

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

Influência da Interleucina-1 beta sobre a Secreção e  
Conteúdo de S100B em Astrócitos, Células de Glioma C6 e  
Fatias Hipocampais

Daniela Fraga de Souza

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, 2008.

"A mente que se abre a uma  
nova idéia jamais voltará ao  
seu tamanho original."

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por sempre ter acreditado em mim e me incentivado, por toda sua doação amor e exemplo.

Ao meu pai, por tudo que me ensinou, pelo apoio incondicional, amor e estímulo apesar da distância.

Ao Jeferson, por toda a compreensão, carinho e amor. Obrigada por ter sempre me apoiado e ficado ao meu lado!

A toda minha grande família especial, que está sempre presente na minha vida, me incentivando e compartilhando cada vitória! Obrigado a cada um de vocês, meus tios, dindos, primos, afilhadas e manas de coração.

Às minhas queridas amigas Carol, Drika e Li, que há mais de 10 anos me presenteiam com suas amizades e força nos principais momentos da minha história.

Aos meus colegas e amigos da graduação que estiveram comigo, me ajudando e apoiando durante o mestrado: especialmente a Vanessa e a Luci, minhas incentivadoras e responsáveis por eu estar hoje na Bioquímica, além de grandes amigas.

À Pati, querida amiga, por toda amizade, desprendimento, ajuda, conselhos e carinho.

Ao André, ao Lucas e a Renata por toda a inestimável colaboração, amizade, pelos essenciais momentos de descontração e por tornar o lab 33 um lugar tão agradável.

À Kati e à Jô pela companhia, conversas e por toda a amizade.

À Marina e à Lúcia, por todos os ensinamentos, disposição, conselhos, conversas e pela grande ajuda!

Ao Maurício por toda a ajuda e interesse.

À Ana, Lê, Lets, Jú, Ale, Nina, Caro, Lari, Vitório, Fafá e todos os demais integrantes do LaBS100 pela ótima convivência, por todas as conversas, ajuda, torcida e amizade.

À Fran por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa e por ter me ensinado grande parte do que hoje sei.

A todos os amigos e colegas do departamento de Bioquímica.

À Alessandra, pelo seu sempre bom humor e carinho e pelo apoio fundamental com o material da cultura.

Ao Departamento de Bioquímica, pela estrutura oferecida e dedicação dos funcionários.

À Carmem, pelos ensinamentos e pela ajuda com as imunos e as imagens.

Ao CA, pela oportunidade, ensinamentos, orientação e apoio. Muito obrigada por acreditar em mim!

## ÍNDICE

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
I. INTRODUÇÃO .....	5
I. 1. Doenças Neurodegenerativas .....	5
I. 1. 1. Doenças Neurodegenerativas e Neuroinflamação.....	6
I. 2. Astrócitos .....	9
I. 3. Proteína S100B.....	11
I.3.1. Papéis Intracelulares .....	12
I.3.2. Papéis Extracelulares.....	12
I.3.3. Expressão e Secreção .....	13
I.3.4. Envolvimento em Doenças Neurodegenerativas.....	14
I.3.4.1. Proteína S100B e o “ciclo das citocinas” .....	14
OBJETIVOS.....	16
II. ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>JOURNAL OF</i> <i>NEUROINFLAMMATION</i> : Astroglial S100B secretion is stimulated by IL-1 $\beta$ : another piece in the “cytokine cycle” puzzle of Alzheimer’s disease. ....	17
III. DISCUSSÃO .....	48
CONCLUSÃO .....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## RESUMO

S100B é uma citocina produzida e secretada por astrócitos, que está envolvida no ciclo de citocinas desencadeado pela IL-1 $\beta$  na doença de Alzheimer. Entretanto, a secreção de S100B seguida de estímulo pela IL-1 $\beta$  não tem sido demonstrado diretamente. Nós investigamos a secreção de S100B em culturas gliais e fatias hipocampais expostas a IL-1 $\beta$ . Culturas corticais primárias de astrócitos, células de glioma C6 e fatias hipocampais agudas de ratos Wistar expostas a IL-1 $\beta$  (de 1 pg a 10ng/mL) foram utilizadas. S100B extracelular foi medida por ELISA. Migração nuclear de NF- $\kappa$ B foi investigada por imunocitoquímica e *immunoblotting*. A secreção de S100B também foi avaliada na presença de inibidores de NF- $\kappa$ B e MAPK. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student ou ANOVA de uma via, assumindo  $p < 0.05$ . A secreção de S100B foi estimulada por IL-1 $\beta$  em todas as preparações. Migração nuclear de NF- $\kappa$ B também foi observada nessas condições experimentais. PDTC (inibidor de NF- $\kappa$ B) e PD98059 (inibidor da via ERK) foram hábeis em inibir o aumento da secreção do S100B. Níveis micromolares de S100B, assim como IL-1 $\beta$ , induziram a produção de óxido nítrico. Nossos dados demonstram que a IL-1 $\beta$  induz um aumento da secreção basal de S100B nos três diferentes modelos *in vitro* utilizados: astrócitos corticais primários, células C6 e fatias hipocampais de ratos, e que esse aumento na secreção foi mediado pela via de sinalização MAPK-ERK/NF $\kappa$ B. Astrócitos primários e glioma C6 exibiram diferente sensibilidade a IL-1 $\beta$  na modulação tanto da secreção, quanto da expressão de S100B. Esses resultados sugerem que S100B extracelular pode contribuir para respostas reparativas em lesões cerebrais agudas, bem como para distúrbios neurodegenerativos em lesões crônicas. O mecanismo de indução de secreção de S100B por IL-1 $\beta$  suporta a hipótese de um "ciclo de citocinas", proposto na gênese da doença de Alzheimer.

## ABSTRACT

S100B is an astrocyte-derived cytokine, which has been implicated in the IL-1 $\beta$ -triggered cytokine cycle in Alzheimer's disease. However, the secretion of S100B following stimulation by IL-1 $\beta$  has not been directly demonstrated. We investigated S100B secretion in glial preparations and hippocampal slices exposed to IL-1 $\beta$ . Cortical primary astrocyte cultures, C6 glioma cells and acute hippocampal slices from the brain of Wistar rats exposed to IL-1 $\beta$  (from 1pg to 10ng/mL) were utilized. Extracellular S100B was measured by ELISA. Nuclear migration of NF- $\kappa$ B was investigated by immunocytochemistry and immunoblotting. S100B secretion was also evaluated in the presence of specific inhibitors for NF- $\kappa$ B and MAPK. Statistical analyses were carried out by Student t test or one-way ANOVA, assuming  $p < 0.05$ . IL-1 $\beta$ -stimulated S100B secretion was observed in all preparations. Nuclear migration NF- $\kappa$ B was also observed under these experimental conditions. PDTTC (an inhibitor of NF- $\kappa$ B) and PD 98059 (an inhibitor of ERK) inhibited S100B secretion stimulated by IL-1 $\beta$ . S100B, at micromolar levels, like IL-1 $\beta$ , was able to induce NO production. Our data demonstrate IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion in three different *in vitro* preparations: cortical primary astrocytes, C6 glioma cells and hippocampal slices of rats; this secretion was mediated by MAPK-ERK/NF- $\kappa$ B signalling. Primary astrocytes and C6 cells exhibited different sensitivities to IL-1 $\beta$  concerning S100B expression and secretion. These results suggest that extracellular S100B could contribute to a reparative response in acute brain injury, as well as in neurodegenerative disorders due to chronic injury. The mechanism of IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion supports the hypothesis for a "cytokine cycle", proposed in the genesis of Alzheimer disease.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

A $\beta$ , peptídeo beta amilóide;

AGE, produto avançado de glicação;

AVC, acidente vascular cerebral;

CSF, fluido cérebro-espinhal;

DA, doença de Alzheimer;

DP, doença de Parkinson;

ERK, cinase reguladora de sinal extracelular;

GAP-43, proteína associada ao crescimento;

IL-1 $\beta$ , interleucina-1-beta;

iNOS, óxido nítrico sintase induzível;

MAPK, proteína cinase ativada por mitógeno;

NF- $\kappa$ B, fator de transcrição nuclear kapa B;

NO, óxido nítrico;

PDTC, pirrolidina ditiocarbamato;

PD98059, 2'-amino-3'-metoxiflavona;

PKC, proteína cinase C;

RAGE, receptor para AGE;

SB203580, 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol;

SNC, sistema nervoso central;

TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa.

# **I. INTRODUÇÃO**

## **I. 1. Doenças Neurodegenerativas**

Desordens neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer (DA), de Parkinson (DP), esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (DH), entre outras, respondem por proporção significativa e crescente da morbidade e mortalidade no mundo desenvolvido. Devido à mudança no perfil da população demográfica, menor número de nascimentos e expectativa de vida aumentada graças ao avanço médico-científico, demências neurodegenerativas e desordens neurodegenerativas do movimento estão tornando-se cada vez mais evidentes, uma vez que a incidência dessas condições patológicas é maior na população idosa (Skovronsky et. al., 2006).

Algumas características, fenotípicas e moleculares, são recorrentes na maioria das patologias conhecidas como doenças neurodegenerativas; déficit cognitivo e/ou motor, morte neuronal acentuada, agregação protéica, formação de corpos de inclusão, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e presença de moléculas pró-inflamatórias nos locais de lesão estão entre elas (Halliwell, 2006).

Dentre as desordens neurodegenerativas, a mais prevalente é a doença de Alzheimer, que afeta de 20 a 30 milhões de indivíduos no mundo. A DA é responsável pela maioria dos casos de demências que são diagnosticados após os 60 anos (Heneka e O'Banion, 2007). Sua prevalência aumenta com a idade, afetando aproximadamente 1% a 3% da população acima de 60 anos, de 3% a 12% da população entre 70 e 80 anos chegando até a 25% a 35% em pessoas acima de 85 anos. Calcula-se que a incidência da DA triplique nos



próximos 50 anos, devido à crescente industrialização e ao envelhecimento da população mundial (Walton e Dodd, 2007).

Exames *post-mortem* em pacientes com DA, revelam uma atrofia macroscopicamente visível em regiões cerebrais relacionadas a aprendizado e memória. Esta redução do volume cerebral é, provavelmente, decorrente de uma profunda degeneração de neurônios e sinapses (Mattson, 2004). O tecido nervoso de portadores de DA apresenta duas alterações morfológicas características: depósito extracelular de peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) também chamado placas neuríticas ou senis e emaranhados neurofibrilares, intracelular, decorrentes da agregação de proteína *tau* hiperfosforilada (Lee et. al., 2001).

A deposição de A $\beta$  e a formação dos emaranhados neurofibrilares podem não explicar por completo os sintomas clínicos encontrados na DA, particularmente os sintomas iniciais, manifestados antes de a degeneração neuronal tornar-se evidente. Interessantemente, alterações inflamatórias são observadas em todo o cérebro de indivíduos com doença, mesmo em estados iniciais, particularmente junto aos depósitos amilóides e emaranhados neurofibrilares, que são forte ativadores de células inflamatórias (Griffin e Mruk, 2002).

