

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

MARIA CRISTINA BARÉA GUERRA

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

**Efeito do LPS e de anti-inflamatórios sobre a secreção de S100B em
cultura de astrócitos**

Porto Alegre

2014

MARIA CRISTINA BARÉA GUERRA

**Efeito do LPS e de anti-inflamatórios sobre a secreção de S100B em
cultura de astrócitos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Doutorado em Bioquímica

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre

2014

“A satisfação está no esforço e não apenas na realização final”.

Mahatma Gandhi (1869-1948), filósofo indiano

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, a minha querida avó, meus irmãos, minha tia Perpétua, meu amado esposo e minha amada filha. Muito obrigada por todo o incentivo, confiança e amor. Vocês são minha vida!!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, sem ele nada aconteceria.

Aos meus pais, por uma vida inteira de dedicação e amor aos seus filhos. Sem eles nada seríamos.

Aos meus irmãos Caroline, Fábio e Silvana por todo amor e respeito que nos une.

À minha amada avó Anda, a qual eu devo o melhor de mim.

À minha amada e inesquecível tia Perpétua “in memória”, sei que estás sempre ao meu lado...

Ao meu amado esposo, meu melhor amigo, meu incentivador, enfim, meu grande companheiro, amor da minha vida.

À minha filha Maria Clara, minha joia preciosa, meu anjo, minha vida inteira, te amo demais!

À Marina, minha querida amiga e irmã de coração, a qual eu agradeço sempre pela vida ter me concedido o privilégio de sua amizade. Eu nunca terei como agradecer o suficiente por todo o tempo, paciência, dedicação e colaboração incansável que tu foste capaz de doar para este projeto e para a minha trajetória profissional, além do teu enorme conhecimento que teve a generosidade de compartilhar comigo. Te adoro!!

À minha querida amiga Fernanda, que a vida sempre mantenha nossa bela amizade.

À adorável Fafá, amiga querida e grande companheira de trabalho, além de uma pessoa que admiro muito.

À doce e amável Pati Sester, minha amiga querida que admiro muito. Muito obrigada pelo carinho!

À Carol e Elisa, minhas eternas bolsistas, amigas queridas, que deram um significado especial para a palavra grupo. Muito obrigada sempre!

Às fofas Lili e Fezinha. Muito obrigada pelo carinho!

Aos queridos amigos Lari e André. Muito obrigada sempre pelo carinho e amizade!!

Às queridas Pati, Caro, Dani, Lucas e Adri pelo carinho de sempre.

A todos os amigos e colegas dos labs 31 e 33, muito obrigada por fazerem parte desta fase tão especial da minha vida. Muito obrigada pelas discussões científicas (e também por aquelas não tão científicas assim, mas sempre divertidas) e pelos momentos de descontração, que sem dúvida foram importantíssimos para a realização desse trabalho.

Ao professor CA, uma das pessoas mais incríveis que tive a felicidade de conhecer. Muito obrigada pelo carinho, pela compreensão, pela confiança, enfim, por tudo. Nunca terei palavras suficientes para te agradecer por esta oportunidade única na minha vida.

Sumário

PARTE I.....	1
Resumo	2
Abstract.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4
1. Introdução.....	6
1.1. Neuroinflamação	6
1.2. Mecanismos moleculares da neuroinflamação.....	7
1.3. Mecanismos celulares da neuroinflamação.....	10
1.3.1. Microglia	11
1.3.2. Astrócitos.....	12
1.4. Mecanismos moleculares da neuroinflamação em astrócitos	14
1.5. LPS como um modelo de neuroinflamação	18
1.6. Anti-inflamatórios e neuroinflamação	21
1.6.1. Uso de anti-inflamatórios para patologias do SNC	23
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
PARTE II.....	28
Capítulo I.....	29
Capítulo II.....	41
Capítulo III	70
PARTE III	82
3. Discussão	83
4. Conclusões.....	94
5. Referências Bibliográficas.....	96

PARTE I

Resumo

As respostas inflamatórias no cérebro são mediadas principalmente pela microglia, mas evidências crescentes sugerem uma importância crucial dos astrócitos. A S100B, uma proteína ligante de cálcio e secretada por astrócitos, tem propriedades neurotróficas e de citocina inflamatória. No entanto, não se sabe se sinais primários que ocorrem durante a indução de uma resposta inflamatória como, por exemplo, lipopolissacarídeo (LPS) modulam diretamente a S100B. A neuroinflamação está implicada na patogênese ou na progressão de uma variedade de distúrbios neurodegenerativos e muitos estudos procuram uma conexão entre S100B e doenças degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer e esquizofrenia. O uso terapêutico de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) para estas doenças tem aumentado. No entanto, existem poucos estudos sobre o efeito desses fármacos em relação à proteína S100B. Neste trabalho, nós avaliamos se os níveis de S100B no líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro de ratos Wistar são afetados por injeção de LPS administrado por via intraperitoneal (IP) ou intracerebroventricular (ICV), bem como se as culturas primárias de astrócitos respondem diretamente ao LPS. Além disso, nós avaliamos o conteúdo e a secreção de S100B medido por ELISA (bem como o conteúdo de GFAP e secreção de TNF- α) em culturas primárias de astrócitos expostos a dexametasona e quatro classes químicas diferentes de AINEs (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenaco e nimesulida) durante 24 h. Os nossos dados sugerem que a secreção de S100B no tecido cerebral é estimulada rapidamente e persistentemente (durante pelo menos 24 h) por administração ICV de LPS. Este aumento da S100B no LCR foi transitório quando o LPS foi administrado IP. Em contraste com estes resultados de S100B, observou-se um aumento nos níveis de TNF- α no soro, mas não no LCR, após a administração IP de LPS. Em astrócitos isolados e em fatias de hipocampo frescas, observou-se uma estimulação direta da secreção de S100B por LPS numa concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$. Um envolvimento de TLR4 foi confirmado pelo uso de antagonistas específicos deste receptor. No entanto, baixas concentrações de LPS em culturas de astrócitos foram capazes de induzir uma diminuição na secreção de S100B após 24 h, sem alteração significativa no conteúdo intracelular de S100B. Além disso, após 24 horas de exposição ao LPS, observou-se um decréscimo na glutatona e um aumento na proteína ácida fibrilar glial. Também foi observado que os AINEs apresentam diferentes efeitos sobre parâmetros gliais. O ácido acetilsalicílico e o diclofenaco foram capazes de aumentar a GFAP, enquanto que a nimesulida, um inibidor seletivo de COX-2, e a dexametasona diminuíram a secreção de S100B. No entanto, todos os AINEs reduziram os níveis de PGE₂. Juntos, esses dados contribuem para a compreensão dos efeitos de LPS em astrócitos, especialmente sobre a secreção de S100B, e nos ajuda a interpretar mudanças nesta proteína no LCR e soro em doenças neuroinflamatórias. Além disso, tecidos periféricos que expressam S100B talvez devam ser regulados diferentemente, uma vez que a administração IP de LPS não foi capaz de aumentar os níveis séricos de S100B. Em relação aos AINEs, a PGE₂ parece estar envolvida no mecanismo de secreção de S100B, mas vias adicionais, não claras neste momento, necessitam de uma maior caracterização. O papel inflamatório de S100B em doenças degenerativas, onde também são observados níveis elevados da COX-2 e PGE₂, poderia ser atenuado por inibidores de COX-2.

Palavras-chave: astrócitos, LPS, anti-inflamatórios e S100B.

Abstract

Inflammatory responses in brain are primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes. S100B, a calcium-binding protein secreted by astrocytes, may act as a neurotrophic or an inflammatory cytokine. However, it is not known whether primary signals occurring during induction of an inflammatory response (e.g. lipopolysaccharide, LPS) directly modulate S100B. Neuroinflammation has been implicated in the pathogenesis or progression of a variety of neurodegenerative disorders and several studies have looked for a connection of S100B, and degenerative diseases including Alzheimer's disease and schizophrenia. The therapeutic use of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID) to these diseases has grown up. However, there are few reports about the effect of these drugs on S100B. In this work, we evaluated whether S100B levels in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of Wistar rats are affected by LPS administered by intraperitoneal (IP) or intracerebroventricular (ICV) injection, as well as whether primary astrocyte cultures respond directly to lipopolysaccharide. Moreover we evaluated S100B content and secretion measured by ELISA (as well as GFAP content and TNF- α secretion) in primary astrocyte cultures exposed to dexamethasone and 4 different chemical classes of NSAID (acetyl salicylic acid, ibuprofen, diclofenac and nimesulide) for 24 h. Our data suggest that S100B secretion in brain tissue is stimulated rapidly and persistently (for at least 24 h) by ICV LPS administration. This increase in CSF S100B was transient when LPS was IP administered. In contrast to these S100B results, we observed an increase in TNF α levels in serum, but not in CSF, after IP administration of LPS. In isolated astrocytes and in acute hippocampal slices, we observed a direct stimulation of S100B secretion by LPS at a concentration of 10 μ g/mL. An involvement of TLR4 was confirmed by use of specific inhibitors. However, lower levels of LPS in astrocyte cultures were able to induce a decrease in S100B secretion after 24 h, without significant change in intracellular content of S100B. In addition, after 24 h exposure to LPS, we observed a decrease in astrocytic glutathione and an increase in astrocytic glial fibrillary acidic protein. We also observe that NSAIDs have distinct effects on glial parameters. ASA and diclofenac are able to increase GFAP, while nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, and dexamethasone were able to decrease S100B secretion. However, all anti-inflammatories were able to reduce levels of PGE₂. Together, these data contribute to the understanding of the effects of LPS on astrocytes, particularly on S100B secretion, and help us to interpret cerebrospinal fluid and serum changes for this protein in neuroinflammatory diseases. Moreover, non-brain S100B-expressing tissues may be differentially regulated, since LPS administration did not lead to increased serum levels of S100. With respect to NSAIDs, PGE₂ is possibly involved in the mechanism of S100B secretion but additional pathways, unclear at this moment, demand further characterization. The inflammatory role of S100B in degenerative diseases, where also is observed elevated levels of COX-2 and PGE₂, could be attenuated by COX-2 inhibitors in which elevated levels of COX-2.

Key words: astrocytes, LPS, anti-inflammatories and S100B.

Lista de Abreviaturas

AAS - ácido acetilsalicílico

AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

AP1 - ativador de proteína 1

ATP - adenosina trifosfato

BHE - barreira hemato-encefálica

BHL – barreira hemato-liquórica

COX - ciclooxigenase

DAMP - padrão molecular associado a dano

ERK - cinase regulada por sinal extracelular

EROs – espécies reativas do oxigênio

GFAP - proteína ácida fibrilar glial

GSH - glutathiona reduzida

ICAM 1 - proteína molecular de adesão intercelular 1

IFN - interferon

IL - interleucina

iNOS - oxido nítrico sintase induzível

IRAK - cinase serina-treonina associada IL-1R

JNK - cinase terminal Jun-N

LBP - proteína ligante de LPS

LCR - líquido

LPS - lipopolissacarídeo

MAL - proteína semelhante a MYD88

MAPK - cinase ativada por mitógeno

MyD88 - proteína adaptadora fator 88 de diferenciação mieloide

NF-κB - fator nuclear κB

NIK - cinase indutora de NF-κB

NLRs - receptores “NOD-like”

PAMP - padrão molecular associado a patógeno

PG - prostaglandina

PLA2 - fosfolipase A2

PRR - receptor de reconhecimento de padrão

RAGE - receptor para produtos terminais de glicação avançada

SNC - sistema nervoso central

SRs – receptores “scavenger”

TGF- β - fator de transformação do crescimento beta

TIR - receptor “Toll/interleukin-1”

TLRs – receptores “toll-like”

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TRAF - fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TX - tromboxano

UTP - uridina trifosfato

VCAM 1 - proteína de adesão celular vascular 1

1. Introdução

1.1. Neuroinflamação

Por muito tempo o sistema nervoso central (SNC) foi visto como um local privilegiado imunologicamente com completa ausência de vigilância imunológica. Uma vez que a homeostase desse tecido é um pré-requisito para a comunicação adequada das células neuronais, a barreira hemato-encefálica (BHE) e a barreira hemato-liquórica (BHL) isolam o SNC das mudanças contínuas nos tecidos periféricos. Atualmente sabe-se que, apesar da presença dessas barreiras, o SNC está sujeito a eventos patogênicos e vigilância imunológica (Ransohoff & Brown 2012). Estudos em modelo animal para esclerose múltipla têm mostrado que células T podem atravessar a BHE e a BHL intactas e acessar o fluido cerebrospinal, espaços perivascular e subaracnóide (Engelhardt 2010).

A neuroinflamação é uma complexa resposta celular e molecular no SNC em resposta a um estresse na tentativa de conter o dano ou infecção através da eliminação do patógeno e morte ou dano de células hospedeiras, auxiliando na recuperação da área danificada. A neuroinflamação tem sido implicada em muitas doenças do SNC, incluindo doenças degenerativas crônicas e dano cerebral agudo. Entre essas condições estão a isquemia cerebral, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Glass *et al.* 2010).

No processo neuroinflamatório, componentes imunes celulares tais como macrófagos especializados (microglia), neurônios e astrócitos, bem como citocinas, quimiocinas, sistema do complemento, receptor de reconhecimento de padrão (PRR) e outras vias de sinalização contribuem para o processo (Shastri *et al.* 2013). Estes mediadores pró-inflamatórios podem ser produzidos dentro do SNC ou serem recrutados do sistema periférico em consequência de dano a BHE. Isto por sua vez, leva à ativação

de células gliais tais como microglia e astrócitos. O efeito da neuroinflamação é considerado neuroprotetor quando a atividade neuroinflamatória atinge um período curto de tempo, enquanto a inflamação crônica está associada com consequências prejudiciais para o SNC (Streit *et al.* 2004).

1.2. Mecanismos moleculares da neuroinflamação

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de diferentes patógenos e é efetiva no controle da infecção até que as células do sistema imune adaptativo sejam capazes de iniciar uma resposta específica contra o antígeno. Entre os componentes envolvidos na resposta imunológica estão PRRs, como os receptores “toll-like” (TLRs), receptores ligantes de nucleotídeos tais como adenosina trifosfato (ATP) e uridina trifosfato (UTP) (P2) (Davalos *et al.* 2005), (Franke *et al.* 2006), NOD-like receptors (NLRs) (Kawai & Akira 2009), “scavenger receptors” (SRs) como o receptor para produtos terminais de glicação avançada (RAGE) (Fang *et al.* 2010) entre outros. Estes receptores reconhecem não somente padrão molecular associado a patógeno (PAMP), como por exemplo, lipídeos derivados de bactérias como lipopolissacarídeo (LPS), mas também moléculas endógenas chamadas padrão molecular associado a dano (DAMP) como, por exemplo, proteínas de choque térmico e alarminas.

Nos últimos anos tornou-se evidente que o sistema imune inato e em particular os PRRs tais como os receptores TLRs são moléculas chave na imunidade inata, tendo o papel principal na infecção, mas também em doenças não infecciosas no SNC (Lehnardt 2010). TLRs representam uma família de PRRs presente nas células de mamíferos que ligam motivos estruturais altamente conservados chamados PAMP, os quais são essenciais para a sobrevivência do respectivo patógeno (Kawai & Akira 2006). Atualmente, 10 TLRs foram identificados em humanos e 13 em camundongos. Os

TLRs são proteínas transmembranas com um domínio extracelular rico em leucina e um domínio citoplasmático, o qual contém uma região conservada conhecida como domínio “Toll/interleukin-1 receptor” (TIR) comum também ao receptor de interleucina 1 (IL1).

Dentro da família, os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 representam uma subfamília que está localizada em compartimentos intracelulares como endossoma e retículo endoplasmático e reconhecem ácido nucleico viral (Figura 1). Por outro lado, outros TLRs como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na superfície celular e reconhecem componentes da parede celular bacteriana ou partículas virais (Kawai & Akira 2008, Mogensen 2009). Quando ativados pelo seu ligante, os TLRs dimerizam e sofrem uma mudança conformacional que leva a indução de uma complexa cascata de sinalização intracelular resultando na ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e do fator de transcrição ativador de proteína1 (AP1), os quais regulam a expressão de uma gama de genes envolvidos na resposta inflamatória.

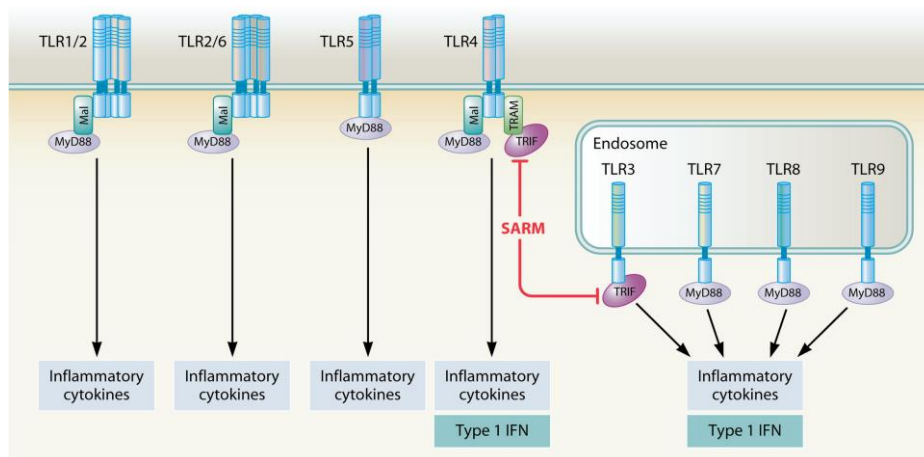


Figura 1: Sublocalização celular dos diferentes tipos de TLRs. Mogensen, 2009.

Em células não estimuladas, o NF- κ B é sequestrado no citoplasma como uma forma inativa, interagindo com um inibidor de NF- κ B (I κ B). Após estimulação com vários ligantes de TLR, as I κ Bs são fosforiladas, ubiquitiniladas e degradadas,

permitindo que o NF- κ B seja translocado para o núcleo ativando a transcrição gênica. A ativação do fator de transcrição AP-1 na sinalização por TLR é principalmente mediada por cinases ativadas por mitógenos (MAPK) como a cinase terminal Jun-N (JNK), p38 e cinase regulada por sinal extracelular (ERK).

Em resumo, a ativação da maior parte dos receptores TLRs resulta no recrutamento da proteína adaptadora fator 88 de diferenciação mieloide (MyD88), cinase serina-treonina associada IL-1R (IRAK), fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF), proteína adaptadora TRAF6, cinase indutora de NF- κ B (NIK) e cinase I κ B (IKK), portanto levando a translocação nuclear do NF- κ B. O MyD88 é crítico para a sinalização através de todos os TLRs exceto TLR3. Entretanto, moléculas adaptadoras alternativas incluindo proteína associada ao TIR (TIRAP) e a proteína semelhante a MYD88 (MAL), transduzem sinais de TLRs através de uma via independente de MyD88 (Akira *et al.* 2006). A via de sinalização resulta na regulação positiva de genes pró-inflamatórios alvos que codificam citocinas, quimiocinas, enzimas e outras moléculas essenciais para a eliminação do patógeno (Figura 2).

No SNC, astrócitos e microglia são as primeiras células a responder através de receptores TLRs a dano, perturbação e estresse celular, bem como infecções causadas por patógenos, induzindo a produção e liberação de sinais moleculares que iniciam a resposta glial podendo levar a excitotoxicidade, inflamação, neurodegeneração e apoptose (Holm *et al.* 2012).

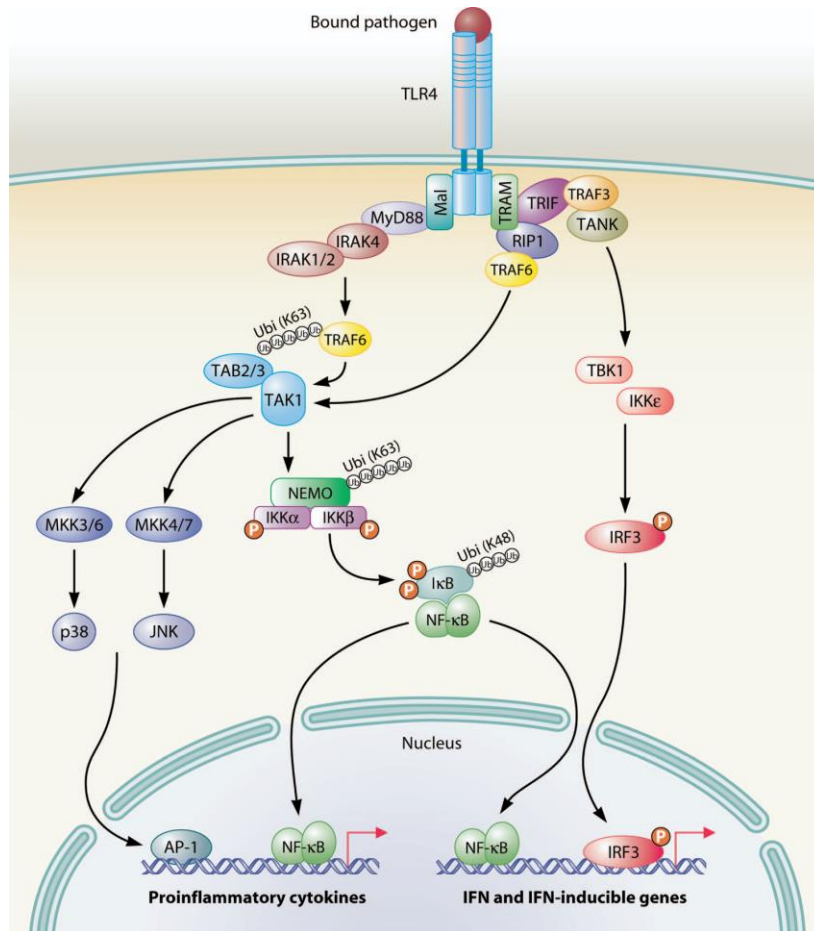


Figura 2: Via de Sinalização ativada por TLR4. Mogensen 2009.

1.3. Mecanismos celulares da neuroinflamação

A neuroglia, ou simplesmente glia, que compreende além de astrócitos, microglia e oligodendrócitos, foi vista como tendo uma única função de proporcionar orientação, suporte estrutural e servir como fonte de nutrientes e isolamento para os neurônios (Van Eldik & Wainwright 2003), pois nenhum de seus tipos celulares apresentam axônio e nem a habilidade de formar potenciais de ação (Wang & Bordey 2008). Contudo, nas últimas décadas, novas pesquisas demonstraram que os astrócitos não são somente suportes passivos da arquitetura e homeostase neuronal sem papel na integração de

sinal, mas sim participantes ativos com neurônios em todas as funções essenciais do encéfalo (Sofroniew & Vinters 2010).

A imunidade inata é um componente constitutivo do SNC e depende fortemente de células residentes como a microglia, entretanto, estudos mostram que os astrócitos participam da resposta imunológica, desencadeada por uma variedade de insultos. Deste modo, os astrócitos juntamente com a microglia apresentam um papel fundamental no processo neuroinflamatório e são reconhecidos como participantes ativos em várias condições patológicas ou doenças neurodegenerativas crônicas (Liu *et al.* 2011).

1.3.1. Microglia

A microglia é um fagócito mononuclear, derivado de progenitores da linhagem mielóide e está envolvida na resposta imune e inflamatória (Ransohoff & Cardona 2010). Estas células, vistas como macrófagos residentes do SNC, são derivadas do saco vitelino durante a embriogênese e colonizam o cérebro em desenvolvimento onde persistem ao longo da vida do indivíduo (Perry & Holmes 2014).

As células microgliais constituem cerca de 10% do total de células do SNC de um humano adulto com considerável heterogeneidade na sua densidade entre as regiões desse tecido. No SNC saudável, a microglia apresenta uma morfologia complexa composta de processos altamente ramificados que se estendem de um corpo celular compacto e que continuamente exploram o ambiente entrando em contato com sinapses e regiões extra-sinápticas e também com astrócitos (Tremblay *et al.* 2010). O microambiente do SNC tem um efeito importante no fenótipo microglial. Vários ligantes expressos em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos ligam-se em receptores expressos na microglia, sinalizando através destes receptores a inibição da ativação microglial (Ransohoff & Perry 2009).

Na presença de um insulto, a microglia torna-se ativada e responde em poucos minutos a áreas muito restritas de dano tão pequenas como um único processo neuronal. Nesta condição esta célula retrai seus processos adquirindo uma forma mais amebóide, sendo capaz de migrar para o local do dano, proliferar, participar na apresentação de antígenos, fagocitar debris celulares e eliminar sinapses anormais (Tremblay et al. 2010). A microglia expressa, entre outros receptores, os TLRs de 1 ao 9 e, quando ativada, libera uma variedade de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-10, interferon- α (IFN- α), IFN- β , além de prostanóides, componentes do complemento e substâncias neurotóxicas como espécies reativas de oxigênio (EROs) e NO, sendo uma fonte importante de fatores proinflamatórios cerebrais.

1.3.2. Astrócitos

Astrócitos são células gliais especializadas, abundantes no SNC, com características fenotípicas e de citoarquitetura únicas que idealmente os posicionam a sentir e responder a mudanças no seu microambiente. Eles estendem numerosos processos formando domínios anatômicos altamente organizados com pouca sobreposição entre células adjacentes e são interconectados em redes funcionais através de junções gap (Kirchhoff *et al.* 2001). Alguns processos astrocíticos os quais expressam uma ampla gama de receptores e canais iônicos circundam as sinapses, enquanto outros estão em contato próximo com vasos sanguíneos intraparenquimais através de processos especializados chamados pés terminais. Deste modo, os astrócitos apresentam um papel importante no acoplamento neurometabólico e neurovascular (Allaman *et al.* 2011). Os astrócitos apresentam uma morfologia heterogênea sendo dividida em duas subpopulações baseadas em sua localização e morfologia: astrócitos fibrosos, que são

encontrados na substância branca e apresentam processos não ramificados, finos e longos envolvendo os nodos de Ranvier e astrócitos protoplasmáticos, os quais se localizam na substância cinzenta e possuem muitos processos ramificados que envolvem as sinapses e os pés terminais que envolvem os vasos sanguíneos (Wang & Bordey 2008). Entre algumas funções astrocíticas estão: promoção da maturação neuronal, formação das sinapses (Christopherson *et al.* 2005), regulação da angiogênese (Latterra & Goldstein 1991), indução e manutenção da barreira hemato-encefálica (Abbott *et al.* 2006), tamponamento de íons do meio extracelular como o potássio, metabolismo e captação de neurotransmissores (GABA e glutamato) (Schousboe *et al.* 1992, Allaman *et al.* 2011) suporte metabólico (Magistretti 2009), detoxificação, protegendo neurônios contra excitotoxicidade, e manutenção do microambiente viável para neurônios (Wang & Bordey 2008).

