



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

“Alterações astrogliais hipocampais no modelo de demência por lesão do núcleo basal magnocelular de ratos com ácido ibotênico”

TESE DE DOUTORADO

Alessandra Swarowsky

Porto Alegre, abril de 2009.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

“Alterações astrogliais hipocampais no modelo de demência por lesão do núcleo basal magnocelular de ratos com ácido ibotênico”

Alessandra Swarowsky

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Neurociências.

Porto Alegre, abril de 2009.

*Para as mulheres da minha vida: minha Vó
Cyria, minha Mãe Márcia, minha Filha Joana e
minha Amiga Lets. Para o homem da minha
vida, meu Marido Eduardo.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pelo simples fato dela ser minha mãe, maravilhosa que eu amo muito.

À minha família pelo apoio.

Ao meu Amor, Eduardo, por todas as passagens Manaus-Poa durante a “nossa” gravidez para que eu pudesse terminar os experimentos, pelos dias que ficaste sem nós, pela confiança, pela compreensão, pelo carinho, pelo apoio, por ser meu maior incentivador, pelo seu amor e por fazer a Joana comigo, meu maior feito do doutorado e da vida. Te amo...

À Pati Nardin por viver e estar sempre do meu lado. Que susto amiga!

Às meninas e meninos do lab S100, pelas conversas muito esclarecedoras e senso de grupo e pela amizade que ficará além dos ependorfs...

À Lets, minha grande amiga, minha inspiração, meu dicionário de Neurociências e minha estrela. À Nina, nossa bolsista mega fofa, por todo esforço e sobretudo por me agüentar. Sem vocês duas não poderia terminar este trabalho e realizar este sonho. “Houston, we have a problem!!!” Trabalhar com vocês foi uma satisfação regada a muitas risadas! Obrigado.

Ao Prof. Jorge por emprestar o estereotáxico e a esquivia inibitória e por suas excelentes contribuições na montagem do modelo experimental. Ao Lucas Fuerstenau e Clarissa Camboim por me ensinarem a operar. A dona Zelma por cuidar tão bem dos meus ratos e ao Felipe por todo apoio e acessória no lab.

À querida Matilde por me ensinar a caminhar e por todo apoio, conselhos e ensinamentos de vida.

Ao meu orientador CA simplesmente por toda a inspiração de trabalho, por me acolher com tanto entusiasmo, por “viajar comigo”, pela compreensão nos momentos difíceis que passei,

por ser meu centro de apoio, amigo e conselheiro. Pelo exemplo de idoneidade e competência. Por todas as piadas que tornavam os dias mais leves e por nos ensinar a fazer ciência brincando e tornar tudo muito mais fácil...

Ao PPG Neurociências

À Andréa e Beth

À Capes

RESUMO

Na doença de Alzheimer, o grau de demência pode ser correlacionado com o dano dos neurônios colinérgicos, particularmente aqueles que inervam o hipocampo e neocórtex. Lesões no núcleo basal magnocelular (nbm) são extremamente utilizados para estudar déficits cognitivos e alterações comportamentais envolvendo a disfunção colinérgica. Neste modelo, astrogliose cortical é descrita, mas ainda não está claro se há ativação dos astrócitos hipocampais. Para tanto, este estudo buscou avaliar possíveis alterações astrogliais no hipocampo de ratos Wistar machos adultos após lesão do nbm através da infusão de ácido ibotênico. Foram investigados os conteúdos de GFAP (proteína glial fibrilar ácida), S100B (tecido e líquido), GSH (glutathiona), atividade da GS (glutamina sintetase) e da AChE (acetilcolinesterase), além da captação de glutamato, secreção de S100B (com alta e baixa concentração de K^+) e imunistoquímica para GFAP após 7 e 28 dias de lesão. O déficit cognitivo foi confirmado através da tarefa de esQUIVA inibitória (parâmetro demência/não demência). Nossos resultados confirmam alterações astrogliais hipocampais, particularmente uma diminuição da defesa antioxidante (diminuição do conteúdo de GSH), diminuição da captação de glutamato, diminuição do conteúdo de GFAP e S100B (tecido) e diminuição da atividade da AChE após 28 dias de lesão no nbm. O conteúdo de S100B e GFAP após 7 dias de lesão não sofreu modificações significativas assim como o conteúdo de S100B no líquido. A atividade da GS também não alterou após 7 ou 28 dias de lesão com ácido ibotênico, bem como a secreção de S100B, que se manteve em níveis basais após 28 dias de lesão. Esses dados contribuem para o entendimento de lesão no nbm através da infusão de IBO, particularmente provocando uma disfunção colinérgica no hipocampo acompanhada de hipofunção glial; este procedimento pode ser considerado um modelo adequado para estudar alguns aspectos da demência, comumente associada à disfunção colinérgica.