### **I. 1. 1. Doenças Neurodegenerativas e Neuroinflamação**

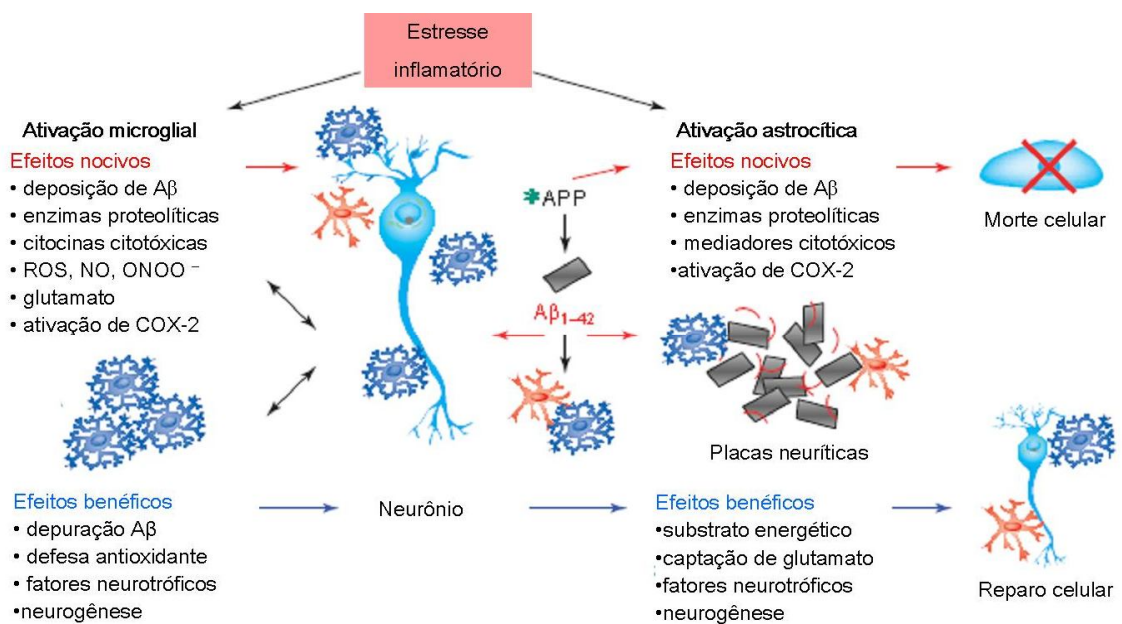
Doenças neurodegenerativas parecem estar fortemente associadas com processos inflamatórios crônicos (Eikelenboom et. al. 2006; Akiyama et. al., 2000). Recorrência de deposição anormal de agregados protéicos, clássicos ativadores de inflamação (Wyss-Coray e Mucke, 2002), ativação glial e

produção aumentada de citocinas são alguns dos sinais característicos de inflamação presente na neurodegeneração do tecido cerebral, tanto em condições agudas (lesão cerebral traumática, AVC, p. ex.), quanto em desordens crônicas (doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica) (Honig, 2000; Schultzberg et. al., 2007).

O sistema nervoso central (SNC) é tradicionalmente conhecido como um órgão “imunologicamente privilegiado”, ou seja, não suscetível à resposta imune e inflamatória sistêmica. Contudo atualmente, sabe-se que ele possui um sistema imune endógeno coordenado por células imunocompetentes, como a microglia e os astrócitos (Mönning et. al., 1992; Dong e Benveniste, 2001; Lucas et. al., 2006). A resposta à infecção ou inflamação gerada no cérebro difere daquelas desencadeadas na periferia, sintomas clássicos, como rubor, tumor, calor e dor não são tipicamente observados no SNC. Além disso, o recrutamento de leucócitos, que é rápido nos órgãos periféricos, apresenta-se modesto e tardio no tecido nervoso. Essas diferenças podem ser atribuídas, em parte, à presença da barreira sangue-cérebro, que obstrui a entrada de células inflamatórias, patógenos e macromoléculas, protegendo assim o sensível sistema neuronal de danos tipicamente associados à inflamação (Tuppo e Arias, 2005).

A neuroinflamação na doença de Alzheimer inclui um amplo espectro de complexas respostas celulares, tais como ativação microglial e astrocítica. A glia quando ativada libera uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, que potencialmente podem contribuir para uma disfunção neuronal e resultar em eventual morte celular. Esses mediadores criam e alimentam um ciclo vicioso que pode ser essencial para a progressão da patologia da DA (Griffin et. al.,

1998). A presença de eventos, como liberação de citocinas, proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda, radicais livres e óxido nítrico, além de diversos processos moleculares relacionados (Tuppo e Arias, 2005), colaboram para uma atual percepção dual da inflamação no cérebro: por um lado com papel neuroprotetor e por outro exercendo efeitos prejudiciais sobre a função neuronal (figura 1). Estas interações podem ser benéficas como limitantes de reações de “fase aguda”, mas em condições crônicas podem culminar em neurodegeneração progressiva (Mrak e Griffin, 2005). Apesar do extraordinário desenvolvimento no conhecimento sobre a resposta inflamatória na DA, ainda permanece controverso se a ativação do sistema imune inato no SNC tem um papel primário ou secundário nos mecanismos que levam ao desenvolvimento dessa patologia (Praticó e Trojanowski, 2000; Zilka et. al., 2006).



**Figura 1.** O papel dual da inflamação na doença de Alzheimer. Adaptado de *Marchetti e Abbracchio, 2005.*

## **I. 2. Astrócitos**

O SNC é constituído basicamente por dois tipos celulares, células neuronais e células gliais. As células gliais são subdivididas em microglia, células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória, e macroglia – composta por oligodendrócitos, formadores da mielina; células endoteliais, que revestem os ventrículos cerebrais, e astrócitos (Perea e Araque, 2005; Jessen, 2004).

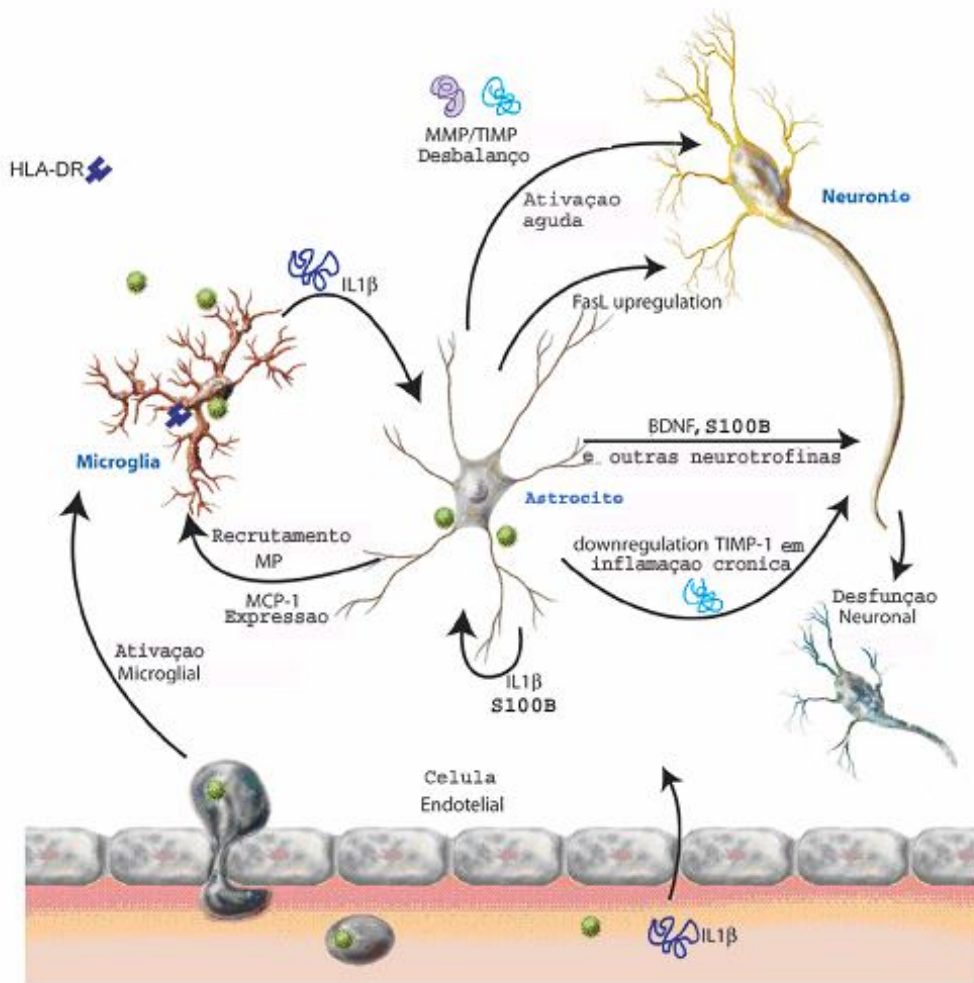
Os astrócitos podem ser classificados em dois subtipos principais: astrócitos protoplasmáticos, encontrados em maior concentração na substância cinzenta, e astrócitos fibrosos, localizados principalmente na substância branca cerebral, que correspondem, respectivamente, ao tipo 1 e tipo 2, em cultura (Kimelberg e Norenberg, 1989). Existem ainda astrócitos especializados, encontrados em estruturas específicas, como a glia de Bergmann no cerebelo, as células de Müller na retina e os pituócitos na neurohipófise (Porter e McCarthy, 1996).

Apesar de serem as células mais abundantes do SNC, somente na última década os astrócitos deixaram de ser considerados apenas como suporte estrutural para os neurônios e passaram a ser reconhecidos por sua capacidade dinâmica e diversidade funcional (Shao e McCarthy, 1994). Hoje se sabe que astrócitos não somente estabelecem a arquitetura estrutural do cérebro, mas também organizam e participam de suas vias de comunicação e plasticidade (Blasko et. al., 2004).

Além de modular a intensidade e atividade sináptica, astrócitos também podem regular a neurogênese e gliogênese, assim como estabelecer interações recíprocas com outros tipos celulares do SNC, como neurônios, células endoteliais, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais.

Dentre as inúmeras funções exercidas pelos astrócitos podemos também citar a formação da barreira hemato-encefálica (Abbott et. al., 2006); tamponamento de níveis extracelulares dos íons (Walz, 1989); produção de fatores tróficos (Schwartz e Mishler, 1990; Eriksen e Druse, 2001); metabolismo de neurotransmissores (Kimelberg e Katz, 1985) e suporte energético para os neurônios (Pellerin, 2005).

Além disso, astrócitos, juntamente com a microglia, são as principais células efetoras de resposta imune inata no SNC, exibem um fenótipo ativado em doenças neurodegenerativas, produzindo diversos mediadores inflamatórios e exercendo atividade fagocítica (figura 2) (Hauwel et. al., 2005; Wyss-Coray e Mucke, 2002). No processo de ativação glial observa-se superexpressão de citocinas neurotróficas como interleucina 1-  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e S100B (Sheng et. al., 2000; Mrak e Griffin, 2005; Liu et. al. 2005; Donato, 2001). Recentes trabalhos têm sugerido que a expressão aumentada dessas citocinas exerce papel chave na progressão da neuroinflamação, disparando e sustentando uma cascata de eventos que resultam em progressiva morte neuronal (Griffin, 2006; Royston et. al., 1999; Allan et. al., 2005).



**Figura 2.** O papel do astrócito na inflamação. Adaptado de [www.unmc.edu](http://www.unmc.edu) (página eletrônica da University of Nebraska Medical Center).

### I. 3. Proteína S100B

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, zinco e cobre pertencente à família das proteínas S100, assim denominadas por serem solúveis em solução 100% de sulfato de amônia (Moore, 1965).

Estruturalmente, a proteína S100B apresenta-se na forma de homodímeros constituídos de duas subunidades, unidas por pontes de

dissulfeto, é uma proteína do tipo EF-hand (hélice-loop-hélice) de 21 kDa com dois sítios ligantes de Ca<sup>2+</sup> (Marenholz , Heizmann e Fritz, 2004). No SNC, a S100B é predominantemente expressa e secretada por astrócitos (Donato, 2001), exercendo efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios.

Essa proteína pode atravessar a barreira hemato-encefálica, concentrações basais e aumentadas, devido à lesão cerebral, podem ser determinadas no soro (Marchi et. al., 2004). Entretanto, sua concentração sérica não pode ser considerada como exclusivamente proveniente de fonte cerebral (Netto et. al., 2006), visto que outras fontes periféricas, como o tecido adiposo, também são capazes de secretar S100B (Marshak, 1985; Haimoto et. al., 1987).

### **I.3.1. Papéis Intracelulares**

Intracelularmente, a S100B é capaz de se ligar a diversas proteínas-alvo, tais como GAP-43, PKC, fator anti-apoptótico Bcl-2 ou à proteína supressora tumoral P53 (Donato, 2001). S100B também pode regular a ubiquitinação de proteínas, via interação com Sgt1 (Bianchi et. al., 1993), e a polimerização do citoesqueleto, inibindo a fosforilação de GFAP e vimentina, dessa forma, possivelmente modulando plasticidade, metabolismo energético e proliferação celular (Donato, 2003; Van Eldik e Wainwright, 2003).

