as próximas três horas. Além disso, nenhuma alteração foi observada no conteúdo de proteína fibrilar glial ácida (GFAP) (dados não mostrados), possivelmente devido ao caráter insolúvel desta proteína e/ou da insensibilidade metodológica para detectar pequenas variações. O ensaio de exclusão do azul de Trypan também indicou

uma diminuição na integridade celular em 5 horas de incubação (Capítulo I, Figura 4C, p. 24). É importante mencionar que o ensaio do azul de Trypan foi realizado com células dissociadas de fatias hipocâmpais frescas indicando uma susceptibilidade à injúria mecânica causada pela dissociação celular, diferente, portanto, de células aderentes no tecido. Então, em 5 horas de incubação, as células das fatias hipocâmpais não são mais permeáveis ao azul de Trypan, mas, provavelmente, são mais susceptíveis à injúria mecânica.

Em relação à integridade metabólica de fatias cerebrais, os níveis de fosfocreatina e ATP são aproximadamente 50% daqueles do cérebro intacto (Lipton, 1985, Aitken *et al.* 1995). A diminuição dos níveis de fosfatos de alta energia, assim como o aumento nos níveis de lactato, podem ser atenuados pela baixa temperatura durante a preparação das fatias agudas. Além disso, o consumo de O<sub>2</sub> diminuiu a 30%, indicando uma adaptação ao metabolismo anaeróbico. Curiosamente, o conteúdo de ATP em fatias frescas é aparentemente o mesmo, tanto em meio com HEPES como em meio tamponado com bicarbonato (Whittingham *et al.* 1984, Robertson *et al.* 2005).

No conceito atual sobre metabolismo energético cerebral, os astrócitos metabolizam a glicose a lactato e, então, o lactato é transportado aos neurônios e oxidado aerobicamente para manutenção da atividade neuronal (Tsacopoulos & Magistretti 1996, Pellerin & Magistretti 2004). Baseado no ensaio do lactato extracelular (Capítulo I, Figura 5A, p. 25) é possível observar uma variação energética significativa durante as primeiras horas e uma recuperação de 1 hora em diante. O significado exato destas mudanças é incerto, pois envolve a produção, liberação, captação e consumo do lactato em diferentes tipos celulares. Entretanto, sabe-se da importância do lactato glial como o principal substrato energético para os neurônios durante o período de estabilização para a recuperação metabólica das fatias cerebrais (Schurr *et al.* 1997).

Nas medidas de captação de glutamato (Capítulo I, Figura 6A, p. 25) e conteúdo de glutatona (GSH) (Capítulo I, Figura 6B, p. 25) é possível especular que astrócitos funcionam ativamente nestas preparações e, que, de acordo com as medidas de lactato extracelular, tem-se uma menor atividade metabólica durante a primeira hora *ex vivo*.

Várias substâncias envolvidas na secreção da proteína S100B em culturas astrogliais já foram descritas, entretanto, o mecanismo de secreção ainda permanece desconhecido.

Além de caracterizar e padronizar a secreção de S100B em fatias frescas hipocâmpais, nosso objetivo foi investigar como a composição iônica do meio extracelular afeta a secreção de S100B nestas fatias.

O bloqueio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  com cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) – bloqueador inespecífico dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (Agrawal *et al.* 2000) ou verapamil – bloqueador dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de alta voltagem (tipos L, P/Q e N) (Oka *et al.* 2003) causou uma diminuição de 50% e 15%, respectivamente, na secreção basal de S100B em 1 hora (Capítulo I, Figura 2B, p. 23). Adicionalmente, poucos estudos demonstraram que a ativação de receptor e a despolarização poderiam induzir a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios (Williams *et al.* 1992) e em células gliais (Gottfried *et al.* 1999).

Em células gliais, o  $\text{Ca}^{2+}$  que entra através da membrana plasmática por meio de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  é destinado principalmente para o reabastecimento de estoques internos como, o retículo endoplasmático (RE). Então, o reabastecimento do RE com  $\text{Ca}^{2+}$  requer  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esse reabastecimento é bastante lento e pode ser necessário de 1 a 2 minutos. Além disso, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem em células gliais, em contraste a neurônios, tendem a diminuir durante o desenvolvimento (Verkhatsky *et al.*, 2002). Portanto, alvos moleculares diferentes destes bloqueadores poderiam ajudar a explicar suas diferenças de atividade na secreção de S100B basal.



Observações prévias de fatias frescas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  ou na exposição a 1 mM de EGTA (dados não demonstrados) causou um significativo aumento na secreção de S100B corroborando com observações prévias em fatias cerebrais (Shashoua *et al.* 1984, Buyukuysal 2005). Estes dados sugerem uma modulação complexa da secreção de S100B envolvendo mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular bem como, a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para reabastecimento dos estoques internos.

A remoção do  $\text{Mg}^{2+}$  do meio tem sido utilizada para remover o bloqueio do  $\text{Mg}^{2+}$  dos receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato) induzindo modelo de convulsão em fatias cerebrais (Anderson *et al.* 1986, Tancredi *et al.* 1990). A secreção de S100B não foi alterada no meio sem  $\text{Mg}^{2+}$  (Capítulo I, Figura 2C, p. 23) sugerindo que a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através de receptores NMDA não está envolvida no mecanismo de secreção da S100B. De acordo com isto, NMDA (ou outro agonista de receptor ionotrópico de glutamato) não afeta a secreção de S100B em cultura de astrócitos (Tramontina *et al.* 2006a). Em adição, aparentemente, receptores NMDA astrocíticos não são afetados por  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular. Astrócitos, sendo células excitáveis não-eletricamente, não têm a obrigatoriedade de despolarizações substanciais que são necessárias para liberar o bloqueio do  $\text{Mg}^{2+}$  nos receptores NMDA como em neurônios (Lalo *et al.* 2006).

Houve um aumento na secreção de S100B em fatias hipocâmpais expostas a 0,2 mM de cloreto de potássio (KCl) (Capítulo I, Figura 3A, p. 24). Uma diminuição de  $\text{K}^+$  extracelular (<1 mM) poderia causar um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em cultura de astrócitos (Dallwig *et al.* 2000). Resultados recentes mostram que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser através de canais de  $\text{K}^+$  do tipo Kir4.1 e parecem mediar oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos em condições de baixo  $\text{K}^+$  extracelular *in vitro* e *in situ* (Hartel *et al.* 2007). A perda da seletividade iônica é uma propriedade conhecida de canais de  $\text{K}^+$  quando o íon nativo é bastante reduzido ou removido do meio extracelular (Yellen 2002).

Além disso, em fatias hipocampais, a maioria das células positivas para S100B, ao contrário de neurônios, respondem com elevações no  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico quando expostas a baixas concentrações de  $\text{K}^+$  (Dallwig & Deitmer 2002). Estes dados, novamente reforçam a idéia que a liberação da S100B é conseqüente a um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Quando fatias foram expostas a altas concentrações de  $\text{K}^+$ , entretanto, foi observada uma diminuição na secreção de S100B (Capítulo I, Figura 3A, p. 24). É notável que enquanto astrócitos são despolarizados por aumento do  $\text{K}^+$  externo, este tipo de estimulação não induz um aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ou liberação de glutamato destas células (Verkhratsky *et al.*, 2002, Carmignoto *et al.* 1998). O mecanismo responsável por esta diminuição da secreção de S100B poderia ser mediado por um fator neuronal não-determinado liberado durante despolarização com alto  $\text{K}^+$  tais como, um neurotransmissor. Sabe-se que a elevação de glutamato extracelular, em cultura de astrócitos (Goncalves *et al.* 2002) e fatias hipocampais (Buyukuysal 2005), diminui a secreção de S100B. Entretanto, o envolvimento da despolarização neuronal está excluído baseado no fato que a ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (Capítulo I, Figura 3B, p. 24), necessário para a despolarização neuronal, não impede a diminuição da secreção de S100B quando comparado à secreção basal.

