

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**INFLUÊNCIA DA AMÔNIA SOBRE O CONTEÚDO E SECREÇÃO DE S100B
EM CULTURA DE ASTRÓCITOS**

MARINA CONCLI LEITE

ORIENTADOR

CARLOS ALBERTO SARAIVA GONÇALVES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2006

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

John R. Mott

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por tudo que sempre me ensinaram, pelo apoio em todas as minhas decisões e pelo incentivo. Amo muito vocês!

À minha querida irmã, Fernanda, pela companhia e carinho em todos os momentos. Te amo, maninha!

Ao Matheus, que sempre acreditou em mim, pelo amor e por todo o incentivo e apoio nos momentos em que achei que tudo daria errado. Amo você!

À Bi e ao Nei, pelo carinho com que sempre me receberam.

Ao Ângelo e à Dani Grisa, pela amizade.

À Lúcia, por ser mais que minha colega de laboratório e amiga, por toda ajuda prática e, principalmente por não me deixar enlouquecer quando tudo deu errado. Te adoro!

A Jô, minha bolsista, pelo excelente convívio e por toda ajuda prática.

À Dani G., por toda amizade, ensinamentos, e por despertar o gosto pela pesquisa em mim.

À Ju, Cris Netto e Fran, por tudo o que me ensinaram durante minha iniciação científica e pela amizade.

A todos os integrantes do LaBS100, bolsistas e pós-graduandos, por fazerem desse laboratório um ótimo lugar para se trabalhar.

À Ana Feoli, Pati, Mari e Ale pelo convívio e amizade.

A meus colegas de faculdade que me deram apoio durante todo o mestrado: Karina, Aletéia, Alexandre, Eduardo, Melissa e Patrícia.

À Cléia e à Simone, secretárias da Pós-graduação, pela dedicação.

À Verlaine pelo apoio técnico e bom humor em todas as manhãs.

À Alessandra por todo apoio com as culturas de células e principalmente pelo bom humor e carinho de todos os dias.

À Carmem, pela ajuda com as culturas e com as imagens e, principalmente, por toda amizade. Muito obrigada por tudo.

Ao CNPq, FAPERGS e PRONEX pelo apoio financeiro.

Por fim, queria agradecer ao CA, não só pela orientação, mas por acreditar em mim desde o primeiro dia que entrei no laboratório. Muito obrigada por fazer com que eu chegasse até aqui!

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
I. INTRODUÇÃO	4
I.1. Astrócitos	4
I.2. Proteínas S100	5
I.2.1. Proteína S100B	5
I.2.1.1. Papéis Intracelulares	6
I.2.1.2. Papéis Extracelulares	6
I.2.1.3. Envolvimento em Doenças Neurodegenerativas	8
I.2.1.4. Expressão e Secreção	8
I.3. Amônia	9
I.3.1. Metabolismo Normal Periférico	9
I.3.2. Metabolismo Normal no SNC	10
I.3.3. Hiperamonemia	11
I.3.3.1. Causas e Conseqüências da Hiperamonemia	11
I.3.3.2. Concentrações Séricas e Centrais de Amônia	12
I.3.3.3. Hiperamonemia e Parâmetros Astrocíticos	14
I.3.3.3.1. S100B e Encefalopatia Hepática	14
I.3.3.3.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial – GFAP	14
I.3.3.3.3. Glutamato	16
I.3.3.3.4. Glutamina Sintetase	17
I.3.3.3.5. Distúrbios Metabólicos e Energéticos	18
I.3.3.3.6. Estresses Oxidativo e Nitrosativo	18

OBJETIVOS	20
II. ARTIGO SUBMETIDO AO BRAIN RESEARCH BULLETIN	21
III. DISCUSSÃO	51
III.1. Sumário dos Resultados	51
III.2. Amônia e Atividade Glial	52
III.3. Limitações e Perspectivas	58
IV. CONCLUSÕES	61
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

A hiperamonemia é o principal elemento na patogênese da encefalopatia hepática e a neurotoxicidade da amônia envolve um efeito no sistema de neurotransmissão glutamatérgica. Os astrócitos são intimamente relacionados com a transmissão glutamatérgica e, de fato, muitas alterações gliais específicas têm sido relatadas devido à exposição à amônia. A proteína S100B, particularmente a S100B extracelular, é usada como um parâmetro de ativação glial em diversas situações de injúria cerebral. Entretanto, existe pouca informação sobre essa proteína na toxicidade da amônia e nada se sabe sobre a sua secreção por astrócitos durante uma exposição à amônia. Nesse trabalho, nós investigamos a secreção de S100B em astrócitos corticais de ratos expostos de forma aguda à amônia, bem como a morfologia astrocítica, o imunoconteúdo da proteína fibrilar ácida glial (GFAP) e a atividade da enzima glutamina sintetase (GS). Além disso, investigamos um possível efeito da creatina nesses parâmetros gliais, devido a esse composto ter um suposto papel contra a toxicidade da amônia em culturas celulares. Encontramos um aumento da secreção de S100B em astrócitos expostos por 24 h à amônia, acompanhado de uma redução do imunoconteúdo de GFAP e da atividade da GS. Como elevados e persistentes aumentos extracelulares de S100B têm um efeito tóxico em células neuronais, a secreção alterada de S100B induzida pela amônia pode contribuir para o dano cerebral observado na encefalopatia hepática. A adição de creatina não impediu esse aumento na secreção de S100B, mas foi capaz de impedir a redução da concentração de GFAP e da atividade da GS induzidas pela exposição à amônia.

ABSTRACT

Hyperammonemia is a major element in the pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE) and ammonia neurotoxicity involves an effect on the glutamatergic neurotransmitter system. Astrocytes are intimately related to glutamatergic neurotransmission and, in fact, many specific glial alterations have been reported due to ammonia exposure. S100B protein, particularly extracellular S100B, is used as a parameter of glial activation or commitment in several situations of brain injury. However, there is little information about this protein in ammonia toxicity and none about its secretion in astrocytes under ammonia exposure. In this study we investigated S100B secretion in rat cortical astrocytes acutely exposed to ammonia, as well astrocyte morphology, glial fibrillary acidic protein (GFAP) content and glutamine synthetase (GS) activity. Moreover, we studied a possible effect of creatine on these glial parameters, since that this compound has a putative role against ammonia toxicity in cell cultures. We found an increase in S100B secretion by astrocytes exposed to ammonia for 24 h, accompanied by a decrease in GFAP content and GS activity. Since elevated and persistent extracellular S100B plays a toxic effect on neural cells, altered extracellular content of S100B induced by ammonia could contribute to the brain impairment observed in HE. Creatine addition did not prevent this increment in S100B secretion, but was able to prevent the decrease in GFAP content and GS activity induced by ammonia exposure.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AMPC	Adenosina Monofosfato Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
CRT	Transportador de Creatina
EAAT (1-3)	Transportador de Aminoácidos Excitatórios
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
gln	Glutamina
glu	Glutamato
GS	Glutamina Sintetase
GSH	Glutathiona Reduzida
IL-1 β	Interleucina 1-beta
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LPA	Ácido Lisofosfatídico
NF κ B	Fator de Transcrição Nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDA-R	Receptor de N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa

I. INTRODUÇÃO

I.1. Astrócitos

Os astrócitos, assim chamados por sua forma estrelar, são as células mais abundantes pertencentes a glia, que durante muito tempo foi considerada somente como um suporte estrutural para os neurônios. Essas células podem ser classificadas em dois tipos: fibrosos e protoplasmáticos e, quando em cultura, tipos 1 e 2, respectivamente (Kimelberg e Norenberg, 1989). Entretanto, importantes funções têm sido atribuídas aos astrócitos:

- ✓ a remoção do glutamato da fenda sináptica e sua detoxificação através da enzima glutamina sintetase (Daikhin e Yudkoff, 2000);
- ✓ secreção de mensageiros químicos, por diferentes mecanismos (Evanko et al, 2004);
- ✓ fornecer suporte energético para os neurônios, produzindo e liberando lactato para o meio extracelular (Pellerin, 2005);
- ✓ proteção contra agentes tóxicos para neurônios, como a amônia (Rao et al, 2005).

Atualmente, sabe-se que neurônios e astrócitos estão intimamente relacionados, tanto na função cerebral normal, quanto em situações de injúria (Benarroch, 2005). Os astrócitos participam também na sinalização celular, fazendo parte das sinapses, formando uma unidade multifuncional juntamente com os neurônios (Fellin e Carmignoto, 2004). Além disso, os astrócitos podem modular a resposta inflamatória e recentemente têm sido considerados como novos alvos para drogas neuroprotetoras (Darlington, 2005).

I.2. Proteínas S100

As proteínas S100 são assim chamadas pelo fato de serem solúveis em solução 100% saturada de sulfato de amônio (Moore, 1965). Atualmente, já foram identificadas 21 proteínas pertencentes a essa família, que se caracterizam por serem ligantes de cálcio, do tipo EF-hand e por não terem distribuição homogênea em todos os tipos celulares. De fato, elas são codificadas por genes diferentes, localizados em diferentes cromossomos e são expressas de forma específica por alguns tipos celulares. Por exemplo, no SNC, a S100A1 é expressa em neurônios, enquanto que a S100B é expressa em astrócitos. As proteínas pertencentes à família S100 são encontradas no meio intracelular na forma de homodímeros, à exceção da calbindina D_{9k} que se encontra na forma monomérica. Em alguns casos, as proteínas S100 podem formar heterodímeros (Donato, 2001).

I.2.1. Proteína S100B

A proteína S100B, uma das proteínas S100 melhor caracterizada, é produzida e secretada, no SNC, por astrócitos (Donato, 2001;2003). Essa proteína pode atravessar a barreira hematoencefálica e concentrações basais podem ser determinadas no soro (Marchi et al, 2004). Quando ocorre dano cerebral, a S100B pode aparecer até mesmo na urina (Gazzolo et al, 2003a). Entretanto, essa concentração sérica basal ou mesmo aumentos dessa concentração não podem ser considerados como provenientes de fonte

exclusivamente cerebral (Netto et al, *in press*), visto que a S100B já foi identificada em tecido adiposo (Marshak, 1985; Haimoto et al, 1987), de onde pode ser secretada (Suzuki e Kato, 1986; Netto et al, *in press*). Células mamárias epiteliais também expressam S100B e ela pode ser encontrada em altas concentrações no leite materno, sugerindo que esse tipo celular também possa secretar S100B (Gazzolo et al, 2003b).

I.2.1.1. Papéis Intracelulares

Dentre suas funções intracelulares no SNC, a S100B é capaz de modular a polimerização do citoesqueleto (Garbuglia et al, 1999), inibindo a fosforilação de GFAP e vimentina em cultura de astrócitos hipocampais (Frizzo et al, 2004).

I.2.1.2. Papéis Extracelulares

Os papéis extracelulares da proteína S100B em cultura estão intimamente relacionados com a sua concentração no meio extracelular (Figura 1).

Em baixas concentrações, variando entre picomolar e valores baixos de nanomolar, essa proteína é trófica. Nessas condições, ela promove a sobrevivência neuronal, o crescimento de neuritos e modula a função sináptica (Van Eldik e Wainwright, 2003). Por exemplo, em cultura de neurônios hipocampais, a adição de S100B é capaz de proteger essas células do dano ocasionado pela privação de glicose (Barger et al, 1995), além de ser

extremamente importante durante o desenvolvimento. Ao nascimento, as concentrações de S100B no líquido e no soro são elevadas e, ao longo do desenvolvimento, vão diminuindo até atingir um platô (Tramontina et al, 2002; Portela et al, 2002).

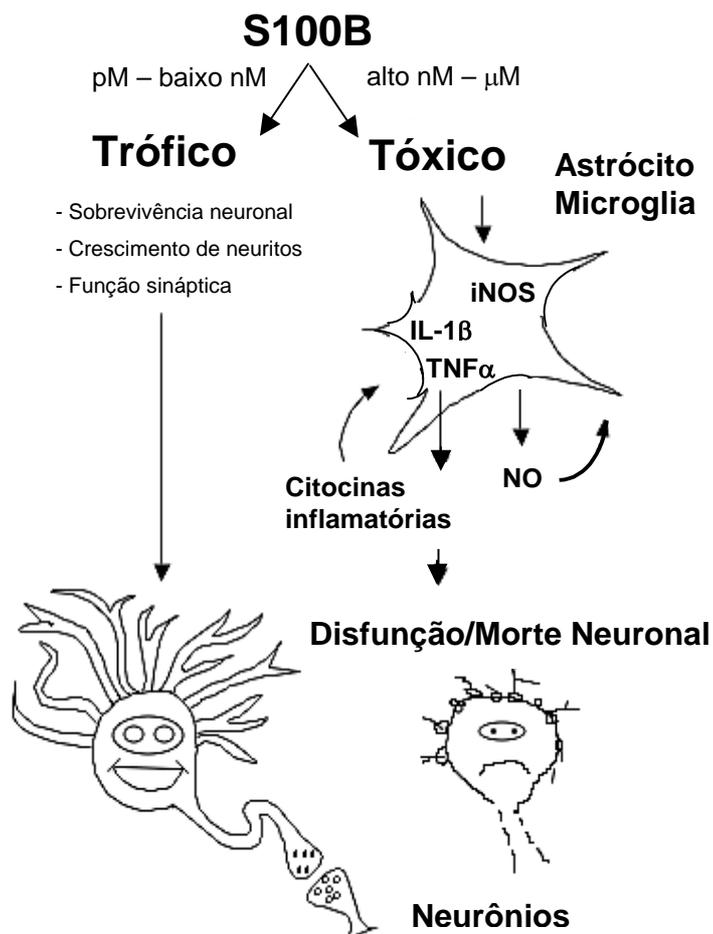


Figura 1: Efeitos extracelulares da S100B são dependentes de concentração.
Adaptado de Van Eldik e Wainwright (2003).