### **I.3.2. Papéis Extracelulares**

Os efeitos extracelulares da proteína S100B em cultura estão intimamente relacionados com a sua concentração no meio extracelular. Em

baixas concentrações, variando entre picomolar e valores baixos de nanomolar, essa proteína é trófica, promovendo crescimento de neuritos, modulação sináptica e sobrevivência neuronal (Van Eldik e Wainwright, 2003).

Contudo, concentrações mais elevadas de S100B, variando entre altos níveis de nanomolar até molar, resultam em efeitos opostos. Altos níveis estimulam a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), podendo até levar à apoptose neuronal (Ahlemeyer et. al., 2000; Steiner, 2007).

Esses efeitos são mediados, em parte, pela interação da S100B com o RAGE, um receptor multiligante, envolvido na transdução de estímulos inflamatórios e de diversos fatores neurotróficos e neurotóxicos (Donato, 2001).

### **I.3.3. Expressão e Secreção**

Apesar de já identificados diversos papéis intra e extracelulares da S100B, o mecanismo através do qual é secretada ainda não está elucidado (Rothermundt et. al., 2003). No entanto, já se tem conhecimento de diversos moduladores da secreção dessa proteína, que é estimulada em estresse metabólico (privação de oxigênio, soro e/ou glicose) e diminuída por altas concentrações de glutamato extracelular, por exemplo (Gerlach et. al., 2006; Tramontina et. al., 2006).

Entretanto, um aumento da expressão de S100B não está diretamente relacionado com um aumento de sua secreção, pois nem toda S100B produzida é necessariamente exportada (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.3.4. Envolvimento em Doenças Neurodegenerativas**

A S100B pode ser considerada como um biomarcador de dano cerebral, altos níveis de S100B no CSF (fluido cérebro-espinhal) e no sangue periférico têm sido correlacionados com diversas desordens neurodegenerativas. Diversos estudos *post-mortem* na doença de Alzheimer e síndrome de Down descrevem a presença da S100B predominantemente em astrócitos reativos circundando placas neuríticas (Mrak e Griffin, 2001; Sheng et. al., 1994). Somado a isso, altas concentrações de S100B foram encontradas no líquido de pacientes nos primeiros estágios da doença de Alzheimer (Peskind et. al., 2001) e no soro de pacientes com síndrome de Down (Netto et. al., 2004).

#### **I.3.4.1. Proteína S100B e o “ciclo das citocinas”**

De acordo com a hipótese de Griffin e colaboradores, IL-1 $\beta$ , proveniente de microglia ativada, induz um aumento da secreção de S100B em astrócitos (Griffin et. al., 1998). De fato, existem evidências (dados de expressão de mRNA) de uma conversa-cruzada entre essas proteínas, com regulação recíproca entre elas, levando a superexpressão de ambas. Interleucina-1 $\beta$  promove a ativação astrocítica, levando a um aumento de expressão da S100B. S100B superexpressa estimula a síntese neuronal de  $\beta$ -APP, além de promover superexpressão da própria IL-1 $\beta$ . Já a IL-1 $\beta$ , age diretamente sobre neurônios aumentando a síntese e processamento errôneo de  $\beta$ -APP,

favorecendo assim a contínua deposição  $\beta$ -amilóide, característica da doença de Alzheimer (Liu, et. al., 2005; Griffin, 2006).

No entanto, o aumento no mRNA de S100B induzido por IL-1 $\beta$  não é necessariamente, acompanhado por um aumento na quantidade de proteína S100B (Hinkle et. al., 1998). Foi mostrado que células de gliomas C6 tratados com IL-1 $\beta$  induzem um aumento do mRNA e da proteína S100B após 24 h (Sheng et. al., 1996). Por outro lado, IL-1 $\beta$  provoca uma diminuição do mRNA S100B em cultura de astrócitos após 48 h de exposição, e esse efeito permanece por, pelo menos, 7 dias, embora nenhuma mudança na concentração da proteína S100B tenha sido observada durante esse tempo (Hinkle et. al., 1998).

Assim sendo, é muito importante uma avaliação apropriada da secreção de S100B na presença de IL-1 $\beta$ , pois, como já dito anteriormente, ao contrário da IL-1 $\beta$  a proteína S100B produzida, não é necessariamente secretada.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da IL-1 $\beta$  sobre a secreção e expressão de S100B

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o comportamento da secreção de S100B em cultura primária de astrócito, cultura de células de glioma C6 e em fatias hipocampais expostas a diferentes concentrações de IL-1 $\beta$ .
- Verificar possíveis alterações do conteúdo de S100B intracelular em cultura primária de astrócitos e cultura de células C6 após exposição a IL-1 $\beta$ .
- Investigar as vias de sinalização envolvidas na modulação da secreção de S100B.
- Analisar o envolvimento do fator de transcrição NF- $\kappa$ B na secreção de S100B, bem como na produção de NO.

**II. ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF  
NEUROINFLAMMATION**

ASTROGLIAL S100B SECRETION IS STIMULATED BY IL-1 $\beta$ :  
ANOTHER PIECE IN THE “CYTOKINE CYCLE” PUZZLE OF  
ALZHEIMER’S DISEASE

**Astroglial S100B secretion is stimulated by IL-1 $\beta$ : another piece in the “cytokine cycle” puzzle of Alzheimer’s disease**

Daniela F de Souza<sup>1</sup>, Marina C Leite<sup>1</sup>, André Quincozes-Santos<sup>1</sup>, Patrícia Nardin<sup>1</sup>,  
Lucas S Tortorelli<sup>1</sup>, Maurício M Rigo<sup>1</sup>, Carmem Gottfried<sup>1</sup>, Rodrigo B Leal<sup>2</sup>, Carlos-  
Alberto Gonçalves<sup>1</sup>

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

Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, ICBS  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Ramiro Barcelos, 2600-Anexo  
90035-003  
Porto Alegre, RS, Brazil  
[casg@ufrgs.br](mailto:casg@ufrgs.br)

## **Abstract**

*Background:* S100B is an astrocyte-derived cytokine, which has been implicated in the IL-1 $\beta$ -triggered cytokine cycle in Alzheimer's disease. However, the secretion of S100B following stimulation by IL-1 $\beta$  has not been directly demonstrated. We investigated S100B secretion in glial preparations and hippocampal slices exposed to IL-1 $\beta$ .

*Methods:* Cortical primary astrocyte cultures, C6 glioma cells and acute hippocampal slices from the brain of Wistar rats exposed to IL-1 $\beta$  (from 1pg to 10ng/mL) were utilized. Extracellular S100B was measured by ELISA. Nuclear migration of NF- $\kappa$ B was investigated by immunocytochemistry and immunoblotting. S100B secretion was also evaluated in the presence of specific inhibitors for NF- $\kappa$ B and MAPK. Statistical analyses were carried out by Student t test or one-way ANOVA, assuming  $p < 0.05$ .

*Results:* IL-1 $\beta$ -stimulated S100B secretion was observed in all preparations. Nuclear migration NF- $\kappa$ B was also observed under these experimental conditions. PDTC (an inhibitor of NF- $\kappa$ B) and PD 98059 (an inhibitor of ERK) inhibited S100B secretion. S100B, at micromolar levels, like IL-1 $\beta$ , was able to induce NO production.

*Conclusions.* Our data demonstrate IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion in three different *in vitro* preparations: cortical primary astrocytes, C6 glioma cells and hippocampal slices of rats; this secretion was mediated by MAPK-ERK/NF- $\kappa$ B signalling. Primary astrocytes and C6 cells exhibited different sensitivities to IL-1 $\beta$  concerning S100B expression and secretion. These results suggest that extracellular S100B could contribute to a reparative response in acute brain injury, as well as in neurodegenerative disorders due to chronic injury. The mechanism of IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion supports the hypothesis for a "cytokine cycle", proposed in the genesis of Alzheimer disease.

## **Background**

Neurodegenerative diseases are commonly associated with chronic inflammatory responses [1-2]. Deposits of protein aggregates (e.g. beta-amyloid), classical inflammatory activators [3], and the presence of pro-inflammatory molecules (e.g. cytokines), suggest that neuroinflammation underlies the pathophysiology of these disorders [4-6]. However, the full role of neuroinflammation is still controversial, because the inflammatory response is also related to the mechanism of neuroprotection [7].

Astrocytes, together with microglia, are the main cells involved in the inflammatory response in the central nervous system; these cells exhibit an activated phenotype in neurodegenerative diseases, producing several inflammatory mediators and displaying phagocytic activity [3, 8]. Glial activation leads to the expression of the neurotrophic cytokines, interleukin –1 beta (IL-1  $\beta$ ) and S100B [9-12]. Recent studies have suggested that the expression of these cytokines play a central role in the development of neuroinflammation, initiating and sustaining a cascade of events that results in progressive neuronal death [13-15].

S100B is a calcium binding protein, predominantly expressed and secreted by astrocytes in vertebrate brain [16]. Intracellularly, S100B binds to many protein targets, possibly modulating cytoskeleton plasticity, cell proliferation and astrocyte energy metabolism [17-18]. High levels of brain tissue S100B have been observed in neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease [19]. The extracellular effect of S100B, observed in cell cultures, depends on its concentration. At sub-nanomolar levels, S100B stimulates neurite growth and promotes neuronal survival, however, at micromolar levels this molecule produces opposite effects and can even induce neuronal apoptosis, leading to the induction of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , tumor

necrosis factor  $\alpha$  and inflammatory stress-related enzymes such as inducible nitric oxide synthase [20-21].

According to the hypothesis of Griffin and co-workers', IL-1 $\beta$  from activated microglia induces S100B upregulation in astrocytes [19]. In fact, there is evidence (RNA expression data) of cross-talk between these proteins, with each upregulating each other, particularly measuring [4]. However, the increase in S100B mRNA induced by IL-1 $\beta$  is not necessarily accompanied by an augment in S100B protein [22]. C6 glioma cells treated with IL-1 $\beta$  induced an increase in S100B mRNA and protein after 24 h [23]. On the other hand, IL-1 $\beta$  decreased S100B mRNA in astrocyte cultures after 48 h and this effect lasted at least for 7 days, although no change in S100B protein was observed during this time [22]. These contrasting results may indicate a different response to IL-1 $\beta$  in astrocyte cultures and C6 glioma cells.

In addition, it should be mentioned that not all S100B that is produced, in contrast to IL-1 $\beta$ , is necessarily exported. Therefore, it is important to evaluate appropriately the secretion of S100B in the presence of IL-1 $\beta$ . However, to our knowledge, no study has directly evaluated IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion. In this study, we investigated S100B secretion in rat cortical astrocyte cultures, C6 glioma cells and acute hippocampal slices exposed to IL-1 $\beta$ . We also investigated the involvement of NF-kappaB in S100B secretion, as well as in NO.



## **Methods**

### *Materials*

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was purchased from Gibco BRL. Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), S100B, monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1), 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), dithiothreitol (DTT), orthovanadate, Ophenylenediamine (OPD), flasks and other material for cell culture were purchased from Sigma; fetal calf serum from Cultilab (São Paulo, Brazil); peroxidase-conjugated IgGs, from Amersham; PD98059, SB203580 and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) from Calbiochem. All other chemicals were purchased from common commercial suppliers.

### *Astrocyte culture*

Primary astrocyte cultures from Wistar rats were prepared as previously described [15]. 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<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free balanced salt solution, pH 7.4, containing (in mM): 137 NaCl; 5.36 KCl; 0.27 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 6.1 glucose. The cortex 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 8.39mM HEPES, 23.8mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% fungizone, 0.032% garamycin and 10% fetal calf serum (FCS). Cultures were maintained in DMEM containing 10% FCS in 5% CO<sub>2</sub>/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 in the absence or presence of IL-1 $\beta$  (1, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> or 10<sup>4</sup> pg/mL) or PDTC (100 $\mu$ M).