Independente do mediador envolvido neste efeito, estes perfis contrastantes de secreção de S100B em resposta ao  $\text{K}^+$  sugerem dois tipos diferentes de regulação da secreção de S100B, um positivo por baixo  $\text{K}^+$  possivelmente envolvendo ou a mobilização de estoques internos de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos (Verkhratsky *et al.*, 2002) ou um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos através de canais de  $\text{K}^+$  que, neste caso, alteram a seletividade iônica (Hartel *et al.* 2007) e outro negativo, por alto  $\text{K}^+$  possivelmente secundário ao influxo de  $\text{K}^+$  em astrócitos, que são responsáveis pela captação e tamponamento sob estas condições (Wang & Bordey 2008).

Nossos dados sugerem que, sob as condições anteriormente descritas, a secreção de S100B (e outros parâmetros de atividade astrogliar) podem ser avaliados em fatias

hipocampais frescas. Esta técnica, assim como outras já descritas (Shashoua et al. 1984, Buyukuysal 2005) permitem que dados sobre a secreção de S100B sejam obtidos do tecido cerebral *ex-vivo*, o que pode ser extremamente útil para o estudo da atividade astrogliar, em adição a outros parâmetros bioquímicos atualmente investigados nestas preparações tais como, fosforilação da GFAP (Leal et al. 1997), captação de glutamato (Thomazi et al. 2004) e atividade da glutamina sintetase (Feoli *et al.* 2006).

Fatias hipocampais frescas exibem uma circuitaria neuronal parcialmente preservada e uma rede funcional de astrócitos (Nagy & Li 2000). A secreção de S100B nestas preparações aparentemente preserva algumas características observadas em astrócitos cultivados (Shashoua et al. 1984, Buyukuysal 2005, Goncalves et al. 2002, Pinto et al. 2000). Portanto, estas fatias podem ser usadas para estudos complementares de secreção de S100B em cultura e, algumas vezes, sobrepor-se às limitações encontradas em culturas gliais isoladas. Além disso, este estudo sugere que a exposição de fatias hipocampais a alto ou baixo  $K^+$  poderia ser usada como um ensaio para avaliar a atividade astrocítica pela secreção de S100B: positivamente regulada por baixo  $K^+$  e negativamente regulada por alto  $K^+$ .

Considerando que: 1) a presença de baixo  $K^+$  extracelular ( $< 1$  mM) leva a um aumento na secreção de S100B em consequência a um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular em astrócitos de fatias hipocampais (Verkhatsky *et al.*, 2002), 2) dados da literatura mostram que esta resposta de aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular pode ser bloqueada por cátions divalentes como,  $Ba^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ou  $Zn^{2+}$  (Zanotti & Charles 1997) e 3) sabendo-se que o íon zinco ( $Zn^{2+}$ ) modula a atividade de canais iônicos como os canais de  $Ca^{2+}$  modulados pelas reservas de  $Ca^{2+}$  (SOCC), nos perguntamos como o  $Zn^{2+}$  modularia a secreção de S100B inclusive sob duas condições específicas associadas com o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular em astrócitos.

O  $Zn^{2+}$  liberado nas sinapses juntamente com o glutamato interage com várias proteínas alvo modulando a plasticidade sináptica. Neste caso, o  $Zn^{2+}$  pode agir como um modulador da neurotransmissão inibitória e excitatória por inibir receptores  $GABA_A$ , receptores NMDA pós-sinápticos, bem como, transportadores de glutamato e GABA (Smart *et al.* 2004, Cohen-Kfir *et al.* 2005, Kay 2006). Além disso, o  $Zn^{2+}$  seria capaz de interferir na secreção e/ou atividade de citocinas inflamatórias como, a  $IL-1\beta$ . Em condições patológicas tais como, isquemia, convulsões e lesões traumáticas cerebrais, a quantidade de  $Zn^{2+}$  liberado é capaz de prejudicar a atividade cerebral (Bitanhirwe & Cunningham 2009). Sob estas condições, a S100B extracelular é considerada um marcador de injúria e ativação astrogliar (Goncalves *et al.* 2008). Neste aspecto, o  $Zn^{2+}$  foi o íon escolhido para dar continuidade à investigação de como a composição iônica do meio extracelular afeta a secreção de S100B em fatias hipocampais frescas já que há pouca informação sobre o  $Zn^{2+}$  afetando a secreção desta proteína.

Estudos prévios mencionaram que a concentração do  $Zn^{2+}$  na fenda sináptica pode atingir 0,3 mM (Frederickson *et al.* 2005). Entretanto, estes níveis elevados poderiam estar superestimados (Kay 2006), apesar de que níveis elevados de  $Zn^{2+}$  foram caracterizados em várias condições patológicas incluindo acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia e doenças degenerativas como, doença de Alzheimer (Bitanhirwe & Cunningham 2009). De fato, níveis elevados de  $Zn^{2+}$  como 0,1 mM são capazes de inibir a captação de glutamato dependente de ATP em astrócitos corticais de camundongos através de um mecanismo envolvendo a poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1) levando a subsequente depleção de ATP comprometendo, desta forma, a captação de glutamato e a sobrevivência neuronal (Suh *et al.* 2007).

Nós demonstramos que  $Zn^{2+}$  de 1 a 300  $\mu M$  inibiu a secreção de S100B (Capítulo II, Figura 1A, p. 43). mas 100 e 300  $\mu M$  de  $Zn^{2+}$  prejudicou a viabilidade celular em fatias

hipocampais conforme o ensaio de redução do MTT (Capítulo II, Figura 1B, p. 43). Além disso, o  $Zn^{2+}$  em concentrações de 1 a 10  $\mu M$  seria capaz de modular a permeabilidade iônica e alterar a resposta astrocítica (Kresse *et al.* 2005) e níveis elevados ( $> 100 \mu M$ ) poderiam induzir a resposta oposta em hemicanais (Chappell *et al.* 2003). Ao observar que o  $Zn^{2+}$  foi capaz de inibir a secreção basal de S100B, nós investigamos se TPEN ou DTT foram capazes de prevenir este efeito. TPEN é um quelante com alta afinidade por  $Zn^{2+}$  e foi capaz, *per se*, de estimular a secreção basal de S100B talvez quelando algum  $Zn^{2+}$  endógeno envolvido na inibição da secreção de S100B. Além disso, o DTT também foi capaz de estimular a secreção de S100B sugerindo um envolvimento de resíduos de cisteína na inibição da secreção de S100B mediada por  $Zn^{2+}$ . Entretanto, o efeito *per se* sobre a secreção de S100B destes compostos, torna difícil a interpretação se o TPEN e o DTT realmente preveniram o efeito inibitório do  $Zn^{2+}$  (Capítulo II, Figura 2, p. 44).

Alguns secretagogos de S100B foram identificados, incluindo forskolina (Pinto *et al.* 2000), cainato (Sakatani *et al.* 2008) e carbenoxolona (Leite *et al.* 2009). Entretanto, o mecanismo de secreção ainda permanece desconhecido e envolve uma via vesicular não-clássica de secreção, onde o  $Ca^{2+}$  é um possível mediador (Davey *et al.* 2001, Goncalves *et al.* 2008). Para investigar o efeito do  $Zn^{2+}$  sobre a secreção de S100B, incubamos as fatias hipocampais sob duas condições específicas associadas com o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular em astrócitos: baixos níveis extracelulares de  $K^+$  (Dallwig & Deitmer 2002) ou ausência de  $Ca^{2+}$  (Zanotti & Charles 1997), que são acompanhadas por um aumento na secreção de S100B (Nardin *et al.* 2009).