Um dos papéis mais importantes dos astrócitos no SNC é a vigilância imunológica, respondendo a lesões, patógenos ou outros insultos ativando uma resposta inflamatória crítica para a defesa ao hospedeiro (Van Eldik & Wainwright 2003). Essas células formam uma glia limitante ao redor dos vasos sanguíneos restringindo o acesso de células imunes do sangue para o parênquima cerebral, e ao contrário de outras células do SNC, são resistentes à morte por apoptose induzida por receptor, mostrando-se bem equipados para sobreviver a insultos inflamatórios (Farina *et al.* 2007). Semelhante às células microgliais, os astrócitos tornam-se ativados em resposta a vários estímulos, de mudanças sutis no microambiente a dano tecidual intenso. Este processo é conhecido como astrogliose reativa, o qual é uma resposta não homogênea e finamente graduada que varia de acordo com o tipo, gravidade e duração do insulto (Sofroniew & Vinters 2010).

1.4. Mecanismos moleculares da neuroinflamação em astrócitos

Histopatologicamente os astrócitos reativos apresentam mudanças como proliferação e sobreposição de domínios astrocíticos, podendo resultar na formação de cicatriz astrogliar, além de hipertrofia e aumento na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Pekny & Pekna 2004). A GFAP é a uma proteína de aproximadamente 50 KDa, insolúvel, regulada por fosforilação e considerada a principal proteína de filamentos intermediários em astrócitos maduros e também um importante componente do citoesqueleto durante o desenvolvimento destas células. Estudos realizados em ratos transgênicos indicaram que a expressão de GFAP não é essencial para a aparência e função normal da maioria dos astrócitos no SNC saudável, mas é essencial para o processo de astrogliose reativa e formação de “cicatriz” glial. Além disso, o aumento no imunoconteúdo de GFAP, independentemente de haver ou não proliferação astrogliar, é comumente usado como medida de astrogliose. Estudos mostram que a GFAP não está presente em todo o citoplasma astrocítico e a imunistoquímica para GFAP não marca todas as partes da célula, mas somente as principais ramificações, estando ausente nos processos finamente ramificados e frequentemente não detectável no corpo celular (Sofroniew & Vinters 2010). Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram outras funções da GFAP, como migração celular, funcionamento adequado da BHE, vias de transdução de sinal e interações neurônio-glia (Middeldorp & Hol 2011).

Os astrócitos expressam vários tipos de PRRs incluindo os receptores TLRs (TLRs 2, 3, 4, 5 e 9) (Farina et al. 2007, Bowman *et al.* 2003). Através da ligação a estes receptores, os astrócitos respondem a insultos como, por exemplo, LPS tanto *in vivo* como *in vitro* com aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α , IL-12, citocinas anti-inflamatórias como IL-10, fatores neurotróficos como fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), enzimas como óxido nítrico sintase

induzível (iNOS), quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, a proteína molecular de adesão intercelular 1 (ICAM 1) e proteína de adesão celular vascular 1 (VCAM 1) podendo ativar e atrair a infiltração de células imunes como leucócitos, células T e monócitos da periferia para o SNC (Carpentier *et al.* 2005). Também foi visto que ligantes de TLRs em cultura de astrócitos são mais potentes indutores de funções da imunidade inata, enquanto citocinas como INF- γ e TNF- α são indutores mais potentes de funções da imunidade adaptativa como, por exemplo, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (Carpentier *et al.* 2005).

Entre as células neurais, os astrócitos são as células mais resistentes ao estresse oxidativo e proporcionam proteção aos neurônios principalmente devido a seu alto conteúdo de glutathiona (GSH), um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina e também considerado o principal antioxidante cerebral (Aoyama *et al.* 2008). Além disso, a GSH é secretada por astrócitos e, quando clivada no dipeptídeo cisteína-glicina no espaço extracelular, serve de substrato para síntese da GSH pelos neurônios (Dringen *et al.* 2000). A habilidade para reduzir ou sintetizar GSH é um importante fator que determina como se encontra o estado redox celular, visto que o estresse oxidativo tem sido associado com o desenvolvimento de condições patológicas como as doenças neuroinflamatórias.

Devido a sua função na resposta imunológica no SNC, nos últimos anos, os astrócitos têm sido amplamente citados pela sua contribuição no início e progressão da maioria das doenças neurodegenerativas (Parpura *et al.* 2012). Um importante marcador de ativação astrogliar e ou morte em várias condições de dano cerebral é a proteína S100B.

A proteína S100B é um membro da família de proteínas S100 assim denominadas por serem solúveis em uma solução 100% saturada de sulfato de amônio (Moore 1965).

Essas proteínas são ligantes de cálcio do tipo EF hand e compreendem 25 membros, expressos de maneira específica para cada tipo celular. Como a maioria dos outros membros da família S100, a S100B têm uma estrutura homodimérica onde cada monômero beta é de aproximadamente 10.5 kDa, tendo dois sítios de ligação ao cálcio do tipo EF hand e sítios independentes para ligação ao zinco, e também duas pontes dissulfeto, mas a estrutura dimérica é mantida independente deste aspecto (Donato 2001). A S100B é expressa em um restrito número de tipos celulares como: astrócitos, linfócitos, oligodendrócitos maduros, células progenitoras neurais, certas populações neuronais, adipócitos entre outras, e sua expressão também está aumentada em vários tumores, no cérebro de idosos, no cérebro de pacientes afetados pela doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia crônica, infecção por HIV entre outras condições patológicas cerebrais (Donato *et al.* 2009). O gene humano que codifica a S100B está no cromossomo 21q22.3 com consequente super expressão da proteína na síndrome de Down (Mrak & Griffin 2004).

A S100B no SNC é principalmente expressa e predominantemente secretada por astrócitos constitutivamente e em resposta a estímulos com vários agentes (Pinto *et al.* 2000), incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Edwards & Robinson 2006) e IL1 β , envolvendo a via das MAPK e sinalização via NF- κ B (de Souza *et al.* 2009). A S100B possui efeitos parácrinos e autócrinos nas células gliais, neurônios e microglia. Esta proteína tem muitos alvos intracelulares estando envolvida na regulação de proteínas do citoesqueleto (GFAP, por exemplo) (Frizzo *et al.* 2004), moduladores do ciclo celular (p53) (Lin *et al.* 2001) e a proteína fosfatase calcineurina (Leal *et al.* 2004). Além de alvos intracelulares, a S100B apresenta efeitos extracelulares observados em culturas neuronais dependendo de sua concentração, uma vez que em concentrações picomolar e nanomolar apresenta efeito trófico, enquanto em concentrações

micromolar, efeito apoptótico. Estes efeitos envolvem ativação via receptor RAGE de vias de sinalização como ERK e NF- κ B (Donato et al. 2009). Um aspecto importante a ser considerado é que expressão genética, a expressão protéica e a secreção da proteína S100B podem ser eventos independentes (Swarowsky *et al.* 2008). Estudos em culturas de astrócitos de ratos indicam que variações da S100B extracelular não são necessariamente acompanhadas por mudanças no conteúdo intracelular desta proteína como visto com altos níveis de amônia a qual aumentou a secreção de S100B sem alterar seu conteúdo intracelular (Leite *et al.* 2006). Por outro lado, cultura de astrócitos em meio com altos níveis de glicose mostrou uma diminuição na secreção e no conteúdo intracelular de S100B (Nardin *et al.* 2007).

A S100B tem sido vista como um útil marcador molecular e periférico de dano cerebral (Gonçalves *et al.* 2008) em várias situações agudas ou crônicas. Um dos motivos para este conceito vem do fato da S100B estar implicada no ciclo das citocinas, uma teoria proposta para a doença de Alzheimer (Griffin 2006). Em situações que levem à injúria no SNC como, por exemplo, um processo inflamatório, astrócitos e microglia, estão ativados. A microglia ativada superexpressa a citocina IL-1 β , a qual ativa os astrócitos, levando a um aumento da expressão de S100B por estas células (Sheng *et al.* 1996). Estudos mostram que a ligação da S100B ao receptor RAGE na linhagem microglial BV-2 resulta na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 os quais cooperam para estimular IL-1 β , TNF- α e a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), contribuindo assim para a neuroinflamação (Bianchi *et al.* 2008).

A enzima COX-2 é a enzima limitante na síntese das prostaglandinas mediadoras da inflamação como a prostaglandina E₂ (PGE₂). Sua expressão no cérebro é altamente regulada em condições fisiológicas, e tem sido mostrado que sua expressão é dividida em duas fases: precocemente em neurônios e mais tarde em células não neuronais, como

astrócitos (Takemiya *et al.* 2007). Estudos mostram que culturas de astrócitos de ratos tratadas com LPS aumentam a produção de prostaglandinas via ativação de COX-2 com um evidente envolvimento de NF- κ B (Pistritto *et al.* 1999).

Vários estudos têm considerado a elevação nos níveis de S100B como um componente de resposta neuroinflamatória, particularmente em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, porém é muito difícil a comparação dos níveis de S100B em cultura de células com aqueles encontrados no líquido ou soro, uma vez que estes níveis refletem várias possíveis fontes de S100B. No entanto estudos recentes mostram que a secreção de S100B pode ser modulada por citocinas pró-inflamatórias como IL6 (de Souza *et al.* 2013) e IL1 β (de Souza *et al.* 2009) provavelmente através da via da MAPK.

1.5. LPS como um modelo de neuroinflamação

O LPS é uma molécula de lipopolissacarídeo que constitui a bicamada lipídica de bactérias gram-negativas, como por exemplo, a bactéria *Escherichia coli*, sendo crítico na estabilidade da membrana. Sua molécula é composta por três domínios distintos: uma cadeia lateral de polissacarídeo (Antígeno O) ligada à região do “core”, um oligossacarídeo (2-ceto-3-ácido deoxioctônico), que está ligado a uma molécula lipídica (Lipídeo A). O antígeno O varia entre as espécies de bactérias gram-negativas tanto em composição como em comprimento, enquanto o core e o lipídeo A são mais conservados entre as diferentes espécies destas bactérias. O domínio lipídeo A é o componente bioativo e tóxico da endotoxina reconhecido durante a infecção humana (Leon *et al.* 2008).

O LPS é uma molécula essencial, uma vez que sua presença é crítica na estabilidade da membrana bacteriana e tem um papel proeminente na intensificação da resposta imunológica (Janeway & Medzhitov 2002); ele tem sido implicado como a molécula responsável por uma variedade de patologias que vão de leves como febre a letais como choque séptico e morte. Esta molécula desencadeia a liberação de muitas citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e é provavelmente o estímulo mais frequentemente usado para desencadear vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica (Glezer *et al.* 2007).

A via de sinalização intracelular desencadeada por LPS envolve primeiramente sua ligação ao receptor TLR4 (Figura 3). O LPS se liga com a proteína ligante de LPS (LBP) e também à proteína CD14 ancorada na membrana da célula alvo, a qual transfere o LPS para o receptor TLR4 de uma maneira dependente da glicoproteína extracelular MD-2; através do domínio TIR, ocorre o recrutamento do MyD88 que se associa com a proteína cinase IRAK4 que interage com IRAK, a qual ativa o TRAF6 seguindo da ativação do NF- κ B e do AP-1 (Glezer *et al.* 2007).

Embora muitos estudos usem o LPS como modelo de sepse (Takaoka *et al.* 2014, Kaplanski *et al.* 2014, Mihaylova *et al.* 2014), a qual é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica desencadeada por fatores infecciosos (Salomao *et al.* 2012), o LPS tem sido o ativador glial mais extensivamente utilizado por pesquisadores em modelos de neuroinflamação *in vivo* e *in vitro*. Estudos *in vitro* mostram que cultura de astrócitos neonatais de diferentes regiões cerebrais exibe diferenças na expressão de fatores pro-inflamatórios sob estímulo com LPS (Kipp *et al.* 2008), assim como em outro estudo usando o mesmo modelo *in vitro* mostrou que o LPS induz uma regulação positiva de enzimas responsáveis pela síntese de PGE₂ e uma regulação negativa de enzimas que catalisam a sua degradação (Johann *et al.* 2008).

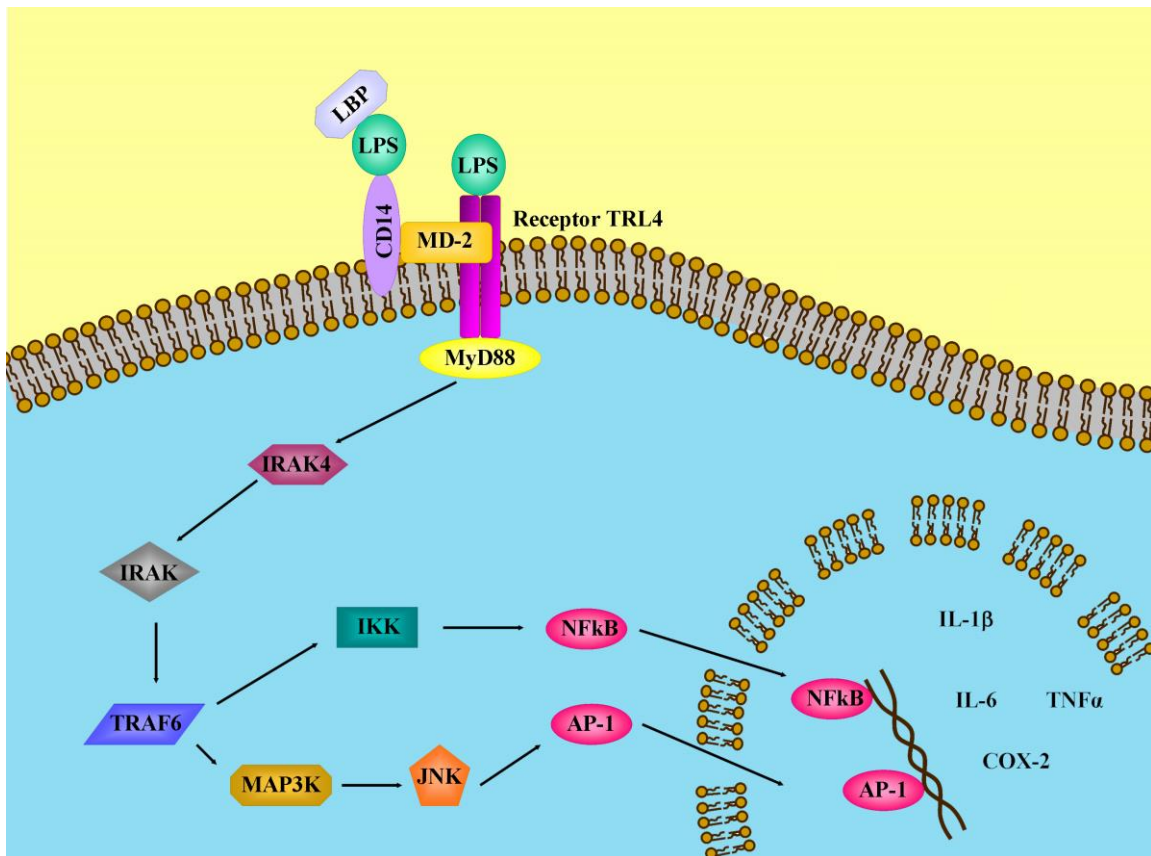


Figura 3: Sinalização por LPS

Um estudo *in vivo* usando injeção intracerebroventricular de LPS para mimetizar um quadro de inflamação cerebral em camundongos, mostrou ocorrer um recrutamento e adesão de leucócitos a microvasculatura cerebral e que este recrutamento é mediado por células que apresentam a via de sinalização TLR4/CD14 como a microglia, e que a sinalização por TNF- α é crítica para o recrutamento de leucócitos (Zhou *et al.* 2006).

Entretanto ainda não há estudos mostrando o efeito desta molécula sobre a secreção e o imunocntéudo da proteína S100B, uma vez que esta também tem sido mostrada uma peça importante no processo inflamatório.

1.6. Anti-inflamatórios e neuroinflamação

Uma vez que a neuroinflamação tem sido implicada na patogênese ou progressão de uma variedade de doenças neurodegenerativas, nos últimos anos vem crescendo o interesse nos efeitos benéficos de compostos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) na neurodegeneração particularmente na doença de Alzheimer (McGeer & McGeer 2007, Vlad *et al.* 2008), doença de Parkinson (Wahner *et al.* 2007) e esquizofrenia (Laan *et al.* 2009).

O principal mecanismo de ação dos AINEs é inibir a ação da enzima COX também conhecida como prostaglandina G/H sintase. A COX tem um papel crucial no processo inflamatório. Esta é uma enzima de aproximadamente 70 kDa, bifuncional e associada à membrana que age sobre o ácido araquidônico, o qual é um ácido graxo insaturado de 20 carbonos que sobre uma variedade de estímulos é liberado da membrana fosfolipídica celular sobre ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). A COX possui duas atividades enzimáticas que ocorrem em dois sítios catalíticos distintos (Vane *et al.* 1998, Simmons *et al.* 2004), catalisando duas reações sequenciais: atividade da ciclooxigenase que catalisa a oxidação e ciclização do ácido araquidônico até o hidroperóxido PGG₂ e atividade de peroxidase que catalisa a peroxidação da PGG₂ até o hidroperóxido prostaglandina H₂ (PGH₂), a qual é convertida por várias sintases e isomerases específicas celulares produzindo cinco prostanóides biologicamente ativos: PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂). Estes produtos agem como mensageiros interagindo com receptores prostanóides acoplados a proteína G além de outros receptores (Rao & Knaus 2008).

Existem duas isoformas da enzima COX: COX1 e COX2. Estas apresentam alta similaridade na cinética, mecanismo catalítico e na estrutura do sítio ativo, mas

apresentam uma diferença estrutural crucial neste último ítem que é a substituição da isoleucina 523 na COX1 por uma valina 523 na COX2, o que torna o sítio da COX2 maior, essa diferença é importante na seleção do tipo de droga que poderá se ligar a cada isoforma. Além disso, elas apresentam diferentes reatividades a substratos lipídicos. A COX1 apresenta alosterismo negativo em baixas concentrações de ácido araquidônico, sendo a COX2 capaz de se ligar mais facilmente ao ácido araquidônico do que a COX1 quando expressas na mesma célula (Smith *et al.* 2000).

A enzima COX1 é expressa na maioria dos tecidos e tipos celulares e é constitutivamente ativa, tendo um papel crucial na manutenção e homeostase da fisiologia celular em geral, através da síntese de precursores prostanóides (Dubois *et al.* 1998). A COX1 apresenta uma função importante nas plaquetas, onde é responsável por produzir precursores para a síntese de tromboxanos, responsáveis pela agregação plaquetária. Outra importante ação desta isoforma é na proteção da mucosa gástrica, onde produz PGE₂ responsável pela produção de muco e secreção de bicarbonato e também prostaciclina capaz de alterar o fluxo sanguíneo na microcirculação da mucosa gástrica (Miller 2006). No SNC esta isoforma é expressa predominantemente em células microgliais e imediatamente ativa a síntese de prostaglandinas em resposta à ativação microglial, sendo importante na modulação da fase inicial da resposta inflamatória (Aid & Bosetti 2011). Tem sido mostrado que a deleção genética ou farmacológica da COX1 atenua a ativação microglial, bem como, alterações na BHE em resposta ao LPS (Choi *et al.* 2008). No entanto o mecanismo exato pela qual a COX1 está envolvida na neuroinflamação não está claro.

A COX2 é a isoforma induzível e inflamatória, rapidamente expressa em vários tipos celulares em resposta a uma variedade de estímulos como, por exemplo, estímulos pró-inflamatórios. No SNC a COX2 é constitutivamente expressa em astrócitos,

microglia, células endoteliais e principalmente em neurônios glutamatérgicos corticais e hipocâmpais, onde tem um papel chave na atividade sináptica, na plasticidade sináptica de longa duração (Yang & Chen 2008) e acoplamento neurovascular durante a hiperemia funcional, mas seu papel nas doenças cerebrais não está bem estabelecido. Enquanto alguns estudos mostram que sua inibição proporciona efeitos benéficos contra dano isquêmico e morte neuronal (Candelario-Jalil & Fiebich 2008) ao contrário em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, inibidores da COX2 podem não ser sempre protetores (McGeer & McGeer 2007). Em cultura de astrócitos, o LPS induz fortemente a expressão de COX2 e a produção de PGE₂ mediado pela via de NF- κ B dependente de MYD88 e pela via das MAPKs além de também regular negativamente a expressão de COX1. Além disso, células deficientes em COX1 produzem mais PGE₂ do que células controle indicando algum efeito negativo de COX1 na produção de PGE₂ dependente de COX2 em astrócitos na presença de LPS (Font-Nieves *et al.* 2012).

1.6.1. Uso de anti-inflamatórios para patologias do SNC

A inflamação é uma reação de autodefesa com o objetivo de eliminar ou neutralizar estímulos prejudiciais e restaurar a integridade tecidual. Nas doenças neurodegenerativas a inflamação ocorre como uma resposta local conduzida primariamente por células microgliais na ausência de infiltração de leucócitos para o parênquima cerebral. Assim como a inflamação periférica, a neuroinflamação torna-se um processo nocivo, sendo amplamente aceito que deva contribuir para a patogênese de muitas doenças do SNC incluindo as doenças neurodegenerativas crônicas.

O uso de anti-inflamatórios para a doença de Alzheimer (McGeer & Rogers 1992), foi primeiro proposto no início dos anos 90. A doença de Alzheimer é a mais comum causa de demência relacionada à idade e uma das mais bem caracterizadas doenças neurodegenerativas crônicas. Duas características da doença são a formação de placas senis, que são depósitos extracelulares de peptídeo β -amiloide e emaranhados neurofibrilares, que consistem de agregados intracelulares de proteína tau hiperfosforilada nos neurônios. Em torno das placas senis, a microglia se torna ativada com consequente aumento de proteínas do complemento, citocinas, quimiocinas e radicais livres, fazendo com que a neuroinflamação se torne um ciclo vicioso, no qual vários fatores como agregados proteicos e componentes celulares ou sinapses anormais ativem mais a microglia, que por sua vez exacerba o depósito β -amiloide e o dano neuronal (Mrak & Griffin 2005). Desde então, vários estudos tem sido realizados para testar esta hipótese (Akiyama *et al.* 2000, Kotilinek *et al.* 2008, Heneka *et al.* 2005, Morihara *et al.* 2005),

Estudos em cultura de células astrogliais mostram que a aspirina é capaz de reduzir níveis proteicos e de mRNA de GFAP, sendo o NF- κ B o principal alvo da aspirina nesta regulação (Bae *et al.* 2006). Foi mostrado que aspirina bloqueia NF- κ B devido à inibição específica da cinase IKK- β (Grilli *et al.* 1996, Yin *et al.* 1998). Outro estudo mostra que a aspirina é capaz de atenuar a produção de metabólitos do ácido araquidônico em um modelo de neuroinflamação induzido por LPS em ratos (Basselin *et al.* 2011). Em um modelo de cultura neuronal para a doença de Parkinson, aspirina parece aumentar a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (Carrasco & Werner 2002) e igualmente ao ibuprofeno protege neurônios dopaminérgicos da toxicidade por glutamato, um importante fator implicado em doenças neurodegenerativas, em cultura de mesencéfalo de rato (Casper *et al.* 2000).

Em um estudo no qual neurônios corticais de ratos em cultura expostos a privação de glicose e oxigênio, a aspirina não foi capaz de alterar a captação de glutamato, mas sim inibir a liberação deste neurotransmissor via recuperação dos níveis de ATP (De Cristobal *et al.* 2002).

Estudos em cultura primária de astrócitos estimulada com citocinas pró-inflamatórias como um modelo de ativação astrocítica mostram que o diclofenaco é capaz de aumentar a produção de NO (Kakita *et al.* 2009), e a expressão da proteína aquaporina 4 (Asai *et al.* 2013) através da sinalização por $\text{NK-}\kappa\text{B}$, além de aumentar a atividade fagocítica de culturas microglias via produção de NO (Kakita *et al.* 2013). Em um modelo de doença de Parkinson induzido por rotenona em ratos, o uso de ibuprofeno foi capaz de apresentar efeitos antidepressivo e antioxidante, associado ao aumento dos níveis de GSH (Zaminelli *et al.* 2014) e também da inibição da NOX2, uma enzima envolvida na geração de EROs pertencente à família NOX de NADPH oxidases, em um modelo de doença de Alzheimer (Wilkinson *et al.* 2012). Além disso, ele foi capaz de amenizar a astrogliose através da diminuição de GFAP em um modelo de demência com camundongos transgênicos expressando corpos de Lewy (Sekiyama *et al.* 2012). Em modelo de isquemia cerebral, o ibuprofeno proporcionou neuroproteção ao dano neuronal excitotóxico em culturas corticais mistas de astrócitos e neurônios (Iwata *et al.* 2010).

A Nimesulida, inibidor seletivo da COX2, confere proteção ao dano cerebral isquêmico através de redução do dano oxidativo (Candelario-Jalil *et al.* 2003), além de ser capaz de atenuar a expressão de GFAP e produção de mediadores proinflamatórios em modelo de neuroinflamação utilizando LPS (Niranjan *et al.* 2010).

Em relação aos anti-inflamatórios esteroidais, a dexametasona parece ser capaz de modular a sinalização de cálcio em astrócitos (Simard *et al.* 1999) e também pode

proteger neurônios da toxicidade por glutamato através da diminuição do cálcio intracelular (Suwanjang *et al.* 2013). O uso de dexametasona em culturas microgliais na presença de LPS diminui a produção de espécies reativas de oxigênio via regulação positiva de MKP-1 (Huo *et al.* 2011). Em co-cultura de astrócito e microglia, a dexametasona foi capaz de aumentar a comunicação celular por junção gap, aumentando a expressão da proteína conexina 43 (Hinkerohe *et al.* 2011). Em um modelo de meningite bacteriano de co-cultura com LPS, dexametasona foi capaz de diminuir a ativação microglial e aumentar conexina 43 (Hinkerohe *et al.* 2010).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do LPS e de anti-inflamatórios sobre parâmetros gliais envolvidos na neuroinflamação na presença e ausência de LPS.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Avaliar o efeito da exposição a diferentes concentrações de LPS sobre a secreção de S100B e o conteúdo de GSH em culturas primárias de astrócitos, bem como em fatias frescas hipocâmpais de ratos Wistar.
- 2.2.2. Avaliar o efeito da exposição a diferentes concentrações de LPS sobre o conteúdo de GFAP e S100B e sobre a secreção de TNF- α em culturas primárias de astrócitos.
- 2.2.3. Avaliar o efeito da administração central (injeção ICV) ou periférica (injeção IP) de LPS sobre as concentrações de S100B e TNF- α no soro e líquido de ratos Wistar.
- 2.2.4. Avaliar o efeito de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais sobre diferentes parâmetros gliais (imunoconteúdo e secreção de S100B, conteúdo de GSH, imunoconteúdo de GFAP e secreção de TNF- α) em culturas primárias de astrócitos.
- 2.2.5. Avaliar o efeito de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais na presença de LPS sobre diferentes parâmetros gliais (imunoconteúdo e secreção de S100B, conteúdo de GSH, imunoconteúdo de GFAP e secreção de TNF- α) em culturas primárias de astrócitos.