### *C6 glioma cell culture*

A rat glioblastoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Late passage cells (i.e. after at least 100 passages) were seeded in 24-well plates at densities of  $10^4$  cells/well, and cultured in DMEM (pH 7.4) supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5 mg/mL Fungizone<sup>®</sup> and 100 U/L gentamicin in 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. After cells reached confluence, the culture medium was replaced by DMEM without serum in the absence or presence of IL-1 $\beta$  (1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$  or  $10^4$  pg/mL), S100B (40  $\mu$ g/mL) or PDTC (100 $\mu$ M).

### *Preparation and incubation of brain slices*

Rats were decapitated, their hippocampi were quickly dissected out and transverse sections (300  $\mu$ m) were rapidly obtained using a McIlwain tissue chopper. One slice was placed into each well of a 24-well culture plate. Slices were incubated in oxygenated physiological medium containing in mM (120 NaCl, 2 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 25 HEPES, 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 10 glucose, pH 7.4) at room temperature and the medium was changed every 15 min with fresh medium. Following a 120 min equilibration period, slices were incubated in medium plus IL-1 $\beta$  (1, 10,  $10^2$ ,  $10^3$  or  $10^4$  pg/mL) and/or PDTC (100  $\mu$ M), PD98059 (10  $\mu$ M) or SB203580, (2  $\mu$ M) for 1 h at 30°C.

### *S100B measurement*

The S100B concentration was determined in the culture medium at 1, 4, 24 h and in the incubation medium of slices at 1 h. Cells were washed and scraped at 24 h for measurement of intracellular S100B content. ELISA for S100B was carried out, as described previously with modifications [24]. Briefly, 50  $\mu$ L of sample plus 50  $\mu$ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1, from Sigma). Polyclonal anti-S100 (from DAKO) was

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

#### *Immunocytochemistry and DAPI nuclei staining*

Astrocytes were cultured on circular glass cover slips. After 1 h of IL-1 $\beta$  exposure, cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS, mM): 2.9 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 38 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 130 NaCl; 1.2 KCl, rinsed with PBS and permeabilized for 10 min in PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma). Fixed cells were then blocked for 60 min with PBS containing 0.5% bovine serum albumin and incubated for 1h with rabbit polyclonal antibody/p65 (Santa Cruz Biotechnologies, 1:200), followed by a secondary FITC-labeled anti-rabbit IgG (Amersham, 1:200) for 2 h. After washing, the cells were stained with 0.2 mg/mL DAPI for 1 h and visualized under a fluorescent microscope (Nikon microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory).

#### *Nuclei fraction preparation*

C6 cells were harvested by scraping them into cold (4°C) phosphate-buffered saline and centrifuging the suspension at 200 X g for 10 min. The sedimented cells were carefully resuspended in a solution containing 10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM dithiothreitol, 20  $\mu$ M sodium orthovanadate, and complete EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche Molecular Biochemicals). The cells were then chilled on ice for 15 min and gently lysed by adding 0.6% (v/v) Nonidet P-40. The lysate was centrifuged at 200 X g for 10 min to produce the whole nuclei fraction pellet [25].

#### *Western blot analysis*

Equal amounts (20  $\mu$ g) of proteins from each whole nuclei sample were boiled in sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, 0.002% (w/v) bromphenol blue) and

electrophoresed in 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The separated proteins were blotted onto a nitrocellulose membrane. Equal loading of each sample was confirmed with Ponceau S staining (Sigma). Anti -p65 (Santa Cruz Biotechnology) was used at a dilution of 1:1,000. After incubating with the primary antibody for 1 h at room temperature, filters were washed and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin (IgG) at a dilution of 1:2000. The chemiluminescence signal was detected using an ECL kit from Amersham.

#### *Measurement of NO by Nitrite Assay*

Nitric oxide was determined by measuring the stable product nitrite using the colorimetric assay described by Hu et al. [26]. Briefly, the Griess reagent (Sigma) was prepared by mixing equal volumes of 1 % sulfanilamide in 0.5 N HCl and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine in deionized water. The reagent was added directly to the cell culture and incubated under reduced light at room temperature during 15 min. Samples were analyzed at 550 nm on a microplate spectrophotometer. Controls and blanks were run simultaneously. Nitrite concentrations were calculated using a standard curve prepared with sodium nitrite (0–50  $\mu$ M).

#### *Other measurements*

Protein content was measured by Lowry's method using BSA as a standard [27]. Extracellular S100B content was referred to as "secretion", based on cell integrity measurement (data not shown) with LDH activity by a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil) and Trypan blue exclusion assay [24].

#### *Statistical analysis*

Parametric data are reported as means  $\pm$  standard error and were analyzed by Student's *t*-test (when two groups were considered) or one-way ANOVA (followed by Tukey's test). Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant.

## Results

A fast response (at 15 min) of S100B secretion was observed in primary astrocyte cultures exposed to IL-1 $\beta$  (Fig 1A). Interestingly, very low levels of IL-1 $\beta$  (1-100 pg/mL) induced S100B secretion, but levels of 1-10 ng/mL were not able to modify basal S100B secretion. On the other hand, C6 glioma cells (Fig 1B) and hippocampal slices (Fig 1C) exhibited an increase in S100B secretion at 1 h after IL-1 $\beta$  addition at concentrations of 10 and 1 ng/mL, respectively. The S100B secretion in astrocytes was transitory and no secretion above basal secretion was observed at 4 h after IL-1 $\beta$  addition (Fig 2A). In C6 glioma, IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion was more persistent. No difference in cell culture integrity was observed during the 24 h after IL-1 $\beta$  addition, as measured by LDH and Trypan blue exclusion assays, even after serum deprivation (data not shown). Interestingly, the basal levels of S100B secretion were found to be quite different among the preparations; namely, approximately 0.047, 0.010 and 0.089 ng/mg of total protein in primary astrocyte cultures, C6 glioma cells and hippocampal slices, respectively. It should be noted that the intracellular content of S100B (at 24 h) only increased significantly in C6 glioma cells (Fig 2B).

The activity of IL-1 $\beta$  was confirmed by nuclear p65 migration in astrocytes (Fig 3A) and immunoblotting for p65 in the nuclear fraction of C6 glioma cells (Fig 3B). Simultaneous nuclear staining with DAPI demonstrates the translocation from the cytoplasm to the nucleus. The involvement of the MAPK signaling pathway, beyond NF-kappaB, was then investigated in the secretion of IL-1 $\beta$ -induced S100B in hippocampal slices using specific inhibitors (Fig 4). PDTC (at 100  $\mu$ M) inhibited the S100B secretion induced by IL-1 $\beta$ , but did not modify basal S100B secretion. PD98059 (inhibitor of MAPK/ERK), but not SB203580 (inhibitor of MAPK/p38), inhibited the S100B secretion induced by IL-1 $\beta$ , without affecting basal S100B

secretion. Finally, we investigated another activity, that of NO production, induced by IL-1 $\beta$  and S100B (Fig 5). Both IL-1 $\beta$  and S100B were observed to induce a similar increase in NO production in C6 glioma preparations that (evaluated by nitrite levels). No synergic or additive effect was observed and PDTC was able to block this increment.

## Discussion

Astrocytes (physiologically involved in glutamate clearance) and microglia, activated during brain injury, are responsible for the clearance of debris, as well as the secretion of cytokines and neurotrophic factors [28]. However, chronic glial activation, with the release of pro-inflammatory cytokines, eicosanoids and NO, contributes to dysfunction and neuronal death. In fact, IL-1 $\beta$  and the astrocyte-derived cytokine, S100B, have been strongly correlated with neuroinflammation disorders and neurodegenerative diseases [29], although the mechanisms involved remain unknown [30].

Although some regulating molecules of S100B secretion have been identified, including beta amyloid peptide [31], forskolin, lysophosphatidic acid [32], serotonin [33] and glutamate [34-35], the mechanisms of regulation still remain unclear [36]. This study shows that IL-1 $\beta$  increases S100B secretion in cultured astrocytes, C6 glioma cells and acute hippocampal slices. Measurement of extracellular S100B was referred to as “secretion”, since no parallel increase of LDH in the medium was observed (data not shown). Previous studies have shown changes in S100B mRNA levels [22,23] and intracellular S100B protein, induced by IL-1 $\beta$  [23], that are not necessarily related to S100B secretion.

Many *in vitro* data indicate a cross-talk between S100B and IL-1 $\beta$ , with each upregulating each other [11]. Interestingly, elevated peripheral levels of S100B have been described in acute brain injury (e.g. stroke and traumatic brain injury) and psychiatric disorders (e.g. schizophrenia) [21], conditions also associated with elevations of IL-1 $\beta$  [15, 37-38] and experimental and clinical evidence has supported the hypothesis of a “cytokine cycle” involving IL-1 $\beta$  and S100B in Alzheimer’s disease [13,19].

Astrocytes and C6 glioma cells have different regulatory mechanisms for the gene expression of S100B [39], but these glial preparations have been used indistinctly to study S100B secretion [32, 36]. In fact, although astrocytes and C6 glioma cells have many common biochemical properties, these cells have some important differences particularly concerning proliferation rate and oxidative metabolism of glucose [40-41]. Recently, we found that astrocytes and C6 gliomas cells, cultured in high-glucose medium, exhibit opposing profiles of S100B secretion under serum deprivation [42]. Our present finding reinforces the difference between these cells with regard to S100B secretion induced by IL-1 $\beta$ . Astrocytes, in contrast to C6 glioma cells, transiently release S100B, and only when exposed to low levels of IL-1 $\beta$ . Moreover, the intracellular content of S100B in C6 glioma cells, differently from astrocytes, significantly changed 24 h after exposure to IL-1 $\beta$ .

Although these cells released S100B at different concentrations of IL-1 $\beta$ , the activation of NF- $\kappa$ B was observed in both preparations. NF- $\kappa$ B is a key signal transducer for IL-1 $\beta$  activity in glial and neuronal cells during brain injury [43-44]. Many inducible genes are activated via NF- $\kappa$ B, resulting in the production of inflammatory mediators such as other cytokines, eicosanoids and NO. A rapid (1h) and persistent activation of NF- $\kappa$ B was observed in 1321N1 astrocytoma cells in response to 10 ng/mL IL-1 $\beta$  [45], as we observed in C6 glioma with regard to S100B secretion. Interestingly, NF- $\kappa$ B activation can also up-regulate RAGE, a multiligand immunoglobulin receptor family, able to mediate S100B effects, and thus contributing to the chronic inflammatory response [46-47]. On the other hand, S100B, during early phases of brain injury could activate RAGE, promoting neuronal survival (via NF- $\kappa$ B/MAPK-ERK) [48].



In spite of a possible and secondary RAGE activation by S100B, IL-1 $\beta$  doubtless induces a secretion of S100B. This increased secretion could be due to an increment in intracellular S100B protein (observed at 24 h only in C6 glioma cells) or an increment in an as yet unknown protein involved in the mechanism of secretion of S100B. Based on our current knowledge of NF- $\kappa$ B signalling, it was surprising how fast (15 min) the effect was observed in primary astrocytes. Moreover, PDTC was unable to inhibit this rapid IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion in astrocytes (data not shown).

Another signal transducer involved in IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion was the MAPK-ERK pathway. This pathway demonstrates a close cross talk with NF- $\kappa$ B [49] and, similarly, has been proposed to be involved in astrocyte survival, proliferation and death [11, 50]. Based on our data, it would be conceivable that ERK activation precedes NF- $\kappa$ B in the modulation of S100B secretion. This also could explain the fast S100B release induced by IL-1 $\beta$ , suggesting that other cytoplasmic protein targets of ERK may exist beyond the transcription factors.