Em células astrogliais, a ausência de  $Ca^{2+}$  extracelular induz um aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, possivelmente envolvendo a mobilização do  $Ca^{2+}$  estocado no RE. Este efeito é bloqueado por tapsigargina e pela substituição do  $Ca^{2+}$  por algum outro cátion divalente, incluindo o  $Zn^{2+}$  (Zanotti & Charles 1997). O mecanismo possivelmente envolve um receptor

sensível a  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos que é expresso em numerosas regiões do SNC inclusive no hipocampo (Yano *et al.* 2004).

Em nosso estudo, o  $\text{Zn}^{2+}$  em níveis micromolares bloqueou a secreção de S100B induzida pela ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (Capítulo II, Figura 4, p. 46). Seria possível especular que este receptor sensível a  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos é tão sensível a  $\text{Zn}^{2+}$  quanto os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  modulados por reservas (SOCC), envolvidos no reabastecimento dos estoques internos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudos demonstram que o  $\text{Zn}^{2+}$  interage com um sítio extracelular dos SOCC e age como um inibidor competitivo do  $\text{Ca}^{2+}$  bloqueando os SOCC (Gore *et al.* 2004, Kresse *et al.* 2005). Portanto, 1-10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  poderia bloquear a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE e reduzir a secreção de S100B. Entretanto, neste momento, não podemos excluir outros alvos do  $\text{Zn}^{2+}$  *downstream* ao receptor sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  envolvido na liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  interno ou no maquinário da secreção de S100B. Como esperado, TPEN *per se* não modificou a secreção de S100B induzida em um meio sem  $\text{Ca}^{2+}$ , mas preveniu o efeito inibitório do  $\text{Zn}^{2+}$ .

Quando o  $\text{K}^+$  foi reduzido no meio externo, a secreção de S100B aumentou cerca de 60% (Capítulo II, Figura 3, p. 45), de acordo com nossos resultados prévios (Nardin *et al.* 2009). Este aumento de S100B pode estar associado com uma elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, talvez por influxo do meio externo através de canais de  $\text{K}^+$ , que são permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  em baixos níveis de  $\text{K}^+$  (Dallwig *et al.* 2000). De fato, os canais de  $\text{K}^+$ , Kir4.1, são essenciais para os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidos por baixos níveis de  $\text{K}^+$  em astrócitos (Hartel *et al.* 2007). A adição de  $\text{Zn}^{2+}$  diminuiu a secreção de S100B para valores abaixo da secreção basal. TPEN *per se* não modificou a secreção de S100B estimulada por baixo  $\text{K}^+$ , mas TPEN preveniu a inibição causada pelo  $\text{Zn}^{2+}$ . De fato, TPEN com  $\text{Zn}^{2+}$  aumentou a secreção de S100B, mas a razão para isto é incerta até o momento.

Concentrações elevadas de glutamato, como as observadas em condições patológicas, induziram uma diminuição na secreção de S100B em cultura de astrócitos primários e em

fatias cerebrais frescas (Goncalves et al. 2002, Buyukuysal 2005). Nós confirmamos o efeito na concentração de 1 mM de glutamato. O mecanismo é incerto, mas parece envolver transportadores de glutamato (Tramontina et al. 2006a). Entretanto, diferente de culturas de astrócitos primários, 0.1 mM de glutamato foi suficiente para diminuir a secreção de S100B em fatias hipocampais. Note que o efeito do  $Zn^{2+}$  não foi aditivo ao efeito do glutamato sobre a secreção de S100B (Capítulo II, Figura 5, p. 47). Níveis elevados de ATP, também observados em condições patológicas, diminuíram a secreção de S100B como observado com o glutamato. Os receptores purinérgicos ou outros alvos do ATP envolvidos neste efeito merecem uma maior caracterização. O  $Zn^{2+}$  novamente não foi aditivo a diminuição da secreção de S100B induzida por ATP (Capítulo II, Figura 6, p. 47).

A S100B extracelular, na ordem de nanomolar, é considerada um fator neurotrófico, mas elevações persistentes poderiam causar dano a neurônios e outras células (Donato et al. 2009, Van Eldik & Wainwright 2003). Em adição, outras proteínas S100 como a S100B, foram consideradas um padrão molecular associado a dano (DAMP) ou alarminas - proteínas intracelulares que sinalizam dano celular ou tecidual (Bianchi 2007). Portanto,  $Zn^{2+}$  em níveis fisiológicos trabalharia reprimindo a secreção de S100B. Esta diminuição não prejudicaria atividades tróficas tais como, estimulação da captação de glutamato (Tramontina et al. 2006b). Por outro lado, uma falha na repressão da liberação de S100B resultaria em uma elevação persistente e dispararia a morte neuronal. Estes resultados em fatias hipocampais confirmam um papel regulatório do  $Zn^{2+}$  sobre a secreção de S100B conforme previamente sugerido para células de glioblastoma já que a S100B liga  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (Davey et al. 2001).

Resumindo, estes resultados demonstraram que baixos níveis de  $Zn^{2+}$ , equivalentes a aqueles encontrados em níveis fisiológicos, são capazes de modular negativamente a secreção de S100B em fatias hipocampais. Em duas condições extremas, na ausência de  $Ca^{2+}$  ou em baixos níveis de  $K^+$  no meio extracelular que são capazes de induzir um aumento de  $Ca^{2+}$

intracelular, o  $Zn^{2+}$  ainda demonstrou a capacidade de bloquear a secreção de S100B. Em adição, TPEN preveniu os efeitos do  $Zn^{2+}$  e *per se* induziu um aumento na secreção de S100B. Além disso, nossos dados confirmam que altos níveis de glutamato (0.1-1 mM) inibiram a secreção de S100B, bem como, foi demonstrado pela primeira vez pelo nosso conhecimento, que o ATP 1 mM também inibiu a secreção desta proteína. Estes dados contribuem para a compreensão do papel do  $Zn^{2+}$  no hipocampo, particularmente sobre a secreção da S100B, uma proteína amplamente utilizada como um marcador de ativação astrogliar em várias condições de injúria cerebral.

Em condições patológicas que envolvem despolarização neuronal prolongada como, AVC isquêmico, epilepsia e injúria traumática cerebral, níveis elevados de  $Zn^{2+}$  extracelular podem contribuir para o dano ao SNC. A toxicidade do  $Zn^{2+}$  em astrócitos parece envolver um aumento do estresse oxidativo e/ou uma diminuição na defesa antioxidante particularmente, uma diminuição nos níveis de GSH (Bishop *et al.* 2007). Estudos demonstraram que a secreção de S100B é afetada por compostos antioxidantes (Donato *et al.* 2009) e apomorfina, um agonista dopaminérgico que tem efeitos protetores sobre a morte celular induzida por estresse oxidativo (Hara *et al.* 2006). Nesta linha, investigamos o efeito da apomorfina juntamente com outros compostos antioxidantes sobre a secreção de S100B.