PARTE II

Capítulo I

Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid
and astrocyte cultures from rats

Artigo publicado no periódico “Journal of Neuroinflammation”.

RESEARCH

Open Access

Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats

Maria Cristina Guerra[†], Lucas S Tortorelli[†], Fabiana Galland, Carollina Da Ré, Elisa Negri, Douglas S Engelke, Letícia Rodrigues, Marina C Leite^{*} and Carlos-Alberto Gonçalves

Abstract

Background: Inflammatory responses in brain are primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes. S100B, a calcium-binding protein secreted by astrocytes, has properties of a neurotrophic or an inflammatory cytokine. However, it is not known whether primary signals occurring during induction of an inflammatory response (e.g. lipopolysaccharide, LPS) directly modulate S100B.

Methods: In this work, we evaluated whether S100B levels in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of Wistar rats are affected by LPS administered by intraperitoneal (IP) or intracerebroventricular (ICV) injection, as well as whether primary astrocyte cultures respond directly to lipopolysaccharide.

Results: Our data suggest that S100B secretion in brain tissue is stimulated rapidly and persistently (for at least 24 h) by ICV LPS administration. This increase in CSF S100B was transient when LPS was IP administered. In contrast to these S100B results, we observed an increase in TNF α levels in serum, but not in CSF, after IP administration of LPS. In isolated astrocytes and in acute hippocampal slices, we observed a direct stimulation of S100B secretion by LPS at a concentration of 10 μ g/mL. An involvement of TLR4 was confirmed by use of specific inhibitors. However, lower levels of LPS in astrocyte cultures were able to induce a decrease in S100B secretion after 24 h, without significant change in intracellular content of S100B. In addition, after 24 h exposure to LPS, we observed a decrease in astrocytic glutathione and an increase in astrocytic glial fibrillary acidic protein.

Conclusions: Together, these data contribute to the understanding of the effects of LPS on astrocytes, particularly on S100B secretion, and help us to interpret cerebrospinal fluid and serum changes for this protein in neuroinflammatory diseases. Moreover, non-brain S100B-expressing tissues may be differentially regulated, since LPS administration did not lead to increased serum levels of S100B.

Keywords: astrocyte, GFAP, glutathione, LPS, TLR4, S100B

Background

S100B is a small very soluble calcium-binding protein that is highly expressed and secreted by astrocytes in the central nervous system (see [1] for a review). This protein has many putative intracellular targets (e.g. glial fibrillary acidic protein, GFAP) and, like other protein members of the S100 family, is involved in regulation of

the cytoskeleton and the cell cycle. Moreover, extracellular S100B at nanomolar levels in *in vitro* assays has trophic effects on astrocytes, neurons and microglia. Many modulators of S100B secretion have been described in astrocyte preparations, such as forskolin, lyso-phosphatidic acid [2], fluoxetine [3] and kainate [4]. S100B secretion is also affected by metabolic stress conditions such as elevated concentrations of glutamate [5], glucose [6] and ammonium [7]. Other cells in the brain (e.g. oligodendrocytes [8]) and outside (e.g. adipocytes [9]) also express this protein, but whether S100B is

* Correspondence: marina.leite@ufrgs.br

† Contributed equally

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, Brazil

secreted by these cells and which secretagogues are involved remain to be better characterized.

S100B has been proposed as a marker of astroglial activation in brain disorders, and changes in its cerebrospinal fluid and/or serum content have been associated with various neurological and psychiatric diseases [10,11]. Such disorders commonly have an important inflammatory component, in which S100B has often been thought of as a cytokine. Recently, we demonstrated that IL-1 β modulates S100B secretion in astrocyte cultures and hippocampal slices [12]. Moreover there is evidence that S100B modulates and is modulated by pro-inflammatory cytokines [13-15]. However, we do not know if primary signals in the induction of inflammatory responses (e.g. LPS) directly modulate S100B.

Astrocytes are the most abundant glial cells in the brain, where they play key roles in neurotransmitter metabolism, antioxidant defense and regulation of extracellular concentration of potassium [16]. GFAP, as mentioned above, is a specific marker of astrocytes and, frequently, its elevation is a strong sign of astrogliosis, which occurs in several conditions involving brain injury [17].

LPS, a component of the cell wall of gram-negative bacteria, has been widely used experimentally to stimulate inflammatory responses, including in the central nervous system (e.g. [18]). Inflammatory response in the brain is primarily mediated by microglia, but growing evidence suggests a crucial importance of astrocytes as well [19]. Like microglia, these cells have a toll-like receptor type 4 (TLR4), which belongs to TLR family receptors in the vertebrate immune system and specifically recognizes LPS [20].

Recent studies have shown that astrocytes respond to LPS, decreasing expression of proteins such as gap junction proteins [21], and increasing expression of others such as GFAP and glutathione-S-transferase [22,23]. Interestingly, we have demonstrated that gap junction inhibitors increase secretion of S100B from astrocytes and hippocampal slices [24].

Our working hypothesis was that S100B is released by astrocytes as a cytokine in response to LPS. In this study, we evaluated whether S100B content in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of rats is affected by LPS administered by intraperitoneal or intracerebroventricular injection, as well as whether astrocyte cultures and acute hippocampal slices respond directly to LPS. In parallel, we investigated whether LPS affects the content of GFAP and glutathione in astrocyte cultures, as indices of astrogliosis (GFAP) and antioxidant defense (based on capacity for synthesis and release of glutathione). Moreover, we measured the profile of secretion of TNF α , a cytokine that is well-known to respond to LPS.

Methods

Materials

Poly-L-lysine, antibody anti-S100B (SH-B1), methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), neutral red, and lipopolysaccharides from *Escherichia coli* (LPS) 055:B5 were purchased from Sigma [St. Louis, USA]. Fetal calf serum (FCS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and other materials for cell culture were purchased from Gibco [Carlsbad, USA]. Polyclonal anti-S100B and anti-rabbit peroxidase linked were purchased from DAKO [São Paulo, Brazil] and GE [Little Chalfont United Kingdom], respectively. Inhibitors for TLR4 (CLI-095 and OxPAPC) were from InVivoGen [San Diego, USA].

Surgical procedure for intracerebroventricular (ICV) LPS infusion

Procedures were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Adult Wistar rats (90 days old) were used. For ventricular access, the animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus. A midline sagittal incision was made in the scalp and one burr hole was drilled in the skull over both ventricles. The following coordinates were used: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the brain surface [25]. The rats received 5 μ L ICV/side of LPS 2.5 μ g/ μ L or phosphate-buffered saline (control). After the surgical procedure, rats were kept in a stereotaxic holder for 30 min or 24 h and CSF was obtained by puncture of the cisterna magna using an insulin syringe. A maximum volume of 30 μ L was collected over a 3-min period to minimize risk of brain stem damage. The blood samples were collected by careful intracardiac puncture, using a 5-mL non-heparinized syringe to obtain 3 mL of blood. Blood samples were incubated at room temperature (25°C) for 5 min and centrifuged at 3200 rpm for 5 min to obtain serum. Cerebrospinal fluid and serum samples were frozen (-70°C) until used for S100B or TNF α analysis.

Intraperitoneal (IP) LPS infusion

Wistar rats (90 days old) were used for intraperitoneal injection of 0.3 mL of LPS, 250 μ g/Kg, or phosphate-buffered saline (control). After 30 min or 24 h, the animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus for CSF puncture. Blood samples were obtained by intracardiac puncture, and the animals were killed by decapitation.

Cell culture

Primary astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described [26]. Procedures were

carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Briefly, cerebral cortices of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and mechanically dissociated in Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free balanced salt solution, pH 7.4, containing (in mM): 137 NaCl; 5.36 KCl; 0.27 Na_2HPO_4 ; 1.1 KH_2PO_4 and 6.1 glucose. The cortices were cleaned of meninges and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1400 RPM for 5 min the pellet was resuspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.39 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO_3 , 0.1% amphotericin, 0.032% gentamicin and 10% fetal calf serum (FCS). Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO_2 /95% air at 37°C, allowed to grow to confluence, and used at 15 days in vitro.

Hippocampal slices

Hippocampal slices were prepared as previously described [27]. Procedures were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Thirty-day old Wistar rats were killed by decapitation and the brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 ; 25 HEPES; 1 KH_2PO_4 , and 10 glucose, adjusted to pH 7.4 and previously aerated with O_2 . 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). Following a 120-min equilibration period, the medium was removed and replaced with physiological saline with or without LPS for 60 min at 30°C on a warm plate. Afterwards, media were collected and stored at -70°C until used for assay of S100B or $\text{TNF}\alpha$.

S100B measurement

S100B was measured by ELISA, as previously described [28]. Briefly, 50 μl of sample plus 50 μl 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. Color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/ml.

GFAP measurement

ELISA for GFAP was carried out, as previously described [29], by coating microtiter plates with 100 μL samples for

24 h at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard human GFAP (from Calbiochem) curve ranged from 0.1 to 5 ng/mL.

MTT reduction assay

Cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) for 30 min in 5% CO_2 /95% air at 37°C. Afterwards, the media was removed and MTT crystals were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650 nm. The reduction of MTT was calculated as (absorbance at 560 nm) - (absorbance at 650 nm).

Neutral red uptake

Neutral red incorporation was carried out as previously described [24] with modifications. Cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ neutral red (NR) for 30 min in 5% CO_2 /95% air at 37°C. Afterwards, the cells were rinsed twice with PBS for 5 min each and NR dye taken up by viable cells was extracted with 500 μL of acetic acid/ethanol/water (1/50/49). Absorbance values were measured at 560 nm.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

Lactate dehydrogenase assay was carried out in 50 μL of extracellular medium, using a commercial colorimetric assay from Doles (Goiânia, Brazil).

Glutathione content

Glutathione content was determined as previously described [30]. Briefly, hippocampal slices or astrocyte cultures were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthalaldehyde (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 glutathione solutions (0-500 μM).

Tumor necrosis factor α ($\text{TNF}\alpha$) measurement

This assay was carried out in 100 μL of CSF, serum or extracellular medium, using a rat $\text{TNF}\alpha$ ELISA from eBioscience (San Diego, USA).

Statistical analysis

Parametric data are reported as mean \pm standard error and were analyzed by Student's *t* test (when two groups were considered) or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test, in the SPSS-16.0. Data from GFAP, S100B and $\text{TNF}\alpha$ measurements were

log-transformed to satisfy the assumption of the statistical tests when necessary. Tests are specified in the legends, with level of significance set at $p < 0.05$.

Results

LPS induces increases in S100B levels in cerebrospinal fluid, but not in serum

Anesthetized adult rats received 10 μL ICV of 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ LPS or phosphate-buffered saline (control). CSF and blood were collected at 30 min or 24 h after LPS administration. A significant increase in CSF S100B was observed at 30 min ($p = 0.009$) and 24 h ($p = 0.003$) (Figure 1A), without significant changes in S100B serum content ($p = 0.99$, 30 min and $p = 0.47$, 24 h) (Figure 1B). Interestingly, when rats received IP LPS (250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ body) they also exhibited an increase in CSF S100B at 30 min ($p = 0.007$), but not at 24 h ($p = 0.68$) (Figure 1C), and again no significant changes in serum S100B were observed when compared with controls that received phosphate-buffered saline ($p = 0.28$, 30 min and

$p = 0.32$, 24 h) (Figure 1D). Notice that, assuming a mean body weight of rats of 0.3 Kg, the amount of LPS administered IP and ICV was 75 and 25 μg , respectively.

LPS directly affects astrocytic S100B secretion, apparently without changing the intracellular content of this protein

In order to investigate whether this effect was attributable to a direct effect of LPS on astrocytes, we added different concentrations of LPS (from 0.01 to 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to primary astrocyte cultures and extracellular S100B was measured at 1 h (Figure 2A) and 24 h (Figure 2B). At 1 h, LPS (at concentrations from 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ upwards) increased S100B secretion ($p < 0.001$, ANOVA). Conversely, at 24 h, LPS caused a decrease in S100B secretion, even with LPS concentrations as low as 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.001$). Acute hippocampal slices were also exposed to LPS for 1 h (Figure 2C) and a decrease in S100B secretion was observed at LPS concentrations from 0.1 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0.001$). However, LPS at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produced an increase in S100B secretion ($p < 0.001$). In order to characterize whether the effect of

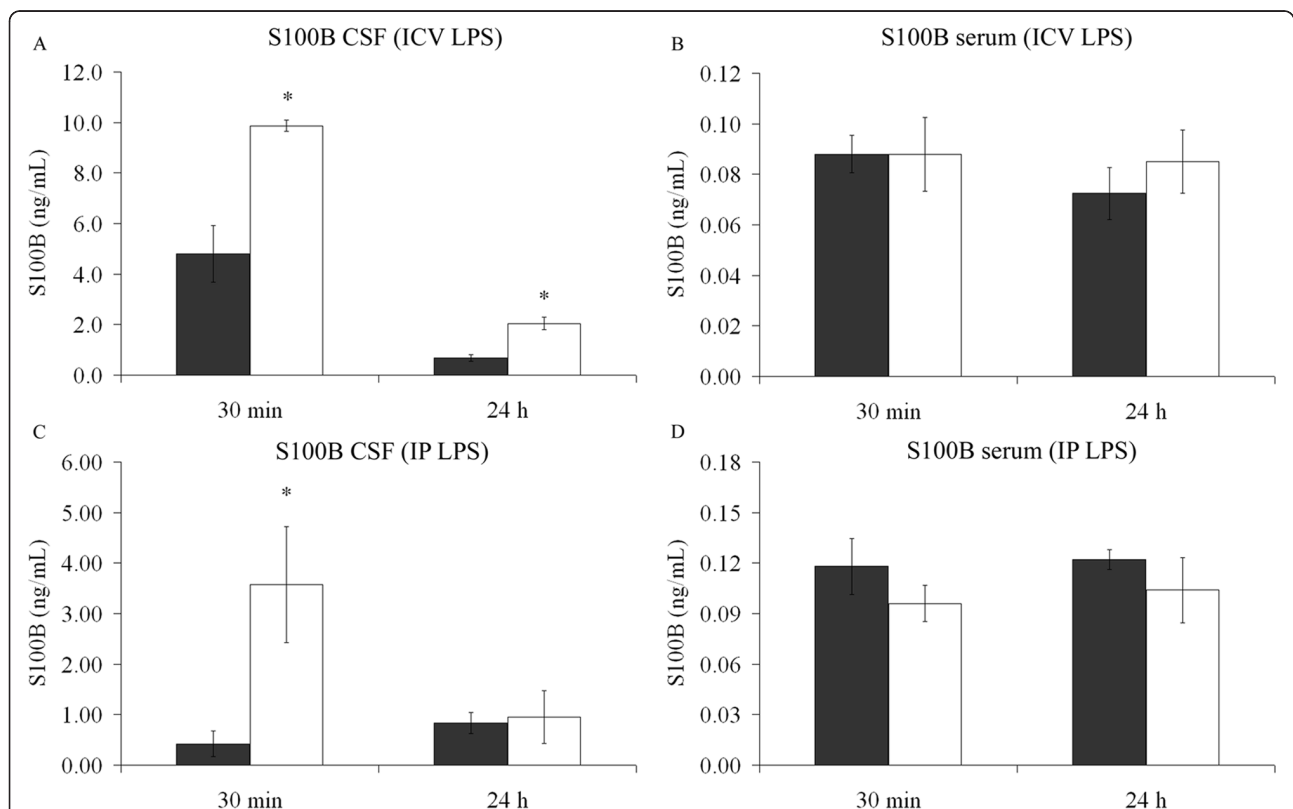


Figure 1 LPS induces increased levels of S100B in cerebrospinal fluid (CSF), but not in serum. Intracerebroventricular injection of LPS, or saline solution, was carried out in adult Wistar rats under anaesthesia. After 30 min or 24 h, cerebrospinal fluid was collected by magna puncture (A) and blood by intracardiac puncture (B). The control group is represented by grey bars and the LPS-treated group is represented by open bars. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. Intraperitoneal infusion of LPS, or saline solution, was carried out in adult Wistar rats under anaesthesia. After 30 min or 24 h, CSF was collected by magna puncture (C) and blood by intracardiac puncture (D). The control group is represented by grey bars and the LPS-treated group is represented by open bars. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 rats per group. * Significantly different from respective control (Student t test, $p < 0.05$).

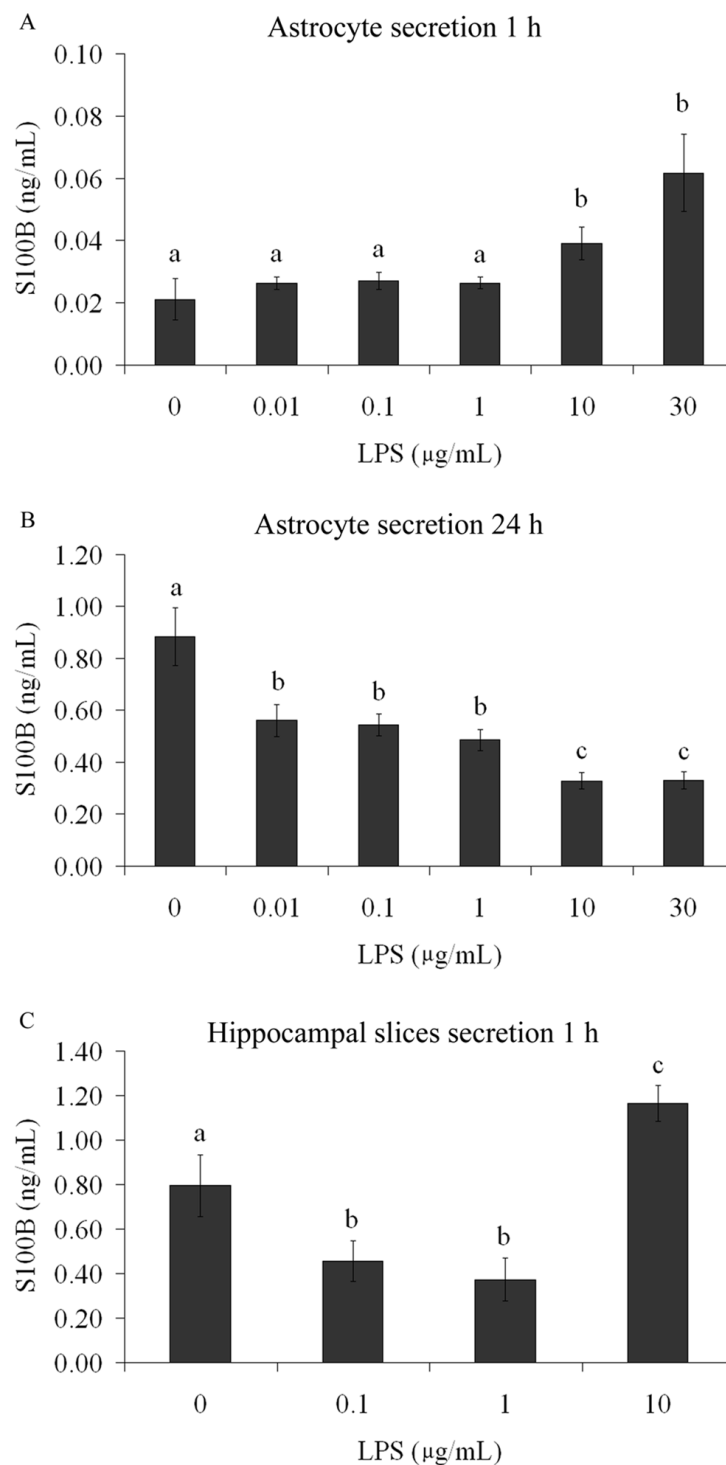


Figure 2 S100B secretion is modified by LPS in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the presence or absence of LPS (from 0.01 to 30 $\mu\text{g/mL}$). S100B was measured by ELISA at 1 h (A) and 24 h (B). Each value is a mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different, assuming $p < 0.05$. (C) Adult Wistar rats were killed by decapitation and 0.3 mm hippocampal slices were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, hippocampal slices were exposed to LPS (from 0.1 to 10 $\mu\text{g/mL}$) and the extracellular content of S100B measured by ELISA at 1 h. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$).

LPS is mediated by TLR4, we incubated astrocytes with specific inhibitors for this receptor (Cli-095 and OxPAPC, at 1 μ M and 30 μ g/mL, respectively). Both CLI-095 (Figure 3) and OxPAPC (data not shown) abolished the effect of LPS. It is important to mention that OxPAPC *per se* increased S100B secretion and therefore it is difficult to affirm that this inhibitor prevented the effect induced by LPS.

After 24 h of exposure to LPS, we measured S100B and GFAP content in lysed preparations of astrocyte cultures (Figure 4A and 4B, respectively). No significant changes were observed in S100B content ($p = 0.85$), but interestingly an increase in GFAP content was observed at all concentrations of LPS ($p = 0.04$).

LPS decreases glutathione content, but does not affect cell viability and integrity

Another parameter analyzed to evaluate astroglial activity was intracellular content of glutathione. After exposure of astrocytes to LPS (at concentrations from 0.01 to 30 μ g/mL), we observed a decrease in intracellular content of glutathione after 24 h ($p = 0.011$), but not at 1 h ($p = 0.49$) (Figure 5A and 5B). Hippocampal slice preparations also exhibited a decrease in glutathione content after LPS exposure for 1 h ($p = 0.015$) (Figure 5C).

In order to detect a possible toxic effect of LPS in our preparations, we evaluated their capacities for MTT reduction, neutral red incorporation and LDH release. No changes in MTT reduction assay ($p = 0.25$) (Figure 6A) or in neutral red assay ($p = 0.37$) (Figure 6B) were induced in astrocyte cultures exposed to LPS (from 0.01 to 30 μ g/mL).

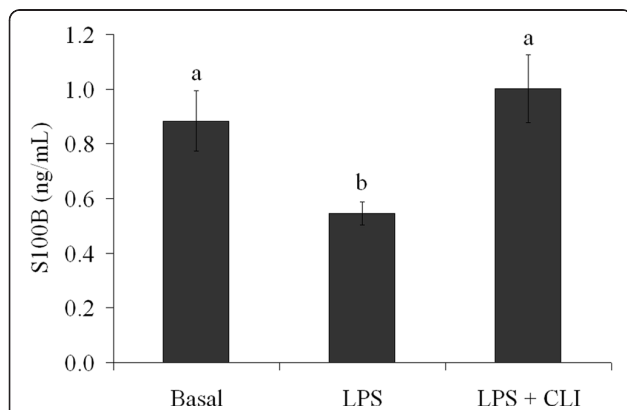


Figure 3 The LPS-induced decrease in S100B secretion is abolished by inhibition of TLR4. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the presence or absence of 0.1 μ g/mL LPS and 1 μ M CLI-095, an inhibitor of TLR4. S100B was measured by ELISA at 24 h. Each value is a mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$).

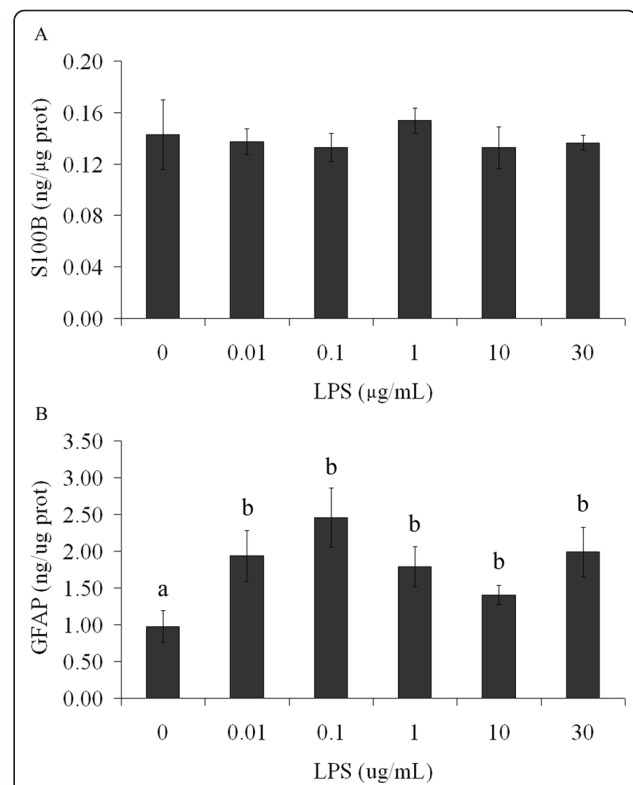


Figure 4 Intracellular GFAP content is modified by LPS without change in intracellular S100B content in astrocytes. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the presence or absence of LPS (from 0.01 to 30 μ g/mL). Cells were lysed and intracellular contents of S100B (A) and GFAP (B) were measured by ELISA. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$).

In addition, no changes in LDH release were seen (data not shown). Similar assays were also carried out in slice preparations confirming cell viability and integrity (data not shown).