Finally, we investigated a possible co-action of S100B and IL-1 $\beta$  in the production of NO in C6 glioma cells. Confirming data from other laboratories, we found that both cytokines stimulated NO production [26, 29, 51]. Furthermore, in agreement with the literature, the NO production by both cytokines was mediated by NF- $\kappa$ B [52], but this effect was neither synergic nor additive. It is important to mention that the effect of S100B on NO production was only observed at micromolar levels of the protein. This would support an earlier protective role of S100B secretion induced by IL-1 $\beta$  (possibly without astroglial NO generation). However, chronic and/or elevated levels of this protein could trigger toxic paracrine signalling (e.g. neuronal expression of precursor protein amyloid) [19].

*Conclusions.* Our data show S100B secretion to be induced by IL-1 $\beta$  in three different *in vitro* preparations: cortical primary astrocytes, C6 glioma cells and hippocampal slices of rats. This secretion was mediated by MAPK-ERK/NF- $\kappa$ B signalling. Primary astrocytes and C6 cells exhibited different sensitivities to IL-1 $\beta$  with different respective S100B expressions and secretions. These results contribute to the idea that extracellular S100B could contribute to a reparative response in acute brain injury, as well as to neurodegenerative disorders in chronic injury. IL-1 $\beta$ -induced S100B secretion is in agreement with the “cytokine cycle” proposed in the genesis of Alzheimer disease.

## List of abbreviations

ANOVA, analysis of variance;

BSA, bovine serum albumine;

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ECL, enhanced chemiluminescent

ERK, extracellular signal-regulated kinase, sub-type of MAPK;

FITC, fluorescein isothiocyanate

IL-1 $\beta$ , interleukin-1-beta;

LDH, lactate dehydrogenase;

MAPK, mitogen-activated protein kinase;

NF- $\kappa$ B, nuclear factor-kappa B;

NO, nitric oxide;

PBS, phosphate-buffered saline;

PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate;

PD98059, 2'-amino-3'-methoxyflavone;

SB203580, 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole;

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00. We would like to thank Ms. Alessandra Heizelmann for technical support with cell culture.

## References

1. Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJM, van Gool WA, Hoozemans JJM: **The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease.** *J Neural Transm* 2006, **113**:1685-1695.
2. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrazek R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyama I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T: **Inflammation and Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2000, **21**:383-421.
3. Wyss-Coray T, Mucke L: **Inflammation in Neurodegenerative Disease - A Double-Edged Sword.** *Neuron* 2002, **35**:419-432.
4. Griffin WS, Mrazek RE: **Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease.** *J Leukoc Biol* 2002, **72**:233-238.
5. Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller J, Eikelenboom P: **Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology.** *Int J Dev Neurosci* 2006, **24**:157-165.
6. Ralay Ranaivo H, Craft JM, Hu W, Guo L, Wing LK, Van Eldik LJ, Watterson DM: **Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration.** *J Neurosci* 2006, **26**:662-670.

7. Marchetti B, Abbracchio MP: **To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?** *Trends Pharmacol. Sci* 2005, **26**:517–525.
8. Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P: **Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: The role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells.** *Brain Research Reviews* 2005, **48**:220-233.
9. Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, Cordell B, Paul SM, Jones RA, Woodward S, Zhou XQ, McGinness JM, Griffin WST: **Overexpression of the neuritotrophic cytokine S100B precedes the appearance of neuritic  $\beta$ -amyloid plaques in APPV717F mice.** *J Neurochem* 2000, **74**:295–301.
10. Mrak RE, Griffin WS: **Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration.** *Neurobiol Aging* 2005, **26**:349-354.
11. 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.** *Journal of Neurochemistry* 2005, **92**:546–553.
12. 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* 2001, **33**:637-668.
13. Griffin WS: **Inflammation and neurodegenerative diseases.** *Am J Clin Nutr* 2006, **83**:470S-474S.
14. Royston MC, McKenzie JE, Gentleman SM, Sheng JG, Mann DM, Griffin WS, Mrak RE: **Overexpression of s100beta in Down's syndrome: correlation with patient age and with beta-amyloid deposition.** *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1999, **25**:387–393.

15. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ: **Interleukin-1 and neuronal injury.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:629-640.
16. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G: **S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature).** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322**:1111-1122.
17. Donato R: **Intracellular and extracellular roles of S100 proteins.** *Microsc Res Tech* 2003, **60**:540-551.
18. Van Eldik LJ, Wainwright MS: **The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain.** *Restor Neurol Neurosci* 2003, **21**:97-108.
19. Griffin WST, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE: **Glial-Neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression.** *Brain Pathol* 1998, **8**:65-72.
20. Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J: **S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702.** *Brain Res* 2000, **858**:121-128.
21. Steiner J, Bernstein HG, Biela H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B: **Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain.** *BMC Neurosci* 2007, **8**:2.
22. Hinkle DA, Harney JP, Cai A, Hilt DC, Yarowsky PJ, Wise PM: **Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 beta regulate S100 beta expression in cultured astrocytes.** *Neuroscience* 1998, **82**:33-41.
23. Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WST: **In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine**

- interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis.** *Neurobiol Aging* 1996, **17**:761-766.
24. Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Portela LV, Gonçalves CA: **Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA.** *Brain Res Brain Res Protoc* 2000, **6**:86-90.
25. Chiarini A, Whitfield JF, Armato U, Dal Pra I: **Protein kinase C-beta II is an apoptotic lamin kinase in polyomavirus-transformed, etoposide-treated pyF111 rat fibroblasts.** *J Biol Chem* 2002, **277**:18827-18839.
26. Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ: **S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes.** *J Biol Chem* 1996, **271**:2543-2547.
27. Peterson GL: **A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.** *Anal Biochem* 1977, **83**:346-356.
28. Schultzberg M, Lindberg C, Aronsson AF, Hjorth E, Spulber SD, Oprica M: **Inflammation in the nervous system-physiological and pathophysiological aspects.** *Physiol Behav* 2007, **92**:121-128.
29. 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*. 2001, **22**:765-772.
30. Allan SM, Rothwell NJ: **Inflammation in central nervous system injury.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **358**:1669-1677.
31. Peña 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* 1995, **34**:118-126.



32. Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Karl J, Gonçalves CA, Wofchuk S, Rodnight R: **Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology.** *FEBS Lett* 2000, **486**:203-207.
33. Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC: **Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology.** *Brain Res* 1990, **528**:155-158.
34. Gonçalves D, Karl J, Leite M, Rotta L, Salbego C, Rocha E, Wofchuk S, Gonçalves CA: **High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes.** *Neuroreport* 2002, **13**:1533-1535.
35. Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Gonçalves CA: **Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes.** *Cell Mol Neurobiol* 2006, **26**:81-86.
36. Davey GE, Murmann P, Heizmann CW: **Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**:30819-30826.
37. Simi A, Porsmyr-Palmertz M, Hjertén A, Ingelman-Sundberg M, Tindberg N: **The neuroprotective agents chlomethiazole and SB203580 inhibit IL-1beta signalling but not its biosynthesis in rat cortical glial cells.** *J Neurochem* 2002, **83**:727-737.
38. Theodoropoulou S, Spanakos G, Baxevasis CN, Economou M, Gritzapis AD, Papamichail MP, Stefanis CN: **Cytokine serum levels, autologous mixed lymphocyte reaction and surface marker analysis in never medicated and chronically medicated schizophrenic patients.** *Schizophr Res* 2001, **47**:13-25.
39. Castets F, Griffin WS, Marks A, Van Eldik LJ: **Transcriptional regulation of the human S100 beta gene.** *Brain Res Mol Brain Res* 1997, **46**:208-216.

40. Tabernero A, Medina JM, Giaume C: **Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions.** *J Neurochem* 2006, **99**:1049-1061.
41. Haghghat N, McCandless DW: **Effect of ammonium chloride on energy metabolism of astrocytes and C6-glioma cells in vitro.** *Metab Brain Dis* 1997, **12**:287-298.
42. Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Gonçalves CA: **S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium.** *Neurochem Int* 2007, **50**:774-782.
43. Moynagh PN: **The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain.** *J Anat* 2005, **207**:265-269.
44. Mémet S: **NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease.** *Biochem Pharmacol* 2006, **72**:1180-1195.
45. Bourke E, Kennedy EJ, Moynagh PN: **Loss of Ikappa B-beta is associated with prolonged NF-kappa B activity in human glial cells.** *J Biol Chem* 2000, **275**:39996-40002.
46. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM: **RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice.** *Circulation* 2002, **106**:2827-2835.
47. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP: **Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products.** *J Mol Med* 2005, **83**:876-886.
48. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H: **Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation.** *J Biol Chem* 2000, **275**:40096-40105.

49. Lubin FD, Johnston LD, Sweatt JD, Anderson AE: **Kainate mediates nuclear factor-kappa B activation in hippocampus via phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated protein kinase.** *Neuroscience* 2005, **133**:969-981.
50. Mandell JW, Gocan NC, Vandenberg SR: **Mechanical trauma induces rapid astroglial activation of ERK/MAP kinase: Evidence for a paracrine signal.** *Glia* 2001, **34**:283-295.
51. Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R: **S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1742**:169-177.
52. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C: **Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase.** *J Biol Chem* 1994, **269**:4705-4708.

## Figure legends

**Figure 1. *Effect of IL-1 $\beta$  on S100B secretion in glial preparations and hippocampal slices.*** Cortical astrocytes from neonate Wistar rats (A), C6 glioma cells (B) and hippocampal slices from 30-day old Wistar rats (C) were exposed to IL-1 $\beta$  at concentrations of 1 pg to 10 ng/mL for 15 min (astrocytes) or 1 h (C6 cells and hippocampal slices). S100B was measured by ELISA. The line indicates basal secretion, assumed as 100% in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2. *Time curve of S100B secretion and intracellular S100B content in glial preparations exposed to IL-1 $\beta$ .*** In A, S100B secretion at 1, 4 and 24 h in primary astrocyte cultures and C6 glioma cells exposed to 100 pg/mL and 10 ng/mL IL-1 $\beta$ , respectively. In B, intracellular content of S100B at 24 h after IL-1 $\beta$  exposure. The dashed line indicates basal secretion (in A) or intracellular content (in B), assumed as 100% in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 4 independent experiments performed in triplicate.

\* Significantly different from basal secretion ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3. *Immunocytochemistry and immunoblotting for p65 in glial preparations exposed to IL-1 $\beta$ .*** In A, primary astrocyte cultures were exposed or not (control) to 100 pg/mL IL-1 $\beta$  for 1h. Immunocytochemistry for p65 developed with FITC-labeled secondary antibody indicates a nuclear migration (panels A and C). DAPI staining confirms the nuclear localization (panels B and D). Scale bar = 50  $\mu$ m. In B, glioma C6 cells were exposed or not (control) to 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 1h. Protein samples were analyzed in 10% SDS-PAGE, blotted to nitrocellulose and immunodetected with anti-p65 antibody by an ECL system.

**Figure 4. Effect of NF- $\kappa$ B and MAPK inhibitors on S100B secretion induced by IL-1 $\beta$  in hippocampal slices.** Hippocampal slices of Wistar rats were (or not) exposed to 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 1h, in the presence of 100  $\mu$ M PDCT (NF- $\kappa$ B inhibitor) or 10  $\mu$ M PD98059 (MAPK-ERK inhibitor) or 2  $\mu$ M SB203580 (MAPK-p38 inhibitor). S100B content in the medium was measured by ELISA. The dashed line indicates basal secretion, assumed as 100% in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 4 independent experiments performed in triplicate. <sup>a</sup> Significantly different from basal secretion ( $p < 0.05$ ). <sup>b</sup> Different from IL-1 $\beta$  -stimulated secretion.

**Figure 5. NO production induced by S100B and IL-1 $\beta$  in glial preparations.** C6 glioma cells were exposed to 10 ng/mL IL-1 $\beta$  and/or 40  $\mu$ g/MmL S100B. Nitrite content in the medium was measured to evaluate NO production. PDTC (at 100  $\mu$ M) was used to inhibit the NO production mediated by NF- $\kappa$ B. The dashed line indicates basal NO content, assumed as 100% in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 5 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion ( $p < 0.05$ ).