Apomorfina, um composto não opióide derivado da morfina, é capaz de ativar receptores tipo  $D_1$  e  $D_2$ . Aparentemente estes receptores exercem sinalizações opostas com moléculas tais como, o AMPc onde, a ativação de  $D_1$  aumenta o AMPc enquanto que a ativação  $D_2$  diminui o nível de AMPc. Um estudo eletrofisiológico em fatias corticais sugeriu que os efeitos da DA são concentrações dependentes. Baixas concentrações de DA preferencialmente ativam receptores  $D_1$ , enquanto que,  $D_1$  e  $D_2$  são ativados em concentrações maiores que 0,5  $\mu$ M de DA e a ativação de  $D_2$  sobrepõe a ativação de  $D_1$  (Trantham-Davidson *et al.* 2004). Além disso, receptores  $D_2$  são altamente expressos em



astrócitos (Khan *et al.* 2001). Portanto, astrócitos poderiam ser importantes alvos de antagonistas D<sub>2</sub>, antipsicóticos típicos e talvez, na patogênese da esquizofrenia.

Nós encontramos que 100 µM de apomorfina foi capaz de causar uma diminuição na secreção de S100B, em fatias hipocampais, em astrócitos corticais primários e em células de glioma C6 (Capítulo III, Figura 1A, 2A e 2B p. 67 e 68). Assumindo que os receptores D<sub>2</sub> astrocíticos destas preparações são negativamente acoplados a adenilato ciclase, uma diminuição na secreção de S100B seria um resultado esperado. Outros resultados com forskolina, fluoxetina e serotonina sugerem uma conexão entre AMPc e a secreção de S100B (Goncalves *et al.* 2002, Tramontina *et al.* 2008).

A esquizofrenia afeta aproximadamente 1% da população e é caracterizada por sintomas positivos (alucinações, delírios, pensamento e discurso desorganizados), negativos (apatia, isolamento social, indiferença emocional) e cognitivos resultantes de um desequilíbrio do sistema dopaminérgico no SNC (Abi-Dargham 2004, Stone *et al.* 2010). Em pacientes esquizofrênicos, uma hiperativação dopaminérgica foi proposta como a base da exacerbação de sintomas positivos, onde antipsicóticos típicos são mais efetivos (Abi-Dargham 2004). Portanto, ignorando o efeito de outros secretagogos de S100B em astrócitos, seria esperado encontrar uma diminuição da secreção de S100B destas células em pacientes esquizofrênicos. E, ao contrário, um aumento da S100B sérica foi observado nestes pacientes em diferentes estudos (Lara *et al.* 2001, Rothermundt *et al.* 2004, Schroeter *et al.* 2009).

Entretanto, permanece incerto, se níveis séricos elevados de S100B refletem especificamente uma ativação astrogliar. De fato, fontes extracelulares poderiam contribuir para a S100B sérica, particularmente adipócitos em situações relacionadas ou não a injúria cerebral (Goncalves *et al.* 2010) e achados recentes sugerem que a S100B no sangue está correlacionada com o tecido adiposo em indivíduos normais e com a resistência à insulina em pacientes esquizofrênicos. Níveis elevados de S100B são mais prevalentes em pacientes

esquizofrênicos obesos ou com diabetes tipo 2 do que em indivíduos saudáveis (Steiner *et al.* 2010b). Nossos dados sugerem, portanto, que a elevação da S100B sérica, observada em pacientes esquizofrênicos, não é necessariamente devido à ativação astrogliar por hiperativação dopaminérgica. Outras fontes celulares de S100B e/ou secretagogos de S100B podem estar envolvidos nesta elevação.

Além disso, o efeito de antipsicóticos sobre a S100B periférica em pacientes esquizofrênicos é também assunto de controvérsia. De fato, estudos clínicos demonstraram ambos, um aumento (Wiesmann *et al.* 1999, Schroeter *et al.* 2003, Schmitt *et al.* 2005, Qi *et al.* 2009) e uma diminuição (Gattaz *et al.* 2000, Ling *et al.* 2007, Steiner *et al.* 2009) da S100B sérica que poderia estar relacionado à medicação antipsicótica. Dois estudos anteriores responderam esta questão investigando o efeito *in vitro* de antipsicóticos sobre a secreção de S100B em células gliais. Células de glioma C6 tratadas com risperidona (10-40  $\mu\text{M}$ ) exibiram um aumento na secreção de S100B (Quincozes-Santos *et al.* 2008), enquanto que células de glioma C6 e oligodendrócitos OLN-93 tratados com haloperidol (1  $\mu\text{g/mL}$  ou 2.5  $\mu\text{M}$ ) ou clozapina (10  $\mu\text{g/mL}$  ou 30  $\mu\text{M}$ ) exibiram uma diminuição na secreção de S100B (Steiner *et al.* 2010a). Esta aparente discrepância poderia ser devido a diferentes condições (drogas, concentrações, meio contendo soro, tipo celular e condições metabólicas). Em nossas condições, nem haloperidol nem risperidona (ambos em 10  $\mu\text{M}$ ) afetaram a secreção basal de S100B em duas preparações investigadas, fatias hipocâmpais (1 h) e culturas de astrócitos corticais (24 h), mas nós observamos um aumento na secreção de S100B em células de glioma C6 (24 h) tratadas com risperidona (Capítulo III, Figura 3, p. 69). Curiosamente, uma diminuição transitória da secreção de S100B (1 h) foi observada em culturas de astrócitos expostas ao haloperidol. Embora células de glioma C6 e astrócitos serem considerados indistintamente como células astrogliais, muitas discrepâncias entre elas têm sido observadas [p.ex. (Nardin *et al.* 2007)] e isto poderia explicar, em parte, nossos resultados. Em relação à comunicação

dopaminérgica, por exemplo, a estimulação da dopamina é capaz de superexpressar a glutatona em astrócitos, mas não em células de glioma C6 o que confere um papel protetor à célula (Han *et al.* 1996).

É bastante difícil usar nossos resultados de secreção de S100B *in vitro* comparados com preparações de astrócitos e fatias cerebrais para interpretar mudanças na S100B periférica em pacientes esquizofrênicos sob uso de medicação por um longo período de tempo. Entretanto, baseado em nossos resultados em fatias hipocâmpais expostas a apomorfina, seria possível especular que antipsicóticos contribuem para normalizar a secreção de S100B em astrócitos. Entretanto, não está claro se isto é mediado pela dopamina ou outro receptor de neurotransmissor.

Baseado no efeito protetor da risperidona sobre o estresse oxidativo (Quincozes-Santos *et al.*, 2010) decidimos investigar o efeito de antioxidantes clássicos: N-acetilcisteína (NAC), GSH e ácido ascórbico sobre a diminuição da secreção de S100B induzida por apomorfina em fatias hipocâmpais. Todos os antioxidantes foram efetivos para normalizar a secreção de S100B, mas a GSH foi capaz de induzir um aumento na secreção de S100B *per se* (Capítulo III, Figura 4, p. 70).

Este aspecto é muito interessante, pois a GSH não é somente um *scavenger* de radicais livres quando é exportada por astrócitos. Este composto tem atividade extracelular sobre alguns canais iônicos e receptores acoplados a proteína G (Wang *et al.* 2006). Isto poderia estar modulando diretamente ou indiretamente a secreção de S100B cujo mecanismo permanece desconhecido até agora (Donato *et al.* 2009). Note que o haloperidol, mas não a risperidona, de alguma maneira afetou esta secreção de S100B induzida por GSH (Capítulo III, Figura 4, p. 70). Isto reforça a idéia que antipsicóticos mais antigos conhecidos como antipsicóticos típicos, o haloperidol, por exemplo, poderiam agravar o estresse oxidativo de pacientes esquizofrênicos por alterar os níveis de enzimas antioxidantes e causar injúria

oxidativa no SNC. Neste sentido, estudos demonstram uma deficiência de GSH no sangue de pacientes esquizofrênicos (Pillai *et al.* 2007, Ng *et al.* 2008).