ABSTRACT

In Alzheimer's disease, the degree of dementia could be correlated with the damage of cholinergic neurons, particularly with those supply the hippocampus and neocortex. Lesions of the nucleus basalis magnocellularis (nbm) was extremely used to study cognitive deficits and behavior alterations involved cholinergic dysfunction. In this model cortical astrogliosis is described, but it is not clear if the activation of hippocampal neurons exist. Despite this, the present study evaluates the possible astroglial alterations in the hippocampus of Wistar male rats after lesion in the nbm with ibotenic acid infusion. Was investigate the GFAP, S100B, GSH content and AChE and GS activity, glutamate uptake, secretion of S100B (with high and low concentration of K^+) and immunohistochemistry of GFAP after 7 and 28 days of lesion. The cognitive deficit was confirmed through the step-down inhibitory avoidance task (dementia/no dementia). Our results confirm hippocampal astroglial alterations, particularly a decrease of antioxidant defense (decrease of GSH content), decrease of glutamate uptake, decrease of GFAP and S100B content and decrease of AChE activity after 28 days of lesion. The content of GFAP and S100B after 7 days of lesion was not modified as well as the S100B content in the CSF (cerebrospinal fluid). The GS activity was not altered after 7 or 28 days of lesion and the S100B secretion was maintained in basal levels after 28 days of insult. These data contribute to understand the nbm lesion with ibotenic acid, particularly a cholinergic dysfunction caused in the hippocampus together with glial hypofunction; this procedure could be considered a good model to study some aspects of dementia, commonly associated with cholinergic dysfunction.

ABREVIATURAS

A β – beta amilóide

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AIF – fator indutor de apoptose

APP – proteína precursora de beta amilóide

ATP – adenosina tri-fosfato

ChAT – colina acetil transferase

DA – doença de Alzheimer

DV – demência vascular

EB – encéfalo basal

EO – estresse oxidativo

ERO – espécies reativas de oxigênio

GABA – gama-amino-butírico

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

GLAST – transportador glutamato/aspartato

GLUT – transportador de glutamato

Gpx – glutathiona peroxidase

GS – glutamina sintetase

GSH – glutathiona

IBO – ácido ibotênico

IL – interleucina

nbm – núcleo basal magnocefalar

nbM – núcleo basal de Meynert

NFκB – fator nuclear κ-beta

NGF – fator de crescimento do nervo

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – óxido nítrico

NADH – nicotinamida adenosina di-nucleotídeo

RAGE – produtos finais de glicação avançada

RL – radical livre

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TNFα – fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. Resumo.....	6
2. Abstract.....	7
3. Abreviaturas.....	8
3. Introdução.....	12
3.1. Demência: definição, prevalência e classificação.....	12
3.2. Doença de Alzheimer.....	14
3.3. Transmissão colinérgica encefálica.....	16
3.4. Lesão do nbm como modelo de demência.....	19
3.5. Astrócitos e doenças neurodegenerativas.....	23
3.5.1. Metabolismo do glutamato	
3.5.2. Defesa antioxidante	
3.5.3. Ativação glial e gliose	
3.5.4. Expressão e secreção de S100B	
4. Objetivos.....	29
5. Resultados.....	30
5.1. Artigo 1: <i>Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis</i>	30
5.2. Artigo 2: <i>S100B content decreases, but not its secretion, in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis</i>	37
6. Discussão.....	53

7. Conclusões.....	63
8. Referências (referentes à introdução e discussão).....	64

3. INTRODUÇÃO

3.1. Demência: definição, prevalência e classificação

Em 1797, Dr. Phillippe Pinel, fundador da psiquiatria moderna, foi o primeiro a utilizar a palavra “demência”. O conceito de demência, segundo *Diagnostic and Statistical Manual of the American Psychiatric Association IV* (DSM-IV) é definido como a perda das habilidades intelectuais (função cognitiva) de severidade suficiente para interferir na vida social ou ocupação funcional. A capacidade intelectual é um complexo de funções com muitos componentes individuais como memória, aprendizado, atenção, concentração, orientação, capacidade de calcular, compreensão (linguagem) e pensamento, entre outros (Zlokovic, 2005; Pákáski e Kálmán, 2008).