LPS induces an increase in TNF α in serum, but not in CSF
 Finally, we measured the response of the classic inflammatory cytokine, TNF α , to LPS *in vivo* to confirm the activity of this compound and to compare this response to that of S100B protein. In contrast to results for S100B, at 30 min and 24 h after IP administration of LPS (approximately 75 μ g) we observed an increase in TNF α in serum ($p = 0.04$, 30 min and $p = 0.04$, 24 h), but not in CSF ($p = 0.15$, 30 min and $p = 0.34$, 24 h) (Table 1). When LPS (25 μ g) was administered ICV we found an early and transient increase in TNF α in serum ($p < 0.001$) (at 30 min) and a later increase in CSF ($p = 0.006$) (at 24 h) (Table 2). In addition, we observed an increase in LPS-induced TNF α release from astrocyte cultures at

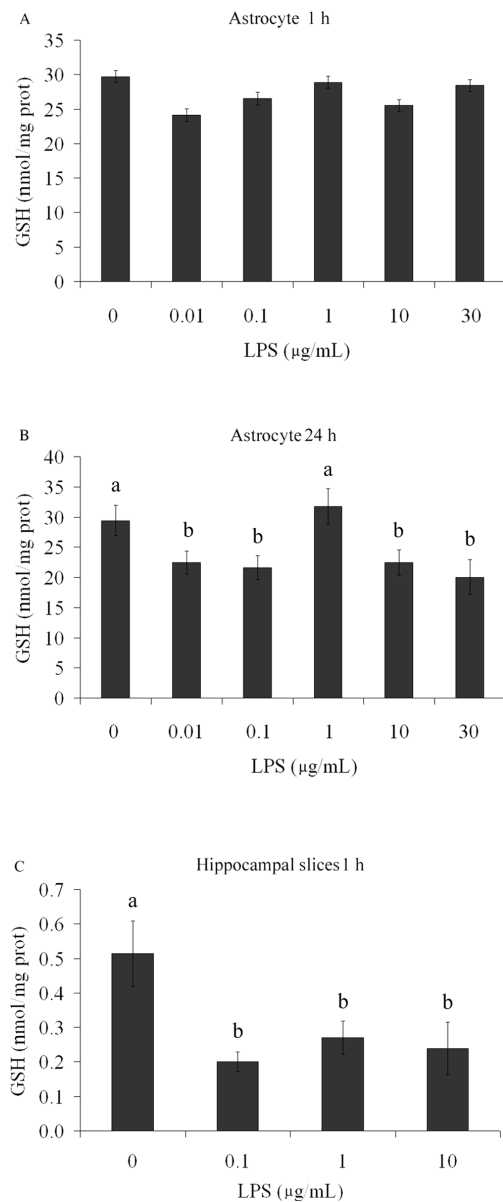


Figure 5 GSH content is modified by LPS in astrocyte cultures and hippocampal slices. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the presence or absence of LPS (from 0.01 to 30 µg/mL). Cells were lysed in 1 h (A) or 24 h (B) and intracellular GSH content was measured. Each value represents the mean (± standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$). (C) Adult Wistar rats were killed by decapitation and 0.3 mm hippocampal slices were obtained using a McIlwain chopper. After a metabolic recovery period, hippocampal slices were exposed to LPS (from 0.1 to 10 µg/mL) and intracellular content of S100B was measured by ELISA at 1 h. Each value is the mean (± standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of $p < 0.05$).

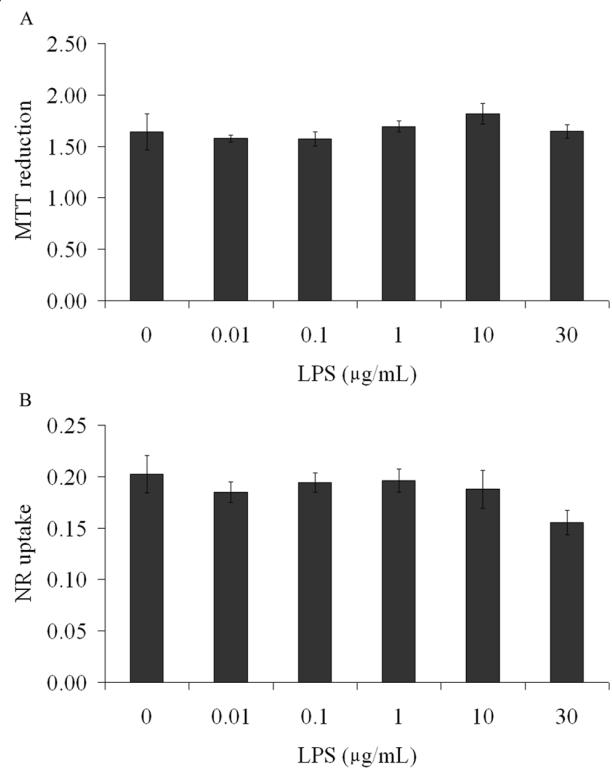


Figure 6 LPS does not affect cell viability. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. Confluent astrocytes were exposed to LPS (from 0.01 to 30 µg/mL), during 24 h. At the end, cells were incubated with MTT (A) or neutral red (B). Each value is the mean (± standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Statistical analysis was performed by one way ANOVA.

1, 6 and 24 h after exposure to LPS (Figure 7, $p < 0.001$). We were not able to detect TNF α release in acute hippocampal slices.

Discussion

S100B has been proposed as a marker of brain injury and its elevation in CSF has been interpreted as a signal of astroglial activation [10,11]. Moreover, it has been assumed that S100B from CSF easily crosses the blood brain barrier and that a S100B increment in peripheral blood is indicative of brain injury. However, in some

Table 1 Serum and CSF TNF α levels after IP administration of LPS in rats

	Control	LPS ^a	P
Serum (30 min)	3.4 ± 1.0	192.1 ± 97.2	0.046*
Serum (24 h)	1.1 ± 0.4	2.6 ± 0.2	0.021*
CSF (30 min)	2.7 ± 1.0	1.1 ± 0.5	0.145
CSF (24 h)	8.3 ± 5.5	2.5 ± 1.0	0.34

Values are mean (pg/mL) ± standard error (n = 5). Statistical analysis was performed using Student's *t* test, * indicates $p < 0.05$; ^a 250 µg/Kg.

Table 2 Serum and CSF TNF α after ICV administration of LPS in rats

	Control	LPS ^b	p
Serum (30 min)	0.7 ± 0.3	121.6 ± 40.0	0.001*
Serum (24 h)	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.945
CSF (30 min)	38.8 ± 9.8	75.1 ± 24.9	0.215
CSF (24 h)	1.7 ± 1.2	19.6 ± 4.5	0.006*

Values are mean (pg/mL) ± standard error (n = 5). Statistical analysis was performed using Student's *t* test, * indicates *p* < 0.05; ^b 25 μ g

pathophysiological conditions other interpretations are possible and, consequently, an intense debate has been developed, mainly because there are extra-cerebral sources of S100B [31].

Serum levels of S100B after exposure to LPS have been measured in some studies. S100B protein blood levels in fetal sheep were found to be significantly higher 1 h after LPS administration (intravenous [IV], 5 mg/Kg) and to return to baseline between 12 and 72 h after exposure [32]. Similarly, in Sprague-Dawley rats, this quantity of LPS is able to induce an increase in serum S100B 5h later [33]. In our study, ICV (2.5 ng) or IP administration (0.25 mg/Kg) of LPS to Wistar rats did not alter serum S100B levels, measured 30 min and 24 h after exposure. This discrepancy could be due to the different quantities of LPS employed, to its method of administration, or to the type of animal. Importantly, LPS (IV 2 ng/Kg), when given to humans, is not able to induce significant changes in serum S100B at 1 h or 8 h post treatment [34].

In addition to measuring serum S100B, we also evaluated S100B levels in CSF, astrocyte cultures and acute hippocampal slices of rats exposed to LPS. Astrocytes are thought of as active cells in the immune response, because they have receptors for this response (e.g TLR4) and are able to secrete cytokines [19,35]. We found an increase in CSF S100B after LPS both for ICV (early and persistent response) and for IP administration (early and transient response). Notice that LPS is potentially able to cross the blood-brain barrier [36]. Clearly no immediate increment in serum S100B occurred in either condition. This suggests brain-specific, LPS-induced release of S100B, i.e., peripheral immune cells stimulated by LPS did not release or cause a detectable S100B release from potential extra-cerebral sources of S100B (e.g. adipocytes). In other words, these data suggest different LPS-sensitivities for S100B secretion in central and peripheral S100B-expressing cells. Conversely, we observed an immediate serum TNF α increase after LPS administration by both ICV and IP routes. It has been proposed that TNF α is able to mediate S100B secretion in astrocytes [37]. However, under LPS stimulation, our results regarding the profiles of increases in TNF α and

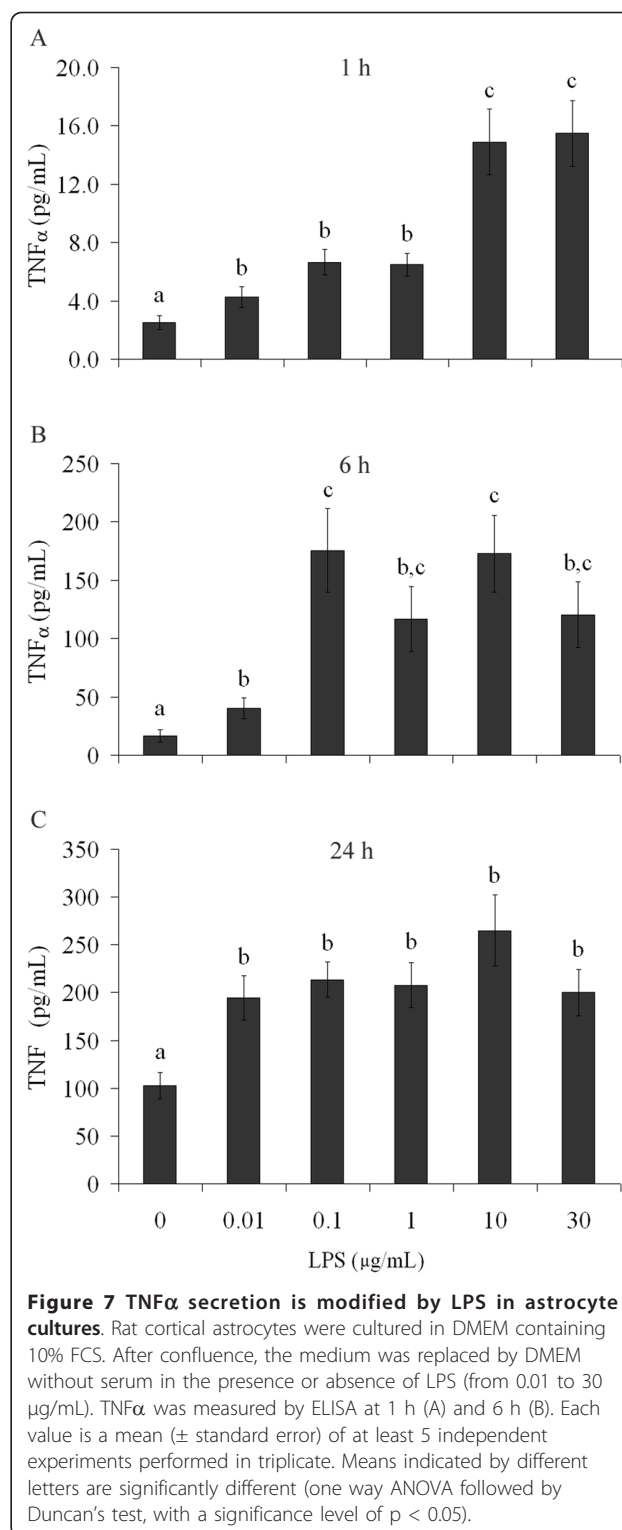


Figure 7 TNF α secretion is modified by LPS in astrocyte cultures. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by DMEM without serum in the presence or absence of LPS (from 0.01 to 30 μ g/mL). TNF α was measured by ELISA at 1 h (A) and 6 h (B). Each value is a mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. Means indicated by different letters are significantly different (one way ANOVA followed by Duncan's test, with a significance level of *p* < 0.05).

S100B in serum and CSF suggest independent responses (Table 3).

Other aspects must be emphasized. The increase in CSF S100B levels that we found was not accompanied or

Table 3 Qualitative comparison of TNF α and S100B levels in serum and CSF after LPS administration

		TNF α	S100B
LPS IP	Serum (30 min)	↑	-
	Serum (24 h)	↑	-
	CSF (30 min)	-	↑
	CSF (24 h)	-	-
LPS ICV	Serum (30 min)	↑	-
	Serum (24 h)	-	-
	CSF (30 min)	-	↑
	CSF (24 h)	↑	↑

↑ indicates a significant increase compared to control, with a significance level of $p < 0.05$; - indicates no significant difference compared to control. See Table 1, Table 2 and Figure 1 for details.

followed by an increase in serum S100B levels, at least in measurements made at the evaluated times (30 min and 24 h after LPS). This increase in CSF S100B was rapid (i.e. detected in 15 min) and lasting (for at least 24 h). Notice that control animals for the experiments involving ICV administration of LPS exhibited higher levels of CSF S100B (Figure 1A) than did controls for IP administration (Figure 1C), suggesting a response to the invasive procedure.

Astrocytes in culture secreted S100B directly in response to LPS (from 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ upward) at 1h, but at 24 h a decrease in secretion (dependent on LPS concentration) was observed even at lower concentrations. This suggests a biphasic response, i.e. an increase in S100B secretion, followed by a decrease. This profile has been observed in astrocyte cultures under other conditions, such as exposure to beta-hydroxybutyrate [38]. This rapid and transient stimulation of S100B secretion in astrocyte cultures was also observed for the cytokine IL-1 β , but without a decrease at 24 h [12]. This finding could suggest that the LPS effect is direct and independent of secondarily-released IL-1 β . Other studies have reported an increase in cell content of S100B in C6 glioma cells after 24 h of exposure to IL-1 β [39] or no change in astrocyte cultures after 48 h [40] and a decrease in S100B content in cultured astrocytes after 3 days of exposure to TNF α [37]. However, these studies did not measure S100B secretion adequately and it is not possible to speculate about a secondary effect of these two cytokines on S100B secretion after long-term LPS exposure under the conditions used here. Therefore, in agreement with our working hypothesis, it appears that LPS is able to directly modulate S100B secretion.

In addition, when we used acute hippocampal slices to evaluate S100B secretion at 1 h, we also observed an increase in S100B secretion with LPS at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, but conversely we observed a decrease in LPS at 0.1 or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These preparations are complex from a cellular view, i.e. in addition to astrocytes, they contain active microglia

and neurons, which makes interpretation of the control of S100B release difficult. However, a similar result, obtained in response to endothelin-1, has also been observed [24]. This compound, due to its blocking effect on gap junctions, increases S100B secretion in astrocyte cultures in the first hour, but after 6 hours decreases S100B secretion. Similarly, in acute hippocampal slices, endothelin-1 decreases S100B secretion at 1 h. Potentially, both LPS and endothelin-1 down-regulate gap junction proteins. Although we have no doubt about the effects of LPS and endothelin-1 on S100B secretion in acute hippocampal slices, we have no explanation for this effect, when compared to that observed in isolated astrocytes, at this moment.

Secreted S100B is a very small part of total cell content (less than 0.5% is found in the medium of astrocyte cultures at 24 h) and changes in S100B secretion are not necessarily accompanied by changes in the cell content [31]. In fact, in our experiments LPS changed S100B secretion without affecting cell content of this protein. On the other hand, GFAP content was increased by all concentrations of LPS used, indicating astroglial activation. This is in agreement with previous reports about the effects of LPS on astrocyte cultures [22,23]. This reinforces the idea that GFAP and S100B have distinct regulatory mechanisms of expression and that astrogliosis (as assessed by GFAP increment) can either be accompanied or not accompanied by changes in cell S100B content [41].

Another interesting aspect of our findings is decreased glutathione content after LPS exposure. The decrease in glutathione content in astrocytes at 24 h (but not at 1 h) is possibly associated with up-regulation of glutathione-S-transferase, as observed very recently [22]. Part of the decrease could involve an intense exportation of this peptide, since it serves as an extracellular antioxidant, and also provides substrates for neuronal synthesis of glutathione [42]. In addition, we also found a decrease in glutathione content in acute hippocampal slices exposed to LPS.

In spite of this decrease in antioxidant defense, both preparations exhibited excellent viability and integrity, based on MTT reduction assays, neutral red incorporation and LDH release. These assays, performed in parallel to assays for S100B measurements, allowed us to be emphatic throughout the text about S100B *secretion*, instead of S100B *release*.

Although S100B has cytokine-like actions (e.g. [43]), some caution should be taken in the categorization of S100B as a cytokine. In contrast to classical cytokines, S100B is not produced exclusively for secretion; only a very small part is exported. More recently, some authors have suggested that S100B, like other members of the S100 family, may act as an alarmin or damage-associated molecular pattern (see [44] for a review). However,

independently of these conceptions, our data suggest that S100B secretion is modulated by LPS. In fact, secretion of S100B might be protective during the initial phase of LPS challenge. In contrast, prolonged LPS treatment results in a dose-dependent decrease in S100B secretion from astrocytes. This indicates that one potential effect of long-lasting exposure to LPS might be decreased secretion of trophic factors from astrocytes.

It should be noted that some aspects of the effect of LPS remain unclear. Firstly, is the effect of LPS mediated exclusively by TLR-4 in astrocytes? We cannot rule out other possibilities at this moment, since LPS could be acting on other receptors (e.g. CD14 and LBP [45]). Secondly, it is still not clear whether LPS can affect S100B secretion in other S100-expressing cells. There are many extracerebral S100B-expressing cells that affect serum S100B levels [46] and these, apparently, were not mobilized under our conditions of LPS stimulation. However, further studies must investigate specific extracerebral sources of S100B. For example, it is known that enteroglia respond to LPS by increasing levels of S100B mRNA [47]. Third, whether gram-negative infectious agents could cause similar effects on S100B secretion, mediated by LPS release, is not clear at the moment. Interestingly, serum S100B was found to be increased in patients with cerebral and extracerebral infectious disease [48]. In that study, S100B elevation was generally higher in patients with cerebral infections than in extracerebral infections. However, specific and chronic effects of gram-negative bacteria on central and peripheral S100B deserve further investigation.

Conclusions

Our data suggest that S100B secretion in brain tissue is stimulated rapidly and persistently (at least for 24 h) by ICV administration of LPS. Moreover, no changes were observed in serum levels of this protein. This profile is quite different from that of TNF α , a canonical inflammatory cytokine. In isolated astrocytes and acute hippocampal slices, we observed a direct stimulation of S100B secretion by LPS at a concentration of 10 μ g/mL, mediated by TLR4. However, in astrocyte cultures, lower levels of LPS were able to induce a decrease in S100B secretion 24 h afterwards, without significant changes in the intracellular content of S100B. In addition, after 24 h of exposure of astrocytes to LPS, we observed a decrease in glutathione and an increase in GFAP. Together, these data contribute to our understanding of the effect of LPS on astrocytes, particularly on S100B secretion, and help us to interpret cerebrospinal fluid and serum changes of this protein in neuroinflammatory diseases and brain disorders in general. Moreover, S100B-expressing tissues may be differentially regulated, since LPS did not lead to increases in serum S100B.

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 01.06.0842-00 and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection. We would like to thank Ms. Gisele Souza for technical support with cell culture.

Authors' contributions

Conception and design of experiments: MCG, LST, MCL and CAG
Acquisition, analysis and interpretation of data: MCG, LST, MCL, FG, CDR, EN, DSE and LR

Writing and/or critical review of article: MCG, LST, MCL and CAG

All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 December 2010 Accepted: 4 October 2011

Published: 4 October 2011

References

1. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I: **S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1793**:1008-1022.
2. Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Karl J, Goncalves CA, Wofchuk S, Rodnight R: **Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology.** *FEBS Lett* 2000, **486**:203-207.
3. Tramontina AC, Tramontina F, Bobermin LD, Zanotto C, Souza DF, Leite MC, Nardin P, Gottfried C, Goncalves CA: **Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008, **32**:1580-1583.
4. Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S, Hirase H: **Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo.** *J Neurosci* 2008, **28**:10928-10936.
5. Buyukkuysal RL: **Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage.** *Neurochem Int* 2005, **47**:580-588.
6. Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Goncalves CA: **S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium.** *Neurochem Int* 2007, **50**:774-782.
7. Leite MC, Brolese G, de Almeida LM, Pinero CC, Gottfried C, Goncalves CA: **Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition.** *Brain Res Bull* 2006, **70**:179-185.
8. Steiner J, Bernstein HG, Biellau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B: **Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain.** *BMC Neurosci* 2007, **8**:2.
9. Haimoto H, Kato K, Suzuki F, Nagura H: **The ultrastructural changes of S-100 protein localization during lipolysis in adipocytes. An immunoelectron-microscopic study.** *Am J Pathol* 1985, **121**:185-191.
10. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V: **S100B in brain damage and neurodegeneration.** *Microsc Res Tech* 2003, **60**:614-632.
11. Sen J, Belli A: **S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain?** *J Neurosci Res* 2007, **85**:1373-1380.
12. de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB, Goncalves CA: **S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway.** *J Neuroimmunol* 2009, **206**:52-57.
13. Kim SH, Smith CJ, Van Eldik LJ: **Importance of MAPK pathways for microglial pro-inflammatory cytokine IL-1 beta production.** *Neurobiol Aging* 2004, **25**:431-439.
14. Bianchi R, Giambanco I, Donato R: **S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha.** *Neurobiol Aging* 2010, **31**:665-677.
15. Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, Rothermundt M: **Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE.** *J Neuroimmunol* 2007, **184**:214-222.

16. Belanger M, Magistretti PJ: **The role of astroglia in neuroprotection.** *Dialogues Clin Neurosci* 2009, **11**:281-295.
17. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL: **Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).** *Neurochem Res* 2000, **25**:1439-1451.
18. Hauss-Wegrzyniak B, Lukovic L, Bigaud M, Stoeckel ME: **Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study.** *Brain Res* 1998, **794**:211-224.
19. Farina C, Aloisi F, Meinl E: **Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.** *Trends Immunol* 2007, **28**:138-145.
20. Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD: **Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity.** *Brain Behav Immun* 2008, **22**:140-147.
21. Liao CK, Wang SM, Chen YL, Wang HS, Wu JC: **Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3.** *Int J Biochem Cell Biol* 2010, **42**:762-770.
22. Vergara D, Martignago R, Bonsegna S, De Nuccio F, Santino A, Nicolardi G, Maffia M: **IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes.** *J Neuroimmunol* 2010, **221**:115-120.
23. Brahmachari S, Fung YK, Pahan K: **Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide.** *J Neurosci* 2006, **26**:4930-4939.
24. Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Goncalves CA: **Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices.** *J Neurosci Res* 2009.
25. Rodrigues L, Biasibetti R, Swarowsky A, Leite MC, Quincozes-Santos A, Quilfeldt JA, Achaval M, Goncalves CA: **Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine.** *J Alzheimers Dis* 2009, **17**:193-202.
26. Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R: **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* 1999, **833**:142-149.
27. Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, Gottfried C, Wofchuk ST, Donato R, Goncalves CA: **S100B Secretion in Acute Brain Slices: Modulation by Extracellular Levels of Ca (2+) and K (+).** *Neurochem Res* 2009.
28. Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA: **A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein.** *J Neurosci Methods* 2008, **169**:93-99.
29. Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andreatza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA: **Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state.** *J Neurosci Methods* 2007, **162**:282-286.
30. Browne RW, Armstrong D: **Reduced glutathione and glutathione disulfide.** *Methods Mol Biol* 1998, **108**:347-352.
31. Goncalves CA, Concli Leite M, Nardin P: **Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury.** *Clin Biochem* 2008, **41**:755-763.
32. Garnier Y, Berger R, Alm S, von Duering MU, Coumans AB, Michetti F, Bruschetini M, Lituania M, Hasaart TH, Gazzolo D: **Systemic endotoxin administration results in increased S100B protein blood levels and periventricular brain white matter injury in the preterm fetal sheep.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006, **124**:15-22.
33. Rosengarten B, Wolff S, Klatt S, Schermuly RT: **Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition or norepinephrine on the neurovascular coupling in an endotoxic rat shock model.** *Crit Care* 2009, **13**:R139.
34. van den Boogaard M, Ramakers BP, van Alfen N, van der Werf SP, Fick WF, Hoedemaekers CW, Verbeek MM, Schoonhoven L, van der Hoeven JG, Pickkers P: **Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain.** *Crit Care* 2010, **14**:R81.
35. Gorina R, Font-Nieves M, Marquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM: **Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent Nf-kappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways.** *Glia* 2011, **59**:242-255.
36. Banks WA, Robinson SM: **Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier.** *Brain Behav Immun* 2010, **24**:102-109.
37. Edwards MM, Robinson SR: **TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease.** *J Neural Transm* 2006, **113**:1709-1715.
38. Leite M, Frizzo JK, Nardin P, de Almeida LM, Tramontina F, Gottfried C, Goncalves CA: **Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures.** *Brain Res Bull* 2004, **64**:139-143.
39. Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS: **In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis.** *Neurobiol Aging* 1996, **17**:761-766.
40. Hinkle DA, Harney JP, Cai A, Hilt DC, Yarowsky PJ, Wise PM: **Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 beta regulate S100 beta expression in cultured astrocytes.** *Neuroscience* 1998, **82**:33-41.
41. Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Gotz M: **Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:3581-3586.
42. Dringen R, Hirrlinger J: **Glutathione pathways in the brain.** *Biol Chem* 2003, **384**:505-516.
43. Liu L, Li Y, Van Eldik LJ, Griffin WS, Barger SW: **S100B-induced microglial and neuronal IL-1 expression is mediated by cell type-specific transcription factors.** *J Neurochem* 2005, **92**:546-553.
44. Bianchi ME: **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**:1-5.
45. Peri F, Piazza M, Calabrese V, Damore G, Cighetti R: **Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules.** *Biochem Soc Trans* 2010, **38**:1390-1395.
46. 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, **2010**:790431.
47. Cirillo C, Sarnelli G, Esposito G, Grosso M, Petruzzelli R, Izzo P, Cali G, D'Armiento FP, Rocco A, Nardone G, *et al*: **Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein.** *Neurogastroenterol Motil* 2009, **21**:1209-e1112.
48. Uden J, Christensson B, Bellner J, Alling C, Romner B: **Serum S100B levels in patients with cerebral and extracerebral infectious disease.** *Scand J Infect Dis* 2004, **36**:10-13.

doi:10.1186/1742-2094-8-128

Cite this article as: Guerra *et al*: Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of Neuroinflammation* 2011 **8**:128.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Capítulo II

Nimesulide decreases S100B secretion in astrocyte cultures

Artigo em Preparação, a ser submetido no periódico “Journal of Neuroinflammation”.

Nimesulide decreases S100B secretion in astrocyte cultures

Maria Cristina Guerra, Elisa Negri, Fabiana Galland, Carollina Da Ré, Liliane Strapazon, Lucas Tortoreli, Marina Concli Leite and Carlos-Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, Brazil

§ Corresponding author: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Dept Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brazil

E-mail: casg@ufrgs.br

Fax: 55-51-3308 5535

Author's e-mail

Maria Cristina Guerra: crisbareaguerra@hotmail.com

Elisa Negri: e.elisanegri@gmail.com

Fabiana Galland: fabianagalland@yahoo.com.br

Carolina Da Ré: caroldared2@gmail.com

Liliane Strapazon: lilianestrapazon@gmail.com

Lucas Tortorelli: lucastorto@yahoo.com.br

Marina Concli Leite: marina.leite@ufrgs.br

Carlos-Alberto Gonçalves: casg@ufrgs.br

Abstract

Many studies have looked for a connection of S100B, an astrocyte derived protein and degenerative diseases including Alzheimer's disease and schizophrenia. The therapeutic use of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID) to these diseases has grown up. However, there are few reports about the effect of these drugs on S100B. Herein, we evaluated S100B content and secretion measured by ELISA (as well as GFAP content and TNF- α secretion) in primary astrocyte cultures exposed to dexamethasone and four different chemical classes of NSAID (acetyl salicylic acid, ibuprofen, diclofenac and nimesulide) for 24 h. Our data suggest that NSAIDs have differentiated effects on glial parameters. ASA and diclofenac can increase GFAP while nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, and dexamethasone were able to decrease S100B secretion. However, all anti-inflammatories were able to reduce levels of PGE2. Therefore, PGE2 is possibly involved in the mechanism of S100B secretion but additional pathways, unclear at this moment, demand further characterization. The inflammatory role of S100B in degenerative diseases, where also is observed elevated levels of COX-2 and PGE2, could be attenuated by COX-2 inhibitors.