Independentemente disto, nossos dados contribuem com a idéia que a terapia antioxidante é útil para prevenir algumas alterações neuroquímicas na esquizofrenia, particularmente, a secreção de S100B astrogliar, mesmo levando em consideração todas as limitações deste estudo *ex vivo* usando apomorfina para induzir hiperativação dopaminérgica.

Resumindo, nossos dados sobre a secreção de S100B astrogliar foram analisados com foco para a S100B, um marcador de ativação astrogliar em desordens psiquiátricas, particularmente esquizofrenia. Entretanto, a elevação da S100B sérica observada em pacientes esquizofrênicos se contradiz com as diminuições de secreções de S100B em fatias hipocâmpais, astrócitos corticais e células de glioma C6 tratados com apomorfina objetivando mimetizar uma hiperativação dopaminérgica. Esta diminuição na secreção de S100B pode ser explicada por uma estimulação de receptores D<sub>2</sub>, negativamente acoplados a adenilato ciclase. A medicação antipsicótica e a suplementação com antioxidantes foram capazes de prevenir a diminuição da secreção de S100B. Isto reforça o uso benéfico da terapia antioxidante em desordens psiquiátricas. Além disso, nossos dados sugerem mais cautela para interpretar mudanças no conteúdo de S100B periférica quando refletido como ativação astrogliar, particularmente levando em consideração fontes extracelulares desta proteína.

Por fim, a secreção de S100B assim como alguns outros parâmetros de atividade astrogliar podem ser avaliados no modelo de fatias hipocâmpais frescas. As fatias hipocâmpais frescas exibem uma circuitaria neuronal parcialmente preservada e uma rede funcional de astrócitos (Lipton, 1985). Portanto, estas fatias podem ser utilizadas para avaliar a secreção da proteína S100B (Capítulo I, Figura 1A e 1B, p. 23) e, algumas vezes, sobrepõem-se às culturas de astrócitos isoladas por evidenciar a secreção desta proteína em função da interação neurônio-glia.

Nossos resultados demonstraram que a presença de baixo  $K^+$  extracelular (0,2 mM) poderia levar a um aumento na secreção de S100B (Capítulo I, Figura 3A, p. 24) em consequência a um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular em astrócitos de fatias hipocâmpais. Já, a presença de alto  $K^+$  extracelular (30mM) leva a uma diminuição na secreção de S100B possivelmente secundária ao influxo de  $K^+$  em astrócitos (Capítulo I, Figura 3A, p. 24). O aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular pode ser bloqueado por cátions divalentes como, o  $Zn^{2+}$  (Zanotti & Charles 1997). De acordo com isto, demonstramos que baixos níveis de  $Zn^{2+}$  equivalentes a aqueles encontrados em níveis fisiológicos bloqueiam a liberação de  $Ca^{2+}$  do RE reduzindo, desta forma, a secreção de S100B em fatias hipocâmpais frescas já que, o  $Zn^{2+}$  modula a atividade de canais iônicos como os canais de  $Ca^{2+}$  que modulam reservas (SOCC) (Gore et al. 2004, Kresse et al. 2005) e/ou, de receptores sensíveis ao  $Ca^{2+}$  (Yano et al. 2004) (Capítulo II, Figura 1A, p. 43). Em duas condições extremas, a ausência de  $Ca^{2+}$  ou baixos níveis de  $K^+$  no meio extracelular que são capazes de induzir um aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, o  $Zn^{2+}$  ainda demonstrou a capacidade de bloquear a secreção da S100B (Capítulo II, Figuras 3 e 4, p. 45 e 46, respectivamente). O mecanismo de secreção da S100B ainda permanece desconhecido (Donato et al. 2009) . Sabe-se que este mecanismo envolve uma via vesicular não-clássica de secreção, onde o  $Ca^{2+}$  é um possível mediador. Os resultados acima demonstrados corroboram esta hipótese.

Além disso, em condições patológicas que envolvem despolarização neuronal prolongada (AVC, epilepsia, injúria traumática cerebral) níveis elevados de  $Zn^{2+}$  extracelular podem contribuir para o dano ao SNC (Bitanhirwe & Cunningham 2009). A toxicidade do  $Zn^{2+}$  em astrócitos parece envolver um aumento do estresse oxidativo e/ou uma diminuição na defesa antioxidante particularmente, uma diminuição nos níveis de GSH (Ralph *et al.* 2010). Estudos demonstram que a apomorfina tem efeitos protetores sobre a morte celular induzida por estresse oxidativo talvez por aumentar a expressão de GSH em cultura de células gliais

(Han et al. 1996). Estudos clínicos demonstraram ambos, um aumento (Wiesmann et al. 1999) e uma diminuição (Gattaz et al. 2000) da S100B sérica que poderia estar relacionado à medicação antipsicótica. Nós demonstramos que a apomorfina 100  $\mu$ M foi capaz de causar uma diminuição na secreção de S100B, em fatias hipocampais, em astrócitos corticais primários e em células de glioma C6 (Capítulo III, Figuras 1 e 2, p. 67 e 68, respectivamente). Assumindo que os receptores D<sub>2</sub> astrocíticos destas preparações são negativamente acoplados a adenilato ciclase (Trantham-Davidson et al. 2004), uma diminuição na secreção de S100B seria um resultado esperado. Os antipsicóticos reverteram esta redução (Capítulo III, Figura 3, p. 69). Em nossos resultados também observamos que antioxidantes foram efetivos para normalizar a secreção de S100B (Capítulo III, Figura 4, p. 70), mas a GSH foi capaz de induzir um aumento na secreção de S100B *per se* (Capítulo III, Figura 4, p. 70). A GSH tem atividade extracelular sobre alguns canais iônicos e receptores acoplados a proteína G (Wang et al. 2006). Isto poderia estar modulando diretamente ou indiretamente a secreção de S100B cujo mecanismo permanece desconhecido até agora.

## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusão Geral

Os resultados deste trabalho confirmam a viabilidade do estudo da secreção da S100B em fatias hipocampais frescas de ratos Wistar. Além disso, os resultados demonstraram uma modulação positiva da secreção de S100B por  $\text{Ca}^{2+}$  e uma modulação negativa da secreção desta proteína por  $\text{Zn}^{2+}$  e por dopamina, a última possivelmente agindo em receptores dopaminérgicos do tipo  $\text{D}_2$ .

### 5.2. Conclusões Específicas

a) O modelo *ex vivo* de fatias hipocampais frescas é adequado tanto em parâmetros metabólicos quanto em parâmetros de viabilidade celular para o estudo da secreção da proteína S100B e outros parâmetros astrocíticos, além de ser uma metodologia simples.

b) A secreção de S100B em fatias hipocampais é positivamente modulada pelo baixo  $\text{K}^+$  possivelmente envolvendo a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  e negativamente modulada por alto  $\text{K}^+$  provavelmente devido a um influxo de  $\text{K}^+$ . Estes dados confirmam a hipótese que um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular leva a um aumento na secreção de S100B.

c) Os dados confirmam um papel regulatório do  $\text{Zn}^{2+}$  sobre a secreção de S100B em fatias hipocampais frescas. A secreção de S100B é negativamente modulada por  $\text{Zn}^{2+}$  em níveis micromolares supostamente devido ao fato do receptor sensível a  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos ser tão

sensível a  $Zn^{2+}$  quanto os canais de  $Ca^{2+}$  que operam as reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$  (SOCC).