O conceito clássico de demência é a disfunção crônica e progressiva da função cortical e subcortical que resulta em complexo declínio cognitivo. Essas alterações são normalmente acompanhadas por distúrbios de humor, comportamento e personalidade (Ritchie e Lovestone, 2002; Nieto-Escámez et al., 2004; Zlokovic, 2005).

Atualmente, a demência é considerada um sinal de doença encefálica, e pode ser causada por muitas condições que o afetam. Também é considerada uma síndrome estando presente em vários distúrbios diferentes e para tanto apresenta três características principais:

- Prejuízo da memória. De esquecimentos leves até um prejuízo severo.
- Distúrbios de comportamento. Normalmente se caracteriza por agitação, insônia, choro fácil, comportamentos inadequados, perda da inibição social normal, alterações de personalidade.
- Perda das habilidades. Habilidades adquiridas durante a vida e relacionadas às atividades de vida diária.

O número de pessoas afetadas pela demência vem crescendo significativamente com o envelhecimento da população. O aumento da longevidade do ser humano, fenômeno mundial, é fruto dos avanços sociais e científicos contemporâneos. No Brasil, em 1970, os idosos constituíam 3,1% da população brasileira. Em 1995, essa taxa subiu para 4,9%.

Estimam-se para o Brasil índices de 8,8% em 2020 e 18,4% em 2050, abrangendo todas as classes sociais e todas as suas regiões (Wannamacher, 2005). Estima-se que em 2025 o número de pessoas demenciadas no mundo seja de 34 milhões (hoje existem cerca de 18 milhões de pessoas com demência). O aumento na incidência da demência será maior nos países em desenvolvimento, aonde a população atual de pessoas com demência (11 milhões) chegará a 24 milhões em 2025 (*World Health Organization* - www.who.int/en). Atualmente, sua prevalência é de 3-11% da população com mais de 65 anos e sua incidência é maior em mulheres (Ritchie e Lovestone, 2002; Pákási e Kálmán, 2008).

Ainda, estudos de meta análise realizados em países desenvolvidos descrevem uma incidência de 1,5% nos indivíduos com mais de 65 anos e que a cada 4 anos, este índice dobra alcançando uma prevalência de 30% aos 80 anos (Ritchie e Lovestone, 2002; Pákási e Kálmán, 2008). Esta incidência é menor em homens e em pessoas de origem asiática e africana. Já nos europeus e norte-americanos, a doença de Alzheimer (DA) é considerada a demência mais comum, e na China, Japão e Rússia, a demência vascular (DV) é mais prevalente. Outros estudos realizados através de autópsias mostram que a DA não ocorre em Nigorianos (Ritchie e Lovestone, 2002).

A demência pode ser classificada como degenerativa ou não degenerativa, de acordo com sua causa. As não degenerativas (potencialmente reversíveis ou evitáveis) são a DV (representando 15-20% dos casos de demência) que se caracteriza pela alteração de funções operativas com ou sem déficits motores e de linguagem com início súbito e progressão escalonada. Decorre de oclusões de artérias cerebrais (doença vascular cerebral) que podem levar ao comprometimento da cognição suficientemente para originar um quadro demencial (Ballone, 2005). Ao contrário da DA, a DV afeta mais homens do que mulheres. Os fatores de risco para DV estão relacionados à idade, sexo, masculino, hipertensão arterial, infarto do miocárdio, doença coronariana, arteriosclerose generalizada, fumo, alta concentração de lipídios e história de acidente vascular cerebral (Skoog, 1998; Zlokovic, 2005).

Ainda há quadros demenciais associadas à depressão, a intoxicações medicamentosas, ao alcoolismo, a infecções do SNC, associadas à hidrocefalia de pressão normal, associadas a tumores, ao hipotireoidismo e a doença de Creutzfeldt-Jacob (Popovic et al, 2006).

As degenerativas, normalmente progressivas e irreversíveis, caracterizam-se pela perda insidiosa, lenta e progressiva da memória que abrange as áreas da fala, motricidade e função operativa (Ritchie e Lovestone, 2002).