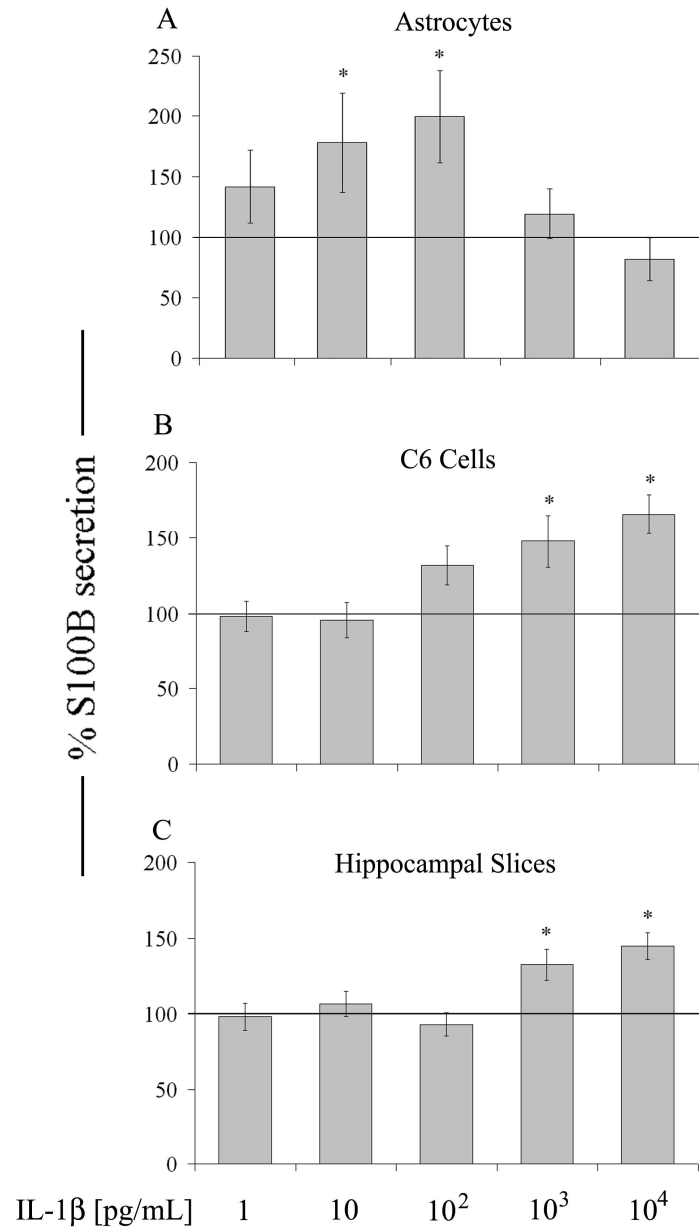


Figure 1

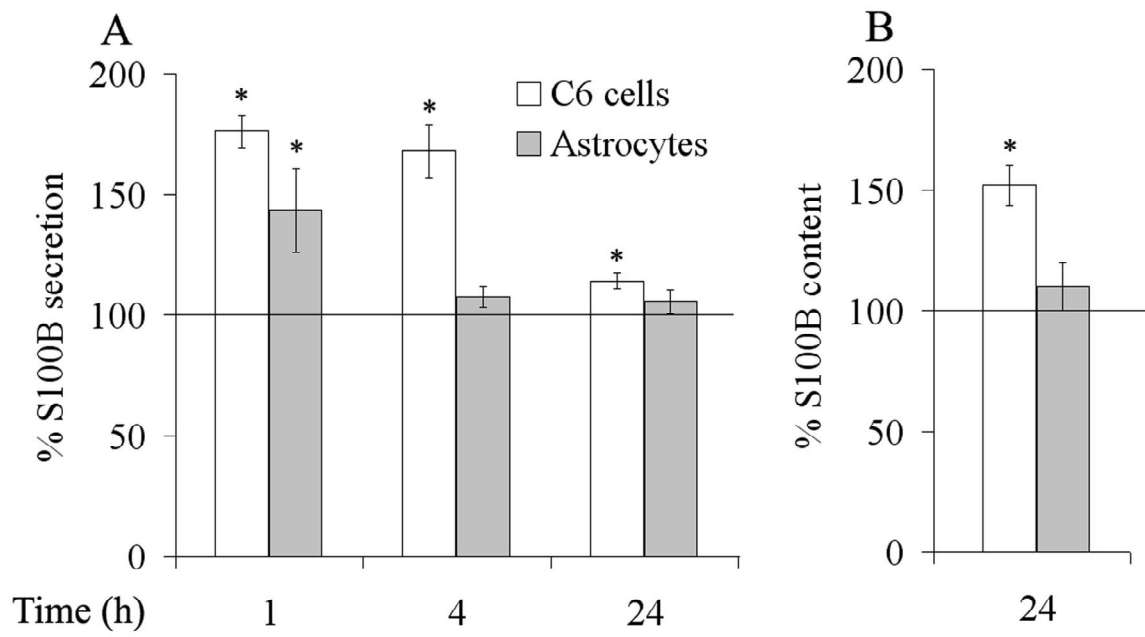


Figure 2

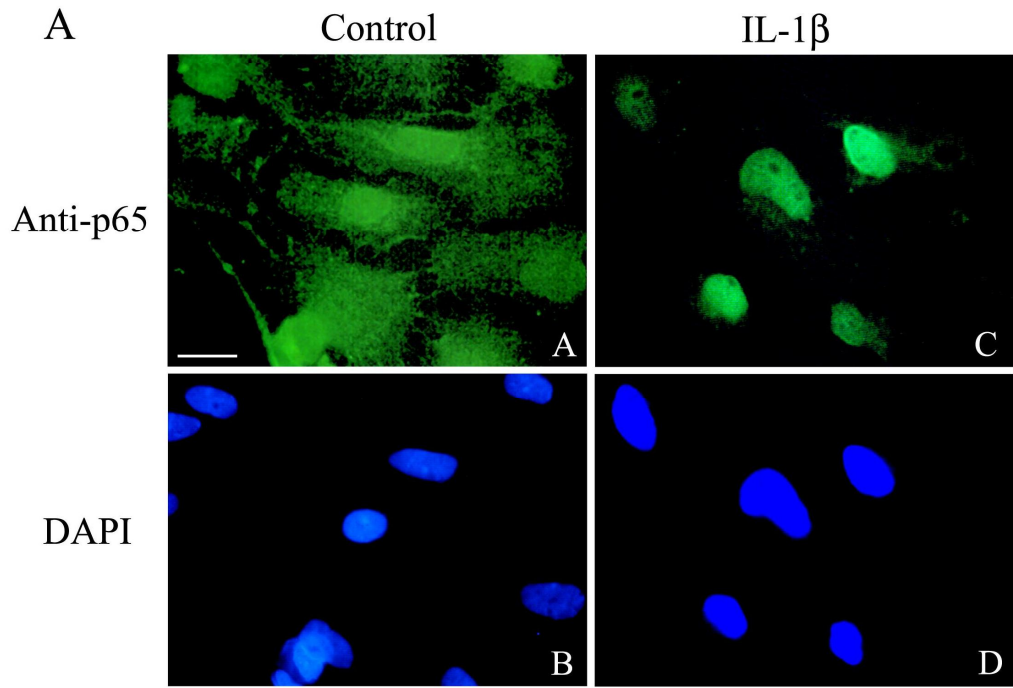


Figure 3



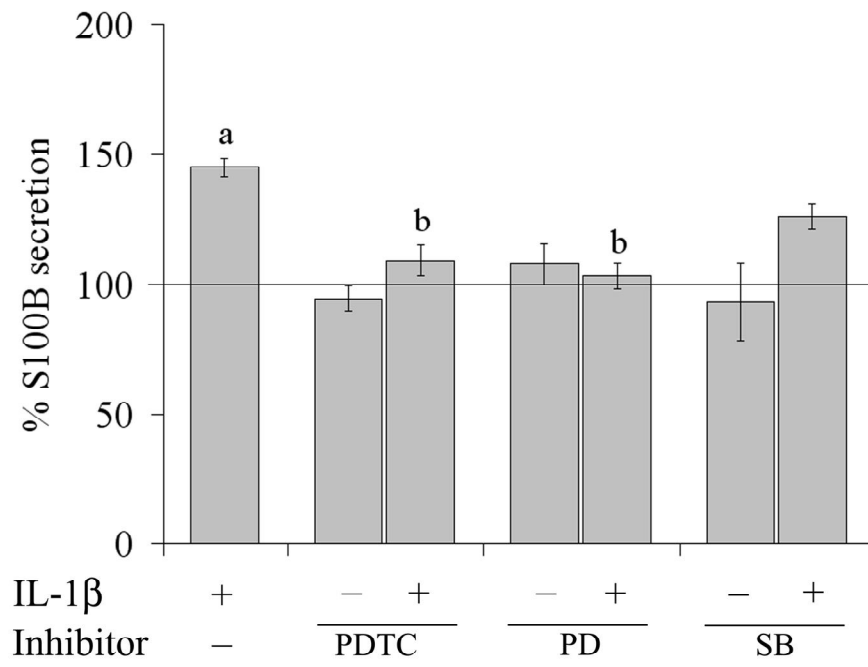


Figure 4

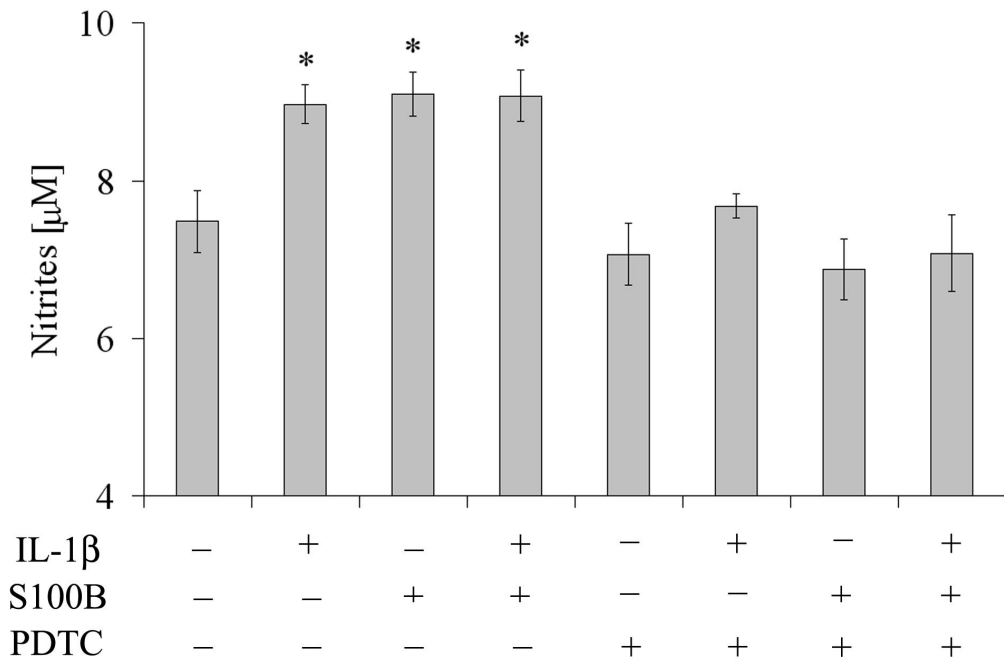


Figure 5

### III. DISCUSSÃO

Astrócitos (fisiologicamente envolvidos na recaptação de neurotransmissores, em especial o glutamato) e microglia, quando ativados durante dano cerebral, são responsáveis pelo *clearance* de debris e patógenos, bem como por secreção de citocinas e fatores neurotróficos (Schultzberg et. al., 2007). No entanto, acredita-se que ativação glial crônica, com subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias e substâncias citotóxicas (NO, ROS, glutamato), tenha um papel central no desenvolvimento de disfunção e morte neuronal. Citocinas gliais, como S100B e IL-1 $\beta$ , podem conduzir a uma ativação glial adicional, que vêm sendo fortemente correlacionada com desordens neuroinflamatórias e fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Lam et. al., 2001). Os mecanismos envolvidos na relação da neuroinflamação com morte neuronal ainda não foram completamente elucidados e têm sido alvo de estudos em diversos modelos experimentais (Allan e Rothwell, 2003).