Key-words: Astrocytes, Alzheimer, COX-1/2, NSAID, S100B, Schizophrenia,

Background

The inflammatory basis of many neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, schizophrenia and major depression has guided a pharmacological strategy using anti-inflammatories, whose main effect (but not exclusively) is inhibition of cyclooxygenases 1 and 2 (COX-1/2) [1, 2]. The neuroprotective action of COX-2 inhibitors against Alzheimer's disease has been proposed based on some epidemiological evidence e.g. [3] and experimental use of these compounds in transgenic models [4, 5] and streptozotocin-induced models of Alzheimer's disease [6]. Moreover, clinical trials with the anti-inflammatories naproxen and celecoxib suggest that the prevention is more efficient when compared to therapeutic intervention [7, 8]. In addition, for other inflammatory-based brain diseases seems that COX-2 inhibitors have a more favorable effect in the early stages.

Recent studies have suggested that glial cells, particularly astrocytes, are essential elements and putative therapeutic targets in the brain inflammation [9]. Astrocytes are functionally coupled to the glutamatergic synapses by glutamate uptake and release of glutamine [10, 11], as well as they in an inflammatory scenario directly release glutamate, which could modulate synaptic transmission [12]. In fact, Volterra's group showed that prostaglandins, the downstream products of COX-1/2, can stimulate glutamate release by astrocytes [13]. Up-regulation of GFAP or changes in other astrocyte markers have been used to characterize "reactive astrocytes" in the neuroinflammatory process [14]. One of them is S100B, a 21 kDa calcium binding protein produced and secreted by astrocytes [15]. Peripheral levels (in serum or CSF) of this protein have been used as indicative of neural damage and/or astrocyte activity [16]. In fact, cultured astrocytes acutely exposed to LPS secrete S100B [17].

Many works have looked for a connection of S100B and degenerative diseases [18], particularly Alzheimer's disease [19]. Gene for S100B protein is found in the same region of chromosome 21, where is located the amyloid precursor protein (APP) [20] and, in addition, elevated levels of S100B can induce APP expression [21]. However, there is little or controversial information about anti-inflammatories affecting COX-1/2 and S100B. A pioneer work showed that dexamethasone, a steroid anti-inflammatory, inhibits S100B production in C6 glioma cells [22]. In addition, dexamethasone also decreased S100B in astrocyte cultures [23] and hippocampal tissue [24]. Among non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAID) flufenamic acid [25], NS-398 [26] and parecoxib [27], which are COX-2 inhibitors, apparently modulate extracellular levels of S100B.

In this work, we evaluated S100B content and secretion (as well as GFAP content and TNF- α secretion) in primary astrocyte cultures exposed to dexamethasone and four different chemical classes of NSAID, chosen by their effect in some other particular astroglial parameter already measured in glial cultures (see Table 1). The *in vivo* effect on glial parameters also was investigated. We observed varied effect of different anti-inflammatory compounds and discussed the possible implications to neuroinflammation and brain related diseases.

Methods

Materials. Poly-L-lysine, antibody anti-S100B (SH-B1), methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and neutral red were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Fetal calf serum (FCS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and other materials for cell culture were purchased from Gibco (Carlsbad, USA). Polyclonal anti-S100B and anti-rabbit peroxidase linked were obtained from DAKO

(Sao Paulo, Brazil) and GE (Little Chalfont, United Kingdom), respectively. Anti-COX1 and anti-COX2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). Anti-inflammatory drugs (ASA, diclofenac, ibuprofen, dexamethasone and nimesulide) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Anti-inflammatory intracerebroventricular (ICV) injection. Adult male Wistar rats weighing 270-310 g, 60 days old, were used for ventricular access in stereotaxic surgery. Procedures were carried out in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) and positioned in a stereotaxic frame. A midline sagittal incision was made in the scalp and one burr hole was drilled in the skull over right side ventricle. The following coordinates were used: 0.9 mm posterior to bregma; 1.5 mm lateral to sagittal suture; 3.6 mm beneath the brain surface. Unilateral ICV injection of diclofenac (n = 5) or acetylsalicylic acid (ASA) (n = 5), dissolved in DMSO 10 %, was slowly injected 5 μ L using Hamilton microsyringe. Assuming a CSF volume of 200 μ L (excluding subarachnoid space) final diclofenac and ASA concentration were 100 μ M. Control group (n = 5) was injected the same volume of DMSO 10%. After 24 h, cisterna magna was accessed for CSF puncture in a stereotactic holder with an insulin syringe. A maximum volume of 30 μ L was collected over a 3-min period to minimize the risk of brain stem damage. The blood samples were collected by careful intracardiac puncture, using a 5-mL non-heparinized syringe to obtain 3 mL of blood. Blood samples were incubated at room temperature (25°C) for 5 min and centrifuged at 3200 rpm for 5 min to obtain serum. Hippocampal tissue was frozen (-70°C) until used for GFAP analysis.

Cell culture. Primary astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described [28]. Procedures were carried out in accordance with the NIH Guide for the

Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Briefly, cerebral cortices of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and mechanically dissociated in Ca²⁺- and Mg²⁺-free balanced salt solution, pH 7.4, containing (in mM): 137 NaCl; 5.36 KCl; 0.27 Na₂HPO₄; 1.1 KH₂PO₄ and 6.1 glucose. The cortices were cleaned of meninges and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1400 RPM for 5 min the pellet was resuspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.39 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO₃, 0.1% amphotericin, 0.032% gentamicin and 10% fetal calf serum (FCS). Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO₂/95% air at 37°C, allowed to grow to confluence, and used at 15 days in vitro.

S100B measurement. S100B was measured by ELISA, as previously described [29]. Briefly, 50 µl of sample plus 50 µl 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. Color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/ml.

GFAP measurement. ELISA for GFAP was carried out as previously described [30], by coating microtiter plates with 100 µL samples for 24 h at 4°C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h was followed by incubation with secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. A colorimetric reaction with o- phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard human GFAP (from Calbiochem) curve ranged from 0.1 to 5 ng/mL.

MTT reduction assay. Cells were treated with 50 µg/mL methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) for 30 min in 5% CO₂/ 95% air at 37°C. Afterwards, the

medium was removed, and MTT crystals were dissolved in DMSO. Absorbance values were measured at 560 and 650 nm. The reduction of MTT was calculated as (absorbance at 560 nm) - (absorbance at 650 nm).

Neutral red uptake. Neutral red incorporation was carried out as previously described [25] with modifications. Cells were treated with 50 µg/mL neutral red (NR) for 30 min in 5% CO₂/95% air at 37°C. Afterwards, the cells were rinsed twice with PBS for 5 min each and NR dye taken up by viable cells was extracted with 500 µL of acetic acid/ethanol/water (1/50/49). Absorbance values were measured at 560 nm.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay. Lactate dehydrogenase assay was carried out in 50 µL of the extracellular medium, using a commercial colorimetric assay from Doles [Goiânia, Brazil].

Glutathione content. Glutathione content was determined as previously described [31]. Briefly, astrocyte cultures were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM 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 glutathione solutions (0-500 µM).

Tumor necrosis factor α (TNF- α) measurement. This assay was carried out in 100 µL of CSF, serum or extracellular medium, using a rat TNF α ELISA from eBioscience [San Diego, USA].

Prostaglandin E₂ (PGE₂) measurement. This assay was carried out in 100 µL of the extracellular medium, using a rat PGE₂ ELISA from Enzo Life Sciences [East Farmingdale, USA].

Western blot analysis. Equal amounts (20 µg) of proteins from each sample were boiled in sample buffer (0.0625M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromophenol blue) and electrophoresed in 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane. Equal loading of each sample was confirmed with Ponceau S staining. Antibodies anti-COX1 and anti-COX2 were used at a dilution of 1:5000. After incubating with the primary antibody for 1 h at 4°C, membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-goat immunoglobulin (IgG) at a dilution of 1:5000 during 1 h at 4°C. The chemiluminescence signal was detected using an ECL kit from Amersham.

Statistical analyzes. Parametric data are reported as mean ± standard error and were analyzed by Student's t test (when two groups were considered) or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test, in the SPSS-16.0, assuming $p < 0.05$.

Results

S100B secretion was reduced by nimesulide and dexamethasone

In the first experiment we investigated the S100B secretion in astrocyte culture exposed to anti-inflammatories (ASA, ibuprofen, diclofenac, nimesulide or dexamethasone) for 24h. The concentrations were chosen based on previous studies in glial cell cultures (See Table 1). Among these compounds, only dexamethasone and nimesulide decreased S100B secretion (Fig 1A). Dexamethasone decreased 50% ($p < 0.001$) of the basal S100B secretion, while nimesulide about 20% ($p = 0.001$). On the other hand, secretion of TNFα, a canonical pro-inflammatory cytokine, was stimulated by ibuprofen (350%, $p < 0.001$) (Fig 1B). Moreover, other NSAIDs did not reduce TNFα. Dexamethasone significantly decreased TNFα secretion to 10% ($p = 0.002$).

Changes in S100B secretion were not accompanied by changes in the intracellular S100B content

The next step was to investigate whether these compounds, in our experimental conditions, modified the cellular S100B content or GFAP content, the most widely used marker of astrogliosis. Neither dexamethasone nor NSAID altered S100B content (Fig 2A). However, ASA and diclofenac increased the GFAP content (Fig 2B), about 70% ($p = 0.010$ and $p = 0.012$ for ASA and diclofenac, respectively).

Dexamethasone and NSAID did not affect astrocyte morphology in culture

Despite changes in S100B secretion or GFAP content, no significant alterations was observed in astrocyte morphology in astrocyte cultures (data not shown). Cell morphology was analyzed by phase contrast microscopy (at 1 h and 24h), as well immunocytochemistry for GFAP, S100B or actin (at 24h).

Ibuprofen and other anti-inflammatories did not modify GSH content or astroglial viability

We also investigated the content of reduced glutathione (GSH) in astrocyte cultures exposed to anti-inflammatories, especially because many antioxidant compounds (to who is attributed anti-inflammatory activity) affect GSH content. Dexamethasone or NSAID were not able to modify GSH levels in astrocyte culture (Fig 3A). Moreover, based on MTT reduction assay is also possible to evaluate that these anti-inflammatory compounds did not impair cell viability (Figure 3B). Indeed, it is important to mention that extracellular LDH activity was not modified by exposure to anti-inflammatories (data not shown).

The effect of acetyl salicylic acid on GFAP was also observed in vivo

In order to investigate the increase of GFAP observed in culture induced by ASA and diclofenac were injected by ICV route, at indicated concentrations, to measured GFAP content in the hippocampus and cerebral cortex 24 h afterwards. An increment of GFAP was observed in the cerebral cortex induced by ASA ($p=0.028$), but not diclofenac ($p=0.776$) (Fig 4A). In the hippocampus no changes were observed (Fig 4B).

A PGE2 decrease could explain, at least in part, the effect on S100B secretion

In Figure 5A is shows an immunoblot of COX-1 and COX-2 in astrocytes cultures basal condition or 24 h after exposure to nimesulide or dexamethasone. Moreover, basal levels of the downstream product of the COX-2, the prostaglandin E2 (PGE2), are reduced after exposure to dexamethasone and all NSAIDs investigated (Figure 5B) ($p < 0.05$).

Discussion

The S100B protein, in the central nervous system, is mainly (but not exclusively) expressed and secreted by astrocytes, where it has many intracellular targets and functions [15]. However, the mechanism the secretion is unknown and this protein has been thought as a marker of glial activation in brain disorders [16] and its extracellular role is permanently in debate. Due to its trophic activity on neurons was regarded as a growth factor, particularly for serotonergic neurons [32]. It was also considered as a cytokine and due to its trophic activity on neurons was labeled as neurotrophic cytokine [33]. However, due to its release in inflammatory conditions also has been considered as an inflammatory cytokine, able to respond and induce pro-inflammatory canonical cytokines [34, 35]. More recently, other authors also have mentioned S100B as a damage-associated molecular pattern (DAMP) [36]. Herein, we present evidence that

anti-inflammatories affect S100B secretion, arguing whether COX-2 and PGE2 are putatively involved in the mechanism of secretion of S100B.

Basal S100B secretion was reduced by nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, and dexamethasone. Other NSAIDs, COX-1/2 inhibitors, were not able to affect S100B secretion. However, TNF α secretion was not affected by NSAIDs, except ibuprofen, which caused an increment in the secretion of this cytokine. Therefore, these NSAIDs (at indicated concentrations) were not able to block the astrocyte secretion of TNF α , a primary inflammatory cytokine. Ibuprofen caused an increment of basal TNF α . This TNF α increment could induce a transient S100B secretion, but not in 24 h, as observed in C6 glioma cells [37].

Assuming that the chronic increment of S100B is maybe underlying degenerative processes [15], nimesulide and dexamethasone would be interesting neuroprotective compounds. On the other hand, in acute conditions of brain injury, in which S100B appears to play an important role in brain recovery, maybe these compounds are not so important [38].

The decrease of S100B secretion induced by nimesulide or dexamethasone was not accompanied by changes in intracellular S100B. This reinforces the idea that changes in secretion are not necessarily accompanied by changes in intracellular content of S100B [16]. Moreover, the decrease of S100B secretion induced by dexamethasone or nimesulide, as well as, an increase of secretion induced by lysophosphatidic acid *in vitro* [39], are not associated to cell morphology. Both ASA and diclofenac induced an increment of GFAP in astrocyte cultures, and only ASA also able to induce an increment of GFAP in brain cortical tissue 24 h after ICV infusion. Differently from our results, a GFAP decrease in astrocyte cultures was described using high concentration

(5 mM) of ASA [40]. Moreover, it is also important to emphasize that the *in vivo* increment of GFAP observed in the cerebral cortex did not occur in hippocampal tissue, suggesting the brain region dependence.

Several studies have reported that antioxidant compounds may exhibit anti-inflammatory properties likely because their ability to modulate redox-sensitive proteins in inflammatory cascades of signaling, such as MAPK and NF-kappaB. Therefore, we investigated the opposite way, if these anti-inflammatory compounds affect redox cell. Do they affect the cell content of GSH, the main antioxidant compound produced by astrocytes. Moreover, astrocyte viability was not altered after anti-inflammatory exposure (evaluated by MTT reduction assay), as well as cell integrity (assessed by LDH and neutral red uptake assay) (data not shown).

Astrocytes in culture express receptors to respond directly to danger stimulus (e.g., LPS) [17], as well as all protein machinery to respond and release inflammatory cytokines and prostaglandins. Astrocytes express and *in vivo* COX 1 and 2, in brain tissue and cultures [41, 42]. Our results confirm the presence of both proteins, as well as basal levels of PGE2 in astrocyte cultures. Considering that cAMP modulates S100B secretion [39, 43] and PGE2, in an autocrine manner, stimulates G receptors coupled to adenylyl cyclase, we hypothesized that COX-1/2 inhibitors would reduce S100B secretion. However, only dexamethasone and nimesulide (a selective COX-2 inhibitor) produced this effect. In addition, NS-398, a selective inhibitor of COX-2, reduced the communication S100B/RAGE mediated in an experimental model of myasthenia gravis [26] and patients that receive parecoxib for analgesia exhibited lower levels of serum S100B [27]. Our results with nimesulide corroborate with those findings. However, those studies did not directly evaluate S100B secretion.

This study has some limitations. Firstly, the study assumed S100B secretion as basal but it was evaluated in cell culture, where cells are in a mild “inflammatory state,” expressing high levels of COX-2 and PGE2. Secondly, as was performed to observe the effect of anti-inflammatories in vivo on GFAP, it would be interesting in further studies to analyze cerebrospinal fluid S100B. Thirdly, the effect of anti-inflammatories on S100B secretion should be analyzed under an inflammatory condition (e.g. LPS).

Despite that, our results suggest that NSAIDs display different effect on glial parameters GFAP and S100B. ASA and diclofenac can increase GFAP, while nimesulide (as well as dexamethasone) was able to decrease S100B secretion. However, all anti-inflammatories were able to reduce levels of PGE2. Therefore, PGE2 is possibly involved in the mechanism of S100B secretion but additional pathways, unclear at this moment, demand further characterization.

As we mentioned before, the chronic increment of S100B maybe underlying degenerative processes such as AD and schizophrenia. In fact, COX-2 inhibitors have been proposed as relevant therapeutic strategy for schizophrenia [44]. The pro-inflammatory role of S100B in AD, in which elevated levels of COX-2 and PGE2 are observed, also could be attenuated by COX-2 inhibitors. On the other hand, in acute conditions of brain injury, where S100B appears to play an important role in brain recovery, maybe these compounds do not afford beneficial effects and may be harmful [38]. This potential decrease of extracellular S100B in acute conditions, such as traumatic brain injury and stroke, reinforces the idea about risks and consequences of using COX-2 under these conditions. However, this idea requires support of additional epidemiological, clinical and experimental data.

References

1. Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G: Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007, 205:295-312.
2. Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J: Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000, 27:1-8.
3. McGeer PL, McGeer E, Rogers J, Sibley J: Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet* 1990, 335:1037.
4. Varvel NH, Bhaskar K, Kounnas MZ, Wagner SL, Yang Y, Lamb BT, Herrup K: NSAIDs prevent, but do not reverse, neuronal cell cycle reentry in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 2009, 119:3692-3702.
5. Choi YH, Back KO, Kim HJ, Lee SY, Kook KH: Pirfenidone attenuates IL-1beta-induced COX-2 and PGE2 production in orbital fibroblasts through suppression of NF-kappaB activity. *Exp Eye Res* 2013, 113:1-8.
6. Dhull DK, Jindal A, Dhull RK, Aggarwal S, Bhateja D, Padi SS: Neuroprotective effect of cyclooxygenase inhibitors in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer's disease in rats. *J Mol Neurosci* 2012, 46:223-235.
7. Group AR, Lyketsos CG, Breitner JC, Green RC, Martin BK, Meinert C, Piantadosi S, Sabbagh M: Naproxen and celecoxib do not prevent AD in early results from a randomized controlled trial. *Neurology* 2007, 68:1800-1808.

8. Group AR, Martin BK, Szekely C, Brandt J, Piantadosi S, Breitner JC, Craft S, Evans D, Green R, Mullan M: Cognitive function over time in the Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT): results of a randomized, controlled trial of naproxen and celecoxib. *Arch Neurol* 2008, 65:896-905.
9. Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD: Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 2005, 49:360-374.
10. Magistretti PJ, Pellerin L: Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci* 1999, 14:177-182.
11. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ: Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 2011, 34:76-87.
12. Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD: What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 2008, 59:932-946.
13. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A: Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998, 391:281-285.
14. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW: Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004, 89:1092-1100.
15. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I: S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1793:1008-1022.

16. Goncalves CA, Concli Leite M, Nardin P: Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 2008, 41:755-763.
17. Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Re C, Negri E, Engelke DS, Rodrigues L, Leite MC, Goncalves CA: Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation* 2011, 8:128.
18. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V: S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003, 60:614-632.
19. Mrak RE, Griffinbc WS: The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001, 22:915-922.
20. Seidl R, Cairns N, Lubec G: The brain in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 2001:247-261.
21. Mori T, Koyama N, Arendash GW, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T: Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* 2010, 58:300-314.
22. Selinfreund RH, Barger SW, Welsh MJ, Van Eldik LJ: Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. *J Cell Biol* 1990, 111:2021-2028.
23. Niu H, Hinkle DA, Wise PM: Dexamethasone regulates basic fibroblast growth factor, nerve growth factor and S100beta expression in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1997, 51:97-105.

24. Bruschetti M, van den Hove DL, Gazzolo D, Steinbusch HW, Blanco CE: Lowering the dose of antenatal steroids: the effects of a single course of betamethasone on somatic growth and brain cell proliferation in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 2006, 194:1341-1346.
25. Leite MC, Galland F, de Souza DF, Guerra MC, Bobermin L, Biasibetti R, Gottfried C, Goncalves CA: Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res* 2009.
26. Mu L, Zhang Y, Sun B, Wang J, Xie X, Li N, Zhang J, Kong Q, Liu Y, Han Z, et al: Activation of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) exacerbates experimental autoimmune myasthenia gravis symptoms. *Clin Immunol* 2011, 141:36-48.
27. Li JZ, Li XZ, Wang XM, Wang MS, Yu HF, Shi F, Miao D, Bi YL: [Effects of parecoxib sodium analgesia on serum concentrations of neuron-specific enolase and S-100beta and postoperative cognitive function of elderly patients undergoing acute replacement of femoral head]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2013, 93:2152-2154.
28. Gottfried C, Valentim L, Salbego C, Karl J, Wofchuk ST, Rodnight R: 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* 1999, 833:142-149.
29. Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA: A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 2008, 169:93-99.

30. Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andrezza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA: Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 2007, 162:282-286.
31. Browne RW, Armstrong D: Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 1998, 108:347-352.
32. Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC: Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 1990, 528:155-158.
33. Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A, Van Eldik LJ: Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* 1995, 65:228-233.
34. de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB, Goncalves CA: S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol* 2009, 206:52-57.
35. Schmitt KR, Kern C, Lange PE, Berger F, Abdul-Khaliq H, Hendrix S: S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. *Neurosci Res* 2007, 59:68-73.
36. Bernardini C, Lattanzi W, Businaro R, Leone S, Corvino V, Sorci G, Lauro G, Fumagalli L, Donato FR, Michetti F: Transcriptional effects of S100B on neuroblastoma cells: perturbation of cholesterol homeostasis and interference on the cell cycle. *Gene Expr* 2010, 14:345-359.

37. de Souza DF, Wartchow K, Hansen F, Lunardi P, Guerra MC, Nardin P, Goncalves CA: Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013, 43:14-22.
38. Kleindienst A, Meissner S, Eyupoglu IY, Parsch H, Schmidt C, Buchfelder M: Dynamics of S100B release into serum and cerebrospinal fluid following acute brain injury. *Acta Neurochir Suppl* 2010, 106:247-250.
39. Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Karl J, Goncalves CA, Wofchuk S, Rodnight R: Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett* 2000, 486:203-207.
40. Bae MK, Kim SR, Lee HJ, Wee HJ, Yoo MA, Ock Oh S, Baek SY, Kim BS, Kim JB, Sik Y, Bae SK: Aspirin-induced blockade of NF-kappaB activity restrains up-regulation of glial fibrillary acidic protein in human astroglial cells. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763:282-289.
41. Aid S, Bosetti F: Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie* 2011, 93:46-51.
42. Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Perdomo A, Marquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM: Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem* 2012, 287:6454-6468.
43. Goncalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E, Wofchuk S, Goncalves CA: High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* 2002, 13:1533-1535.

44. Müller N, Schwarz MJ: The immunological basis of glutamatergic disturbance in schizophrenia: towards an integrated view. *J Neural Transm Suppl* 2007;269-280.
45. Aleong R, Aumont N, Dea D, Poirier J: Non-steroidal anti-inflammatory drugs mediate increased in vitro glial expression of apolipoprotein E protein. *Eur J Neurosci* 2003, 18:1428-1438.
46. Iwata Y, Nicole O, Zurakowski D, Okamura T, Jonas RA: Ibuprofen for neuroprotection after cerebral ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010, 139:489-493.
47. Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Saitoh S, Asai K: Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte. *Cell Mol Neurobiol* 2013, 33:393-400.
48. Niranjana R, Rajasekar N, Nath C, Shukla R: The effect of guggulipid and nimesulide on MPTP-induced mediators of neuroinflammation in rat astrocytoma cells, C6. *Chem Biol Interact* 2012, 200:73-83.

Table 1-Effect of NSAID on astroglial cells

Compound	Activity	Effect/Molecular target
Aspirin	COX-1 (preferential) and 2	↓ ApoE [45] ↓ GFAP [40]
Ibuprofen	COX-1 and 2	Neuronal protective (in presence of glial cells) [46]
Diclofenac	COX 1 and 2	↑ cytokine-induced AQP-4 [47]
Nimesulide	Selective COX-2	↓ MPTP-induced MAPK and NF-kappa activation in C6 glioma cells [48]

Figure Legends

Figure 1. **S100B and TNF- α secretion in cultured astrocytes stimulated by anti-inflammatory drugs.** Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by the DMEM 1% FCS in the presence or absence of anti-inflammatory drugs (ASA 100 μ M, diclofenac 100 μ M, ibuprofen 100 μ M, dexamethasone 0.1 μ M or nimesulide 50 μ M). After 24 h of exposure, extracellular S100B (A) or TNF- α (B) were measured by ELISA. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. * indicates significant difference from basal condition, assuming $p < 0.05$.

Figure 2. **Changes in S100B secretion were not accompanied by changes in the intracellular S100B and GFAP content.** Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by the DMEM 1% FCS in the presence or absence of anti-inflammatory drugs (ASA 100 μ M, diclofenac 100 μ M, ibuprofen 100 μ M, dexamethasone 0,1 μ M or nimesulide 50 μ M). After 24 h of exposure, intracellular S100B (A) or GFAP (B) were measured by ELISA.

Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. * indicates significant difference from basal condition, assuming $p < 0.05$.

Figure 3. Ibuprofen and other anti-inflammatories did not modify GSH content or astroglial viability. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by the DMEM 1% FCS in the presence or absence of anti-inflammatory drugs (ASA 100 μ M, diclofenac 100 μ M, ibuprofen 100 μ M, dexamethasone 0.1 μ M or nimesulide 50 μ M). After 24 h of exposure, GSH content (A) or cell viability (B) were measured by ELISA. Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate.

Figure 4. The effect of acetyl salicylic acid on GFAP level was also observed *in vivo*. Intracerebroventricular injection of anti-inflammatory drugs (ASA or diclofenac) or DMSO 10% was carried out in adult Wistar rats under anaesthesia. After 24 h, rats were killed, and cerebral cortex (A) or hippocampus (B) were dissected out and 0.3 mm slices were obtained using a McIlwain chopper. Each value is the mean (\pm standard error) from 5 rats per group. * Significantly different from control ($p < 0.05$).