Entre elas, a demência com corpos de Lewy (cada vez mais frequente na população), envolve prejuízo de função cognitiva e motora com manifestações de Parkinson, alucinações visuais, habilidades cognitivas flutuantes e aumento do risco de quedas. Isto se deve a presença de corpos de Lewy (agregados de sinucleína) tanto em regiões corticais como em áreas subcorticais do encéfalo (Popovic et al., 2006). Também pode ocorrer demência do tipo degenerativa em outras doenças como o Parkinson, doença de Pick, doença de Huntington, paralisia supra-nuclear progressiva, degeneração córtico-basal, associadas à degeneração cerebelar e a doença do neurônio motor (Ballone, 2005). A demência degenerativa mais comum é a DA representando 50 a 60% de todos os casos.

3.2. Doença de Alzheimer (DA):

Alois Alzheimer, médico alemão que viveu entre a segunda metade do século XIX e o início do século XX, publicou, em 1907, o artigo “*A characteristic serious disease of the cerebral cortex*”, em que apresenta os achados clínicos e anatomo-patológicos de um caso peculiar. Auguste D. foi atendida inicialmente aos 51 anos, quando passou a apresentar sintomas delirantes (ciúmes intensos) em relação ao marido. Além de alterações de linguagem e de memória, apresentava-se desorientada no tempo e no espaço e em seguida, teve piora progressiva. A paciente faleceu quatro anos e meio após o início dos sintomas, em estágio avançado de demência, sendo encontrada acamada e em posição fetal (Parihar e Hemnani, 2004).

Alzheimer observou acúmulo de placas características no espaço extracelular (placas senis) e lesões neurofilamentares no interior de neurônios, distribuídas difusamente pelo córtex cerebral. Cinco anos após, em 1912, o renomado professor alemão de psiquiatria E. Kraepelin faz pela primeira vez menção, em seu compêndio de Psiquiatria, a “esta doença descrita por Alzheimer”. A partir dessa época, o epônimo Doença de Alzheimer passou a ser utilizado para os casos de demência ocorrendo na faixa etária pré-senil (antes dos 65 anos) e que apresentavam características clínicas e neuropatológicas semelhantes à paciente inicialmente descrita (Okamoto, 2002).

Durante várias décadas, esse diagnóstico ficou reservado a tais casos de demência degenerativa pré-senil, em oposição aos casos bem mais frequentes - e já conhecidos no início do século XX - de Demência Senil. Foi apenas muitas décadas após, no final dos anos 60, que diferentes estudos demonstraram que a então denominada Doença de Alzheimer e a Demência Senil eram, na realidade, a mesma condição clínico-patológica, embora com algumas diferenças de apresentação clínica (Okamoto, 2002). A partir da década de 70, o termo Doença de Alzheimer passou a ser empregado de forma indistinta para os casos de demência degenerativa que apresentavam as lesões cerebrais descritas, independentemente da faixa etária de início dos sintomas (Parihar e Hemnani, 2004).

Conceitualmente a DA é definida como doença neurodegenerativa caracterizada pela progressiva perda de memória, declínio cognitivo, perda neuronal e sináptica em diversas áreas do encéfalo (Sonkusare e Ramarao, 2005).

Entre as características histopatológicas da DA estão as placas senis (acúmulo de peptídeo A β), emaranhados neurofibrilares (fibrilas insolúveis acumuladas no interior dos neurônios contendo a proteína tau na sua forma hiperfosforilada), perda neuronal e sináptica (sobretudo no encéfalo basal e córtex), astrogliose e microgliose (ativação de astrócitos e microglia) (Nagele et al., 2004).

O A β é derivado do APP (proteína precursora do peptídeo A β) e pode ser processado de duas maneiras: a forma amiloidogênica, que libera o peptídeo (quando este é clivado pela BACE - enzima de clivagem amilóide, e pela γ -secretase), e a forma não amiloidogênica (quando o peptídeo é clivado pela α -secretase) que impede a formação deste e gera uma forma secretada de APP no ou próximo aos sítios onde este gene é clivado (Hardy e Selkoe, 2002; Ritchie e Lovestone, 2002; Sonkusare e Ramarao, 2005; Pákási e Kálmán, 2008).