Já em concentrações mais elevadas, variando entre altos níveis de nM até μM , a S100B é tóxica, tanto para astrócitos quanto para neurônios. Nessas condições, ela causa a ativação da glia, estimulando a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF α , bem como estimulando a

produção de NO, através da iNOS. Esse conjunto de fatores pode levar a disfunção ou até mesmo a morte neuronal (Van Eldik e Wainwright, 2003). Os efeitos da S100B sobre as células gliais são diferentes nos astrócitos e na microglia. Por exemplo, a S100B sozinha é capaz de estimular a produção de NO pela iNOS em astrócitos, enquanto que em células de microglia, essa ativação ocorre somente com outro estímulo sinérgico (Petrova et al, 2000).

Recentemente foi demonstrado que a S100B pode induzir a expressão de IL-1 β não apenas pela microglia como também por neurônios (Liu et al, 2005).

I.2.1.3. Envolvimento em Doenças Neurodegenerativas

Aumentos na concentração basal de S100B têm sido relacionados com diversas doenças neurodegenerativas (Mrak e Griffin, 2005), bem como no dano cerebral traumático e isquêmico (Rothermundt et al, 2003). Altas concentrações de S100B foram encontrados no líquido de pacientes nos primeiros estágios da doença de Alzheimer (Peskind et al, 2001) e em pacientes com síndrome de Down (Netto et al, 2004).

I.2.1.4. Expressão e Secreção

Apesar de serem conhecidos diversos papéis intra e extracelulares da proteína S100B e de se saber que seus diferentes efeitos extracelulares variam drasticamente conforme sua concentração no meio, pouco se sabe sobre seu mecanismo de secreção (Davey et al, 2001). No entanto, vários moduladores

da secreção de S100B são conhecidos, como o glutamato (Gonçalves et al, 2002), forskolina e LPA (Pinto et al, 2000), serotonina (Whitaker-Azmitia et al, 1990) e adenosina (Ciccarelli et al, 1999). Há evidências de que um aumento de AMPc (Gonçalves et al, 2002) ou de cálcio intracelular (Davey et al, 2001) podem sinalizar para a liberação de S100B.

Sabe-se também que NFkB está envolvido na expressão protéica de S100B (Lam et al, 2001) e que IL-1 β (Sheng et al, 1996) e o peptídeo beta-amilóide (Peña et al, 1995) provocam um aumento na expressão dessa proteína, mas ainda não se conhecem os efeitos na secreção de S100B mediada por esses compostos.

Entretanto, um aumento da expressão de S100B não está diretamente relacionado com um aumento de sua secreção (Tramontina et al, 2002), assim como alterações morfológicas em astrócitos também não se correlacionam diretamente com a secreção de S100B (Pinto et al, 2000).

I.3. Amônia

I.3.1. Metabolismo Normal Periférico

A amônia é produzida principalmente no fígado, onde glutamato e glutamina (provenientes do próprio fígado e dos tecidos extra-hepáticos) liberam a amônia em sua forma iônica (íon amônio, NH₄⁺), através das reações da glutaminase (glutamina \rightarrow glutamato + amônia livre) e da glutamato desidrogenase (glutamato \rightarrow α cetoglutarato + amônia livre). Essa amônia livre,

através da seqüência de reações do ciclo da uréia (Morris, 2002), é convertida em uréia e é transportada para os rins para ser eliminada na urina.

I.3.2. Metabolismo Normal no SNC

A amônia encontrada no SNC pode se originar tanto do metabolismo protéico cerebral quanto da reação da glutaminase. Essa enzima converte a glutamina captada pelos neurônios em glutamato, o principal neurotransmissor excitatório, que é armazenado em vesículas. A concentração cerebral normal de amônia está em torno de 0,05 mM e essa concentração basal é mantida principalmente através da reação da glutamina sintetase, uma enzima encontrada predominantemente em astrócitos. Essa enzima converte o glutamato e a amônia captados pelos astrócitos em glutamina (figura 2), que é liberada no meio extracelular e pode ser utilizada pelos neurônios como precursora de glutamato (ciclo glutamato-glutamina), ou ainda ser liberada na corrente sangüínea (Daikhin e Yudkoff, 2000; Felipo e Butterworth, 2002).

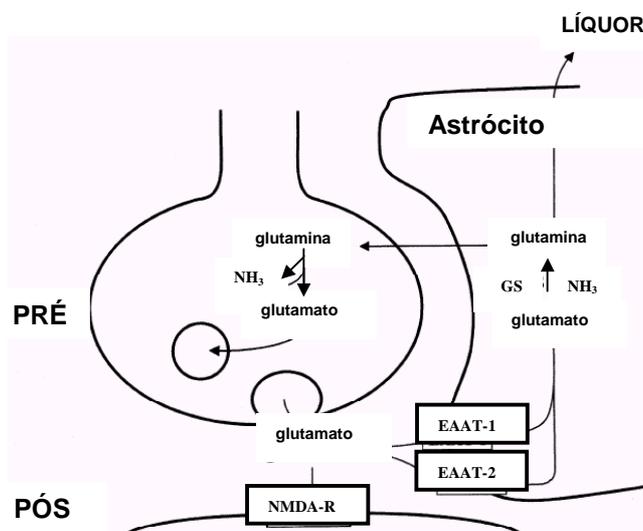


Figura 2: Ciclo glutamato-glutamina. Adaptado de Felipo e Butterworth (2002).

I.3.3. Hiperamonemia

I.3.3.1. Causas e Conseqüências da Hiperamonemia

Diversas patologias podem provocar hiperamonemia, ou seja, um aumento da concentração plasmática normal de amônia livre, atingindo concentrações entre 0,1-0,2 mM (Felipo e Butterworth, 2002). Essas patologias podem ser de origem inata, como a deficiência de ornitina transcarbamilase (uma das enzimas reguladoras na formação da uréia), provocando coma ou até mesmo a morte (Gordon, 2003; Cohn e Roth, 2004). No entanto, diversas situações clínicas podem gerar quadros de hiperamonemia adquirida, principalmente relacionadas com doenças hepáticas (hepatite, cirrose e doenças autoimunes). À medida que a função hepática se deteriora, uma grave desordem neuropsiquiátrica se desenvolve: a encefalopatia hepática (Felipo e Butterworth, 2002). Essa desordem pode ser definida como um estado de perturbação da função do SNC associado a uma hepatopatia aguda ou crônica grave. Nesses casos, a amônia sanguínea é o marcador mais facilmente medido, embora nem sempre se correlacione com o estado clínico (Harrison, Manual de Medicina, 15^o edição, 2002).

O aumento da concentração de amônia cerebral promove o inchamento dos astrócitos e o aumento da pressão intracraniana, podendo levar a uma situação de coma. Em casos mais graves, pode ocorrer uma herniação, levando o paciente à morte (Ott et al, 2005).

I.3.3.2. Concentrações Séricas e Centrais de Amônia

A concentração sérica normal de amônia livre circulante é bastante baixa e encontra-se na faixa de 0,05-0,1 mM. Na verdade, essa amônia está em um equilíbrio entre as formas NH_3 (amônia) e NH_4^+ (íon amônio), que varia conforme o pH do meio. Por ser uma base forte, no pH sanguíneo (7,4), a amônia encontra-se principalmente na forma NH_4^+ . No cérebro, como já dissemos, a concentração basal de amônia se encontra em torno de 0,05 mM (Felipo e Butterworth, 2002).

Em situações de hiperamonemia, a concentração de amônia no sangue não ultrapassa 0,2 mM. Já no cérebro, esses valores atingem concentrações em torno de 5 mM, ou seja, mais de 10 vezes o valor da concentração sérica (Felipo e Butterworth, 2002).

Essa diferença de concentração de amônia entre sangue e cérebro pode ser explicada por diferentes mecanismos. Primeiramente, a amônia em sua forma não iônica, NH_3 , é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica por difusão, o que equilibraria as concentrações de amônia do sangue e do cérebro (Ott e Larsen, 2004). Entretanto, considerando que o pH do sangue é 7,4 e o pH intracelular no cérebro é 7,1, ocorre um deslocamento do equilíbrio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, que explica em parte esse fluxo de amônia. Além disso, em situações de hiperamonemia, pode ocorrer uma diminuição do pH intracelular nos astrócitos, devido a alterações metabólicas (Rao e Norenberg, 2001), como o aumento do lactato (Haghighat e McCandless, 1997). Outro fator que explica esse aumento de concentração de amônia no cérebro em relação aos valores

sanguíneos é o aumento do fluxo sanguíneo cerebral, e o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Ott e Larsen, 2004).

Entretanto, essas evidências parecem não explicar de forma conclusiva o fluxo de amônia em direção ao cérebro durante a hiperamonemia. Estudos recentes têm proposto a entrada da forma iônica, NH_4^+ , no SNC (figura 3). O íon NH_4^+ pode ser transportado pelos transportadores de potássio de forma competitiva ou ainda por transportadores específicos (Ott e Larsen, 2004).

Em situações fisiológicas, os astrócitos é que regulam os níveis extracelulares de potássio (Nagaraja e Brookes, 1998). No caso de hiperamonemia, ocorre a competição entre os íons NH_4^+ e K^+ e um conseqüente aumento do potássio extracelular, que funciona como um potente vasodilatador cerebral (Paulson e Newman, 1987), aumentando ainda mais o fluxo sanguíneo cerebral.

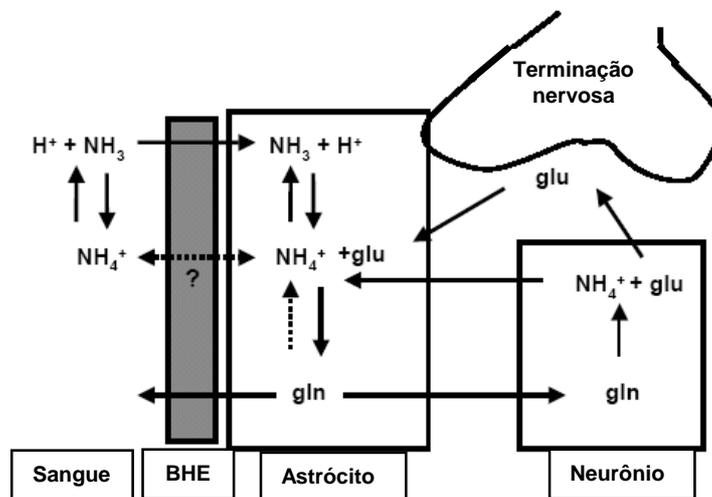


Figura 3: Transporte de amônia pela barreira hematoencefálica.
Adaptado de Ott e Larsen (2004)

I.3.3.3. Hiperamonemia e Parâmetros Astrocíticos

I.3.3.3.1. S100B e Encefalopatia Hepática

Pouco se sabe sobre o envolvimento da proteína S100B com a encefalopatia hepática ou outras situações de hiperamonemia tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Dosagens de S100B no soro de pacientes com cirrose indicaram um aumento da concentração dessa proteína relacionado com o quadro de encefalopatia subclínica (Wiltfang et al, 1999). Esse estudo sugere seu uso como um marcador precoce, visto que mostra uma melhor correlação com a clínica do que a concentração de amônia arterial. Entretanto, a S100B também possui fontes extracerebrais e sua dosagem no soro pode refletir alterações periféricas e não apenas relacionadas com o SNC.

Recentemente foi observado que ratos submetidos à anastomose porta-cava, um modelo animal de encefalopatia hepática, não sofrem alterações na expressão de S100B, tanto no que se refere a mRNA, quanto à quantidade de proteína (Bélanger et al, 2002). Esse é o primeiro trabalho relacionando S100B de fonte exclusivamente cerebral com encefalopatia hepática que, no entanto, se refere apenas à expressão de S100B e não descarta possíveis alterações na secreção dessa proteína.

I.3.3.3.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial - GFAP

A GFAP é o maior componente dos filamentos intermediários de astrócitos diferenciados (Eng et al, 2000). Um decréscimo seletivo de GFAP em

córtex de pacientes com encefalopatia hepática tem sido relatado (Sobel et al, 1981; Kretzschmar et al, 1985; Kimura e Budka, 1986).