Embora, já tenham sido identificadas algumas moléculas capazes de modular a secreção de S100B, como o peptídeo  $\beta$ -amilóide (Peña, Brecher e Marshak, 1995), forskolina, ácido lisofosfatídico (Pinto et. al., 2000), serotonina (Whitaker-Azmitia, Murphy e Azmitia, 1990), adenosina (Cicarelli et. al., 1999), amônia (Leite et. al., 2006),  $\alpha$ - ceto ácidos (Funchal et. al., 2007) e glutamato (Gonçalves et. al., 2002), seu mecanismo de regulação ainda é pouco conhecido (Davey, Murmann e Heizmann, 2001). Neste estudo nós demonstramos que IL-1 $\beta$  extracelular aumenta a secreção basal de S100B em cultura cortical de astrócitos, cultura de células de glioma C6 e em fatias hipocampais. A quantificação de S100B extracelular foi referida como

“secreção”, já que não foram observados aumentos paralelos de LDH no meio de cultivo celular (dados não mostrados).

Diversos trabalhos mostram mudanças nos níveis do mRNA de S100B (Hinkle et. al., 1998; Sheng et. al., 1996) e da proteína S100B intracelular induzidos por IL-1 $\beta$  (Sheng et. al., 1996), que não se refletem necessariamente em secreção de S100B.

Estudos prévios *in vitro* têm demonstrado que S100B estimula a secreção de IL-1 $\beta$  em células gliais e neuronais, apontando para uma super-regulação recíproca entre estas citocinas (Liu et. al., 2005). Interessantemente, elevados níveis periféricos de S100B têm sido observados em lesões cerebrais agudas (AVC, lesões cerebrais traumáticas), desordens auto-imunes (LES), desordens infecciosas (meningoencefalite) e transtornos psiquiátricos (esquizofrenia) (Van Eldik e Wainwright, 2003; Portela et. al., 2002; Steiner et. al., 2007), condições que também estão associadas à elevação de IL-1 $\beta$  (Simi et. al., 2002; Allan e Rothwell, 2003; Theodoropoulou et. al., 2001), além da existência de diversas evidências clínicas e experimentais de um “ciclo de citocinas” envolvendo S100B e IL-1 $\beta$  na doença de Alzheimer. Entretanto, deve-se observar que a S100B também possui fontes extra-cerebrais e, portanto, sua dosagem no soro pode refletir também alterações periféricas e não apenas às relacionadas ao SNC.

Apesar de possuírem mecanismos regulatórios distintos para a expressão do gene da S100B (Castets et. al., 1997), astrócitos primários e glioma C6 são utilizados indistintamente no estudo da expressão e secreção de S100B. Devido à similaridade com células gliais primárias em cultura, a linhagem celular de glioma C6 é extensamente usada como modelo celular

astrocítico (Vernadakis et. al., 1992). Todavia, é importante enfatizar, que apesar de astrócitos e células C6 apresentarem diversas propriedades bioquímicas comuns (Pinto et. al., 2000; Davey, Murmann e Heizmann, 2001), essas células possuem importantes diferenças, particularmente no que diz respeito à taxa de proliferação e metabolismo oxidativo da glicose (Taberner et. al., 2006; Haghghat et. al., 1997). Recentemente, nós demonstramos que astrócitos e gliomas C6, cultivados em meio com alto conteúdo de glicose, exibiram um perfil oposto de secreção de S100B mediante privação de soro (Nardin et. al., 2007). Nossos resultados presentes apontam disparidade em relação à secreção de S100B induzida por IL-1 $\beta$ , reforçando a idéia de possíveis diferenças existentes entre essas células. Astrócitos, em relação a células C6, apresentaram uma resposta mais sensível e transitória de secreção de S100B, e somente quando expostos a baixos níveis de IL-1 $\beta$ . Adicionalmente, o conteúdo intracelular de S100B em células de glioma C6, diferentemente de astrócitos, foi alterada significativamente após 24 h de exposição a IL-1 $\beta$ ; sugerindo que possa haver inclusive diferença na regulação de vias intracelulares e/ou expressão de receptores de citocinas.

Embora essas células tenham apresentado liberação de S100B quando trabalhado com concentrações diferentes de IL-1 $\beta$ , em ambos os tipos celulares foi observada a ativação de NF-kappaB (dados não apresentados). O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é um mediador chave nas vias de transdução do sinal para a atividade da IL-1 $\beta$  durante injúria cerebral, em células gliais e neuronais. Quando ativado, o NF- $\kappa$ B transloca-se para o núcleo, promovendo a transcrição de diversos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ,

metaloproteinases, iNOS, e outros, podendo assim, estar envolvido no desenvolvimento de neuropatologias (Moynagh, 2005; Mémet, 2006).

Uma rápida (1h) e persistente ativação de NF- $\kappa$ B foi observada em célula astrocitoma 1321N1 em resposta a IL-1  $\beta$  10 ng/mL (Bourke et. al. 2000), esses resultados podem exemplificar um dos mecanismos responsáveis pela ativação prolongada da secreção de S100B, observada em glioma C6. No entanto, não se pode descartar a participação de outras moléculas na regulação dessa secreção sustentada. Sabe-se que NF- $\kappa$ B pode induzir a transcrição de um grande número de genes diferentes, podendo levar a produção de possíveis proteínas hábeis em “perpetuar” (Bierhaus et. al., 2005) a sinalização, como por exemplo, a própria IL-1 $\beta$  ou ainda RAGE (Bucciarelli et. al., 2002), um receptor multiligante pertencente à superfamília das imunoglobulinas, capaz de mediar efeitos da S100B (Ponath et. al., 2007), e assim, contribuir para respostas inflamatórias crônicas (Bucciarelli et. al., 2002; Bierhaus et. al., 2005). Por outro lado, S100B, durante as fases iniciais de lesão cerebral, poderia ativar RAGE e através da via MAPK-ERK1/2 - NF- $\kappa$ B, gerar uma superprodução de fatores anti-apoptótico, como Bcl-2, promovendo assim a sobrevivência neuronal (Huttunen et. al., 2000).

Apesar de existir uma possível e secundária ativação de RAGE por S100B, o que constatamos é que IL-1 $\beta$  sem dúvida induz a liberação de S100B. Este aumento da secreção poderia ser devido a um incremento na própria proteína S100B intracelular (observado nas 24 h, apenas em células de glioma C6) ou a indução de alguma proteína ainda desconhecida, envolvida no seu mecanismo de secreção. Com base em nossos conhecimentos atuais sobre a sinalização do NF- $\kappa$ B, mostrado como importante integrante da via de

sinalização modulada por IL-1 $\beta$ , foi surpreendente quão rápido (15 min) o efeito foi observado em astrócitos primário. Além disso, PDTC não foi capaz de inibir esta rápida indução da secreção de S100B por IL-1 $\beta$  nos astrócitos (dados não apresentados).

Outro sinal de transdução envolvido na liberação de S100B induzida por IL-1 $\beta$  é a via MAPK-ERK. Esta via apresenta uma estreita “conversa-cruzada” com NF- $\kappa$ B (Lubin et. al., 2005) e, da mesma forma, pode ser ativada por diversos estímulos extracelulares, incluindo IL-1 e S100 (Lam et. al., 2001), tendo papéis relevantes na sobrevivência, proliferação e controle de respostas inflamatórias, em diferentes tipos celulares (Liu et. al., 2005). Nós observamos que a secreção de S100B estimulada por IL-1 $\beta$ , em fatias hipocampais, é dependente da via ERK/MAPK, mas não da via p38/MAPK. Já foi demonstrado que fosforilação da ERK produz ativação astrogliar que, dependendo do ambiente e/ou do dano, pode ser tanto benéfica (combate a patógenos, reparo celular), quanto prejudicial (desordens neuroinflamatórias crônicas) (Mandell, Gocan e Vandenberg, 2001). É possível que NF- $\kappa$ B possa representar um dos mecanismos moleculares convergentes através dos quais se desenvolvam as respostas inflamatórias via ERK/MAPK observadas, contudo a rápida modulação da secreção observada (15 min em astrócitos primários) sugere que existam outros alvos citoplasmáticos da proteína ERK, além dos fatores de transcrição.

Finalmente nós investigamos a possível ação conjunta de S100B e IL-1 $\beta$  na produção de NO em células de glioma C6. O óxido nítrico exerce papéis essenciais na modulação do tônus vascular, neurotransmissão e processos inflamatórios. Diversos estudos têm demonstrado que citocinas pró-

inflamatórias podem estimular a produção de iNOS induzindo um subsequente aumento de liberação de NO (Pahan, Raymonde e Singh, 1999). Quando níveis elevados de NO estão presentes concomitantemente com superóxido, é formado peroxinitrito, uma molécula NO-derivada altamente reativa, que contribui com o dano neuronal associado ao estresse oxidativo e inflamação (Van Eldik e Wainwright, 2003). Nossos resultados, de acordo com os de outros laboratórios (Hu et al., 1996; Lam et. al., 2001; Adami et al., 2004), mostram um aumento na liberação de nitrito (um metabólito estável do NO, passível de quantificação) em células C6 expostas a concentrações nanomolar de IL-1 $\beta$  e/ou micromolar de S100B, mas este efeito não foi sinérgico nem aditivo. Além disso, acordando com a literatura, a produção de NO tanto por IL-1 $\beta$ , quanto por S100B foi mediada por NF-kB. A presença de uma seqüência consenso para ligação de NF-kB na região promotora de iNOS (Xie, Kashiwabara e Nathan, 1994), a inibição da liberação de NO e da expressão de iNOS após a ativação de NF-kB ser inibida, confirmam nossos achados de que a liberação de NO ocorre de maneira NF-kB-dependente. A estimulação simultânea por IL-1 $\beta$  e S100B não apresentou efeito somatório muito provavelmente devido ao fato de as duas citocinas agirem através da ativação de NF-kB e conseqüentemente estarem competindo pela mesma via de sinalização.

É importante enfatizar que S100B só exerceu efeito estimulatório sobre a liberação de NO quando em níveis micromolares. Esses achados ratificam um possível papel protetor inicial da secreção de S100B induzida por IL-1 $\beta$ , possivelmente sem geração astrogliar de NO. Todavia, níveis elevados e/ou crônica ativação da secreção desta proteína, poderia levar a uma sinalização



parácrina tóxica, como, por exemplo, para expressão neuronal de A $\beta$  (Griffin et. al., 1998).

## CONCLUSÃO

Nossos dados demonstram, pela primeira vez de nosso conhecimento, um aumento na secreção de S100B induzido diretamente por IL-1 $\beta$ , em três diferentes preparações *in vitro*: astrócitos corticais primários, células de glioma C6 e fatias hipocâmpais de ratos. Esta secreção foi mediada pela via de sinalização MAPK-ERK/NF- $\kappa$ B. Também observamos um aumento do conteúdo de S100B intracelular, em células expostas a IL-1 $\beta$  por 24 h, e estímulo da liberação de NO pelas proteínas S100B e IL-1  $\beta$ . Astrócitos primários e células C6 exibiram diferente sensibilidade a IL-1 $\beta$ , com respectiva diferença na expressão e secreção de S100B.