Figure 5. Extracellular PGE2 and COX1 and COX2 intracellular content in cultured astrocytes stimulated by anti-inflammatory drugs. Rat cortical astrocytes were cultured in DMEM containing 10% FCS. After confluence, the medium was replaced by the DMEM 1% FCS in the presence or absence of anti-inflammatory drugs (ASA 100 μ M, diclofenac 100 μ M, ibuprofen 100 μ M, dexamethasone 0.1 μ M or

nimesulide 50 μ M). After 24 h of exposure, intracellular content of COX1 and COX2 was analyzed by immunoblot (A) and extracellular PGE2 was measured by ELISA (B). Each value is the mean (\pm standard error) of at least 5 independent experiments performed in triplicate. * indicates significant difference from basal condition, assuming $p < 0.05$.

Figure 1

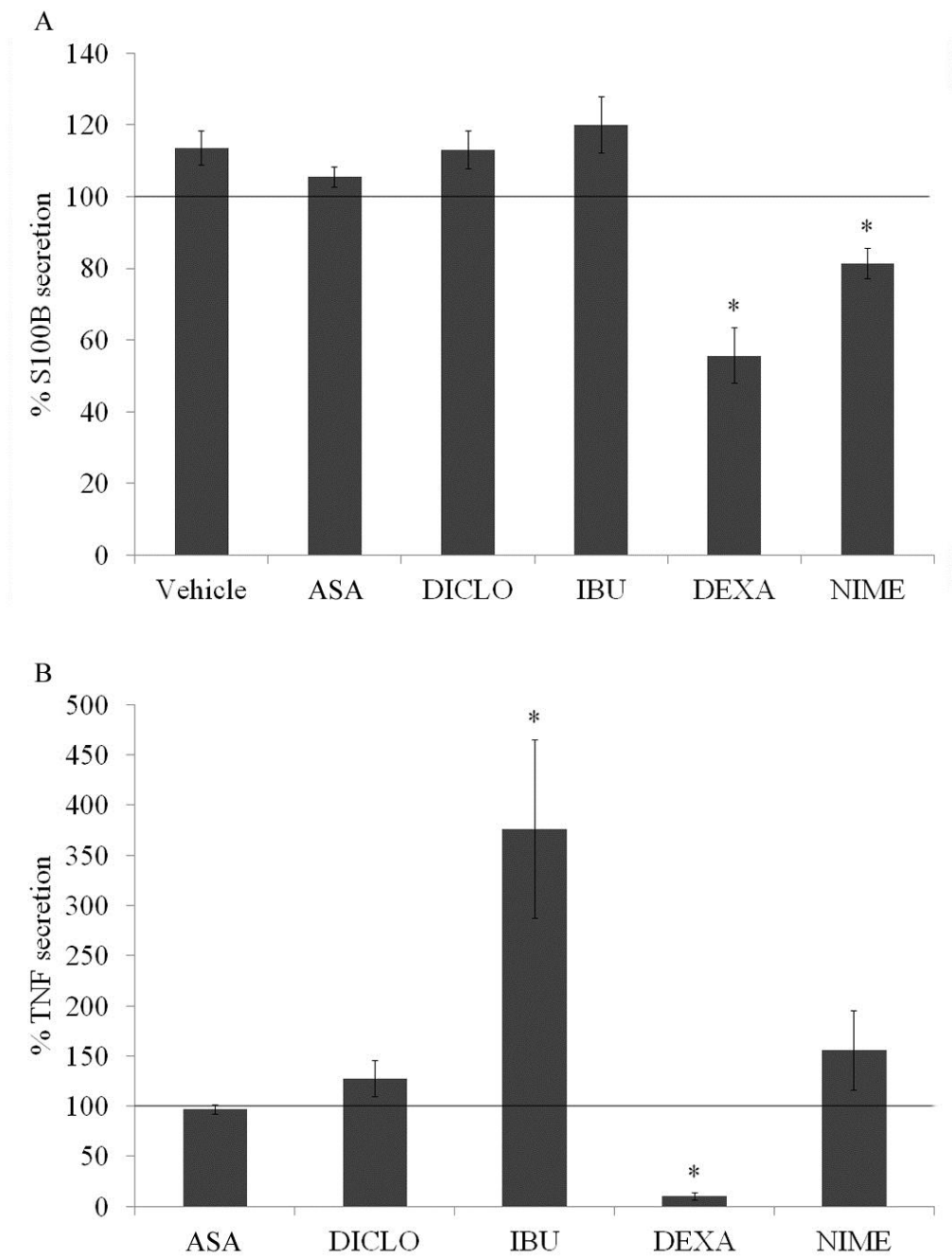


Figure 2

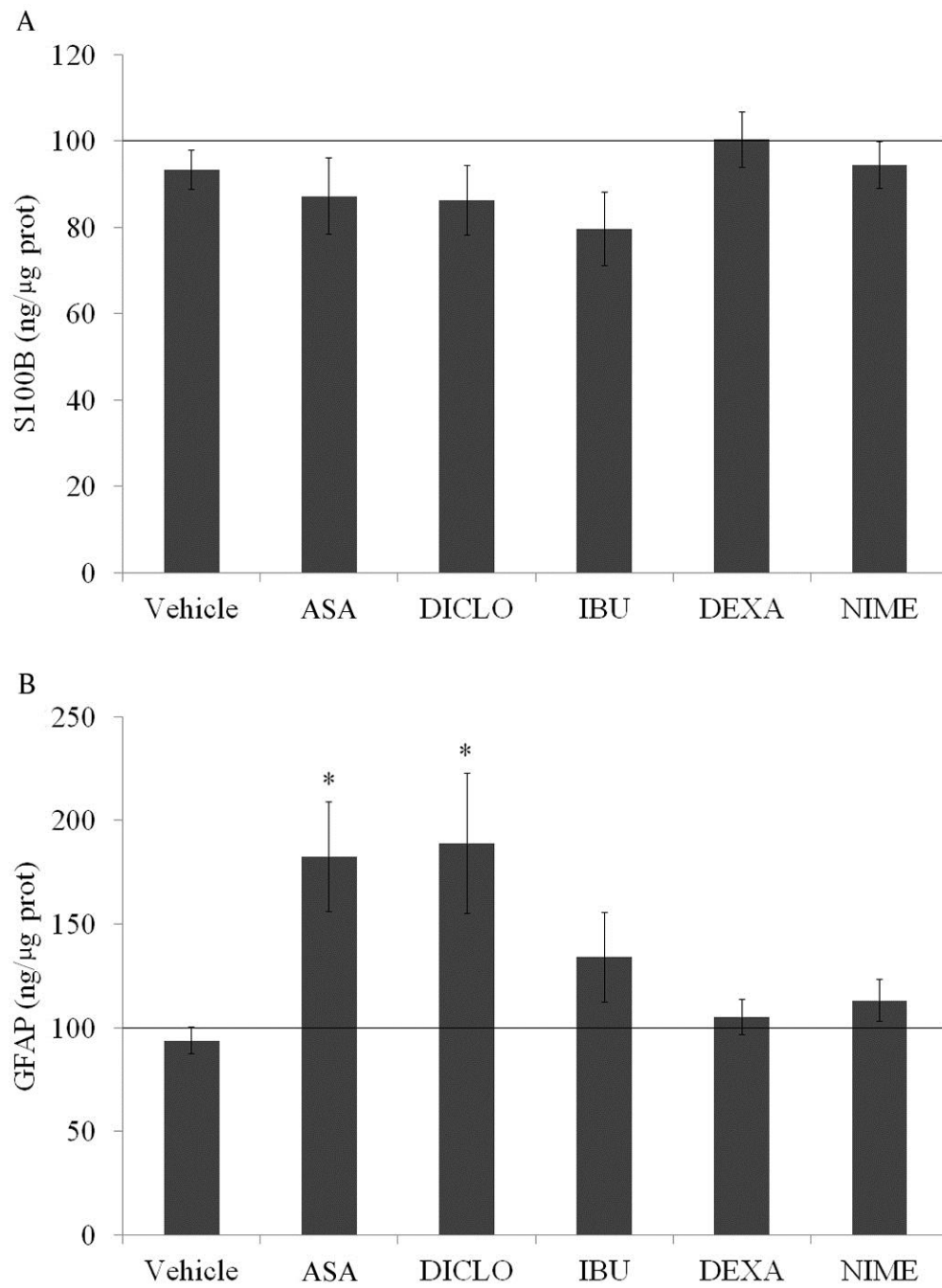


Figure 3

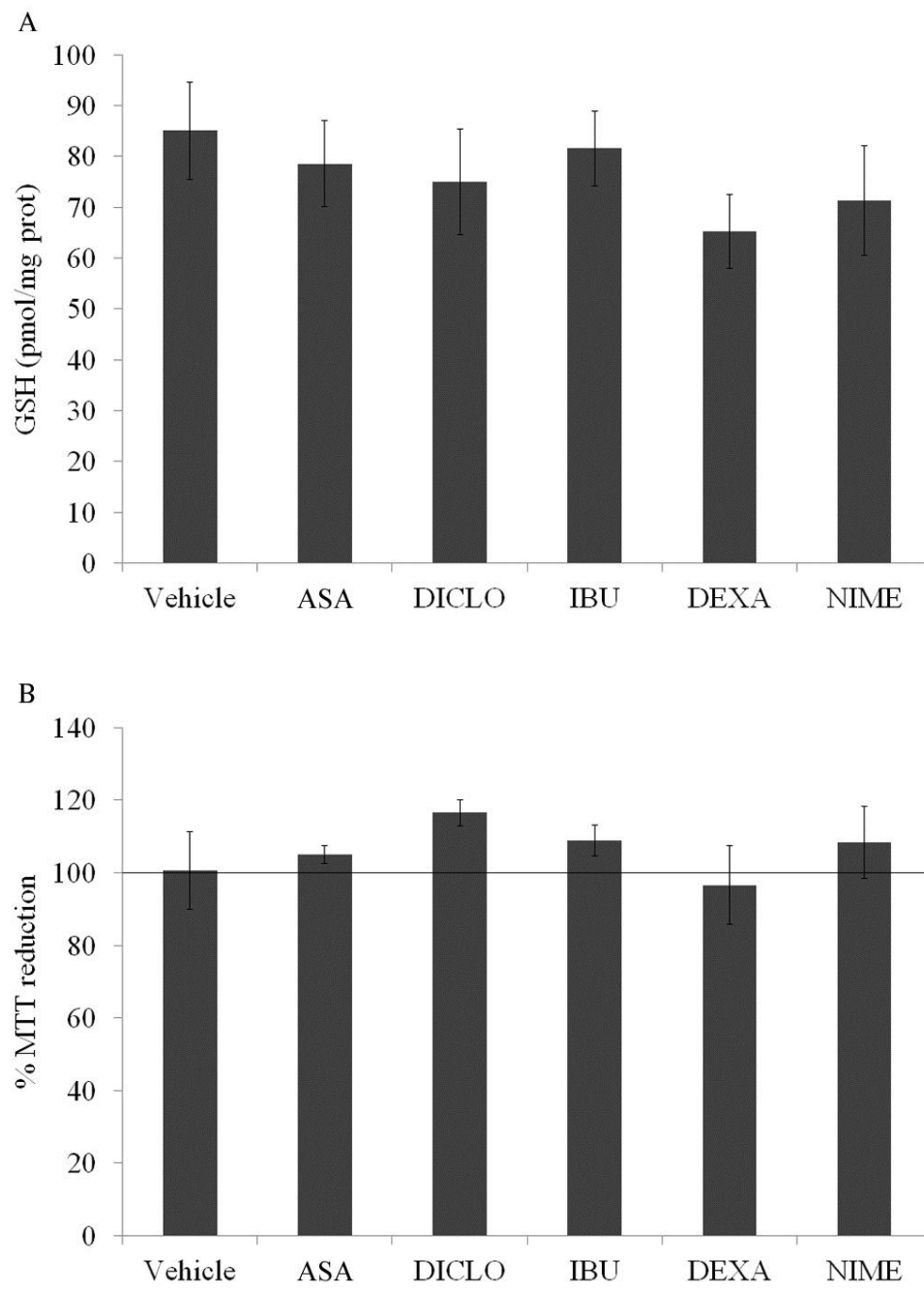


Figure 4

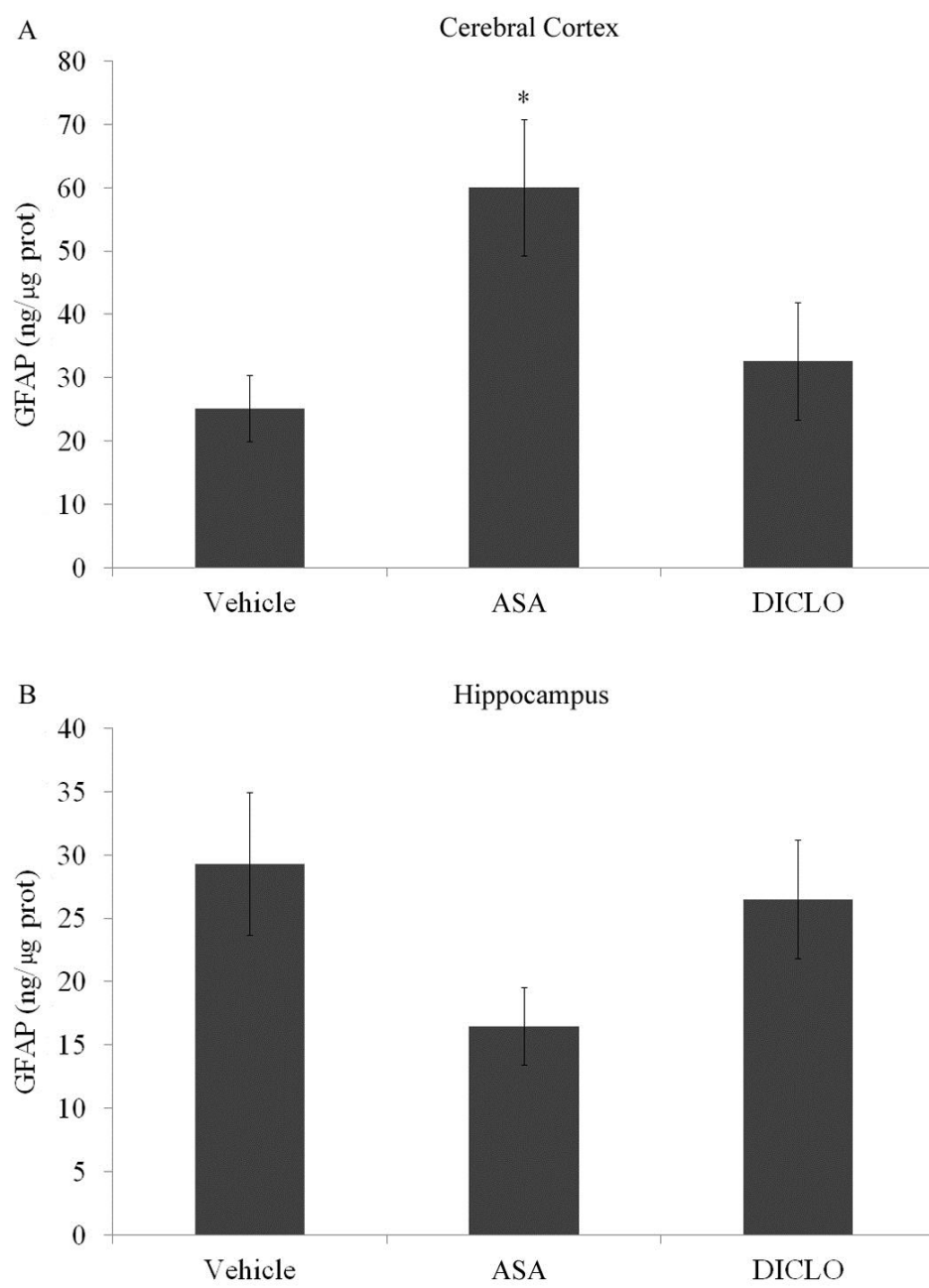
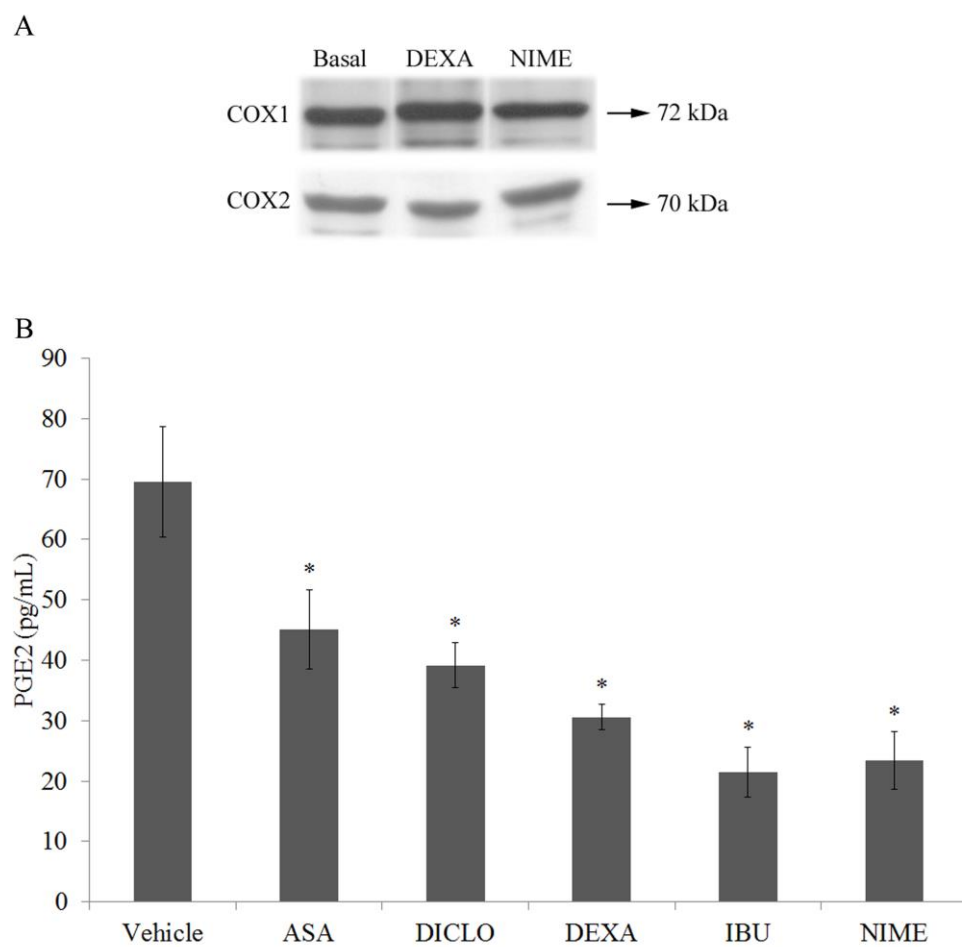


Figure 5



Capítulo III

Efeito de anti-inflamatórios em astrócitos estimulados com LPS sobre diferentes
parâmetros de ativação glial

Dados preliminares

Justificativa

Uma vez descrita a importância do processo neuroinflamatório em várias doenças neurodegenerativas, o envolvimento ativo de células astrogliais neste processo e a relevância da proteína S100B como um possível marcador de dano cerebral, nós resolvemos desenvolver um estudo com o objetivo de reunir algumas observações que ajude a compreender o papel da proteína S100B na neuroinflamação.

No capítulo I desta tese nós investigamos o efeito do LPS sobre a secreção e imunoconteúdo da proteína S100B em culturas astrogliais e também seu efeito *in vivo* e *ex vivo* e observamos que o LPS é capaz de modular a secreção dessa proteína, bem como de alterar outros parâmetros de ativação glial.

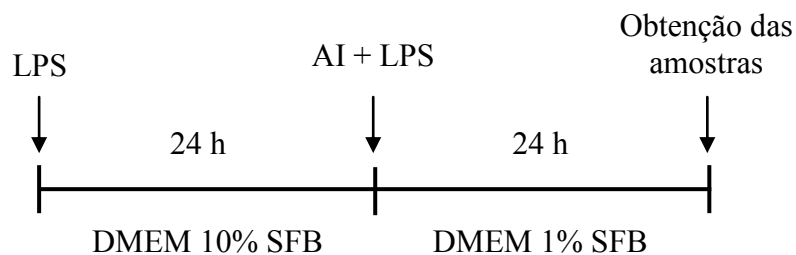
Além disso, sabendo da importância do uso de anti-inflamatórios contribuindo no tratamento de doenças neurodegenerativas, no capítulo II desta tese, nós observamos que estes fármacos modulam principalmente a secreção de S100B, sendo esta modulação específica para cada fármaco independente da classe em que se encontram.

Tendo em vista os efeitos do LPS e dos anti-inflamatórios sobre os astrócitos, observados anteriormente, o objetivo do capítulo III desta tese é investigar o efeito dos anti-inflamatórios em culturas primárias de astrócitos estimuladas com LPS sobre os diferentes parâmetros testados nos outros estudos.

Metodologia

Todas as técnicas utilizadas neste capítulo foram realizadas da mesma forma que estão descritas nos capítulos I e II.

Desenho experimental



Para os experimentos desse capítulo, foram utilizadas culturas primárias de astrócitos corticais de rato confluentes, com aproximadamente 21 dias de crescimento *in vitro*, mantidas em DMEM 10% SFB a 37°C em atmosfera de 5%CO₂/95% ar. Nesse experimento, as células foram pré-expostas a 0,1 µg/mL de LPS em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 h. Após, o meio de incubação foi substituído por DMEM contendo 1% SFB na presença de 0,1 µg/mL de LPS e de cada um dos anti-inflamatórios (AI) testados anteriormente (ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco, ibuprofeno, dexametasona e nimesulida), nas mesmas concentrações utilizadas no capítulo II desta tese.

Resultados

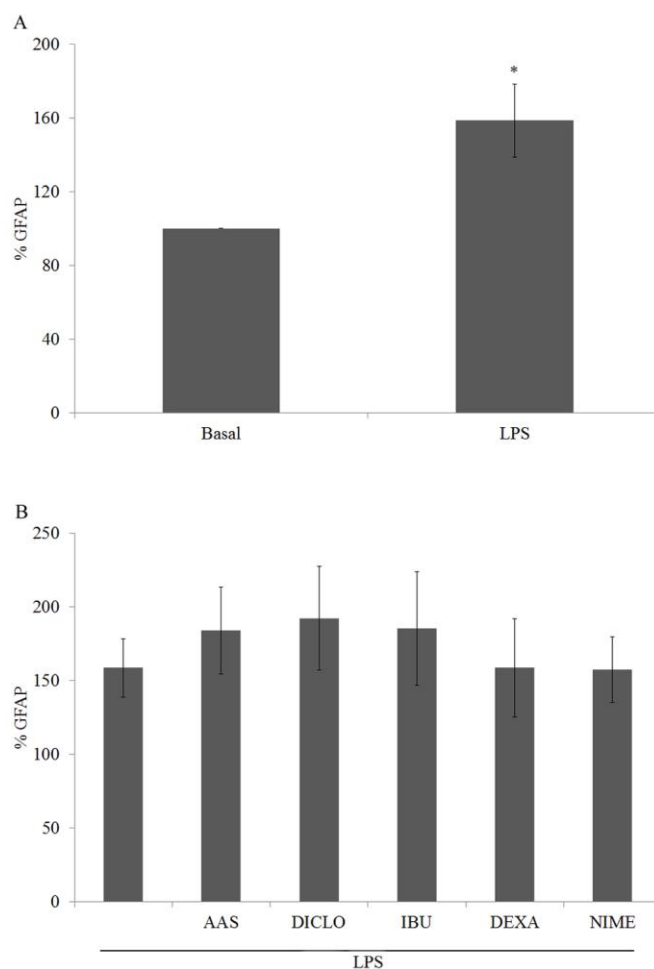


Figura 1: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre o imunoconteúdo de GFAP. As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 μM de AAS, 100 μM de diclofenaco, 100 μM de ibuprofeno, 0,1 μM de dexametasona e 50 μM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h. As células foram lisadas e o imunoconteúdo de GFAP foi medido por ELISA. O efeito do LPS sobre o imunoconteúdo basal de GFAP está representado em A e o efeito dos anti-inflamatórios na presença do LPS está representado em B. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100%, de no mínimo 5 experimentos independentes realizados em triplicata.

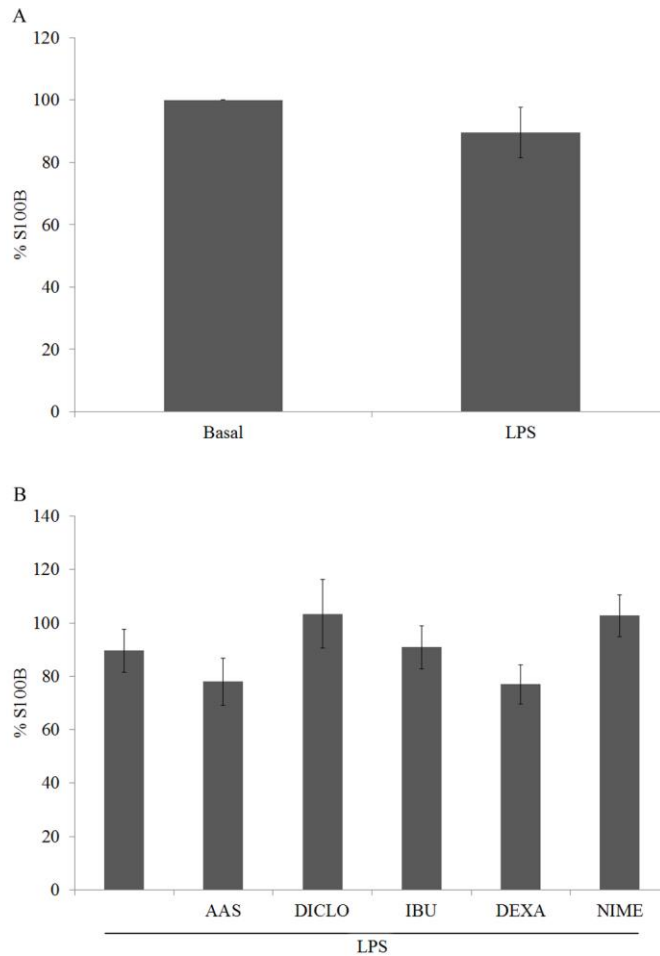


Figura 2: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre o imunocnteúdo de S100B. As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 µg/mL de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 µg/mL de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 µM de AAS, 100 µM de diclofenaco, 100 µM de ibuprofeno, 0,1 µM de dexametasona e 50 µM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h. As células foram lisadas e o imunocnteúdo de S100B foi medido por ELISA. O efeito do LPS sobre o imunocnteúdo basal de S100B está representado em A e o efeito dos anti-inflamatórios na presença do LPS está representado em B. Os dados estão apresentados na forma de média ± erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100%, de no mínimo 5 experimentos independentes realizados em triplicata.