Na tentativa de reproduzir essa redução de GFAP em um modelo animal, o tratamento de ratos com uma dieta rica em amônia não foi capaz de reduzir os níveis de GFAP, sugerindo uma resposta adaptativa desses animais à dieta (Bodega et al, 1993). Entretanto, um modelo de encefalopatia hepática induzida por anastomose porta-cava mostrou diferentes respostas na expressão de GFAP nas diferentes regiões do hipocampo (Suárez et al, 1998). Utilizando esse mesmo modelo animal, Bélanger et al (2002), mostra uma redução da expressão de GFAP nos estágios de pré-coma e coma, tanto no que se refere a mRNA, quanto à quantidade de proteína.

Com o objetivo de verificar o efeito direto da amônia sobre a expressão de GFAP em astrócitos, alguns trabalhos com culturas de células foram realizados. A diminuição dos níveis de GFAP em cultura primária de astrócitos corticais submetidas a um tratamento crônico (quatro dias) com amônia foi relatada pela primeira vez por Norenberg et al, 1990. Sabe-se também, que o mRNA dessa proteína também diminui em tratamentos crônicos (três dias) com amônia e que essa redução é transitória, sendo revertida simplesmente pela retirada da amônia do meio de cultivo (Neary et al, 1994). O efeito da amônia sobre a expressão de GFAP em tratamentos menos prolongados ainda não foi relatado.

I.3.3.3.3. Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC; entretanto, uma exposição prolongada a altas concentrações de glutamato é tóxica para neurônios e astrócitos. Dessa forma, após sua liberação e ação, o glutamato deve ser rapidamente removido da fenda sináptica (Chen e Swanson, 2003). A captação de glutamato para evitar altas concentrações desse composto na fenda sináptica é realizada principalmente por dois tipos de transportadores de glutamato astrocíticos: EAAT1/GLAST e EAAT2/GLT-1. Além dos transportadores astrocitários, existe um transportador neuronal, o EAAT3, que contribui pouco para a remoção do glutamato do meio extracelular, mas parece estar envolvido na regulação da concentração intracelular de glutamato (Chan e Butterworth, 2003).

Sabe-se que, durante a encefalopatia hepática, ocorre um aumento da concentração de glutamato extracelular (Monfort et al, 2002) e que o tratamento crônico de culturas de astrócitos com amônia provoca uma diminuição do mRNA de GLAST (Zhou e Norenberg, 1999), diminuindo a captação de glutamato por essas células (Butterworth, 2002; Bender e Norenberg, 1996). A expressão de GLT-1 também está diminuída em ratos submetidos à falência hepática isquêmica, bem como em ratos com hiperamonemia, sugerindo o envolvimento da amônia na captação de glutamato (Butterworth, 2002). O transportador de glutamato neuronal, EAAT3, também tem sua atividade diminuída em células tratadas com amônia (Chan e Butterworth, 2003).

Outro fator importante no aumento de glutamato extracelular é que a amônia, em concentrações tóxicas, causa a liberação de glutamato pelos astrócitos. Essa liberação não ocorre por reversão do transporte e sim através de um mecanismo dependente da liberação de cálcio intracelular (Rose et al, 2005).

Além desses efeitos sobre o glutamato, sabe-se também que a toxicidade aguda da amônia pode ser devida a uma ativação de receptores ionotrópicos de glutamato do tipo NMDA (Marcaida et al, 1992) e que essa ativação parece não ser consequência do aumento da concentração de glutamato extracelular. Entretanto, tratamentos crônicos com amônia podem provocar a dessensibilização desse mecanismo e diminuir a atividade NMDA (Monfort et al, 2002).

I.3.3.3.4. Glutamina Sintetase – GS

A enzima glutamina sintetase está presente no SNC em astrócitos e é a responsável pela detoxificação da amônia cerebral e pela regulação metabólica do glutamato. A reação da GS é muito rápida e a enzima, no SNC, funciona muito perto da sua capacidade máxima em situações fisiológicas (Suárez et al, 2002).

Resultados controversos têm sido descritos na literatura em modelos animais de encefalopatia hepática no que refere à atividade da glutamina sintetase. Histologicamente se observa um aumento da GS em regiões glutamatérgicas e uma redução em regiões não glutamatérgicas (Suárez et al, 2002). Entretanto, em cerebelo de ratos submetidos à anastomose porta-cava

ocorre uma redução da atividade dessa enzima (Suárez et al, 2005). Existem poucos relatos sobre a atividade da GS em cultura de astrócitos isolados, mas o tratamento crônico dessas células com amônia provoca um aumento da síntese de glutamina (Huang et al, 1994).

I.3.3.3.5. Distúrbios Metabólicos e Energéticos

A hiperamonemia provoca distúrbios metabólicos cerebrais, levando a uma falha energética. Isso ocorre porque a amônia inibe fortemente a enzima α -cetoglutarato desidrogenase, provocando um acúmulo de α -cetoglutarato e a conseqüente inibição do ciclo do ácido tricarboxílico. De fato, um aumento da concentração de α -cetoglutarato é observada em pacientes com encefalopatia hepática (Rao e Norenberg, 2001; Ott et al, 2005). Além do mais, sabe-se que em condições de hiperamonemia ocorre uma diminuição da concentração de ATP (Haghighat e McCandless, 1997; Rao e Norenberg, 2001), de glicogênio cerebral (Rao e Norenberg, 2001) e um aumento na produção de lactato (Haghighat e McCandless, 1997; Hertz et al, 2000).

I.3.3.3.6. Estresses Oxidativo e Nitrosativo

Os estresses oxidativo e nitrosativo estão envolvidos com a neurotoxicidade da amônia (Norenberg, 2003), bem como com a patogênese da encefalopatia hepática (Norenberg et al, 2004). Em cultura primária de astrócitos, a amônia aumenta a produção de radicais livres (Murthy et al, 2001) e a permeabilidade mitocondrial (Rao et al, 2005) e esses efeitos são revertidos

com a adição de antioxidantes. Além disso, sabe-se que a amônia, em ratos, causa uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Rao e Norenberg, 2001). Um aumento nos níveis de glutathione reduzida (GSH) é observado em cultura de astrócitos (Murthy et al, 2000). Curiosamente, ratos neonatos possuem um aumento da atividade das enzimas antioxidantes (García et al, 2004) e apresentam uma maior tolerância à hiperamonemia (García et al, 2003).

O óxido nítrico é um radical livre envolvido com a encefalopatia hepática, sendo um dos responsáveis pelo dano nas enzimas da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Rao e Norenberg, 2001). A amônia pode diretamente ativar o transporte de L-arginina (Rao, 2002), que é substrato para a formação de NO. A disponibilidade intracelular de L-arginina depende exclusivamente desse transporte e é uma importante via de regulação da NOS (Rose e Felipo, 2005). De fato, a amônia é capaz de aumentar a produção de NO cerebral (Swamy, 2005).

OBJETIVOS

- ✓ Verificar o perfil de secreção da proteína S100B em culturas de astrócitos corticais na presença de concentrações fisiológicas e tóxicas (variando de 0,05 até 10 mM) de amônia, em um período de 24 h;
- ✓ Verificar possíveis alterações morfológicas nos astrócitos tratados com amônia;
- ✓ Quantificar o conteúdo intracelular da proteína GFAP em 24 h de exposição à amônia;
- ✓ Analisar a atividade da enzima glutamina sintetase em culturas de astrócitos exposta durante 3 e 24 h à amônia;
- ✓ Avaliar o possível papel protetor da creatina em culturas primárias de astrócitos expostas à amônia.

II. ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAIN RESEARCH BULLETIN

Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition

Marina Leite, Giovana Brolese, Lúcia Maria Vieira de Almeida, Cristopher Celintano Piñero, Carmem Gottfried, Carlos-Alberto Gonçalves.

Running title: Ammonia-induced S100B secretion

Marina Leite, Giovana Brolese, Lucia Maria Vieira de Almeida, Cristopher Piñero, Carmem Gottfried, Carlos-Alberto Gonçalves

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

Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax: 55-51-3316 5535

E-mail: casg@ufrgs.br

**Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not
reverted by creatine addition**

Running title: Ammonia-induced S100B secretion

Abstract

Hyperammonemia is a major element in the pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE) and ammonia neurotoxicity involves an effect on the glutamatergic neurotransmitter system. Astrocytes are intimately related to glutamatergic neurotransmission and, in fact, many specific glial alterations have been reported due to ammonia exposure. S100B protein, particularly extracellular S100B, is used as a parameter of glial activation or commitment in several situations of brain injury. However, there is little information about this protein in ammonia toxicity and none about its secretion in astrocytes under ammonia exposure. In this study we investigated S100B secretion in rat cortical astrocytes acutely exposed to ammonia, as well astrocyte morphology, glial fibrillary acidic protein (GFAP) content and glutamine synthetase (GS) activity. Moreover, we studied a possible effect of creatine on these glial parameters, since that this compound has a putative role against ammonia toxicity in cell cultures. We found an increase in S100B secretion by astrocytes exposed to ammonia for 24 h, accompanied by a decrease in GFAP content and GS activity. Since elevated and persistent extracellular S100B plays a toxic effect on neural cells, altered extracellular content of S100B induced by ammonia could contribute to the brain impairment observed in HE. Creatine addition did not prevent this increment in S100B secretion, but was able to prevent the decrease in GFAP content and GS activity induced by ammonia exposure.

Key words: ammonia toxicity; astrocyte; GFAP; Glutamine synthetase; S100B secretion

1.Introduction

Hyperammonemia is a major element in the pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE) and as well as other brain metabolic disorders, particularly associated with inherited urea cycle enzyme deficiencies [12]. Increased ammonia is due to reduced capacity for hepatic synthesis of urea and glutamate. In these conditions, ammonia concentrations reach as high as 5 mM in the brain tissue.

There is growing evidence to suggest that ammonia neurotoxicity results from its effects on the glutamatergic neurotransmitter system, including elevation of extracellular glutamate content [12, 19], decrease in glutamate transporters [12] and hyperactivation of NMDA receptors [11, 17]. Astrocytes play an essential role in protecting the central neurons against excitotoxicity by taking up excess ammonia and glutamate and converting it into glutamine, using the enzyme glutamine synthetase [6].

Exposure to ammonia, either in vitro or vivo results in alterations in astrocyte morphology and specific proteins, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), excitatory amino acid transporter 2 (GLAST), peripheral-type benzodiazepine receptor (PTBR) and glutamine synthetase (GS). GFAP, the major protein of intermediate filaments in mature astrocytes, is reduced in cultured astrocytes exposed to millimolar concentration of ammonia [3, 20]. A significant loss in the content of GLAST was also observed in cortical astrocytes [7]. In contrast, the multimeric complex PTBR, localized predominantly on astrocytic mitochondria, is increased in astrocytes and C6 glioma cells exposed to ammonia [12, 29]. There is also evidence suggesting that GS expression in brain is increased under hyperammonemia [12, 32] and its activity appears to

be elevated in astrocytes located in proximity to blood vessels in glutamatergic areas [30].

S100B is a calcium binding protein predominantly expressed and secreted by astrocytes in vertebrate brain [18]. The extracellular effect of the S100B observed in cell cultures depends on its concentration, being neurotrophic at nanomolar levels and apoptotic at micromolar levels [10, 34]. There is much evidence to suggest that, at nanomolar concentrations, S100B stimulates glial proliferation, neuronal survival and protects neurons against glutamate excitotoxicity [1]. S100B expression, particularly extracellular S100B, is used as a parameter of glial activation or death in several situations of brain injury [27]. In fact, an elevation of serum S100B was observed in HE [36]. However, there is little information about this protein and none about its secretion in astrocytes under ammonia exposure [3].

In this study, we investigated S100B secretion in rat cortical astrocytes acutely exposed to ammonia, as well astrocyte morphology, GFAP content and GS activity. Moreover, we studied a possible effect of creatine on these glial parameters, since this compound has a putative role against ammonia toxicity in cell cultures [2].

2. Material and methods

2.1 Materials. Antibody anti-S100B (SH-B1), DMEM, ammonium chloride, beta-hydroxy-butyrate, creatine and other material for cell cultures were purchased from Sigma. Polyclonal anti-S100 and anti-GFAP antibodies were purchased from DAKO. Fetal calf serum was purchased from Cultilab (São Paulo, Brazil).

2.2 Cell culture. Primary astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described [14]. Procedures were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities. Briefly, cerebral cortex 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 cortex were cleaned of meninges and mechanically dissociated by sequential passage through a Pasteur pipette. After centrifugation at 1000 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% fungizone, 0.032% garamycin and 10% fetal calf serum (FCS). Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO_2 /95% air at 37°C and allowed to grow to confluence and used at 15 days *in vitro*. The medium was replaced by DMEM without serum plus ammonia (at indicated concentrations in the Figures).

2.3 S100B measurement. The S100B concentration was determined in the culture medium at 1, 6 and 24 h. Cells were washed and scraped at 24 hours for measurement of intracellular S100B content. ELISA for S100B was carried as described previously [33] with modifications. 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 (SH-B1, from Sigma). Polyclonal anti-S100 (from DAKO) was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit was added for more 30 min. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm.

2.4 GFAP measurement. ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100 μL samples containing 20 ng of protein 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 1h, 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.