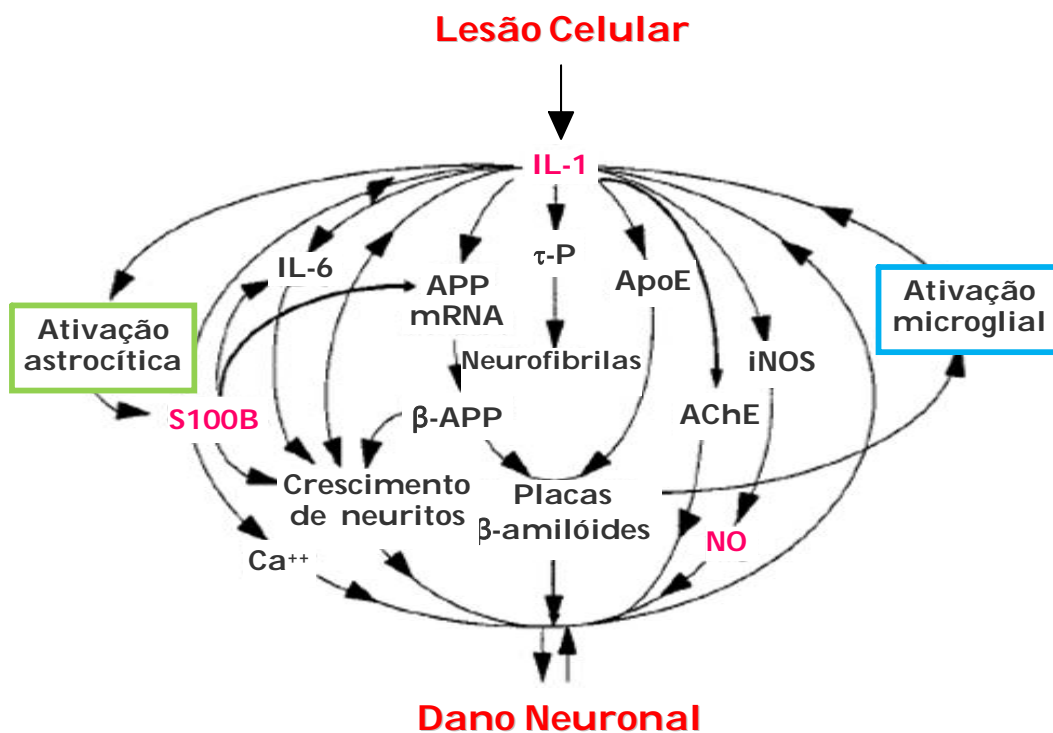


Figura 3. "Ciclo das Citocinas". Adaptado de Griffin et.al., 2006.

Estes achados colaboram com a idéia de que haja uma “conversa-cruzada” entre citocinas pró-inflamatórias e de que S100B extracelular possa contribuir para resposta de reparação em dano cerebral agudo, bem como para desordem neurodegenerativa em lesões crônicas. A secreção de S100B induzida por IL-1 $\beta$ , observada nesse estudo, poderia levar à progressão de processos neuroinflamatórios e de desordens neurodegenerativas, estando de acordo com a proposta da existência de um “ciclo de citocinas” presente na gênese da doença de Alzheimer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E: **Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.** *Nat Rev Neurosci* 2006, **7**:41-53.

Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R: **S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1742**:169-177.

Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J: **S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702.** *Brain Res* 2000, **858**:121-128.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrazek R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T: **Inflammation and Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2000, **21**:383-421.

Allan SM, Rothwell NJ: **Inflammation in central nervous system injury.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003, **358**:1669-1677.

Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ: **Interleukin-1 and neuronal injury.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**:629-640.

Bianchi R, Giambanco R, Donato R: **S100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner.** *J Biol Chem* 1993, **268**:12669–12674.

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP: **Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products.** *J Mol Med* 2005, **83**:876-886.

Blasko I, Beer R, Bigl M, Apelt J, Franz G, Rudzki D, Ransmayr G, Kampfl A, Schliebs R: **Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase (BACE-1).** *J Neural Transm* 2004, **111**:523–536.

Bourke E, Kennedy EJ, Moynagh PN: **Loss of Ikappa B-beta is associated with prolonged NF-kappa B activity in human glial cells.** *J Biol Chem* 2000, **275**:39996-40002.

Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM: **RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice.** *Circulation* 2002, **106**:2827-2835.

Castets F, Griffin WS, Marks A, Van Eldik LJ: **Transcriptional regulation of the human S100 beta gene.** *Brain Res Mol Brain Res* 1997, **46**:208-216.

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* 1999, **27**:275-81.

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

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

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* 2001, **33**:637-668.

Dong Y, Benveniste E N: **Immune function of astrocytes.** *Glia* 2001, **36**:180–190.

Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJM, van Gool WA, Hoozemans JJM: **The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease.** *J Neural Transm* 2006, **113**:1685-1695.

Eriksen JL, Druse MJ: **Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B.** *Brain Res Dev Brain Res* 2001, **131**:9-15.

Funchal C, Tramontina F, dos Santos AQ, Fraga de Souza D, Gonçalves CA, Pessoa-Pureur R, Wajner M: **Effect of the branched-chain  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple syrup urine disease on S100B release from glial cells.** *J Neurolog Sci* 2007, **260**:87-94.

Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kogel D: **Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress.** *Neuroscience* 2006, **41**:1697-1701.

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

Griffin WS, Mrak RE: **Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease.** *J Leukoc Biol* 2002, **72**:233-238.

Griffin WS: **Inflammation and neurodegenerative diseases.** *Am J Clin Nutr* 2006, **83**:470S-474S.

Griffin WST, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE: **Glial-Neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression.** *Brain Pathol* 1998, **8**:65-72.

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

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

Halliwell B: **Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?** *J Neurochem* 2006, **97**:1634–1658.

Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P: **Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: The role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells.** *Brain Research Reviews* 2005, **48**:220-233.

Heneka MT, O'Banion MK: **Inflammatory processes in Alzheimer's disease.** *J Neuroim* 2007, **184**:69–91.

Hinkle DA, Harney JP, Cai A, Hilt DC, Yarowsky PJ, Wise PM: **Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 beta regulate S100 beta expression in cultured astrocytes.** *Neuroscience* 1998, **82**:33-41.

Honig LS: **Inflammation in Neurodegenerative Disease: Good, Bad, or Irrelevant?** *Arch Neurol* 2000, **57**:786-788.

Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ: **S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes.** *J Biol Chem* 1996, **271**:2543-2547.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H: **Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation.** *J Biol Chem* 2000, **275**:40096-40105.

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

Kimelberg HK, Norenberg MD: **Astrocytes.** *Scientific Am* 1989, **260**:66-76.

Kimelberg HK, Katz DM: **High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes.** *Science* 1985, **228**:889-891.



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*. 2001, **22**:765-772.

Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ: **Neurodegenerative tauopathies.** *Annu Rev Neurosci* 2001, **24**:1121–1159.

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

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.** *Journal of Neurochemistry* 2005, **92**:546–553.

Lubin FD, Johnston LD, Sweatt JD, Anderson AE: **Kainate mediates nuclear factor-kappa B activation in hippocampus via phosphatidylinositol-3 kinase and extracellular signal-regulated protein kinase.** *Neuroscience* 2005, **133**:969-981.

Lucas S-M, Rothwell NJ, Gibson RM: **The role of inflammation in CNS injury and disease.** *British Journal of Pharmacology* 2006, **147**:S232–S240.

Mandell JW, Gocan NC, Vandenberg SR: **Mechanical trauma induces rapid astroglial activation of ERK/MAP kinase: Evidence for a paracrine signal.** *Glia* 2001, **34**:283-295.

Marchetti B, Abbracchio MP: **To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?** *Trends Pharmacol. Sci* 2005, **26**:517–525.

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

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

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

Mattson MP: **Pathways towards and away from Alzheimer's disease.** *Nature* 2004, **430**:631–639.

Mémet S: **NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease.** *Biochem Pharmacol* 2006, **72**:1180-1195.

Mönning U, König G, Banati R B, Mechler H, Czech C, Gehrman J, Schreiter-Gasser U, Masters CL, Beyreuther K: **Alzheimer  $\beta$ A4-amyloid Protein Precursor in Immunocompetent Cells.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 23950–23956.

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

Moynagh PN: **The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain.** *J Anat* 2005, **207**:265-269.

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

Mrak RE, Griffin WST: **Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2001, **22**:903–908.

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

Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Gonçalves CA: **S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome.** *Clin Biochem* 2004, **37**: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* 2006, **37**:683–686.

Pahan K, Raymond JR, Singh I: **Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase induces nitric-oxidesynthase in lipopolysaccharide- or cytokine-stimulated C6 glial cells.** *J Biol Chem* 1999, **274**:7528–7536.

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

Peña 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* 1995, **34**:118-126.

Perea G e Araque A: **Glial calcium signaling and neuron-glia communication.** *Cell Calcium* 2005, **38**:375-382.

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* 2001, **39**:409-413.

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

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

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* 2002, **48**:950-952.

Porter JT, McCarthy KD: **Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals.** *J Neurosci* 1996, **16**:5073–5081.

Praticó I, Trojanowski JQ: **Inflammatory hypotheses: novel mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration and new therapeutic targets?** *Neurobiol Aging* 2000, **21**:441-445.

Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V: **S100B in Brain Damage and Neurodegeneration.** *Microsc Res Tech* 2003, **60**: 614-632.

Royston MC, McKenzie JE, Gentleman SM, Sheng JG, Mann DM, Griffin WS, Mrak RE: **Overexpression of s100beta in Down's syndrome: correlation with patient age and with beta-amyloid deposition.** *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1999, **25**:387–393.

Schultzberg M, Lindberg C, Aronsson AF, Hjorth E, Spulber SD, Oprica M: **Inflammation in the nervous system-physiological and pathophysiological aspects.** *Physiol Behav* 2007, **92**:121-128.

Schwartz JP, Mishler K: **Beta-adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes.** *Cell Mol Neurobiol* 1990, **10**:447-457.

Shao Y, McCarthy KD: **Plasticity of astrocyte.** *Glia* 1994, **11**:147-155.

Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WST: **In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis.** *Neurobiol Aging* 1996, **17**:761-766.

Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, Cordell B, Paul SM, Jones RA, Woodward S, Zhou XQ, McGinness JM, Griffin WST: **Overexpression of the neuritotropic cytokine S100B precedes the appearance of neuritic  $\beta$ -amyloid plaques in APPV717F mice.** *J Neurochem* 2000, **74**:295–301.

Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS: **S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques.** *J Neurosci Res* 1994, **39**:398–404.

Simi A, Porsmyr-Palmertz M, Hjertén A, Ingelman-Sundberg M, Tindberg N: **The neuroprotective agents chlomethiazole and SB203580 inhibit IL-1beta signalling but not its biosynthesis in rat cortical glial cells.** *J Neurochem* 2002, **83**:727-737.

Skovronsky DM, Lee VMY, Trojanowsk JQ: **Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications.** *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006, **1**:151–170.

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B: **Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain.** *BMC Neurosci* 2007, **8**:2.

Taberner A, Medina JM, Giaume C: **Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions.** *J Neurochem* 2006, **99**:1049-1061.

Theodoropoulou S, Spanakos G, Baxevas CN, Economou M, Gritzapis AD, Papamichail MP, Stefanis CN: **Cytokine serum levels, autologous mixed lymphocyte reaction and surface marker analysis in never medicated and chronically medicated schizophrenic patients.** *Schizophr Res* 2001, **47**:13-25.

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

Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Gonçalves CA: **Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes.** *Cell Mol Neurobiol* 2006, **26**:81-86.

Tuppo EE, Arias HR: **The role of inflammation in Alzheimer's disease.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37**:289–305.

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

Vernadakis A, Lee K, Kentroti S, Brodie C: **Role of astrocytes in aging: late passage primary mouse brain astrocytes and C6 glial cells as models.** *Prog Brain Res* 1992, **94**:391–409.

Walton HS, Dodd PR: **Glutamate–glutamine cycling in Alzheimer's disease.** *Neurochem Int* 2007, **50**:1052–1066.

Walz W: **Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment.** *Prog Neurobiol* 1989, **33**:309-333.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC: **Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology.** *Brain Res* 1990, **528**:155-158.



Wyss-Coray T, Mucke L: **Inflammation in Neurodegenerative Disease - A Double-Edged Sword.** *Neuron* 2002, **35**:419–432.

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C: **Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase.** *J Biol Chem* 1994, **269**:4705-4708.

Zilka N, Ferencik M, Hulin I: **Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter?** *Bratisl Lek Listy* 2006, **107**:374-383.