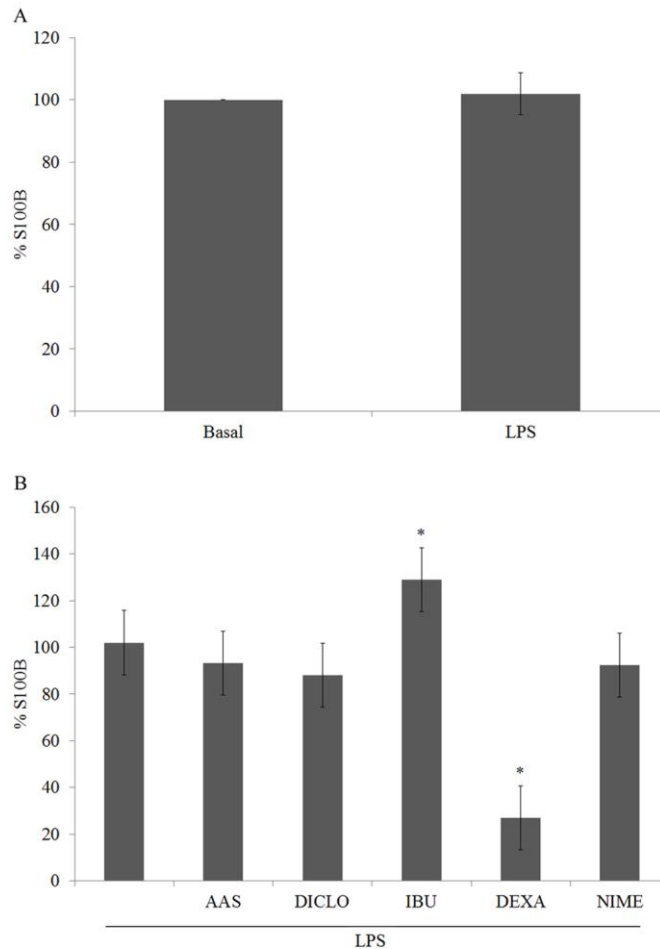


Figura 3: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre a secreção de S100B. As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 μM de AAS, 100 μM de diclofenaco, 100 μM de ibuprofeno, 0,1 μM de dexametasona e 50 μM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h. O meio de incubação foi coletado e a secreção de S100B foi medida por ELISA. O efeito do LPS sobre a secreção basal de S100B está representado em A e o efeito dos anti-inflamatórios na presença do LPS está representado em B. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100%, de no mínimo 5 experimentos independentes realizados em triplicata. * representa diferença significativa em comparação com o basal em A (teste T de Student) e em comparação com o LPS em B (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnet) para um $p < 0,05$.

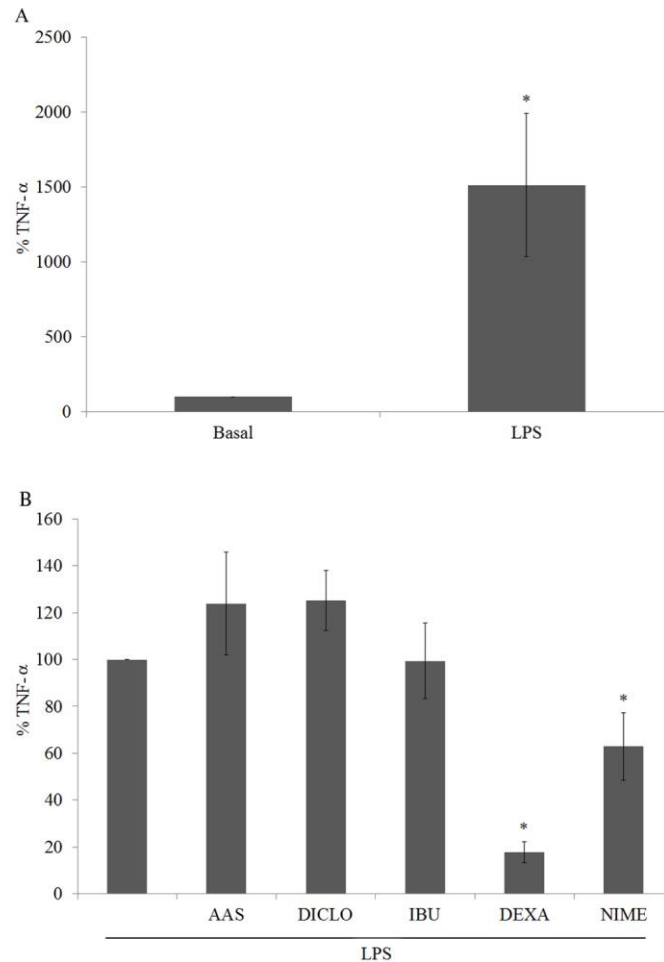


Figura 4: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre a secreção de TNF- α . As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 μM de AAS, 100 μM de diclofenaco, 100 μM de ibuprofeno, 0,1 μM de dexametasona e 50 μM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h. O meio de incubação foi coletado e a secreção de TNF- α foi medida por ELISA. O efeito do LPS sobre a secreção basal de TNF- α está representado em A e o efeito dos anti-inflamatórios na presença do LPS está representado em B. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100% (em A) e o LPS (em B), de no mínimo 5 experimentos independentes realizados em triplicata.* representa diferença significativa em comparação com o basal em A (teste T de Student) e em comparação com o LPS em B (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnet) para um $p < 0,05$.

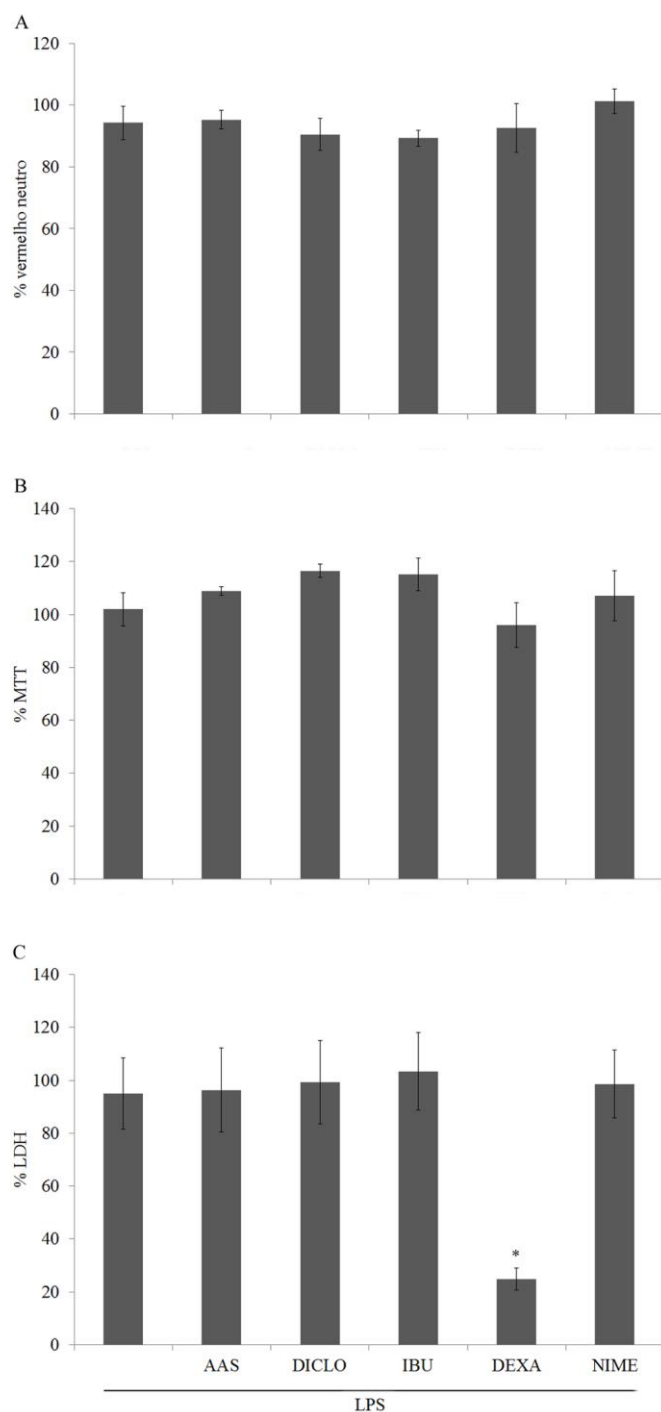


Figura 5: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre a viabilidade celular. As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 µg/mL de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 µg/mL de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 µM de AAS, 100 µM de diclofenaco, 100 µM de ibuprofeno, 0,1 µM de dexametasona e 50 µM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h.

Após, a viabilidade celular foi testada por incorporação de vermelho neutro em A, redução de MTT em B e liberação de LDH em C. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100%, de no mínimo 5 experimentos independentes realizados em triplicata.* representa diferença significativa em comparação com o basal (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnet) para um $p < 0,05$.

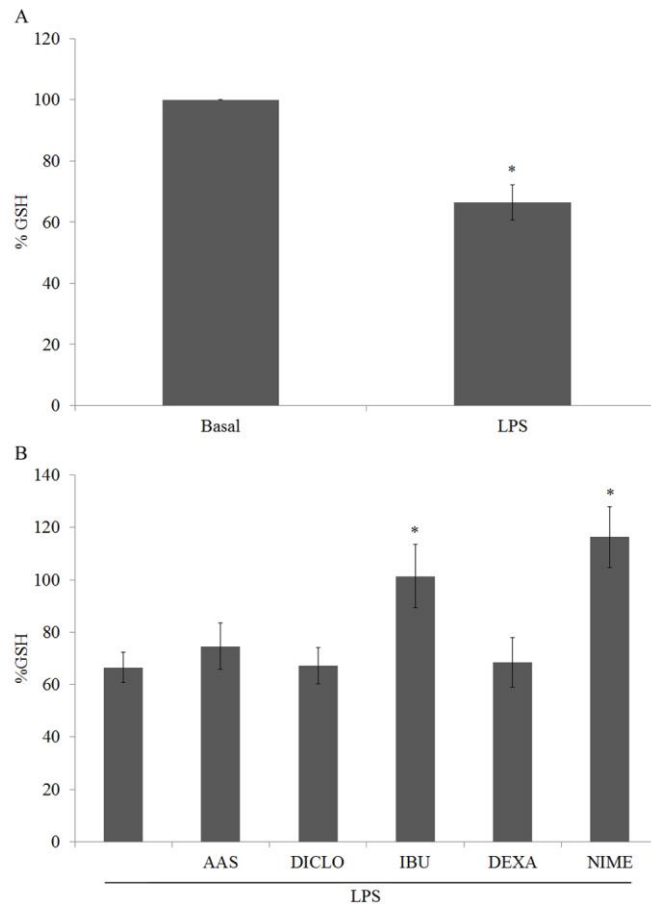


Figura 6: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre o conteúdo de glutatona reduzida. As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 μM de AAS, 100 μM de diclofenaco, 100 μM de ibuprofeno, 0,1 μM de dexametasona e 50 μM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h. As células foram lisadas e o conteúdo de GSH foi medido por uma técnica fluorimétrica. O efeito do LPS sobre o conteúdo basal de GSH está representado em A e o efeito dos anti-inflamatórios na presença do LPS está representado em B. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100%, de no mínimo 5 experimentos independentes realizados em triplicata.* representa diferença significativa em comparação com o basal em A (teste T de Student) e em comparação com o LPS em B (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnet) para um $p < 0,05$.

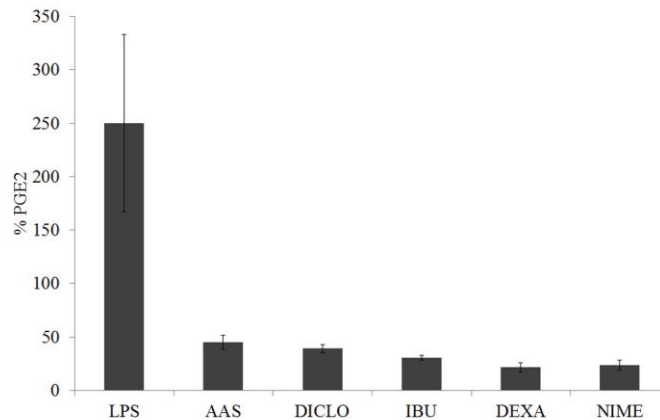


Figura 7: Efeito de anti-inflamatórios na presença de LPS sobre a secreção de PGE2. As culturas de astrócitos confluentes foram pré-expostas a 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS em DMEM 10% SFB por 24 h. Após, o meio foi substituído por DMEM 1% SFB, adicionado de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS e cada um dos diferentes anti-inflamatórios testados (100 μM de AAS, 100 μM de diclofenaco, 100 μM de ibuprofeno, 0,1 μM de dexametasona e 50 μM de nimesulida), conforme indicado na figura, durante 24 h. O meio de incubação foi coletado e a secreção de PGE2 foi medida por ELISA. Os dados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão, considerando o valor do basal como sendo 100%.

Descrição dos resultados

Nós avaliamos o conteúdo da proteína GFAP e da proteína S100B na presença de LPS e anti-inflamatórios e nenhuma mudança no conteúdo dessas proteínas foi observada (Figuras 1 e 2).

Outro parâmetro avaliado foi a secreção de S100B em 24 h de exposição ao LPS e na presença de anti-inflamatórios. Nós observamos uma diminuição na secreção de S100B na presença de dexametasona. O ibuprofeno, na presença de LPS, aumentou a secreção de S100B (Figura 3).

Em relação à liberação de TNF- α , somente a dexametasona foi capaz de reverter o aumento observado nas culturas expostas ao LPS (Figura 4).

Em relação às defesas antioxidantes, ibuprofeno e nimesulida foram capazes de reverter a diminuição de GSH observada na presença de LPS (Figura 5).

Em relação à viabilidade e integridade celular, nenhum comprometimento foi observado. Estes resultados são mostrados com base nos ensaios de redução de MTT, incorporação de vermelho neutro e liberação de LDH. Nós observamos uma redução da liberação de LDH na presença de dexametasona (Figura 6).

O LPS foi capaz de aumentar a liberação de PGE2, enquanto que a exposição a todos os anti-inflamatórios testados foi capaz de reverter esse aumento (Figura 7).

PARTE III

3. Discussão

A reação inflamatória dentro do SNC difere consideravelmente de outros tecidos, uma vez que não apresenta células dendríticas do sistema imune e a permeabilidade de vasos para a saída de grandes moléculas e células sanguíneas é reduzida em comparação com o resto do corpo pela presença da BHE. Outro aspecto é a dificuldade em ativar a cascata do complemento e recrutar células envolvidas na resposta imune adaptativa como leucócitos, com exceção de células T ativadas, as quais rapidamente penetram a BHE (Ransohoff & Brown 2012). Isto mostra que as células imunes inatas no SNC não são tão eficazes em recrutar a maquinaria da resposta imune adaptativa, como as células dendríticas nos tecidos periféricos. Outra importante diferença na inflamação dentro ou fora do parênquima cerebral são os tipos celulares envolvidos como, por exemplo, os astrócitos e microglia no SNC.

Apesar das células microgliais, entre outras funções (Salter & Beggs 2014), serem consideradas as células inflamatórias residentes no SNC, os astrócitos também apresentam-se como importantes mediadores celulares no processo inflamatório. Similar à microglia, os astrócitos tornam-se ativados em resposta a vários estímulos, processo conhecido como astrogliose reativa. Nesta condição os astrócitos são capazes de liberar uma ampla variedade de mediadores como, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias.

Um importante parâmetro de ativação astrogliosa é a proteína S100B (Rothermundt *et al.* 2003), a qual é predominantemente expressa e secretada por astrócitos no SNC e exerce efeitos autócrinos e parácrinos em neurônios e células gliais (Donato 2001, Donato *et al.* 2009). Esta proteína é capaz de atravessar a BHE e sua concentração no soro ou LCR parece refletir o grau de dano nas doenças cerebrais, sendo considerada como um marcador de dano cerebral (Goncalves *et al.* 2008). A S100B parece ser capaz

de modular a secreção de citocinas e também ser modulada por estas (de Souza et al. 2009, Schmitt *et al.* 2007). Por se comportar muitas vezes como uma citocina, a S100B já foi considerada como tal, mas ao contrário das citocinas clássicas, a S100B não é produzida exclusivamente para secreção, somente uma pequena parte é exportada, portanto esta ideia é controversa.

Estudos tem mostrado que astrócitos são capazes de responder ao LPS, o qual é um estímulo amplamente usado nos modelos de neuroinflamação. O LPS é capaz de diminuir a expressão de algumas proteínas como as proteínas de junção gap (Liao *et al.* , Liao *et al.* 2010) e aumentar a expressão de outras como a proteína GFAP e glutathione-S-transferase (Vergara *et al.* 2010, Brahmachari *et al.* 2006).

Uma hipótese é a S100B ser um marcador de dano cerebral e o aumento desta proteína no sangue periférico pode ser um indicativo de dano. Entretanto dependendo da condição patofisiológica, outras interpretações são possíveis, principalmente pela existência de fontes extracerebrais de S100B (Goncalves et al. 2008, Goncalves *et al.* 2010).

Alguns estudos trazem a medida dos níveis de S100B no soro após exposição ao LPS (Garnier *et al.* 2006, Rosengarten *et al.* 2009). No nosso estudo, a administração de LPS ICV ou IP em ratos Wistar não alterou os níveis de S100B no soro medida 30 min e 24 h após a exposição. Esta divergência pode ser devida à quantidades diferentes de LPS utilizado, do seu modo de administração, ou a linhagem do animal.

É importante ressaltar que LPS (IV 2 ng/kg), quando administrado a seres humanos, não é capaz de induzir mudanças significativas no S100B sérica em 1h ou 8h pós-tratamento (van den Boogaard *et al.* 2010). Além de medir S100B no soro, nós também avaliamos os níveis de S100B no LCR e encontramos um aumento de S100B

após LPS tanto para a administração ICV (uma resposta precoce e persistente) como IP (uma resposta precoce e transitória). Claramente nenhum aumento imediato ocorreu em ambas as condições. Isto sugere uma liberação de S100B cérebro específica induzida por LPS, mostrando talvez que células da periferia que secretam S100B como adipócitos não liberam ou causam uma liberação detectável de S100B quando estimuladas por LPS. Isso mostra que a secreção de S100B responde de maneiras diferentes a estímulo por LPS em células que expressam S100B na periferia e no SNC.

Ao contrário da S100B, nós observamos um aumento imediato de TNF- α no soro, após a administração de LPS tanto IP quanto ICV. Tem sido proposto que TNF- α é capaz de mediar a secreção de S100B em astrócitos (Edwards & Robinson 2006). Entretanto nossos resultados de avaliação dos níveis de TNF e S100B sugerem respostas independentes em relação ao LPS. Outro aspecto a ser enfatizado é que o aumento dos níveis de S100B no LCR não foi acompanhado por um aumento nos níveis no soro, pelo menos nos tempos avaliados (30 min e 24 h após LPS). O aumento da S100B no líquido foi rápido (detectada em 30 min) e persistente (por pelo menos 24 h). Os animais controles envolvidos no experimento envolvendo administração de LPS ICV apresentaram níveis maiores de S100B no líquido do que os controles envolvidos na administração de LPS IP, sugerindo uma resposta a um procedimento invasivo.

Em cultura de astrócitos nós observamos um aumento na secreção de S100B em 1 h de exposição ao LPS em concentrações acima de 10 $\mu\text{g/mL}$, mas em 24 h nós observamos uma diminuição da secreção mesmo nas concentrações mais baixas de LPS. Isto sugere uma resposta bifásica, isto é, um aumento seguido por uma diminuição na secreção de S100B. Este perfil tem sido observado em cultura de astrócitos sobre outras condições, como exposição ao beta-hidroxibutirato (Leite *et al.* 2004). Esta rápida e transitória estimulação da secreção em cultura de astrócitos também foi observada para

a IL1 β , mas sem a diminuição em 24 h. Estes dados podem sugerir que o efeito do LPS é direto e independente da liberação secundária de IL-1 β . Portanto, de acordo com nossa hipótese de trabalho, parece que o LPS é capaz de modular diretamente a secreção de S100B.

Além de cultura de astrócitos, nós também avaliamos a secreção de S100B em fatias hipocámpais em 1 h de exposição ao LPS e observamos um aumento na secreção de S100B com LPS na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, mas ao contrário nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 μg houve uma diminuição na secreção. Em relação a esta metodologia, a interpretação dos resultados é difícil devido a preparação apresentar mais de um tipo celular como a presença de astrócitos, microglia ativada e neurônios. Entretanto, um resultado similar tem sido observado em relação à endotelina-1 (Leite *et al.* 2009). Este composto bloqueia junções gap e aumenta a secreção de S100B em 1 h, mas diminui após 6 h. De forma semelhante, a endotelina-1 diminui a secreção de S100B em 1 h em fatias hipocámpais fresca. Potencialmente, ambos LPS e endotelina-1 inibem proteínas de junção gap. Embora nós não tenhamos dúvidas sobre os efeitos do LPS e da endotelina-1 na secreção de S100B em fatias hipocámpais fresca, nós não temos neste momento uma explicação para este efeito quando comparado a astrócitos isolados.

O conteúdo de S100B proveniente da sua secreção corresponde a uma pequena fração do conteúdo desta proteína nas células (menos que 0,5% é encontrado no meio de cultura de astrócitos em 24 h) e mudanças na secreção de S100B não necessariamente são acompanhadas por mudanças no conteúdo celular (Goncalves *et al.* 2008). De fato, nos nossos experimentos o LPS mudou a secreção sem alterar o conteúdo intracelular de S100B. Por outro lado o conteúdo de GFAP aumentou em todas as concentrações de LPS testadas, indicando ativação astrogliar, estando de acordo com estudos prévios sobre os efeitos de LPS em cultura de astrócitos (Vergara *et al.* 2010, Brahmachari *et al.*

2006). Estes resultados reforçam a ideia que GFAP e S100B têm mecanismos regulatórios de expressão distintos e que a astrogliose (medida por o aumento de GFAP) pode ser acompanhada ou não por mudanças no conteúdo intracelular de S100B.

Outro interessante resultado é a diminuição do conteúdo de glutathiona após exposição ao LPS em cultura de astrócitos em 24 h e não em 1 h, possivelmente associado com a regulação positiva da glutathiona-S-transferase (Vergara et al. 2010). Parte da diminuição de GSH pode estar envolvendo uma intensa exportação deste peptídeo, uma vez que ele serve como um antioxidante extracelular e também proporciona substratos para a síntese neuronal de glutathiona (Dringen & Hirrlinger 2003). Além disso, nós também encontramos uma diminuição no conteúdo de glutathiona em fatias hipocámpais expostas ao LPS.

Apesar da diminuição nas defesas antioxidantes, ambas as preparações não apresentam nenhum comprometimento na viabilidade e integridade celular, mostrado com base nos ensaios de redução de MTT, incorporação de vermelho neutro e liberação de LDH. Estes ensaios executados em paralelo com os ensaios para medir S100B, nos permite ser enfático em relação à secreção e não à liberação de S100B.

Recentemente alguns autores sugerem que a S100B deve agir como uma alarmina ou padrão molecular associado a dano (Bianchi 2007). Entretanto independente de qualquer conceito, nossos dados sugerem que a secreção de S100B é modulada por LPS, podendo ser protetora durante a fase inicial de exposição ao LPS. Ao contrário sua diminuição a uma exposição mais prolongada de astrócitos ao LPS dose dependente pode estar relacionada a diminuição de fatores tróficos por astrócitos nestas condições.

Como já comentado anteriormente, o receptor TLR4 é essencial no reconhecimento do LPS. Então, para caracterizar se o efeito do LPS é via TLR4, nós estimulamos os astrócitos com dois antagonistas específicos desse receptor (Cli-095 e OxPAPC) e

ambos foram capazes de abolir o efeito do LPS. Esse resultado nos indica que a modulação de S100B por LPS é dependente da união do LPS ao seu receptor TLR4, uma vez que, estudos recentes mostram que TLRs podem compartilhar vias de sinalização e ligantes com o receptor RAGE como, por exemplo, o LPS (Ibrahim et al., 2013). Este é capaz de se ligar ao RAGE e esta ligação desencadeia uma resposta similar à observada com TLR4, mas parece não necessitar das moléculas necessárias para a ligação ao TLR4 (Ibrahim *et al.* 2013).

Embora estes dados tenham contribuído para o nosso entendimento sobre o efeito do LPS na secreção de S100B, alguns aspectos permanecem pouco claros, como por exemplo, a possibilidade do LPS estar agindo sobre outro receptor que não o TLR4 nos astrócitos, ou o LPS estar modulando a secreção em outras células extracerebrais que expressam S100B afetando os níveis séricos desta proteína. Deste modo efeitos específicos e crônicos de bactérias gram-negativas sobre a proteína S100B tanto no SNC como sistema periférico merece maior investigação.

Como já descrito a proteína S100B extracelular é conhecida por afetar atividades microgliais, neuronais e astrocíticas com diferentes efeitos dependendo de sua concentração. Enquanto em baixas concentrações exerce efeitos tróficos em neurônios e astrócitos, em concentrações relativamente altas, pode causar apoptose neuronal e ativar astrócitos e microglia, então representando um fator endógeno implicado na neuroinflamação. Essa proteína é amplamente usada como parâmetro de ativação e ou morte astrogliar em várias condições de dano cerebral e variações dessa proteína no soro e LCR são propostas para avaliar resultados clínicos nestas situações (Gonçalves et al. 2008).

Uma vez que o aumento de S100B no SNC ocorre em diversas doenças neurodegenerativas como, por exemplo, doença de Alzheimer (Mori *et al.* 2010),

doença de Parkinson (Sathe *et al.* 2012), esquizofrenia (Rothermundt *et al.* 2004, Steiner *et al.* 2006), e vários estudos mostram o possível efeito de fármacos anti-inflamatórios sobre estas patologias, nós consideramos interessante avaliar o efeito dos anti-inflamatórios não esteroidais como aspirina, diclofenaco, ibuprofeno e nimesulida e esteroidais como a dexametasona sobre a secreção e o conteúdo intracelular da proteína S100B em cultura de astrócitos e no soro e LCR de ratos Wistar na ausência de estímulo inflamatório.

Primeiramente nós avaliamos a proteína GFAP conhecida por ser um marcador de astrogliose e podendo também ser observada em astrócitos durante processos neuropatológicos. Entretanto, o mecanismo molecular preciso que leva a esta indução durante processos neuropatológicos permanece pouco esclarecido. Nós observamos um aumento no conteúdo de GFAP em cultura de astrócitos após 24 h de exposição ao AAS e diclofenaco. Quando analisamos estes anti-inflamatórios *in vivo*, observamos também um aumento de GFAP em resposta à exposição ao AAS no córtex e uma tendência à diminuição no hipocampo, mostrando efeitos diferentes para regiões distintas do SNC. Nenhum resultado com diclofenaco foi significativo nas regiões testadas.