2.5 Glutamine synthetase activity. The enzymatic assay was performed according to [23] with minor modifications. Homogenate (0.1 mL) was added to 0.1 mL of reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride; 670 HCl; 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate (from Sigma) treated with ferric chloride reagent.

2.6 Immunocytochemistry and cell morphology. After 24 h of ammonia exposure, cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS, mM): 2.9 KH₂PO₄; 38 Na₂HPO₄·7H₂O; 130 NaCl; 1.2 KCl, rinsed with PBS and permeabilized for 10 min in PBS containing 0.2 % Triton X-100. Fixed cells were then blocked for 60 min with PBS containing 0.5% bovine serum albumin and incubated overnight with monoclonal anti-S100B (Sigma, 1:200), polyclonal anti-GFAP (DAKO, 1:200) or polyclonal anti-actin (Sigma, 1:200) followed by peroxidase-conjugated IgG (Amersham, 1:200) for 2 h. Finally, the cells were treated with 0.05% diaminobenzidine (Sigma) containing 0.01% hydrogen peroxide for 10 min [24]. Cells were viewed with a Nikon inverted microscope and images transferred to computer with a digital camera

(Sound Vision Inc. Wayland, MA). All images are representative fields from at least 3 experiments carried out in triplicate.

2.7 Statistical analysis. Parametric data are reported as mean \pm standard error and were analyzed by Student's t test (when two groups were considered), two-way ANOVA (followed by Tukey's test) or by repeated measures ANOVA. Significance was considered when $p < 0.05$.

3. Results

S100B secretion is shown in the Fig 1. A non-significant increase in extracellular S100B was observed at 1 h of ammonia exposure, independent of concentration (0.1- 10 mM) (Fig 1A). This apparent increase disappears by 6 h, except for the 10 mM ammonia concentration, which induced a significant increment of 19% in S100B secretion (Fig 1B). At 24 h of ammonia exposure, a significant increase in extracellular S100B was observed from concentrations of 5 mM ammonia and higher, in a concentration-dependent manner (Fig 1C).

Phase-contrast images show that the typical polygonal astrocytes change to process-bearing cells (stellation) in cultures exposed to 10 mM ammonia for 24 h (Fig 2). A pronounced, but transitory, swelling is observed in the first six hours (data not shown). Immunocytochemistry for S100B and GFAP is shown in panels C-D and E-F, respectively. An altered S100B distribution was observed in astrocytes immunostained with anti-S100B, accompanying cell stellation at 24 h of 10 mM ammonia exposure. However, no changes in the intracellular S100B content were observed by ELISA (data not shown). Immunocytochemistry for GFAP also show pronounced morphologic alterations

at 24 h of ammonia exposure. Moreover, a significant decrease in GFAP content (about 21%), as measured by ELISA, was observed at 24 h with 10 mM ammonia (Fig 3). No changes in the GFAP content at 24 h were observed with low concentrations of ammonia (≤ 1 mM).

In contrast, GS activity was reduced by exposure to ammonia from 0.1 to 10 mM. This decrease was already observed at 3 h (Fig 4A) and it was maintained until 24 h. Since astrocytes from glutamatergic brain regions could have different GS activities in the presence of ammonia, we pre-incubated some astrocytes with glutamate for 24 h (0.1 or 1 mM) and then carried out ammonia exposure. A similar reduction in GS activity was observed under these conditions (Fig 4B). The pre-incubation with glutamate *per se* did not change GS activity.

Altered S100B secretion, by 10 mM ammonia at 24 h, was not prevented by the addition of 5 mM creatine or 5 mM beta-hydroxy-butyrate (Fig 5). The effect of creatine on GFAP content and GS activity of astrocytes exposed to 10 mM ammonia for 24 h is shown in Fig 6. Creatine reverted the effect of ammonia on GFAP content (Fig 6A) and GS activity (Fig 6B).

4. Discussion

S100B protein has intra and extracellular activities. Intracellularly, S100B binds to many protein targets, possibly modulating cytoskeleton plasticity, cell proliferation and astrocyte energy metabolism [10, 34]. Extracellular S100B activity depends on its concentration. *In vitro* studies, at nanomolar concentrations of S100B, suggest its trophic effects on glial cells and neurons.

In contrast, micromolar concentrations of S100B exert toxic effects on neurons. Therefore, alterations in the extracellular content of S100B should affect neural activity and survival.

Although some regulating molecules of S100B secretion have been identified, including interleukin-1beta [28], beta amyloid peptide [22], forskolin, lysophosphatidic acid [24], serotonin [35], adenosine [8] and glutamate [13], the mechanisms of regulation still remain unclear [9]. Here we are show, for the first time, that extracellular levels of ammonia affect basal S100B secretion in cultured cortical astrocytes. Measurement of extracellular S100B was referred to as "secretion", since no parallel increase of LDH in the medium was observed (data not shown). Interestingly, a study demonstrated elevated serum S100B in the presence of subclinical or early portal-systemic encephalopathy, but not arterial ammonia [36]. It is important to mention that normal ammonemia does not necessarily indicate an absence of brain commitment in HE [25]. Moreover, experimental encephalopathy suggests that brain ammonia is about 5-10 times higher than corresponding blood ammonia [31]. Possibly, this increment in serum S100B is due to astrocyte activation that we observed in culture, but other sources of serum S100B cannot be rule out [21]. However, our data reinforce the possible usefulness of peripheral S100B as a marker for HE [36] as in other conditions of brain injury [27].

Acute insult from ammonia in many cell types, including astrocytes, results in an increase in cell calcium [26]. An increment in cAMP was also observed in glioma C6 cells exposed to ammonia [37]. Both calcium mobilization and cAMP accumulation have been proposed as mediators in S100B release [9, 13] and, therefore, one of these mechanisms or both could

be involved in the S100B release induced by ammonia. However, this matter requires further investigation.

We found a reduced content of GFAP after 24 h ammonia exposure, confirming data from other laboratories [3, 20]. This finding was not accompanied by a parallel decrease in cellular S100B, as also observed in experimental HE [3]. A decrease in the intermediate filaments could favor astrocyte swelling [12] and may be involved in the morphologic alterations that we observed at 24 h.

Increased GS expression is another common biochemical alteration observed in HE, likely induced by hyperammonemia. *In vivo* GS increment appears to occur predominantly in astrocytes located in glutamatergic regions [30]. Prolonged exposure to ammonia (at least 3 days) leads to an increase in glutamine synthesis in cultured astrocytes [15]. However, during a short-term exposure to ammonia we observed an early (3 h) and persistent (24 h) decrease in GS activity. Even pre-incubating these astrocytes with glutamate (to mimetize a glutamatergic environment), ammonia induced a decrease in GS activity. This GS decrease, observed with short-term exposure to ammonia, seems to be in agreement with the reduced glutamate uptake commonly observed in astrocytes exposed to ammonia [4, 7]. Moreover, it has been proposed that brain GS works near to its maximal capacity under physiological conditions and that ammonia may be able (via NMDA/nitric oxide activation) to cause an additional limitation in GS activity [12]. However, we do not know if this happens in isolated astrocytes.

Creatine has been suggested to protect against ammonia toxicity in cell culture [2]. When rat embryonic brain cells were co-treated with creatine (5 mM)

during ammonia exposure, the ammonia-induced axon growth impairment was prevented, apparently in a glial cell-dependent manner [5]. Since S100B is able to interfere in neurite growth [10, 34], we decided to investigate the effect of creatine on S100B secretion. Creatine was not able to change the basal S100B secretion or to invert the ammonia-induced S100B increment in 24 h. Similarly, beta-hydroxy-butyrate, which decreases basal S100B secretion *per se* [16], was also unable to prevent the increment induced by ammonia. Interestingly, creatine prevented the GFAP and GS decrease observed in 24h. These observations reinforce the hypothesis of the neuroprotective role of creatine against ammonia toxicity, somehow affecting astrocyte activity.

In summary, our data indicate an increase in S100B secretion by astrocytes exposed to ammonia for 24 h, in parallel to a decrease in GFAP content and GS activity. Since elevated and persistent extracellular S100B plays a toxic effect on neural cells, an altered extracellular content of S100B, induced by ammonia, could contribute to the brain impairment observed in HE. Creatine addition did not prevent this increment in S100B secretion, but was able to prevent the decrease in GFAP content and GS activity induced by ammonia exposure.

Acknowledgements: This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We would like to thank Ms Alessandra Heizelmann Marques for her technical support with cell culture.

References

- [1] B. Ahlemeyer, H. Beier, I. Semkova, C. Schaper, J. Krieglstein, S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858 (2000) 121-128.
- [2] C. Bachmann, O. Braissant, A.M. Villard, O. Boulat, H. Henry, Ammonia toxicity to the brain and creatine. *Mol. Genet. Metab.* 81 (2004) S52-57.
- [3] M. Bélanger, P. Desjardins, N. Chatauret, R.F. Butterworth, Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem. Int.* 41 (2002) 155-160.
- [4] A.S. Bender, M.D. Norenberg, Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* 21 (1996) 567-573.
- [5] O. Braissant, H. Henry, A.M. Villard, M.G. Zurich, M. Loup, B. Eilers, G. Parlascino, E. Matter, O. Boulat, P. Honegger, C. Bachmann, Ammonium-induced impairment of axonal growth is prevented through glial creatine. *J Neurosci.* 22 (2002) 9810-9820.
- [6] N. Brookes, Functional integration of the transport of ammonium, glutamate and glutamine in astrocytes. *Neurochem. Int.* 37 (2000) 121-129.

- [7] H. Chan, A.S. Hazell, P. Desjardins, R.F. Butterworth, Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem. Int.* 37 (2000) 243-248.
- [8] R. Ciccarelli, P. Di Iorio, V. Bruno, G. Battaglia, I. D'Alimonte, M. D'Onofrio, F. Nicoletti, F. Caciagli, Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia* 27 (1999) 275-281.
- [9] G.E. Davey, P. Murmann, C.W. Heizmann, Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 30819-30826.
- [10] R. Donato, Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60 (2003) 540-551.
- [11] M. Fedosiewicz-Wasiluk, Z.Z. Holy, R.J. Wisniewska, K. Wisniewski, The influence of NMDA, a potent agonist of glutamate receptor, on behavioral activity of rats with experimental hyperammonemia evoked by liver failure. *Amino Acids* 28 (2005) 111-117.
- [12] V. Felipo, R.F. Butterworth, Neurobiology of ammonia, *Prog. Neurobiol.* 67 (2002) 259-279.

- [13] D. Gonçalves, J. Karl, M. Leite, L. Rotta, C. Salbego, E. Rocha, S. Wofchuk, C.A. Gonçalves, High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* 13 (2002) 1533-1535.
- [14] C. Gottfried, L. Valentim, C. Salbego, J. Karl, S.T. Wofchuk, R. Rodnight, Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res.* 833 (1999) 142-149.
- [15] R. Huang, G. Kala, R.K. Murthy, L. Hertz, Effects of chronic exposure to ammonia on glutamate and glutamine interconversion and compartmentation in homogeneous primary cultures of mouse astrocytes. *Neurochem. Res.* 19 (1994) 257-265.
- [16] M. Leite, J.K. Frizzo, P. Nardin, L.M. de Almeida, F. Tramontina, C. Gottfried, C.A. Gonçalves, Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res. Bull.* 64 (2004) 139-143.
- [17] G. Marcaida, V. Felipo, C. Hermenegildo, M.D. Minana, S. Grisolia, Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 296 (1992) 67-68.

[18] I. Marenholz, C.W. Heizmann, G. Fritz, S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 1111-1122.

[19] P. Monfort, M.D. Munoz, A. ElAyadi, E. Kosenko, V. Felipo, Effects of hyperammonemia and liver failure on glutamatergic neurotransmission. *Metab. Brain. Dis.* 17 (2002) 237-250.

[20] J.T. Neary, S.R. Whitemore, Q. Zhu, M.D. Norenberg, Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J. Neurochem.* 63 (1994) 2021-2027.

[21] C.B.O. Netto, S. Conte, M. Leite, C. Pires, T.L. Martins, P. Vidal, M.S. Benfato, R. Giugliani, C.A. Gonçalves, Serum S100B is increased in fasting rats. *Arch. Med. Res.* *in press*.

[22] L.A. Pena, C.W. Brecher, D.R. Marshak, beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Mol. Brain Res.* 34 (1995) 118-126.

[23] C.K. Petito, M.C. Chung, L.M. Verkhovsky, A.J. Cooper, Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 569 (1992) 275-280.

- [24] S.S. Pinto, C. Gottfried, A. Mendez, D. Gonçalves, J. Karl, C.A. Gonçalves, S. Wofchuk, R. Rodnight, Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486 (2000) 203-207.
- [25] A. Reif, C. Leonhard, R. Mossner, K.P. Lesch, A.J. Fallgatter, Encephalopathy and myoclonus triggered by valproic acid. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28 (2004) 1061-1063.
- [26] C. Rose, W. Kresse, H. Kettenmann, Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20937-20944.
- [27] M. Rothermundt, M. Peters, J.H. Prehn, V. Arolt, S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60 (2003) 614-632.
- [28] J.G. Sheng, K. Ito, R.D. Skinner, R.E. Mrak, C.R. Rovnaghi, L.J. Van Eldik, W.S. Griffin, In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 17 (1996) 761-766.
- [29] T. Shiraishi, K.L. Black, K. Ikezaki, D.P. Becker, Peripheral benzodiazepine induces morphological changes and proliferation of mitochondria in glioma cells. *J. Neurosci. Res.* 30 (1991) 463-474.