A hipótese amilóide propõe que a neurodegeneração na DA seria causada pelo depósito extracelular do peptídeo A β em placas no tecido encefálico. De acordo com ela, o acúmulo de A β é o primeiro evento na patogenia da DA. O restante do processo incluindo a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares, a morte neuronal e a demência são resultados do desequilíbrio entre a produção/degradação de A β (Hardy e Selkoe, 2002; Parihar e Hemnani, 2004). Porém, todos os eventos moleculares e

celulares que ocorrem na DA, não podem ser explicados pela clássica hipótese amilóide. Elegantes estudos realizados demonstraram que o depósito amilóide não é o primeiro evento na neurodegeneração. Além disso, não há uma correlação com o montante de placas senis e o grau de demência nos pacientes acometidos pela DA (Hardy e Selkoe, 2002; Tian et al., 2004).

A hipótese amilóide levou a uma série de estudos para verificar a toxicidade do peptídeo. Acredita-se que a neurotoxicidade do A β pode ser mediada pelo Óxido Nítrico (NO) ou pela atividade aumentada da óxido nítrico sintase neuronal (nNOs) (Stepanichev et al., 2008). A perda da integridade do citoesqueleto neuronal, o déficit do transporte associado aos microtúbulos e a disfunção sináptica observadas na DA podem ser devidas a interação entre A β e a proteína associada aos microtúbulos 1B (Gevorkian et al., 2008). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem uma associação entre a perda neuronal e os efeitos pro-apoptóticos da forma solúvel e oligomérica do A β (Pákaski e Kálmán, 2008). Além disso, tem sido proposta uma interação entre o A β e os neurônios colinérgicos. Para sumarizar todas as alterações encontradas na DA, Pákaski e Kálmán (2008) sugeriram que o A β causaria uma diminuição da atividade da ChAT (colina acetil transferase – enzima de síntese de acetilcolina), da liberação da Ach (acetilcolina), dos receptores muscarínicos acoplados a proteína G, além de outras isoformas ianotrópicas como m1 e m2; redistribuiria a AChE (acetilcolinesterase), diminuiria a densidade do transportador vesicular de ACh além de inibir seus receptores nicotínicos. Com estes dados, a nova hipótese sugerida pelos autores, propõem uma ligação entre a toxicidade amilóide e a hipofunção colinérgica encontrada na DA. Contudo, embora diversos estudos tenham sido feitos, a etiologia da DA permanece desconhecida. Atualmente, o alvo da indústria farmacêutica continua sendo o déficit colinérgico, um dos primeiros eventos na gênese da DA (Ahmed et al., 2004; Sonkusare e Ramarao, 2005).

3.3. Transmissão colinérgica encefálica

Um dos primeiros eventos da DA é a perda da transmissão sináptica colinérgica. Baseado nesta evidência, diversos estudos foram feitos na tentativa de elucidar este mecanismo. A hipótese colinérgica (anterior a amilóide), se fundamenta em exames *pós-*

mortem de pacientes acometidos pela doença, que mostram uma intensa degeneração de marcadores colinérgicos e uma profunda perda destes neurônios em regiões específicas do encéfalo. Sabe-se hoje, que as lesões nos tratos colinérgicos levam a sérios déficits cognitivos e alguns autores apostam que estas lesões seriam o início da DA. Por algum motivo, ainda não completamente esclarecido, os neurônios do encéfalo basal (maior fonte colinérgica envolvida na cognição), possuem uma vulnerabilidade seletiva nesta doença e são seriamente comprometidos (Butt e Hodge, 1997; Mesulam, 1998; Harkany et al., 2001; Mufson et al., 2003; Nieto-Escámez et al., 2004; Sato et al., 2004; Toledano e Álvarez, 2004; Popovic et al., 2006; Herholz et al., 2008; Pákási e Kálmán, 2008).

A acetilcolina (ACh) é sintetizada a partir da colina e da acetil coenzima A (acetil-CoA) através da ação da colina acetiltransferase (ChAT). A hidrólise do transmissor é realizada pela enzima acetilcolinesterase (AChE). A AChE é encontrada nas terminações nervosas está ancorada à membrana plasmática. Os receptores colinérgicos são classificados em metabotrópicos e ionotrópicos, ditos muscarínicos e os nicotínicos, respectivamente. (Kandel et al., 2000).