Em relação ao efeito do AAS na proteína GFAP, um estudo em glioblastoma humano mostra uma diminuição na expressão de GFAP na presença de aspirina, um resultado dependente de concentração (2 e 5 mM) (Bae *et al.* 2006) ao contrário do nosso resultado em cultura primária, mas compatível com nosso resultado *in vivo*, onde tivemos uma tendência de diminuição de GFAP no hipocampo. Esta diferença observada neste estudo em relação ao nosso resultado na modulação da GFAP pode estar relacionada à dose de AAS utilizada. No trabalho citado a concentração do fármaco é muito mais alta em relação a que utilizamos podendo estar sendo tóxica para as células. Além disso, o modelo utilizado no estudo é uma linhagem de astrócitos, que

embora seja um modelo muito utilizado para estudar essas células, apresenta limitações biológicas em relação à cultura primária, que podem influenciar no resultado observado. Estes resultados mostram que os anti-inflamatórios podem apresentar diferentes efeitos dependendo da condição a que são expostos.

O efeito inibitório da aspirina sobre a GFAP pode ser via NFκ-B, uma vez que estudos mostram que a aspirina é capaz de inibir a ativação de NFκ-B (Grilli et al. 1996), o qual é um regulador da expressão gênica de GFAP em células astrogliais (Bae et al. 2006). Quando testados em relação ao conteúdo intracelular de S100B nenhum dos anti-inflamatórios foi capaz de alterar o conteúdo desta proteína.

Um resultado interessante foi o efeito da dexametasona e nimesulida sobre a secreção de S100B e liberação de TNF-α após 24 h de tratamento. Tanto dexametasona como a nimesulida são inibidores específicos da COX2 e foram capazes de diminuir tanto a secreção de S100B, quanto a produção de TNF-α nas culturas astrogliais. A dexametasona é um anti-inflamatório esteroide capaz de inibir a expressão gênica de proteínas pró-inflamatórias como TNF-α e a enzima COX2. A inibição da síntese de COX2 conseqüentemente inibe a síntese de prostaglandinas, principais prostanóides inflamatórios. Entre estes prostanóides está a PGE₂, um dos mais importantes moduladores da inflamação e parece contribuir para a resposta inflamatória na doença de Alzheimer (Cudaback *et al.* 2014). A PGE₂ age em seu receptor EP2 acoplado a proteína G em astrócitos promovendo o aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (Bos *et al.* 2004). Uma vez que AMPC e cálcio estão envolvidos no aumento da secreção de S100B, a diminuição observada nos níveis desta proteína poderiam ser via PGE₂.

Os experimentos não apresentam nenhum comprometimento na viabilidade e integridade celular, mostrado com base nos ensaios de redução de MTT, incorporação

de vermelho neutro e liberação de LDH. A diminuição na incorporação de vermelho neutro observada na presença de ibuprofeno não nos parece ser um efeito significativo, visto que, os outros ensaios não mostraram nenhuma alteração. A diminuição significativa da liberação de LDH na presença de dexametasona pode ser devido a alguma interferência na técnica utilizada. Estes ensaios executados em paralelo com os ensaios para medir S100B, nos permite ser enfático em relação à secreção e não liberação de S100B.

Em relação às defesas antioxidantes, nós não observamos nenhuma alteração no nos níveis de GSH com os anti-inflamatórios testados.

Como observamos que o LPS é capaz de modular a secreção de S100B e que cada um dos anti-inflamatórios estudados pode ou não ter efeito na secreção de S100B, nós resolvemos investigar como a secreção e o imunoconteúdo da proteína S100B em culturas astrogliais estimuladas com LPS irão se comportar na presença desses anti-inflamatórios.

Nós avaliamos o conteúdo da proteína GFAP na presença de LPS e anti-inflamatórios. Nenhum anti-inflamatório foi capaz de reverter o aumento de GFAP causado pelo LPS. Curiosamente, AAS e diclofenaco, que sozinhos foram capazes de aumentar o conteúdo de GFAP, não tiveram um efeito aditivo na presença de LPS. Tanto na presença como na ausência de LPS, nenhum dos anti-inflamatórios testados foi capaz de modular o conteúdo intracelular de S100B.

Outro parâmetro avaliado foi a secreção de S100B em 24 h de exposição ao LPS e na presença de anti-inflamatórios. Nós observamos uma diminuição na secreção de S100B na presença de dexametasona, o mesmo resultado obtido na ausência do estímulo por LPS. Este resultado mostra que a dexametasona, um anti-inflamatório esteroide é capaz de inibir a secreção de S100B também em uma condição inflamatória

e como já discutido podendo esta inibição estar relacionada com a via das prostaglandinas. O mesmo perfil foi observado com a liberação de TNF- α , pois a dexametasona foi capaz de diminuir a liberação desta citocina na ausência e na presença de LPS. Este resultado nos faz pensar na S100B tendo um papel de citocina com caráter próinflamatório.

Interessantemente a nimesulida que em culturas não estimuladas por LPS foi capaz de diminuir a secreção de S100B, na presença de estímulo, o efeito desapareceu, não sendo capaz de reverter o efeito do LPS sobre a secreção de S100B. Na secreção de TNF- α , a nimesulida apresentou o mesmo perfil nos dois desenhos experimentais utilizados, uma tendência a redução.

O ibuprofeno que em culturas não estimuladas não apresentou nenhum efeito sobre a secreção de S100B, na presença de LPS curiosamente aumentou a secreção de S100B. Em relação a liberação de TNF- α , o ibuprofeno sozinho aumento a liberação de TNF- α , mas na presença de LPS este efeito desapareceu.

Em relação à viabilidade e integridade celular, tanto nas culturas astrogliais não estimuladas, quanto às estimuladas por LPS, nenhum comprometimento foi observado. Estes resultados são mostrados com base nos ensaios de redução de MTT, incorporação de vermelho neutro e liberação de LDH. A redução observada na incorporação de vermelho neutro na presença de diclofenaco em culturas não estimuladas desapareceu na presença de LPS, sugerindo que esse resultado não implica uma redução na viabilidade celular. A redução da liberação de LDH observada na presença de dexametasona em culturas não estimuladas se manteve nas culturas expostas ao LPS, corroborando a hipótese de uma possível interferência na técnica utilizada. Estes ensaios executados em paralelo com os ensaios para medir S100B, nos permite ser enfático em relação à secreção e não liberação de S100B.

Em relação às defesas antioxidantes, interessante­mente ibuprofeno e nimesulida foram capazes de reverter a redução do conteúdo de GSH observada na presença de estímulo inflamatório, sem ser observado efeito isolado destes fármacos. De acordo com nossos resultados, estudos mostram que a nimesulida é capaz de conferir proteção antioxidante através do aumento de GSH em modelo de isquemia (Candelario-Jalil et al. 2003) e também em astrocitoma e linhagem C6 estimuladas com LPS (Niranjan et al. 2010). Embora outros mecanismos possam estar envolvidos, a capacidade antioxidante da nimesulida pode ser por sua inibição seletiva da COX2 e consequentemente de prostaglandinas, considerando que o metabolismo do ácido araquidônico por ciclooxigenases é uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio.

4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, nós observamos que o LPS causa uma resposta inflamatória no SNC diferente da resposta inflamatória no sistema periférico, uma vez que é capaz de modular a liberação de S100B e TNF- α de maneiras diferentes nos dois sistemas. O LPS é capaz de estimular a secreção de S100B no SNC, mas células periféricas que expressam S100B quando estimuladas por LPS não parecem liberar essa proteína, diferentemente do perfil observado para a liberação de TNF- α , o qual apresenta um aumento tanto no SNC quanto na periferia. Em culturas de astrócitos, o LPS é capaz de estimular a secreção de S100B, portanto sendo capaz de modular diretamente esta proteína. Juntos estes dados contribuem para entender o efeito de LPS em astrócitos particularmente na secreção de S100B e nos ajuda a interpretar mudanças nesta proteína que ocorrem no LCR e no soro em doenças neuroinflamatórias e desordens cerebrais em geral.

Em relação ao estudo com anti-inflamatórios em parâmetros gliais, nós observamos que estes fármacos apresentam diferentes efeitos em diferentes condições. Todos os anti-inflamatórios estudados são capazes de atravessar a BHE e, portanto podem apresentar diferentes efeitos no SNC. Além da COX, outras proteínas estão envolvidas no processo inflamatório e os anti-inflamatórios podem agir sobre essas proteínas. Por exemplo, sabe-se que ácido flufenâmico, um anti-inflamatório não-esteroidal e inibidor de junção gap, é capaz de aumentar a secreção de S100B em cultura de astrócitos e nimesulida diminui a ativação de NF- κ B e MAPK.

Nossos resultados confirmam a presença de COX 1 e 2, bem como níveis basais de PGE₂. Diferentemente do resultado esperado, onde todos os anti-inflamatórios poderiam reduzir a secreção de S100B, uma vez que AMPc modula a secreção de S100B e a PGE₂ estimula receptores acoplados a proteína G e a adenilato ciclase,

interessantemente somente a nimesulida e dexametasona foram capazes de reduzir a secreção basal de S100B e TNF- α . Além disso, AAS e diclofenaco aumentam GFAP em cultura de astrócitos, mas somente o AAS foi capaz de reproduzir o mesmo efeito *in vivo*. Todos os anti-inflamatórios foram capazes de reduzir os níveis de PGE₂. Portanto a PGE₂ pode estar envolvida no mecanismo de secreção de S100B, no entanto vias bioquímicas envolvidas, não tão claras neste momento, necessitam ser melhor caracterizadas.

5. Referências Bibliográficas

- Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 41-53.
- Aid, S. and Bosetti, F. (2011) Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie*, **93**, 46-51.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S. et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **21**, 383-421.
- Allaman, I., Belanger, M. and Magistretti, P. J. (2011) Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in neurosciences*, **34**, 76-87.
- Aoyama, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2008) Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci*, **108**, 227-238.
- Asai, H., Kakita, H., Aoyama, M., Nagaya, Y., Saitoh, S. and Asai, K. (2013) Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte. *Cellular and molecular neurobiology*, **33**, 393-400.
- Bae, M. K., Kim, S. R., Lee, H. J. et al. (2006) Aspirin-induced blockade of NF-kappaB activity restrains up-regulation of glial fibrillary acidic protein in human astroglial cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1763**, 282-289.
- Basselin, M., Ramadan, E., Chen, M. and Rapoport, S. I. (2011) Anti-inflammatory effects of chronic aspirin on brain arachidonic acid metabolites. *Neurochem Res*, **36**, 139-145.
- Bianchi, M. E. (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**, 1-5.

- Bianchi, R., Giambanco, I. and Donato, R. (2008) S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol Aging*.
- Bos, C. L., Richel, D. J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M. P. and Versteeg, H. H. (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 1187-1205.
- Bowman, C. C., Rasley, A., Tranguch, S. L. and Marriott, I. (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, **43**, 281-291.
- Brahmachari, S., Fung, Y. K. and Pahan, K. (2006) Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci*, **26**, 4930-4939.
- Candelario-Jalil, E., Alvarez, D., Merino, N. and Leon, O. S. (2003) Delayed treatment with nimesulide reduces measures of oxidative stress following global ischemic brain injury in gerbils. *Neuroscience research*, **47**, 245-253.
- Candelario-Jalil, E. and Fiebich, B. L. (2008) Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury. *Current pharmaceutical design*, **14**, 1401-1418.
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J. and Miller, S. D. (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, **49**, 360-374.
- Carrasco, E. and Werner, P. (2002) Selective destruction of dopaminergic neurons by low concentrations of 6-OHDA and MPP+: protection by acetylsalicylic acid aspirin. *Parkinsonism & related disorders*, **8**, 407-411.
- Casper, D., Yaparpalvi, U., Rempel, N. and Werner, P. (2000) Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. *Neurosci Lett*, **289**, 201-204.

- Choi, S. H., Langenbach, R. and Bosetti, F. (2008) Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-1 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response and brain injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**, 1491-1501.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C. et al. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, **120**, 421-433.
- Cudaback, E., Jorstad, N. L., Yang, Y., Montine, T. J. and Keene, C. D. (2014) Therapeutic implications of the prostaglandin pathway in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, **88**, 565-572.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L. and Gan, W. B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, **8**, 752-758.
- De Cristobal, J., Cardenas, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Fernandez-Tome, P., Lorenzo, P. and Moro, M. A. (2002) Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke*, **33**, 261-267.
- 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.
- de Souza, D. F., Wartchow, K., Hansen, F., Lunardi, P., Guerra, M. C., Nardin, P. and Goncalves, C. A. (2013) Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **43**, 14-22.

- 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., 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. *Biochimica et biophysica acta*, **1793**, 1008-1022.
- Dringen, R., Gutterer, J. M. and Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*, **267**, 4912-4916.
- Dringen, R. and Hirrlinger, J. (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem*, **384**, 505-516.
- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B. and Lipsky, P. E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **12**, 1063-1073.
- 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.
- Engelhardt, B. (2010) T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, **1**, 79-93.
- Fang, F., Lue, L. F., Yan, S. et al. (2010) RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal :*

official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, **24**, 1043-1055.

- Farina, C., Aloisi, F. and Meinl, E. (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, **28**, 138-145.
- Font-Nieves, M., Sans-Fons, M. G., Gorina, R., Bonfill-Teixidor, E., Salas-Perdomo, A., Marquez-Kisinousky, L., Santalucia, T. and Planas, A. M. (2012) Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 6454-6468.
- Franke, H., Krugel, U. and Illes, P. (2006) P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch*, **452**, 622-644.
- Frizzo, J. K., Tramontina, F., Bortoli, E., Gottfried, C., Leal, R. B., Lengyel, I., Donato, R., Dunkley, P. R. and Goncalves, C. A. (2004) S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res*, **29**, 735-740.
- Garnier, Y., Berger, R., Alm, S. et al. (2006) Systemic endotoxin administration results in increased S100B protein blood levels and periventricular brain white matter injury in the preterm fetal sheep. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, **124**, 15-22.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C. and Gage, F. H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, **140**, 918-934.
- Glezer, I., Simard, A. R. and Rivest, S. (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*, **147**, 867-883.

- 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, 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. *Cardiovascular psychiatry and neurology*, **2010**, 790431.
- Griffin, W. S. (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*, **83**, 470S-474S.
- Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M. and Spano, P. (1996) Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science*, **274**, 1383-1385.
- Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L. et al. (2005) Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain : a journal of neurology*, **128**, 1442-1453.
- Hinkerohe, D., Smikalla, D., Schoebel, A., Haghikia, A., Zoidl, G., Haase, C. G., Schlegel, U. and Faustmann, P. M. (2010) Dexamethasone prevents LPS-induced microglial activation and astroglial impairment in an experimental bacterial meningitis co-culture model. *Brain Res*, **1329**, 45-54.
- Hinkerohe, D., Wolfkuhler, D., Haghikia, A., Meier, C., Faustmann, P. M. and Schlegel, U. (2011) Dexamethasone differentially regulates functional membrane properties in glioma cell lines and primary astrocytes in vitro. *Journal of neuro-oncology*, **103**, 479-489.

- Holm, T. H., Draeby, D. and Owens, T. (2012) Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia*, **60**, 630-638.
- Huo, Y., Rangarajan, P., Ling, E. A. and Dheen, S. T. (2011) Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. *BMC Neurosci*, **12**, 49.
- Ibrahim, Z. A., Armour, C. L., Phipps, S. and Sukkar, M. B. (2013) RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Molecular immunology*, **56**, 739-744.
- Iwata, Y., Nicole, O., Zurakowski, D., Okamura, T. and Jonas, R. A. (2010) Ibuprofen for neuroprotection after cerebral ischemia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, **139**, 489-493.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Johann, S., Kampmann, E., Denecke, B., Arnold, S., Kipp, M., Mey, J. and Beyer, C. (2008) Expression of enzymes involved in the prostanoid metabolism by cortical astrocytes after LPS-induced inflammation. *J Mol Neurosci*, **34**, 177-185.
- Kakita, H., Aoyama, M., Hussein, M. H., Kato, S., Suzuki, S., Ito, T., Togari, H. and Asai, K. (2009) Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced nitric oxide production through NF-kappaB signaling in cultured astrocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, **238**, 56-63.
- Kakita, H., Aoyama, M., Nagaya, Y., Asai, H., Hussein, M. H., Suzuki, M., Kato, S., Saitoh, S. and Asai, K. (2013) Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced phagocytosis of cultured microglia via nitric oxide production. *Toxicology and applied pharmacology*, **268**, 99-105.

- Kaplanski, J., Nassar, A., Sharon-Granit, Y., Jabareen, A., Kobal, S. L. and Azab, A. N. (2014) Lithium attenuates lipopolysaccharide-induced hypothermia in rats. *European review for medical and pharmacological sciences*, **18**, 1829-1837.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ*, **13**, 816-825.
- Kawai, T. and Akira, S. (2008) Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1143**, 1-20.
- Kawai, T. and Akira, S. (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, **21**, 317-337.
- Kipp, M., Norkute, A., Johann, S. et al. (2008) Brain-region-specific astroglial responses in vitro after LPS exposure. *J Mol Neurosci*, **35**, 235-243.
- Kirchhoff, F., Dringen, R. and Giaume, C. (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **251**, 159-169.
- Kotilinek, L. A., Westerman, M. A., Wang, Q. et al. (2008) Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain : a journal of neurology*, **131**, 651-664.
- Laan, W., Smeets, H., de Wit, N. J., Kahn, R. S., Grobbee, D. E. and Burger, H. (2009) Glucocorticosteroids associated with a decreased risk of psychosis. *Journal of clinical psychopharmacology*, **29**, 288-290.
- Laterra, J. and Goldstein, G. W. (1991) Astroglial-induced in vitro angiogenesis: requirements for RNA and protein synthesis. *J Neurochem*, **57**, 1231-1239.
- Leal, R. B., Frizzo, J. K., Tramontina, F., Fieuw-Makaroff, S., Bobrovskaya, L., Dunkley, P. R. and Goncalves, C. A. (2004) S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport*, **15**, 317-320.

- Lehnardt, S. (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, **58**, 253-263.
- Leite, M., Frizzo, J. K., Nardin, P., de Almeida, L. M., Tramontina, F., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2004) Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull*, **64**, 139-143.
- Leite, M. C., Brolese, G., de Almeida, L. M., Pinero, C. C., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull*, **70**, 179-185.
- Leite, M. C., Galland, F., 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*.
- Leon, C. G., Tory, R., Jia, J., Sivak, O. and Wasan, K. M. (2008) Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm Res*, **25**, 1751-1761.
- Liao, C. K., Wang, S. M., Chen, Y. L., Wang, H. S. and Wu, J. C. Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Liao, C. K., Wang, S. M., Chen, Y. L., Wang, H. S. and Wu, J. C. (2010) Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**, 762-770.
- Lin, J., Blake, M., Tang, C., Zimmer, D., Rustandi, R. R., Weber, D. J. and Carrier, F. (2001) Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J Biol Chem*, **276**, 35037-35041.

- Liu, W., Tang, Y. and Feng, J. (2011) Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci*, **89**, 141-146.
- Magistretti, P. J. (2009) Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr*, **90**, 875S-880S.
- McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging*, **28**, 639-647.
- McGeer, P. L. and Rogers, J. (1992) Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*, **42**, 447-449.
- Middeldorp, J. and Hol, E. M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, **93**, 421-443.
- Mihaylova, S., Schweighofer, H., Hackstein, H. and Rosengarten, B. (2014) Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation in endotoxemic rats on blood and spleen lymphocyte subsets. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, **63**, 683-690.
- Miller, S. B. (2006) Prostaglandins in health and disease: an overview. *Seminars in arthritis and rheumatism*, **36**, 37-49.
- Mogensen, T. H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, **22**, 240-273, Table of Contents.
- Moore, B. W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, **19**, 739-744.

- Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J. and Town, T. (2010) Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, **58**, 300-314.
- Morihara, T., Teter, B., Yang, F., Lim, G. P., Boudinot, S., Boudinot, F. D., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2005) Ibuprofen suppresses interleukin-1beta induction of pro-amyloidogenic alpha1-antichymotrypsin to ameliorate beta-amyloid (Abeta) pathology in Alzheimer's models. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **30**, 1111-1120.
- Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (2004) Trisomy 21 and the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 679-685.
- Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of aging*, **26**, 349-354.
- 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.
- Niranjan, R., Kamat, P. K., Nath, C. and Shukla, R. (2010) Evaluation of guggulipid and nimesulide on production of inflammatory mediators and GFAP expression in LPS stimulated rat astrocytoma, cell line (C6). *Journal of ethnopharmacology*, **127**, 625-630.
- Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V. et al. (2012) Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem*, **121**, 4-27.
- Pekny, M. and Pekna, M. (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, **204**, 428-437.

- Perry, V. H. and Holmes, C. (2014) Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, **10**, 217-224.
- 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.
- Pistrutto, G., Franzese, O., Pozzoli, G., Mancuso, C., Tringali, G., Preziosi, P. and Navarra, P. (1999) Bacterial lipopolysaccharide increases prostaglandin production by rat astrocytes via inducible cyclo-oxygenase: evidence for the involvement of nuclear factor kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 570-574.
- Ransohoff, R. M. and Brown, M. A. (2012) Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*, **122**, 1164-1171.
- Ransohoff, R. M. and Cardona, A. E. (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, **468**, 253-262.
- Ransohoff, R. M. and Perry, V. H. (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*, **27**, 119-145.
- Rao, P. and Knaus, E. E. (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, **11**, 81s-110s.
- Rosengarten, B., Wolff, S., Klatt, S. and Schermuly, R. T. (2009) Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition or norepinephrine on the neurovascular coupling in an endotoxic rat shock model. *Critical care*, **13**, R139.

- 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.
- Salomao, R., Brunialti, M. K., Rapozo, M. M., Baggio-Zappia, G. L., Galanos, C. and Freudenberg, M. (2012) Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock*, **38**, 227-242.
- Salter, M. W. and Beggs, S. (2014) Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*, **158**, 15-24.
- Sathe, K., Maetzler, W., Lang, J. D. et al. (2012) S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF-alpha pathway. *Brain : a journal of neurology*, **135**, 3336-3347.
- Schmitt, K. R., Kern, C., Lange, P. E., Berger, F., Abdul-Khaliq, H. and Hendrix, S. (2007) S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. *Neuroscience research*, **59**, 68-73.
- Schousboe, A., Westergaard, N., Sonnewald, U., Petersen, S. B., Yu, A. C. and Hertz, L. (1992) Regulatory role of astrocytes for neuronal biosynthesis and homeostasis of glutamate and GABA. *Progress in brain research*, **94**, 199-211.
- Sekiyama, K., Fujita, M., Sekigawa, A., Takamatsu, Y., Waragai, M., Takenouchi, T., Sugama, S. and Hashimoto, M. (2012) Ibuprofen ameliorates protein aggregation and astrocytic gliosis, but not cognitive dysfunction, in a transgenic mouse expressing dementia with Lewy bodies-linked P123H beta-synuclein. *Neurosci Lett*, **515**, 97-101.

- Shastri, A., Bonifati, D. M. and Kishore, U. (2013) Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators of inflammation*, **2013**, 342931.
- Sheng, J. G., Ito, K., Skinner, R. D., Mrak, R. E., Rovnaghi, C. R., Van Eldik, L. J. and Griffin, W. S. (1996) In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiology of aging*, **17**, 761-766.
- Simard, M., Couldwell, W. T., Zhang, W., Song, H., Liu, S., Cotrina, M. L., Goldman, S. and Nedergaard, M. (1999) Glucocorticoids-potent modulators of astrocytic calcium signaling. *Glia*, **28**, 1-12.
- Simmons, D. L., Botting, R. M. and Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, **56**, 387-437.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*, **69**, 145-182.
- Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, **119**, 7-35.
- Steiner, J., Bielau, H., Bernstein, H. G., Bogerts, B. and Wunderlich, M. T. (2006) Increased cerebrospinal fluid and serum levels of S100B in first-onset schizophrenia are not related to a degenerative release of glial fibrillar acidic protein, myelin basic protein and neurone-specific enolase from glia or neurones. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **77**, 1284-1287.
- Streit, W. J., Mrak, R. E. and Griffin, W. S. (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, **1**, 14.

- Suwanjang, W., Holmstrom, K. M., Chetsawang, B. and Abramov, A. Y. (2013) Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium*, **53**, 256-263.
- Swarowsky, A., Rodrigues, L., Biasibetti, R. et al. (2008) Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res*, **190**, 206-211.
- Takaoka, Y., Goto, S., Nakano, T., Tseng, H. P., Yang, S. M., Kawamoto, S., Ono, K. and Chen, C. L. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice. *Scientific reports*, **4**, 5204.
- Takemiya, T., Matsumura, K. and Yamagata, K. (2007) Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int*, **51**, 112-120.
- Tremblay, M. E., Lowery, R. L. and Majewska, A. K. (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology*, **8**, e1000527.
- van den Boogaard, M., Ramakers, B. P., van Alfen, N. et al. (2010) Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Critical care*, **14**, R81.
- 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.
- Vane, J. R., Bakhle, Y. S. and Botting, R. M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **38**, 97-120.
- Vergara, D., Martignago, R., Bonsegna, S., De Nuccio, F., Santino, A., Nicolardi, G. and Maffia, M. (2010) IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes. *J Neuroimmunol*, **221**, 115-120.

- Vlad, S. C., Miller, D. R., Kowall, N. W. and Felson, D. T. (2008) Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, **70**, 1672-1677.
- Wahner, A. D., Bronstein, J. M., Bordelon, Y. M. and Ritz, B. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may protect against Parkinson disease. *Neurology*, **69**, 1836-1842.
- Wang, D. D. and Bordey, A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, **86**, 342-367.
- Wilkinson, B. L., Cramer, P. E., Varvel, N. H., Reed-Geaghan, E., Jiang, Q., Szabo, A., Herrup, K., Lamb, B. T. and Landreth, G. E. (2012) Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **33**, 197 e121-132.
- Yang, H. and Chen, C. (2008) Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Current pharmaceutical design*, **14**, 1443-1451.
- Yin, M. J., Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, **396**, 77-80.
- Zaminelli, T., Gradowski, R. W., Bassani, T. B., Barbiero, J. K., Santiago, R. M., Maria-Ferreira, D., Baggio, C. H. and Vital, M. A. (2014) Antidepressant and Antioxidative Effect of Ibuprofen in the Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity research*.
- Zhou, H., Lapointe, B. M., Clark, S. R., Zbytniuk, L. and Kubes, P. (2006) A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*, **177**, 8103-8110.