[30] I. Suarez, G. Bodega, B. Fernandez, Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem. Int.* 41 (2002) 123-142.

[31] M. Swain, R.F. Butterworth, A.T. Blei, Ammonia and related amino acids in the pathogenesis of brain edema in acute ischemic liver failure in rats. *Hepatology* 15 (1992) 449-453.

[32] H. Tanigami, A. Rebel, L.J. Martin, T.Y. Chen, S.W. Brusilow, R.J. Traystman, R.C. Koehler, Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience* 131 (2005) 437-449.

[33] F. Tramontina, J. Karl, C. Gottfried, A. Mendez, D. Goncalves, L.V. Portela, C.A. Goncalves, Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res. Protoc.* 6 (2000) 86-90.

[34] L.J. Van Eldik, M.S. Wainwright, The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21 (2003) 97-108.

[35] P.M. Whitaker-Azmitia, R. Murphy, E.C. Azmitia, Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res.* 528 (1990) 155-158.

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

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

Figure legends

Figure 1. *Effect of ammonia on S100B secretion in cultured cortical astrocytes.*

Cortical astrocytes from neonate Wistar rats were cultured in DMEM/ calf fetal serum. After confluence, the medium was replaced by the DMEM without serum and cell secretion was measured at 1, 6 and 24 h, in the presence of ammonia (from 0.1 to 10 mM). S100B was measured by ELISA. Basal secretion, assumed as 100% in each experiment, is indicated by the dashed line. Each value is a mean (\pm standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from basal secretion ($p < 0.05$); ** Significantly different from basal and 5 mM ammonia ($p < 0.01$).

Figure 2. *Morphology and immunocytochemistry for S100B and GFAP in cortical astrocytes exposed to ammonia.*

Cortical astrocytes were exposed to 10 mM ammonia for 24 h. Phase-contrast images from control and ammonia-exposed cells are shown in panels A and B, respectively. Immunocytochemistry for S100B from control and ammonia-exposed cells are shown in panels C and D, respectively. Immunocytochemistry for GFAP from control and ammonia-exposed cells are shown in panels E and F, respectively. Scale bar = 50 μ m.

Figure 3. *GFAP content in cortical astrocytes exposed to ammonia.*

Cortical astrocytes from neonate Wistar rats were cultured in DMEM/ calf fetal serum. After confluence, the medium was replaced by the DMEM without serum. GFAP content was measured 24 h later in the presence of ammonia (from 0.1 to 10 mM). GFAP was measured by ELISA. Basal content was assumed as 100% in each experiment is indicated by the dashed line. Each value is the mean (\pm

standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate.*
Significantly different from basal GFAP content ($p < 0.05$).

Figure 4. *GS activity in cortical astrocytes acutely exposed to ammonia.* Cortical astrocytes from neonate Wistar rats were cultured in DMEM/ calf fetal serum. After confluence, the medium was replaced by the DMEM plus ammonia at indicated concentrations. In A, GS activity measured 3 h after ammonia exposure. In B, cells after confluence were pre-incubated with glutamate (0.1 or 1 mM) for 24 h and then incubated with 10 mM ammonia for 24 h. Basal GS activity was assumed as 100% in each experiment and is indicated by a dashed line. Each value is the mean (\pm standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from basal GS activity ($p < 0.05$).

Figure 5. *The effect of creatine and beta-hydroxy-butyrate on basal and ammonia-induced S100B secretion* After confluence, the medium was replaced by the DMEM in the presence or absence of 10 mM ammonia for 24 h. Beta-hydroxy-butyrate (BHB, at 5 mM) or creatine (at 5 mM) were added to measure basal and ammonia-induced S100B secretion in 24 h. S100B was measured by ELISA. Basal secretion, assumed as 100% in each experiment, is indicated by dashed line. Each value is a mean (\pm standard error) from 5 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from basal secretion ($p < 0.05$).

Figure 6. *The effect of creatine on basal and ammonia-induced decreases in GFAP content and GS activity.* After confluence, the medium was replaced by

the DMEM in the presence or absence of 10 mM ammonia for 24 h. In A, GFAP content when creatine (at 5 mM) was added for 24 h. In B, GS activity when creatine was added for 24 h. Basal GFAP content and GS activity are indicated by dashed lines. Each value is a mean (\pm standard error) of 4 independent experiments performed in triplicate. * Significantly different from GFAP content in A or GS activity in B ($p < 0.05$).