O encéfalo basal (EB) está situado entre o septo e o mesencéfalo abaixo da comissura anterior. Na área posterior, os núcleos são lateralmente dispersos, as células caracterizam-se por entremear-se com estruturas estriatais e hipotalâmicas. Lateralmente eles estão em íntima relação com a amígdala e a área medial do lobo temporal. O arranjo geral do EB varia conforme espécies. Classicamente, da área ântero-medial para pósterolateral, 3 grupos colinérgicos são considerados: o septo medial, o núcleo basal de Meynert (nbM), as porções vertical e horizontal da banda diagonal de Broca. Para alguns autores, a substância inominata é considerada parte integrante do EB (Harkany et al., 2001; Sato e Uchida, 2004). Para outros, ela nada mais é do que o núcleo basal de Meynert (Mufson et al., 2003; Toledano e Álvarez, 2004).

O septo medial e a banda de Broca são centros neuronais relativamente bem definidos, mas o nbM é extremamente difícil de delimitar, tanto em primatas quanto em roedores. Theodore Meynert em 1872 foi o primeiro a descrever os neurônios magnocelulares no telencéfalo. Este agregado de neurônios foi chamado por Kolliker em 1886 de núcleo basal. Em 1929, Kodama mostra evidências da projeção destas células

para o córtex e em 1976, Mesulam e Van Holsen demonstraram que estas projeções eram ricas em acetilcolinesterase (AChE) (Sato et al., 2004). O núcleo basal de Meynert é uma estrutura telencefálica situada medial e ventralmente nos hemisférios cerebrais compondo o prosencéfalo dos primatas. Cerca de 90% de suas células são colinérgicas e enviam projeções para o córtex e amígdala. Ele pode ser dividido em subsetores, porém esta subdivisão ainda não é clara. O nbM é considerado homólogo ao núcleo basal magnocelular (nbm) de ratos e por isto, tem recebido grande atenção dos pesquisadores. Animais com lesões nesta estrutura têm sido considerados modelo experimental de aprendizado e memória e, portanto, um clássico modelo para estudar alguns aspectos da DA. Embora não exista nenhum agente isolado que produza esta doença em animais, este modelo é usado no intuito de examinar as possibilidades de prevenção, cessamento ou reversão da neurodegeneração e déficits cognitivos causados (Harkany et al., 2001; Toledano e Álvarez, 2004; Mufson et al., 2004; Tian et al., 2004; Popovic et al., 2006).

O nbm recebe projeções gabaérgicas, aminérgicas, colinérgicas, glutamatérgicas e neuropeptidérgicas de diferentes aferentes, como estruturas límbicas e paralímbicas, incluindo a amígdala. Também contém neurônios não colinérgicos, em sua maioria gabaérgicos, que se projetam para os interneurônios corticais (Mesulam, 1998). Cabe ressaltar que todos os núcleos do EB são interconectados e assim, suas ações podem sofrer influências de todos os núcleos (Alhei e Heimer, 1988). Contudo, projeções deste núcleo para o córtex já estão bem estabelecidas na literatura. O que permanece controverso é a interação deste com outras estruturas como o hipocampo, por exemplo.

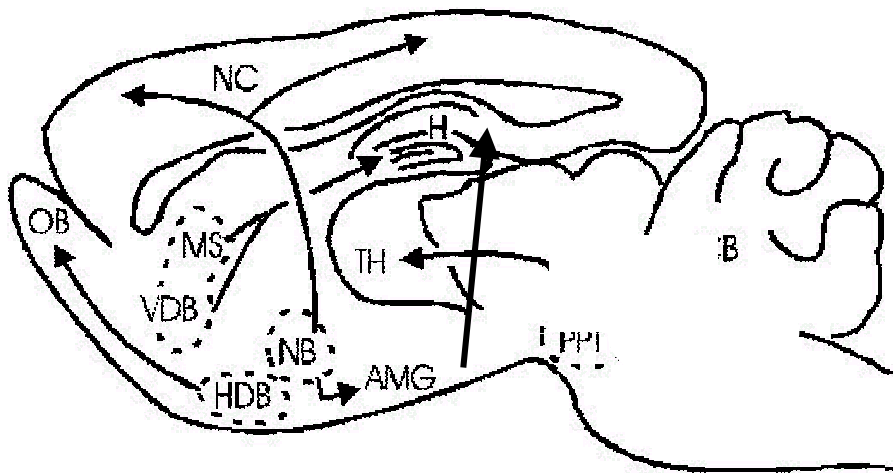


Fig.1: Desenho do encéfalo do rato mostrando a inervação colinérgica (resumo), secção sagital. NB, nbm, AMG, amígdala, H, hipocampo, VDB e HDB, banda de Broca porção horizontal e vertical respectivamente, MS, septo medial, OB, bulbo olfatório, NC, neocórtex, TH, tálamo. Note as projeções ascendentes do NB para amígdala e córtex.