**d)** Os resultados demonstram uma modulação da secreção de S100B por apomorfina 100  $\mu$ M que foi capaz de causar uma diminuição na secreção de S100B em fatias hipocâmpais, em astrócitos corticais primários e em células de glioma C6. Além disso, os antipsicóticos, haloperidol e risperidona bem como, os antioxidantes utilizados (NAC, GSH e vitamina C) foram efetivos para normalizar a secreção de S100B reduzida pela apomorfina.

**e)** A GSH foi capaz de induzir um aumento na secreção de S100B *per se* então, a GSH poderia estar modulando, direta ou indiretamente, a secreção de S100B.



## 6. PERSPECTIVAS

1. A literatura mostra que canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem são encontrados principalmente em células gliais imaturas e tendem a desaparecer durante o desenvolvimento (Verkhratsky *et al*, 2002) e que a maturação dos tecidos hipocámpais em ratos é atingida somente após 3 ou 4 semanas de idade (Cho *et al*. 2007). Com base nisto, pretendemos determinar a modulação do alto e baixo  $\text{K}^+$  sobre a secreção de S100B em fatias hipocámpais agudas de ratos Wistar em diferentes idades pós-natal.
2. Confirmar se após tratamento das fatias hipocámpais com baixo nível de  $\text{K}^+$  ocorre um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que leva a um aumento na secreção da S100B através da medida da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  nestas fatias por microscopia confocal em tempo real utilizando fluoróforos como Fura-2 AM ou Fluo -3AM para as medidas do  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. Confirmar se o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular após tratamento com baixo KCl ocorre através dos canais de  $\text{K}^+$  que alteram sua seletividade utilizando um inibidor destes canais.
4. Verificar se a glutatona poderia modular a secreção de S100B determinando um possível novo mecanismo para a secreção desta proteína.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Dargham, A. (2004) Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol*, **7 Suppl 1**, S1-5.
- Abib, R. T., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Wofchuk, S. T., Perry, M. L., Goncalves, C. A. and Gottfried, C. (2008) Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage. *Mol Cell Biochem*, **310**, 153-158.
- Adami, C., Sorci, G., Blasi, E., Agneletti, A. L., Bistoni, F. and Donato, R. (2001) S100B expression in and effects on microglia. *Glia*, **33**, 131-142.
- Agrawal, S. K., Nashmi, R. and Fehlings, M. G. (2000) Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. *Neuroscience*, **99**, 179-188.
- Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C. and Krieglstein, J. (2000) S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*, **858**, 121-128.
- Aitken, P. G., Breese, G. R., Dudek, F. F. et al. (1995) Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Methods*, **59**, 139-149.
- Anderson, W. W., Lewis, D. V., Swartzwelder, H. S. and Wilson, W. A. (1986) Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res*, **398**, 215-219.
- Bear, M. F., Connors, B.W., Paradiso, M. A. (2002) *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Artmed, Porto Alegre.
- Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**, 1-5.
- Bishop, G. M., Dringen, R. and Robinson, S. R. (2007) Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic Biol Med*, **42**, 1222-1230.
- Bitanhirwe, B. K. and Cunningham, M. G. (2009) Zinc: the brain's dark horse. *Synapse*, **63**, 1029-1049.
- Buyukuysal, R. L. (2005) Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*, **47**, 580-588.
- Carmignoto, G., Pasti, L. and Pozzan, T. (1998) On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. *J Neurosci*, **18**, 4637-4645.

- Castets, F., Griffin, W. S., Marks, A. and Van Eldik, L. J. (1997) Transcriptional regulation of the human S100 beta gene. *Brain Res Mol Brain Res*, **46**, 208-216.
- Chappell, R. L., Zakevicius, J. and Ripps, H. (2003) Zinc modulation of hemichannel currents in *Xenopus* oocytes. *Biol Bull*, **205**, 209-211.
- Cho, S., Wood, A. and Bowlby, M. R. (2007) Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr Neuropharmacol*, **5**, 19-33.
- Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Bruno, V., Battaglia, G., D'Alimonte, I., D'Onofrio, M., Nicoletti, F. and 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**, 275-281.
- Cohen-Kfir, E., Lee, W., Eskandari, S. and Nelson, N. (2005) Zinc inhibition of gamma-aminobutyric acid transporter 4 (GAT4) reveals a link between excitatory and inhibitory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6154-6159.
- Cousins, D. A., Butts, K. and Young, A. H. (2009) The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, **11**, 787-806.
- Dallwig, R. and Deitmer, J. W. (2002) Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods*, **116**, 77-87.
- Dallwig, R., Vitten, H. and Deitmer, J. W. (2000) A novel barium-sensitive calcium influx into rat astrocytes at low external potassium. *Cell Calcium*, **28**, 247-259.
- Davey, G. E., Murmann, P. and Heizmann, C. W. (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**, 30819-30826.
- de Almeida, L. M., Pineiro, C. C., Leite, M. C., Brolese, G., Tramontina, F., Feoli, A. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2007) Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol*, **27**, 661-668.
- de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B. and Goncalves, C. A. (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol*, **206**, 52-57.
- Dietrich, M. O., Tort, A. B., Schaf, D. V., Farina, M., Goncalves, C. A., Souza, D. O. and Portela, L. V. (2003) Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can J Appl Physiol*, **28**, 710-716.
- Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 637-668.

- Donato, R. (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*, **60**, 540-551.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 1008-1022.
- Edwards, M. M. and Robinson, S. R. (2006) TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, **113**, 1709-1715.
- Feoli, A. M., Siqueira, I., Almeida, L. M., Tramontina, A. C., Battu, C., Wofchuk, S. T., Gottfried, C., Perry, M. L. and Goncalves, C. A. (2006) Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *J Nutr*, **136**, 2357-2361.
- Fontella, F. U., Cimarosti, H., Crema, L. M. et al. (2005) Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull*, **65**, 443-450.
- Frederickson, C. J., Koh, J. Y. and Bush, A. I. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 449-462.
- Fritz, G. and Heizmann, C.W. (2004) 3D structures of the calcium and zinc binding S100 proteins. In: *Handbook of Metalloproteins*. W. Bode, A. Messerschmidt, M. Cygler editors, Toronto, 1-12.
- Funchal, C., Tramontina, F., Quincozes dos Santos, A., Fraga de Souza, D., Goncalves, C. A., Pessoa-Pureur, R. and 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**, 87-94.
- Gattaz, W. F., Lara, D. R., Elkis, H., Portela, L. V., Goncalves, C. A., Tort, A. B., Henna, J. and Souza, D. O. (2000) Decreased S100-beta protein in schizophrenia: preliminary evidence. *Schizophr Res*, **43**, 91-95.
- Gazzaniga, M.S., Ivry, R.B., Mangun, G.R. (2006) In: *Neurociência Cognitiva: A Biologia da Mente*. Artmed, Porto Alegre, 42-113.
- Gerlach, R., Demel, G., Konig, H. G., Gross, U., Prehn, J. H., Raabe, A., Seifert, V. and Kogel, D. (2006) Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*, **141**, 1697-1701.
- Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Guerra, M. C. (2010) Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, **2010**, 790431.

- Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, **41**, 755-763.
- Goncalves, D., Karl, J., Leite, M., Rotta, L., Salbego, C., Rocha, E., Wofchuk, S. and Goncalves, C. A. (2002) High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport*, **13**, 1533-1535.
- Gong, C. X., Lidsky, T., Wegiel, J., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2001) Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Res Brain Res Protoc*, **6**, 134-140.
- Gore, A., Moran, A., Hershinkel, M. and Sekler, I. (2004) Inhibitory mechanism of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels by zinc. *J Biol Chem*, **279**, 11106-11111.
- Gottfried, C., Valentim, L., Salbego, C., Karl, J., Wofchuk, S. T. and Rodnight, R. (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res*, **833**, 142-149.
- Han, S. K., Mytilineou, C. and Cohen, G. (1996) L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem*, **66**, 501-510.
- Hara, H., Ohta, M. and Adachi, T. (2006) Apomorphine protects against 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway. *J Neurosci Res*, **84**, 860-866.
- Harpio, R. and Einarsson, R. (2004) S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem*, **37**, 512-518.
- Hartel, K., Singaravelu, K., Kaiser, M., Neusch, C., Hulsmann, S. and Deitmer, J. W. (2007) Calcium influx mediated by the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1 (KCNJ10) at low external K<sup>+</sup> concentration. *Cell Calcium*, **42**, 271-280.
- Hassel, B. and Dingledine, R. (2006) Glutamate. *In: Basic Neurochemistry*, Wayne Albers, R., Brady, S.T., Price, D.L. editors. Elsevier Academic Press, Canada, 267-290.
- Hensler, J.G. (2006) Serotonin. *In: Basic Neurochemistry*, Wayne Albers, R., Brady, S.T., Price, D.L. editors. Elsevier Academic Press, Canada, 227-248.
- Hof, P.R., Trapp, B.D., deVellis, J., Luz, C. and Colman, D.R. (1999) The cellular components of nervous tissue. *In: Fundamental Neuroscience*. Academic Press, San Diego, 41-70.
- Ichikawa, J. and Meltzer, H. Y. (1999) Relationship between dopaminergic and serotonergic neuronal activity in the frontal cortex and the action of typical and

atypical antipsychotic drugs. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **249 Suppl 4**, 90-98.

- Iuvone, T., Esposito, G., De Filippis, D., Bisogno, T., Petrosino, S., Scuderi, C., Di Marzo, V. and Steardo, L. (2007) Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro. *J Mol Med*, **85**, 1379-1392.
- Kay, A. R. (2006) Imaging synaptic zinc: promises and perils. *Trends Neurosci*, **29**, 200-206.
- Khan, Z. U., Koulen, P., Rubinstein, M., Grandy, D. K. and Goldman-Rakic, P. S. (2001) An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1964-1969.
- Kogel, D., Peters, M., Konig, H. G., Hashemi, S. M., Bui, N. T., Arolt, V., Rothermundt, M. and Prehn, J. H. (2004) S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*, **127**, 913-920.
- Kresse, W., Sekler, I., Hoffmann, A., Peters, O., Nolte, C., Moran, A. and Kettenmann, H. (2005) Zinc ions are endogenous modulators of neurotransmitter-stimulated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in both cultured and in situ mouse astrocytes. *Eur J Neurosci*, **21**, 1626-1634.
- Kuhar, M.J., Minneman, K. and Muly, E.C. (2006) Catecholamines. In: *Basic Neurochemistry*, Wayne Albers, R., Brady, S.T., Price, D.L. editors. Elsevier Academic Press, Canada, 211-225.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A. and Verkhratsky, A. (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci*, **26**, 2673-2683.
- Lam, A. G., Koppal, T., Akama, K. T., Guo, L., Craft, J. M., Samy, B., Schavoocky, J. P., Watterson, D. M. and Van Eldik, L. J. (2001) Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging*, **22**, 765-772.
- Lara, D. R., Gama, C. S., Belmonte-de-Abreu, P., Portela, L. V., Goncalves, C. A., Fonseca, M., Hauck, S. and Souza, D. O. (2001) Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res*, **35**, 11-14.
- Leal, R. B., Goncalves, C. A. and Rodnight, R. (1997) Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. *Brain Res Dev Brain Res*, **104**, 1-10.
- Leclerc, E., Sturchler, E. and Vetter, S. W. (2010) The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, **2010**, 539581.

- Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*, **87**, 2439-2446.
- Li, C. L. and Mc, I. H. (1957) Maintenance of resting membrane potentials in slices of mammalian cerebral cortex and other tissues in vitro. *J Physiol*, **139**, 178-190.
- Linden, J. and Rosin, D.L. (2006) Purinergic Systems. *In: Basic Neurochemistry*, Wayne Albers, R., Brady, S.T., Price, D.L. editors. Elsevier Academic Press, Canada, 303- 316.
- Ling, S. H., Tang, Y. L., Jiang, F., Wiste, A., Guo, S. S., Weng, Y. Z. and Yang, T. S. (2007) Plasma S-100B protein in Chinese patients with schizophrenia: comparison with healthy controls and effect of antipsychotics treatment. *J Psychiatr Res*, **41**, 36-42.
- Lipton, P. (1985) Brain Slices: Uses and Abuses. *In: Neuromethods: General Neurochemical Techniques*, Boulton, A.A. and Baker, G.B. editors. Humana Press, New Jersey, 69-115.
- Lossi, L., Alasia, S., Salio, C. and Merighi, A. (2009) Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol*, **88**, 221-245.
- Marenholz, I., Heizmann, C. W. and Fritz, G. (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 1111-1122.
- Mazzini, G. S., Schaf, D. V., Vinade, E. R. et al. (2007) Increased S100B serum levels in dilated cardiomyopathy patients. *J Card Fail*, **13**, 850-854.
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F. and Malavolta, M. (2005) Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol*, **75**, 367-390.
- Moore, B. W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, **19**, 739-744.
- Nagy, J. I. and Li, W. E. (2000) A brain slice model for in vitro analyses of astrocytic gap junction and connexin43 regulation: actions of ischemia, glutamate and elevated potassium. *Eur J Neurosci*, **12**, 4567-4572.
- Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A. et al. (2009) S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res*, **34**, 1603-1611.
- Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M. C., Tramontina, A. C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L. M., Battastini, A. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2007)

S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int*, **50**, 774-782.

Ng, F., Berk, M., Dean, O. and Bush, A. I. (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*, **11**, 851-876.

Oka, M., Itoh, Y., Wada, M., Yamamoto, A. and Fujita, T. (2003) A comparison of Ca<sup>2+</sup> channel blocking mode between gabapentin and verapamil: implication for protection against hypoxic injury in rat cerebrocortical slices. *Br J Pharmacol*, **139**, 435-443.

Pellerin, L. and Magistretti, P. J. (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist*, **10**, 53-62.

Pillai, A., Parikh, V., Terry, A. V., Jr. and Mahadik, S. P. (2007) Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res*, **41**, 372-386.

Pinto, S. S., Gottfried, C., Mendez, A., Goncalves, D., Karl, J., Goncalves, C. A., Wofchuk, S. and Rodnight, R. (2000) Immunoccontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett*, **486**, 203-207.

Ponath, G., Schettler, C., Kaestner, F., Voigt, B., Wentker, D., Arolt, V. and Rothermundt, M. (2007) Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *J Neuroimmunol*, **184**, 214-222.

Privat, A., Gimenez-Ribotta, M. and Ridet, J-L. (1995) Morphology of astrocytes. In: *Neuroglia*. Kettenmann, H. e Ransom, B.R. editors, Oxford University Press, New York, 58-84.

Qi, L. Y., Xiu, M. H., Chen da, C., Wang, F., Kosten, T. A., Kosten, T. R. and Zhang, X. Y. (2009) Increased serum S100B levels in chronic schizophrenic patients on long-term clozapine or typical antipsychotics. *Neurosci Lett*, **462**, 113-117.

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

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

Ralph, D. M., Robinson, S. R., Campbell, M. S. and Bishop, G. M. (2010) Histidine, cystine, glutamine, and threonine collectively protect astrocytes from the toxicity of zinc. *Free Radic Biol Med*, **49**, 649-657.