Figure 1

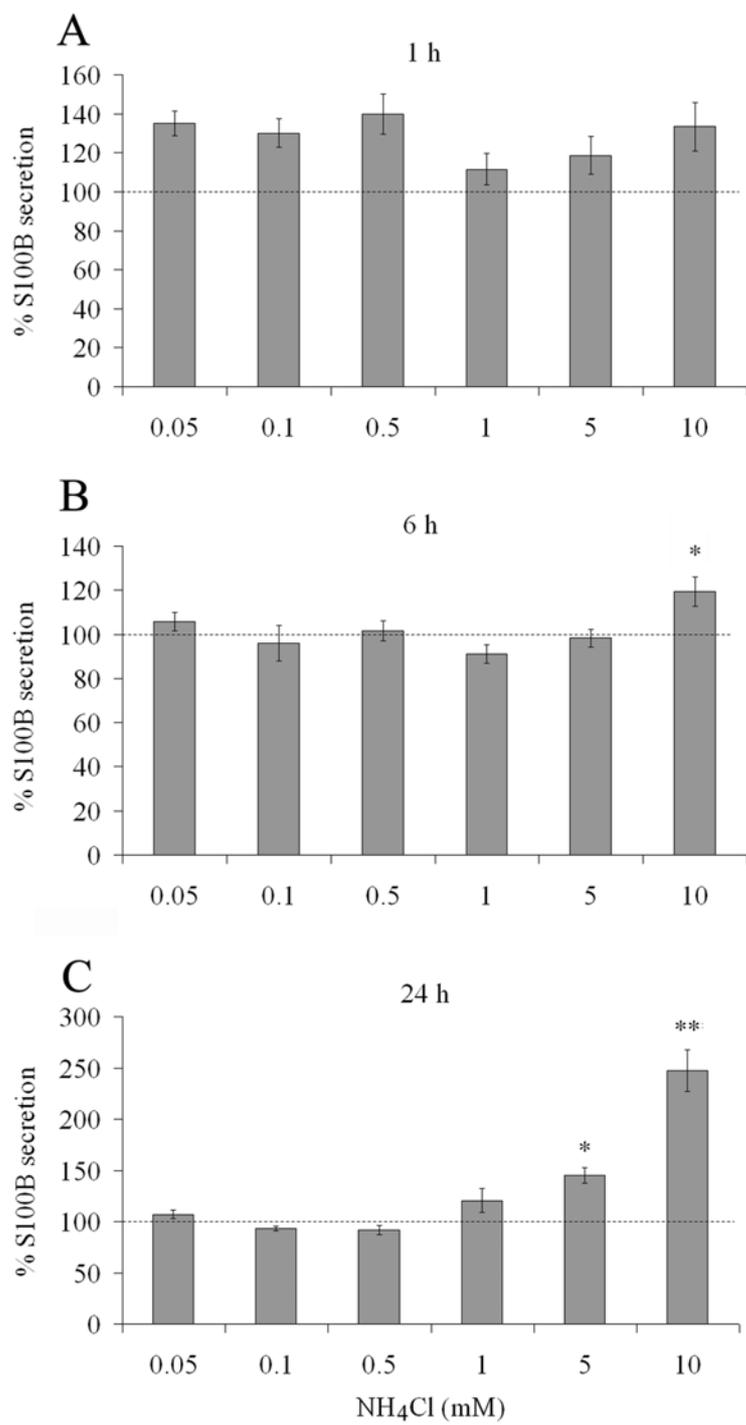


Figure 2

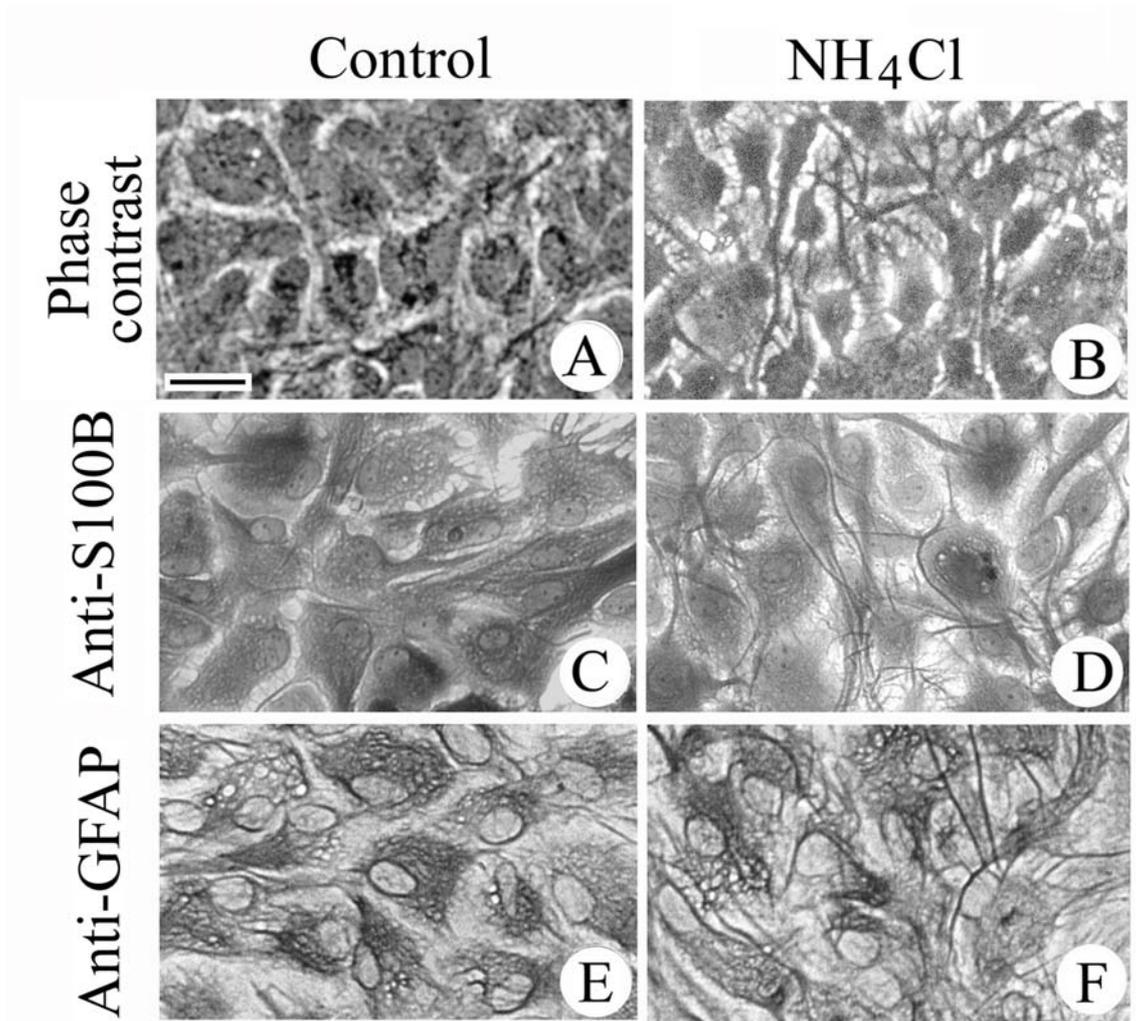


Figure 3

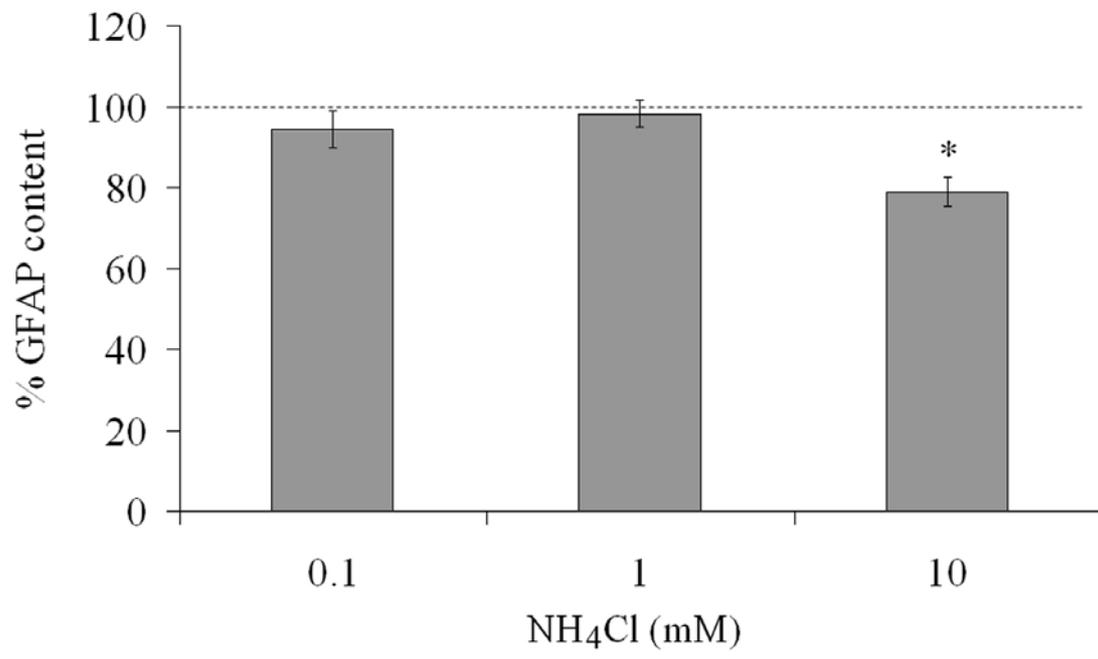
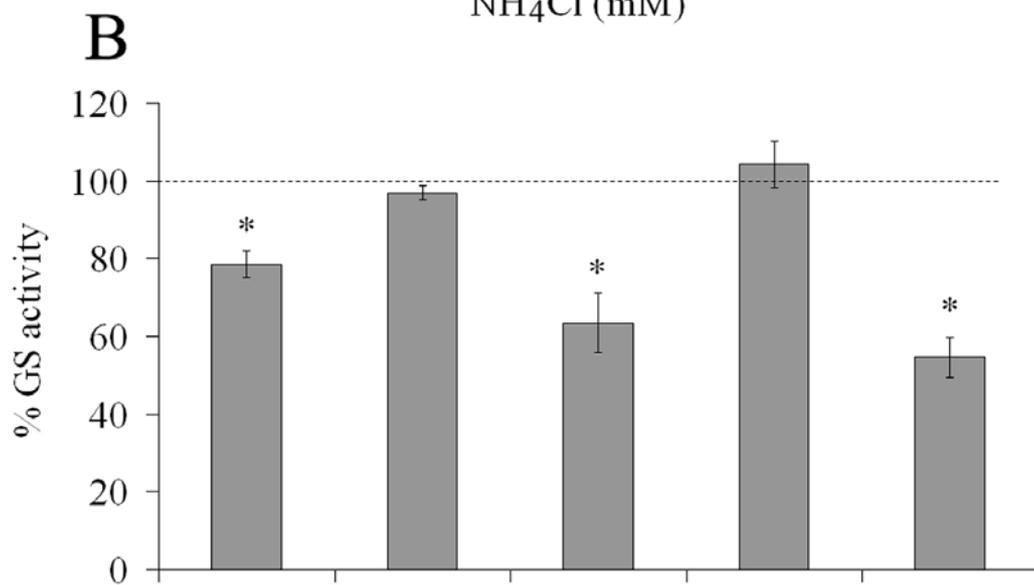
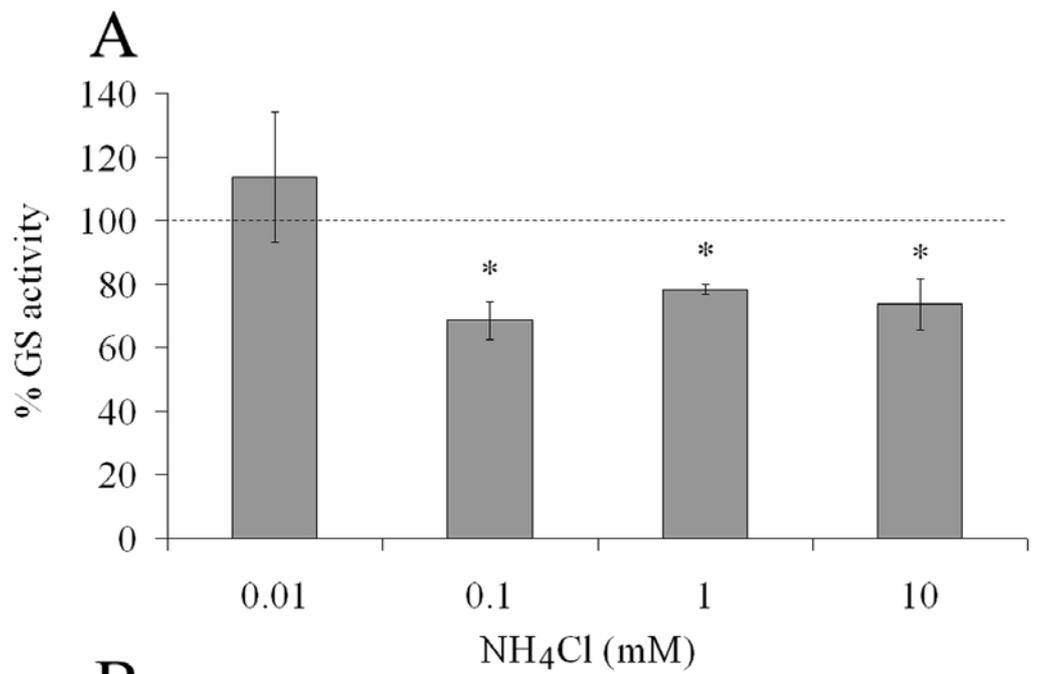


Figure 4



NH ₄ Cl 10 mM	+	-	+	-	+
Glu 0.1 mM	-	+	+	-	-
Glu 1 mM	-	-	-	+	+

Figure 5

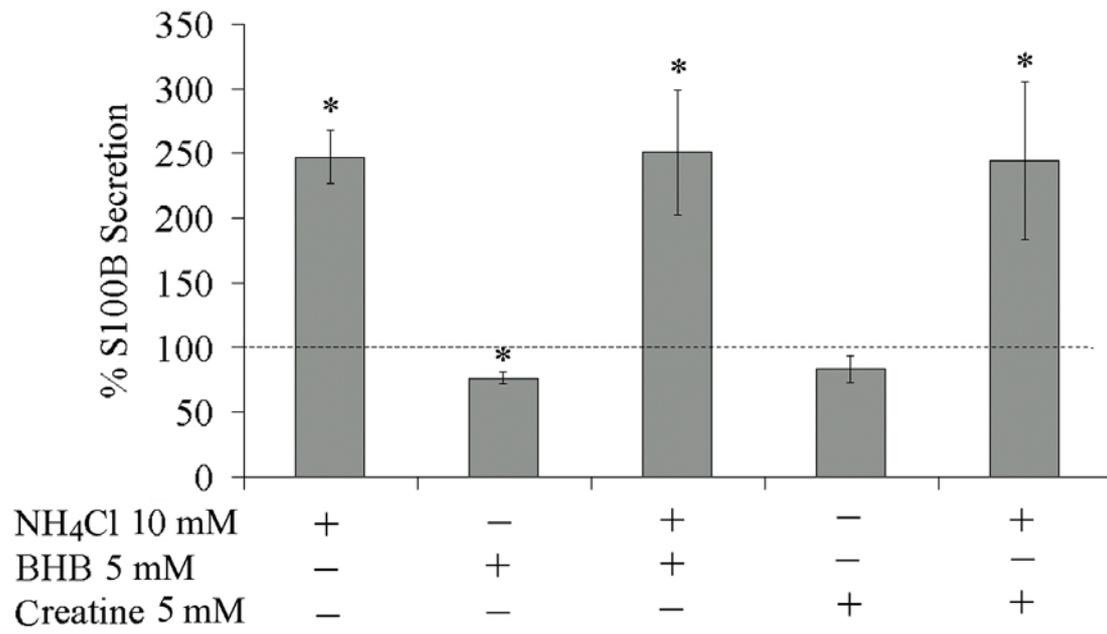
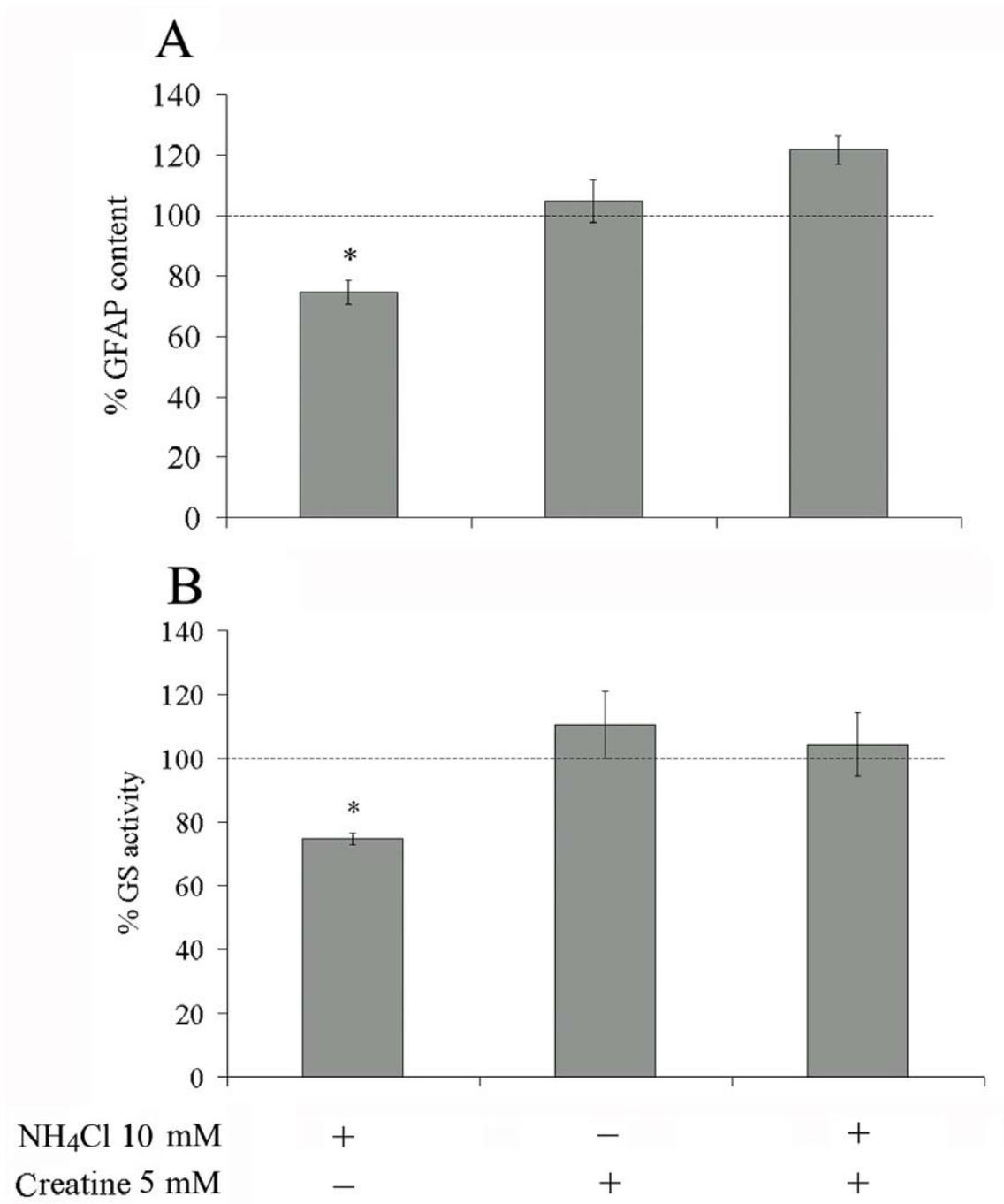


Figure 6



III. DISCUSSÃO

III.1. Sumário dos Resultados

- ✓ Um aumento não significativo do conteúdo extracelular de S100B foi observado em astrócitos primários expostos à amônia durante 1 h, independente da concentração testada (0,1-10 mM);
- ✓ Em 6 h de exposição à amônia, esse aumento de secreção desapareceu, exceto na concentração de 10 mM. Em 24 h de tratamento, observou-se um aumento significativo da secreção de S100B a partir da concentração de 5 mM;
- ✓ Em 24 h de exposição à amônia 10 mM, os astrócitos, normalmente de morfologia poligonal, adquirem uma morfologia estelada e um pronunciado inchamento celular é observado em 1 h de tratamento;
- ✓ A imunocitoquímica para GFAP e S100B mostrou uma pronunciada alteração morfológica em 24 h de exposição à amônia. Essa alteração foi acompanhada de um decréscimo do conteúdo intracelular de GFAP, dosada por ELISA, observado apenas em células expostas a altas concentrações de amônia. Entretanto, o conteúdo intracelular de S100B não foi alterado;
- ✓ A exposição a concentrações entre 0,1 e 10 mM de amônia diminuiu a atividade da GS a partir de 3 h de tratamento. Na concentração de 10 mM, essa diminuição de atividade persistiu por 24 h. A pré-incubação com glutamato não foi capaz de impedir essa diminuição da atividade da GS;

- ✓ A adição de creatina ou beta-hidroxi-butilato não foi capaz de impedir o aumento de secreção de S100B observado em 24 h de exposição à amônia;
- ✓ A adição de creatina foi capaz de impedir a diminuição da atividade da GS e do conteúdo de GFAP induzidos por amônia;

III.2. Amônia e Atividade Glial

A proteína S100B tem atividades intra e extracelulares. Intracelularmente, a S100B se liga a diversas proteínas alvo, possivelmente modulando a plasticidade do citoesqueleto, a proliferação celular e o metabolismo energético dos astrócitos (Donato, 2003; Van Eldik e Wainwright, 2003). A atividade extracelular da proteína S100B depende da sua concentração, podendo ser trófica (em concentrações nanomolar) ou tóxica (em concentrações micromolar). Portanto, alterações no conteúdo extracelular de S100B podem afetar a atividade e sobrevivência neuronal.