3.4. Lesão do nbm como modelo de demência

Já está bem determinado na literatura o envolvimento do sistema colinérgico nas diversas tarefas comportamentais. Nesta linha, lesões envolvendo o nbm afetam uma variedade de comportamentos, incluindo processos cognitivos, principalmente, aprendizado e memória (Nieto-Escámez, et al., 2004). Contudo, não está bem esclarecida em quais tarefas comportamentais esta estrutura estaria diretamente envolvida. Uma série de experimentos tem sido feitos para demonstrar o envolvimento direto deste núcleo, como por exemplo, no Labirinto aquático de Morris, T e Y-maze, discriminação de objetos, entre outros. É consenso entre os autores que o aprendizado e memória dependem de diversas estruturas encefálicas e que o nbm é apenas uma destas estruturas e sua projeção ascendente cortical é um simples, porém importante, elemento que atua em conjunto com outras áreas (Toledano e Álvarez, 2004). Macacos com lesão no nbm, apresentam déficit na discriminação de objetos, porém, melhoram com o tempo atingindo o desempenho dos animais controle. Todavia, lesões adicionais na CA1 do hipocampo, prejudicam o desempenho dos animais. Estes dados provêm evidências de que em caso de lesão no nbm, o hipocampo poderia estar substituindo algumas funções

desta estrutura, corroborando com a idéia de que todas as estruturas agem conjuntamente (Ridley et al., 1999).

O modelo animal de lesão no nbm é considerado um modelo experimental colinérgico de DA. O que difere, são as diversas toxinas utilizadas para produzir a lesão, os parâmetros medidos, além dos paradigmas comportamentais analisados, o que muitas vezes pode trazer resultados conflitantes (Toledano e Alvarez, 2004). As mais usadas são substâncias que atuam em diferentes receptores glutamatérgicos, como agonistas e antagonistas NMDA (ácido ibotênico, ácido quisquálico, ácidos NMDA e AMPA). Outros modelos utilizam ácido quinólico, colchicina e outras substâncias alcalóides com ação colinérgica inespecífica, porém similares as excitotoxinas. Normalmente, estas são injetadas utilizando uma seringa de Hamilton e manipuladas no aparelho estereotáxico, utilizando infusões unilaterais ou bilaterais, conforme o objetivo do estudo (Butt e Hodge, 1997; Harkany et al., 2001; Toledano e Alvarez, 2004; Nieto-Escámez et al., 2004; Tian et al., 2004; Parihar e Hemnani, 2004; Pákási e Kálmán, 2008).

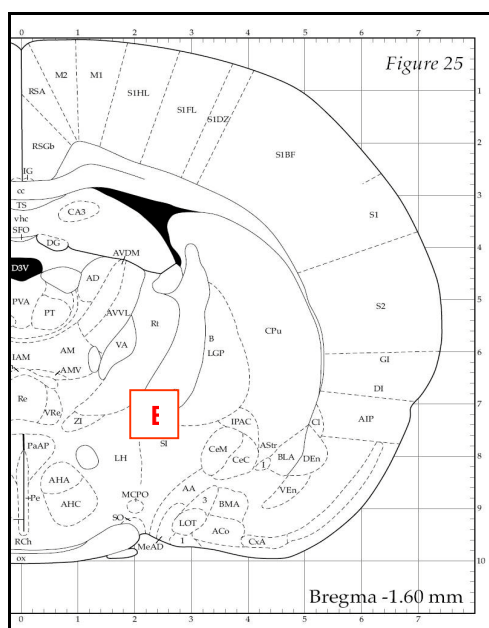


Fig.2. Corte coronal do encéfalo do rato (hemisfério direito). Em B, nbm. Adaptado de Paxinos, 1997.