- Reali, C., Scintu, F., Pillai, R., Donato, R., Michetti, F. and Sogos, V. (2005) S100B Counteracts Effects of the Neurotoxicant Trimethyltinon Astrocytes and Microglia. *J Neurosc Res*, **81**, 677-686
- Reeves, R. H., Yao, J., Crowley, M. R., Buck, S., Zhang, X., Yarowsky, P., Gearhart, J. D. and Hilt, D. C. (1994) Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5359-5363.
- Robertson, N. J., Bhakoo, K., Puri, B. K., Edwards, A. D. and Cox, I. J. (2005) Hypothermia and amiloride preserve energetics in a neonatal brain slice model. *Pediatr Res*, **58**, 288-296.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H. and Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech*, **60**, 614-632.
- Rothermundt, M., Ponath, G. and Arolt, V. (2004) S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol*, **59**, 445-470.
- Sajikumar, S., Navakkode, S. and Frey, J. U. (2005) Protein synthesis-dependent long-term functional plasticity: methods and techniques. *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 607-613.
- Sakatani, S., Seto-Ohshima, A., Shinohara, Y., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Itohara, S. and Hirase, H. (2008) Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci*, **28**, 10928-10936.
- Schmitt, A., Bertsch, T., Henning, U., Tost, H., Klimke, A., Henn, F. A. and Falkai, P. (2005) Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr Res*, **80**, 305-313.
- Schroeter, M. L., Abdul-Khaliq, H., Fruhauf, S., Hohne, R., Schick, G., Diefenbacher, A. and Blasig, I. E. (2003) Serum S100B is increased during early treatment with antipsychotics and in deficit schizophrenia. *Schizophr Res*, **62**, 231-236.
- Schroeter, M. L., Abdul-Khaliq, H., Krebs, M., Diefenbacher, A. and Blasig, I. E. (2009) Neuron-specific enolase is unaltered whereas S100B is elevated in serum of patients with schizophrenia--original research and meta-analysis. *Psychiatry Res*, **167**, 66-72.
- Schurr, A., Payne, R. S., Miller, J. J. and Rigor, B. M. (1997) Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res*, **774**, 221-224.
- Schwartz, J.H. (2000) Neurotransmitters. In: *Principles of Neural Science*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. editors, McGraw-Hill, New York, USA, 69-87.

- Schwartz, J.H. and Westbrook, G.L. (2000) The Cytology of Neurons. *In: Principles of Neural Science*. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. editors, McGraw-Hill, New York, USA, 69-87.
- Sedaghat, F. and Notopoulos, A. (2008) S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia*, **12**, 198-204.
- Selinfreund, R. H., Barger, S. W., Pledger, W. J. and Van Eldik, L. J. (1991) Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3554-3558.
- Sen, J. and Belli, A. (2007) S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res*, **85**, 1373-1380.
- Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I. and Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 780-791.
- Shashoua, V. E., Hesse, G. W. and Moore, B. W. (1984) Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem*, **42**, 1536-1541.
- Smart, T. G., Hosie, A. M. and Miller, P. S. (2004) Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist*, **10**, 432-442.
- Steiner, J., Schroeter, M. L., Schiltz, K. et al. (2010a) Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. *Neuroscience*, **167**, 1025-1031.
- Steiner, J., Walter, M., Guest, P. et al. (2010b) Elevated S100B levels in schizophrenia are associated with insulin resistance. *Mol Psychiatry*, **15**, 3-4.
- Steiner, J., Walter, M., Wunderlich, M. T. et al. (2009) A new pathophysiological aspect of S100B in schizophrenia: potential regulation of S100B by its scavenger soluble RAGE. *Biol Psychiatry*, **65**, 1107-1110.
- Stone, J. M., Morrison, P. D. and Pilowsky, L. S. (2007) Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia--a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol*, **21**, 440-452.
- Stone, J. M., Raffin, M., Morrison, P. and McGuire, P. K. (2010) Review: The biological basis of antipsychotic response in schizophrenia. *J Psychopharmacol*, **24**, 953-964.
- Suh, S. W., Aoyama, K., Alano, C. C., Anderson, C. M., Hamby, A. M. and Swanson, R. A. (2007) Zinc inhibits astrocyte glutamate uptake by activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mol Med*, **13**, 344-349.
- Takeda, A. (2001) Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals*, **14**, 343-351.

- Tancredi, V., Hwa, G. G., Zona, C., Brancati, A. and Avoli, M. (1990) Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. *Brain Res*, **511**, 280-290.
- Taylor, P. and Brown, J.H. (2006) Acetylcholine. *In: Basic Neurochemistry*, Wayne Albers, R., Brady, S.T., Price, D.L. editors. Elsevier Academic Press, Canada, 185-209.
- Thomazi, A. P., Godinho, G. F., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E., Moriguchi, E., Souza, D. O. and Wofchuk, S. T. (2004) Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mech Ageing Dev*, **125**, 475-481.
- Tramontina, A. C., Tramontina, F., Bobermin, L. D., Zanotto, C., Souza, D. F., Leite, M. C., Nardin, P., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **32**, 1580-1583.
- Tramontina, F., Leite, M. C., Goncalves, D. et al. (2006a) High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*, **31**, 815-820.
- Tramontina, F., Tramontina, A. C., Souza, D. F., Leite, M. C., Gottfried, C., Souza, D. O., Wofchuk, S. T. and Goncalves, C. A. (2006b) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*, **26**, 81-86.
- Trantham-Davidson, H., Neely, L. C., Lavin, A. and Seamans, J. K. (2004) Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci*, **24**, 10652-10659.
- Tsacopoulos, M. and Magistretti, P. J. (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci*, **16**, 877-885.
- Van Eldik, L. J. and Wainwright, M. S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*, **21**, 97-108.
- Van Eldik, L. J. and Zimmer, D. B. (1987) Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res*, **436**, 367-370.
- Verkhatsky, A. Solovyeva, N. Toescu, E.N. (2002) Calcium excitability of glial cells. *In: Volterra, A., Magistretti, P.J., Haydon, P.G., (eds) The tripartite synapse. Glia in synaptic transmission*, 1<sup>st</sup> edn. Oxford University Press, New York.
- Vieira de Almeida, L. M., Pineiro, C. C., Leite, M. C., Brolese, G., Leal, R. B., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res*, **33**, 8-15.

- Wang, D. D. and Bordey, A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, **86**, 342-367.
- Wang, M., Yao, Y., Kuang, D. and Hampson, D. R. (2006) Activation of family C G-protein-coupled receptors by the tripeptide glutathione. *J Biol Chem*, **281**, 8864-8870.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Murphy, R. and Azmitia, E. C. (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**, 155-158.
- Whittingham, T. S., Lust, W. D., Christakis, D. A. and Passonneau, J. V. (1984) Metabolic stability of hippocampal slice preparations during prolonged incubation. *J Neurochem*, **43**, 689-696.
- Wiesmann, M., Wandinger, K. P., Missler, U., Eckhoff, D., Rothermundt, M., Arolt, V. and Kirchner, H. (1999) Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*, **45**, 1508-1511.
- Williams, L. R., Pregoner, J. F. and Oostveen, J. A. (1992) Induction of cobalt accumulation by excitatory amino acids within neurons of the hippocampal slice. *Brain Res*, **581**, 181-189.
- Yano, S., Brown, E. M. and Chattopadhyay, N. (2004) Calcium-sensing receptor in the brain. *Cell Calcium*, **35**, 257-264.
- Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, **419**, 35-42.
- Zanotti, S. and Charles, A. (1997) Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J Neurochem*, **69**, 594-602.