Apesar de alguns moduladores da secreção de S100B já terem sido identificados, incluindo IL-1 β (Sheg et al, 1996), forskolina, ácido lisofosfatídico (Pinto et al, 2000), serotonina (Whitaker-Azmitia et al, 1990), adenosina (Cicarelli et al, 1999) e glutamato (Gonçalves et al, 2002), o mecanismo de regulação de secreção ainda não é claro (Davey et al, 2001). Nesse trabalho, nós mostramos, pela primeira vez, que as concentrações extracelulares de amônia alteram a secreção basal de S100B em cultura de astrócitos corticais de ratos. As medidas de S100B extracelular se referem à “secreção”, visto que não foi observado nenhum aumento de LDH no meio extracelular (dado não

mostrado). Interessantemente, um estudo mostra elevadas concentrações séricas de S100B na presença de encefalopatia subclínica, mas não nas concentrações de amônia arterial (Wiltfang, 1999). É importante mencionar que a anemia normal não indica necessariamente a ausência de comprometimento cerebral na encefalopatia hepática (Reif, 2004). Além do mais, modelos de encefalopatia experimental sugerem que a concentração de amônia cerebral é cerca de 5-10 vezes maior que a concentração de amônia no sangue (Swain et al, 1992). Possivelmente, esse aumento da S100B sérica é devido à ativação de astrócitos que é observada em cultura, mas outras fontes para a S100B sérica não podem ser excluídas (Netto et al, *in press*). Entretanto, nossos dados reforçam o possível uso das concentrações de S100B sérica como marcadoras de encefalopatia hepática (Wiltfang et al, 1999), assim como em outras situações de dano cerebral (Rothermundt et al, 2003).

O tratamento agudo com amônia em muitos tipos celulares, incluindo astrócitos, resulta em um aumento de cálcio intracelular (Rose et al, 2005). Um aumento de AMPc também foi observado em células de glioma C6 expostas à amônia (Zielinska et al, 2005). Tanto a mobilização de cálcio (Davey et al, 2001) quanto o aumento de AMPc (Gonçalves et al, 2002) têm sido propostos como mediadores da secreção de S100B e, portanto, um desses mecanismos, ou os dois, pode estar envolvido na secreção de S100B induzida por amônia. Contudo, esse assunto requer maiores investigações.

Encontramos um conteúdo reduzido de GFAP após 24 h de exposição à amônia, confirmando resultados de outros laboratórios (Bélanger et al, 2002; Neary et al, 1994). Esse resultado não foi acompanhado de uma redução no

conteúdo intracelular de S100B, como já havia sido observado em modelos animais de encefalopatia hepática (Bélanger et al, 2002). Uma diminuição dos filamentos intermediários pode favorecer o inchamento dos astrócitos (Felipo e Butterworth, 2002; Bélanger et al, 2002), observado a partir de 1 h de exposição à amônia (dado não mostrado), assim como pode estar envolvido com a alteração morfológica observada em 24 h.

O aumento da expressão da GS é outra alteração bioquímica observada na encefalopatia hepática induzida por hiperamonemia. *In vivo* o aumento da GS parece ocorrer predominantemente em astrócitos localizados próximos a regiões glutamatérgicas (Suárez et al, 2002). A exposição prolongada à amônia (durante três dias) levou a um aumento da síntese de glutamina em cultura de astrócitos (Huang et al, 1994). Entretanto, durante uma curta exposição de 3 h à amônia, nós observamos uma redução na atividade da GS, que persistiu até 24 h de tratamento. Mesmo pré-incubando esses astrócitos com glutamato, a amônia induziu uma redução da atividade da GS. Essa redução observada na GS em uma exposição aguda à amônia está de acordo com a redução na captação de glutamato comumente observada em astrócitos tratados com amônia (Bender e Norenberg, 1996; Chan et al, 2000).

Estudos recentes têm proposto que a GS funcione perto da sua capacidade máxima em condições fisiológicas (Felipo e Butterworth, 2002; Rose e Felipo, 2005). O tratamento de células com amônia e modelos animais de encefalopatia hepática têm mostrado que ela é capaz de aumentar o estresse oxidativo e nitrosativo (Rao, 2002; Norenberg et al, 2004; Murty et al, 2001). Sabe-se que a amônia é capaz de ativar a captação de L-arginina (substrato limitante para a formação de NO) por sinaptossomas e que essa

captação aumentada é suficiente para regular a formação de NO pela NOS (Fig. 4) (Rao, 2002). Além disso, em agregados celulares expostos a concentrações tóxicas de amônia, ocorre a indução de duas enzimas envolvidas na produção de arginina (argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liase) em astrócitos, mas não em neurônios (Braissant et al, 1999). Outro mecanismo que resulta em aumento da concentração de NO é a ativação NMDA e conseqüente influxo de cálcio, observado tanto em modelos animais injetados com acetato de amônia quanto em neurônios expostos à amônia. Essa ativação NMDA parece não ser conseqüência do aumento de glutamato extracelular (Marcaida et al, 1992; Felipo et al, 1998).

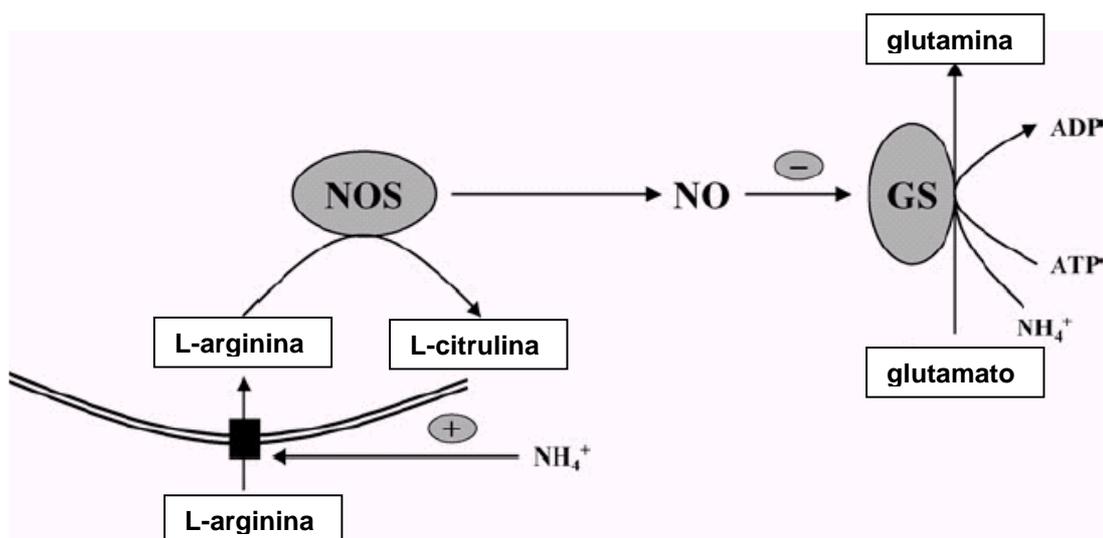


Figura 4: Hipótese pela qual a amônia estimula a captação de L-arginina, ativando a NOS. O aumento de NO favoreceria a nitração da GS, diminuindo sua atividade. Adaptado de Rose e Felipo (2005).

De fato, diferentes regiões cerebrais, em um modelo de encefalopatia hepática, mostram um aumento na concentração de NO (Swamy et al, 2005). Esse aumento da formação de NO, seja por ativação NMDA ou pelo aumento da captação de L-arginina, pode levar a um aumento de peroxinitrito, levando a nitração da GS e diminuindo assim sua atividade (Rose e Felipo, 2005), como

observado nesse trabalho. No entanto, não se sabe se toda essa via de regulação pode acontecer em astrócitos isolados.

Alguns estudos têm proposto que o inchamento observado em astrócitos em cultura tratados com amônia e o edema cerebral observado na encefalopatia hepática seriam resultado do efeito osmótico de um acúmulo de glutamina resultante do aumento da atividade da GS (Willard-Mack et al, 1996; Tanigami et al, 2005). Entretanto, outros mecanismos têm sido propostos para o inchamento dos astrócitos e o conseqüente edema cerebral observado na encefalopatia hepática, como o aumento do estresse oxidativo e a formação de NO, que altera a circulação cerebral e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Rao, 2002). De fato, o tratamento de cultura de astrócitos com diversos antioxidantes suprimiu o inchamento dessas células induzido por amônia (Norenberg et al, 2004). Outro fator associado com o edema cerebral é a diminuição de GFAP, como discutido anteriormente.

A creatina é um composto sintetizado principalmente pelo fígado e rim a partir da arginina e pode ser captada pelas células através de transportadores (CRT). A barreira hematoencefálica é pouco permeável à creatina e, portanto, o cérebro sintetiza a maior parte da creatina de que precisa. Neurônios e glia sintetizam creatina; no entanto, apenas neurônios e oligodendrócitos possuem seu transportador CRT1, que normalmente não é expresso em astrócitos (Braissant et al, 2001). Entretanto, quando agregados celulares são expostos à amônia, ocorre uma moderada indução de CRT1 nos astrócitos e sua expressão em oligodendrócitos é diminuída (Bachmann et al, 2004). Muitos trabalhos relatam o efeito neuroprotetor da creatina contra a excitotoxicidade do glutamato *in vivo* (Massieu et al, 2001) e em cultura de neurônios, onde ela

também se mostrou protetora contra a toxicidade induzida pelo peptídeo beta-amilóide (Brewer e Wallimann, 2000). A ação neuroprotetora da creatina também foi evidenciada em modelos de isquemia em ratos (Adcock et al, 2002; Zhu et al, 2004). O mecanismo da ação protetora da creatina ainda não é claro, mas em culturas mistas de neurônio e glia tratadas com glutamato, esse mecanismo parece envolver a via de sinalização Ras/ NF-kB (Juravleva et al, 2005).

A creatina tem sido sugerida como protetora contra a toxicidade da amônia em culturas celulares (Bachmann et al, 2004). Quando células embrionárias são co-tratadas com creatina (5 mM) durante uma exposição à amônia, o impedimento do crescimento axonal induzido por amônia é revertido, aparentemente por um mecanismo dependente da glia (Braissant et al, 2002). Sabendo que a S100B é capaz de interferir no crescimento de neuritos (Donato, 2003; Van Eldik e Wainwright, 2003), nós decidimos investigar o efeito da creatina na secreção de S100B. A creatina não foi capaz de alterar a secreção basal de S100B ou de reverter o aumento de secreção de S100B induzido por amônia em 24 h de tratamento. De forma similar, beta-hidroxibutirato, que sozinho é capaz de diminuir a secreção basal de S100B (Leite et al, 2004), foi incapaz de impedir o aumento de secreção de S100B induzida por amônia. Interessantemente, a creatina impediu o decréscimo do conteúdo intracelular de GFAP e da atividade da GS observados em 24 h. Essas observações reforçam a hipótese do papel neuroprotetor da creatina contra a toxicidade da amônia, de alguma forma alterando diretamente a atividade astrocítica.

III.3. Limitações e Perspectivas

A encefalopatia hepática é uma manifestação clínica que pode ser ocasionada por uma diversidade de fatores (cirrose, medicamentos, doenças autoimunes). Sendo assim, se torna bastante difícil o entendimento de seus mecanismos de toxicidade. Nesse trabalho realizado com cultura de astrócitos expostas à amônia, podemos observar que algumas características da encefalopatia hepática foram reproduzidas *in vitro*, como a redução do conteúdo de GFAP. Entretanto, o uso de culturas de células isoladas talvez não seja o melhor modelo para mimetizar uma situação *in vivo*, visto que células em cultura se desenvolvem em um meio artificial e sem o contato com outros tipos celulares. Portanto, devemos tomar cuidado ao relacionar diretamente os resultados obtidos a partir da exposição de astrócitos à amônia com o quadro da encefalopatia hepática.

Por outro lado, modelos *in vivo* representam melhor a doença como um todo e os efeitos de uma substância e seus produtos de metabolismo nos diferentes tipos celulares. Entretanto, um efeito observado em um modelo de anastomose porta-cava não pode ser atribuído diretamente à toxicidade da amônia e nem a um tipo celular específico. Portanto, para avaliar o perfil de secreção de S100B em situações com alta concentração de amônia, como no caso da encefalopatia hepática, se torna necessário o uso de culturas celulares. Só assim se pode ter certeza de que o aumento de secreção de S100B é devido a uma ativação dos astrócitos diretamente pela amônia e não a um efeito indireto, mediado por outros tipos celulares. Dessa forma, uma das perspectivas desse trabalho é a avaliação dos parâmetros de ativação glial em

um modelo animal de encefalopatia hepática, o que possibilitaria uma comparação mais direta entre resultados obtidos *in vitro* e uma situação *in vivo*.

É importante ressaltar que a S100B não é expressa apenas por astrócitos no SNC; oligodendrócitos também expressam S100B (Jenning et al, 2002; Romero-Aleman et al, 2003; Hachem et al, 2005). Nesse tipo celular, a S100B parece estar envolvida com o processo de diferenciação celular (Deloume et al, 2004) e com a mielinização (Rickmann e Wolff, 1995; Richter-Landsberg e Heinrich, 1995). Contudo, esse é um tema bastante recente e ainda não há relatos de que oligodendrócitos possam secretar S100B para o meio extracelular.

O envolvimento do cálcio intracelular e do AMPc no mecanismo de secreção de S100B ainda não é claro e sabe-se que o tratamento de cultura de astrócitos com amônia provoca uma mobilização de cálcio intracelular (Rose et al, 2005) e, em células de glioma C6, um aumento de AMPc (Zielinska et al, 2005). Nesse trabalho, mostramos que a amônia também é capaz de aumentar drasticamente a secreção de S100B em astrócitos, se tornando uma ferramenta interessante para a investigação do mecanismo de secreção dessa proteína.

O envolvimento dos estresses oxidativo e nitrosativo na encefalopatia hepática já está bem caracterizado. Atualmente, o aumento de NO observado na encefalopatia hepática tem sido relacionado com uma redução da atividade da GS, devido a nitração dessa enzima. Entretanto, a fonte desse NO (astrócito ou neurônio) ainda é incerta (Rose e Felipo, 2005). Nesse trabalho, nós observamos a redução da atividade da GS em culturas de astrócitos isolados tratados com amônia. Outra perspectiva é investigar se essa diminuição da

atividade da GS pode estar sendo causada por um aumento de NO produzido pelos próprios astrócitos.

IV. CONCLUSÕES

Nossos dados indicam um aumento da secreção de S100B induzida por amônia em 24 h, em paralelo com uma diminuição do conteúdo intracelular de GFAP e da atividade da GS. Sabendo-se que elevados e persistentes aumentos de S100B extracelulares possuem um efeito tóxico em células neuronais, um alterado conteúdo extracelular dessa proteína, induzido por amônia, pode contribuir para o dano cerebral observado na encefalopatia hepática. A creatina não impediu esse aumento na secreção de S100B, mas foi capaz de impedir a diminuição do conteúdo intracelular de GFAP e da atividade da GS induzidos por amônia.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adcock KH, Nedelcu J, Loenneker T, Martin E, Wallimann T, Wagner BP. Neuroprotection of creatine supplementation in neonatal rats with transient cerebral hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci*. 24 (2002) 382-388.

Bachmann C, Braissant O, Villard AM, Boulat O, Henry H. Ammonia toxicity to the brain and creatine. *Mol Genet Metab*. 81 (2004) 52-57.

Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson MP. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res*. 677 (1995) 167-170.

Belanger M, Desjardins P, Chatauret N, Butterworth RF. Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem Int*. 41 (2002) 155-160.

Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc*. 80 (2005) 1326-1338.

Bender AS, Norenberg MD. Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res*. 21 (1996) 567-573.

Bodega G, Suarez I, Boyano MC, Rubio M, Villalba RM, Arilla E, Gonzalez-Guijarro L, Fernandez B. High ammonia diet: its effect on the glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Neurochem Res.* 18 (1993) 971-975.

Braissant O, Honegger P, Loup M, Iwase K, Takiguchi M, Bachmann C. Hyperammonemia: regulation of argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase genes in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Neurosci Lett.* 266 (1999) 89-92.

Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res.* 86 (2001) 193-201.

Braissant O, Henry H, Villard AM, Zurich MG, Loup M, Eilers B, Parlascino G, Matter E, Boulat O, Honegger P, Bachmann C. Ammonium-induced impairment of axonal growth is prevented through glial creatine. *J Neurosci.* 22 (2002) 9810-9820.

Brewer GJ, Wallimann TW. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem.* 74 (2000) 1968-1978.

Butterworth RF. Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem Int.* 41 (2002) 81-85.

Chan H, Butterworth RF. Cell-selective effects of ammonia on glutamate transporter and receptor function in the mammalian brain. *Neurochem Int.* 43 (2003) 525-532.

Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int.* 37 (2000) 243-248.

Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23 (2003) 137-149.

Ciccarelli R, Di Iorio P, Bruno V, Battaglia G, D'Alimonte I, D'Onofrio M, Nicoletti F, Caciagli F. Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia.* 27 (1999) 275-281.

Cohn RM, Roth KS. Hyperammonemia, bane of the brain. *Clin Pediatr (Phila).* 43 (2004) 683-689.

Daikhin Y, Yudkoff M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *J Nutr.* 130 (2000) 1026S-1031S.

Darlington CL. Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr Opin Investig Drugs.* 6 (2005) 700-703.

Davey GE, Murmann P, Heizmann CW. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem.* 276 (2001) 30819-30826.

Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J. Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci.* 27 (2004) 453-465.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33 (2001) 637-668.

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

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25 (2000) 1439-1451.

Evanko DS, Zhang Q, Zorec R, Haydon PG. Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia.* 47 (2004) 233-240.

Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 559 (2004) 3-15.

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

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

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

Garbuglia M, Verzini M, Sorci G, Bianchi R, Giambanco I, Agneletti AL, Donato R. The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res.* 32 (1999) 1177-1185.

Garcia MV, Lopez-Mediavilla C, Juanes de la Pena MC, Medina JM. Tolerance of neonatal rat brain to acute hyperammonemia. *Brain Res.* 973 (2003) 31-38.

Garcia MV, Lopez-Mediavilla C, Juanes de la Pena MC, Medina JM. Antioxidant defence of the neonatal rat brain against acute hyperammonemia. *Brain Res.* 1001 (2004) 159-163.

Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschetti M, Kornacka M, Lituania M, Majewska U, Serra G, Michetti F. Measurement of urinary S100B protein

concentrations for the early identification of brain damage in asphyxiated full-term infants. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 157 (2003a) 1163-1168.

Gazzolo D, Monego G, Corvino V, Bruschetti M, Bruschetti P, Zelano G, Michetti F. Human milk contains S100B protein. *Biochim Biophys Acta.* 1619 (2003b) 209-212.

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

Gordon N. Ornithine transcarbamylase deficiency: a urea cycle defect. *Eur J Paediatr Neurol.* 7 (2003) 115-21.

Hachem S, Aguirre A, Vives V, Marks A, Gallo V, Legraverend C. Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia.* 51 (2005) 81-97.

Haghighat N, McCandless DW. Effect of ammonium chloride on energy metabolism of astrocytes and C6-glioma cells in vitro. *Metab Brain Dis.* 12 (1997) 287-298. Erratum in: *Metab Brain Dis* 13 (1998)173.

Haimoto H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest.* 57 (1987) 489-498.

Harrison. Manual de Medicina. 15^a edição. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2002. p. 761.

Hertz L, Yu AC, Kala G, Schousboe A. Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. *Neurochem Int.* 37 (2000) 83-102.

Huang R, Kala G, Murthy RK, Hertz L. Effects of chronic exposure to ammonia on glutamate and glutamine interconversion and compartmentation in homogeneous primary cultures of mouse astrocytes. *Neurochem Res.* 19 (1994) 257-265.

Jennings AR, Kirilak Y, Carroll WM. In situ characterisation of oligodendrocyte progenitor cells in adult mammalian optic nerve. *J Neurocytol.* 31 (2002) 27-39.

Juravleva E, Barbakadze T, Mikeladze D, Kekelidze T. Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glia cells, modulates Ras/NF-kappaB signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci Res.* 79 (2005) 224-230.

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

Kimura T, Budka H. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol (Berl)*. 70 (1986) 17-21.

Kretzschmar HA, DeArmond SJ, Forno LS. Measurement of GFAP in hepatic encephalopathy by ELISA and transblots. *J Neuropathol Exp Neurol*. 44 (1985) 459-471.

Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging*. 22 (2001) 765-772.

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*. 64 (2004) 139-143.

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*. 92 (2005) 546-553.

Marcaida G, Felipo V, Hermenegildo C, Minana MD, Grisolia S. Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett*. 296 (1992) 67-68.

Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 342 (2004) 1-12.

Marshak DR, Umekawa H, Watterson DM, Hidaka H. Structural characterization of the calcium binding protein s100 from adipose tissue. *Arch Biochem Biophys*. 240 (1985) 777-780.

Massieu L, Del Rio P, Montiel T. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo: correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience*. 106 (2001) 669-677.

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

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 19 (1965) 739-744.

Morris SM Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 22 (2002) 87-105.

Mrak RE, Griffin WS. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 26 (2005) 349-354.

Murthy CR, Bender AS, Dombro RS, Bai G, Norenberg MD. Elevation of glutathione levels by ammonium ions in primary cultures of rat astrocytes. *Neurochem Int.* 37 (2000) 255-268.

Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res.* 66 (2001) 282-288.

Nagaraja TN, Brookes N. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol.* 274 (1998) 883-891.

Neary JT, Whittemore SR, Zhu Q, Norenberg MD. Destabilization of glial fibrillary acidic protein mRNA in astrocytes by ammonia and protection by extracellular ATP. *J Neurochem.* 63 (1994) 2021-2027.

Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Goncalves CA. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem.* 37 (2004) 134-137.

Netto CBO, Conte S, Leite M, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R, Gonçalves CA. Serum S100B is increased in fasting rats. *Arch. Med. Res.* *in press.*

Norenberg MD, Neary JT, Norenberg LO, McCarthy M. Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 49 (1990) 399-405.

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 19 (2004) 313-329.

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

Ott P, Larsen FS. Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int.* 44 (2004) 185-198.

Ott P, Clemmesen O, Larsen FS. Cerebral metabolic disturbances in the brain during acute liver failure: from hyperammonemia to energy failure and proteolysis. *Neurochem Int.* 47 (2005) 13-18.

Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science.* 237 (1987) 896-898.

Pellerin L. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol.* 32 (2005) 59-72.

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

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 39 (2001) 409-413.

Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res.* 853 (2000) 74-80.

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

Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Goncalves CA, Souza DO. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem.* 48 (2002) 950-952.

Rao KV, Norenberg MD. Cerebral energy metabolism in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis.* 16 (2001) 67-78.

Rao KV, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res.* 30 (2005) 1311-1318.

Rao VL. Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochem Int.* 41 (2002) 161-170.

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

Richter-Landsberg C, Heinrich M. S-100 immunoreactivity in rat brain glial cultures is associated with both astrocytes and oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 42 (1995) 657-665.

Rickmann M, Wolff JR. S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci Lett.* 186 (1995) 13-16.

Romero-Aleman Mdel M, Monzon-Mayor M, Yanes C, Arbelo-Galvan JF, Lang D, Renau-Piqueras J, Negrin-Martinez C. S100 immunoreactive glial cells in the forebrain and midbrain of the lizard *Gallotia galloti* during ontogeny. *J Neurobiol.* 57 (2003) 54-66.

Rose C, Felipe V. Limited capacity for ammonia removal by brain in chronic liver failure: potential role of nitric oxide. *Metab Brain Dis.* 20 (2005) 275-283.

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

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

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.* 17 (1996) 761-766.

Sobel RA, DeArmond SJ, Forno LS, Eng LF. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 40 (1981) 625-632.

Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Changes in Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity in Response to Experimental Hepatic Encephalopathy in the Rat Hippocampus. *Restor Neurol Neurosci.* 12 (1998) 49-54.

Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int.* 41 (2002) 123-142.

Suarez I, Bodega G, Rubio M, Fernandez B. Down-regulation of astroglial proteins in the rat cerebellum after portacaval anastomosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 31 (2005) 163-169.

Suzuki F, Kato K. Induction of adipose S-100 protein release by free fatty acids in adipocytes. *Biochim Biophys Acta.* 889 (1986) 84-90.

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

Swamy M, Zakaria AZ, Govindasamy C, Sirajudeen KN, Nadiger HA. Effects of acute ammonia toxicity on nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, arginase and related metabolites in different regions of rat brain. *Neurosci Res.* 53 (2005) 116-122.

Tanigami H, Rebel A, Martin LJ, Chen TY, Brusilow SW, Traystman RJ, Koehler RC. Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience.* 131 (2005) 437-449.

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

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

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

Willard-Mack CL, Koehler RC, Hirata T, Cork LC, Takahashi H, Traystman RJ, Brusilow SW. Inhibition of glutamine synthetase reduces ammonia-induced astrocyte swelling in rat. *Neuroscience.* 71 (1996) 589-599.

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

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

Zhu S, Li M, Figueroa BE, Liu A, Stavrovskaya IG, Pasinelli P, Beal MF, Brown RH Jr, Kristal BS, Ferrante RJ, Friedlander RM. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.* 24 (2004) 5909-5912.

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