Lesões no EB utilizando colinotoxinas, como por exemplo, a AF64A, são considerados ótimos modelos de DA, pois afetam especificamente neurônios colinérgicos, preservando os demais neurônios bem como as fibras de passagem. Esta

colinotoxina se liga ao sistema de captação de acetilcolina com grande afinidade levando ao déficit colinérgico (Hanin, 1996). No intuito de encontrar uma toxina colinérgica seletiva, estudos analisaram mecanismos celulares específicos dos neurônios do EB, onde encontraram um sistema celular extremamente dependente do fator neurotrófico NGF (fator de crescimento neural), que exerce seu efeito através do receptor de baixa afinidade p75 (p75NGFr). Com isto, foi desenvolvida uma imunotoxina específica, a 192IgG saporina que liga-se irreversivelmente e seletivamente ao p75NGFr. As células colinérgicas são destruídas e/ou lesionadas dependendo da dose administrada e rota de administração (Toledano e Alvarez, 2004).

Modelos animais transgênicos também têm sido amplamente desenvolvidos para estudar os déficits colinérgicos, incluindo a ausência ou super expressão do NGF ou seu receptor (p75NGFr). Ambos os animais *knock-out* para NGF ou p75NGFr têm um tempo de vida muito curto e por isso não são modelos usuais. Provavelmente, a ausência de ambos seria o ponto inicial para uma via apoptótica neste modelo genético (Van der Zee et al., 1996).

Dois grandes modelos colinérgicos têm sido utilizados para tentar produzir alguns aspectos da DA em animais. A infusão de A β e ácido ibotênico no EB, sobretudo no nbm (Toledano e Alvarez, 2004; Pakási e Kálmán, 2008). A administração de A β provoca diferentes graus de lesão ou disfunção nos neurônios colinérgicos do EB, assim como provoca modificações na liberação de acetilcolina. Quando injetado diretamente no nbm, torna os neurônios colinérgicos hipofuncionantes (Pavía et al., 2002; Chacón et al., 2003; Li et al., 2005). Já a infusão de ácido ibotênico, tanto no EB quanto especificamente no nbm, provoca alterações em diversas tarefas comportamentais e prejuízo da função colinérgica.

O ácido ibotênico (IBO) é uma neurotoxina encontrada em uma espécie de cogumelo do gênero *Amanita muscaria*. Quando ingerido causa delírio, aparente inebriação, comportamento maníaco, confusão mental, distorção visual e convulsões. Seus efeitos aparecem de 30 min à 2 h após ingestão e podem durar por no mínimo 4 h (*North American Mycological Association* – www.nama.com). O IBO é um agonista do receptor glutamatérgico NMDA (N-metil-D-aspartato) e, portanto, é considerada uma

excitotoxina. Sua ação se restringe a estimulação dos receptores NMDA resultando no aumento da liberação de glutamato, o que afeta diretamente a homeostasia do cálcio, levando a excitotoxicidade. Nas células gliais, há evidências que sugerem que o IBO atue nos receptores de glutamato presentes nos astrócitos e tanícitos (GluR5-7 e GluR6/7). Porém os mecanismos envolvendo a ativação glial em animais lesionados com IBO ainda não estão completamente esclarecidos (Ahmed et al., 2004).

Em altas concentrações (10 mM ou mais) a administração de IBO pode causar danos irreversíveis ao tecido encefálico bem como baixas concentrações são utilizadas como modelo de lesão reversível. Quando injetado, provoca alterações morfológicas nas células, como por exemplo, edema agudo nos dendritos e soma e degeneração neuronal (Metzner e Juranek, 1997). Também há evidências que mostram que lesões com IBO no nbm causam alterações nos níveis de peptídeos e enzimas em determinadas regiões do encéfalo (Yamamoto et al., 2003).

A administração local do IBO é considerada um bom modelo para destruir as células do nbm sem dano às fibras de passagem. Embora não seja uma toxina colinérgica específica, também afeta os neurônios colinérgicos, prova disto, são os resultados que mostram uma diminuição das fibras que contém AChE no córtex e amígdala. Todavia, não pode ser excluído que o dano possa ocorrer em neurônios não colinérgicos bem como na glia (Nieto-Escámez et al., 2004; Toledano e Alvarez, 2004; Ahmed et al., 2004). Estas lesões “combinadas”, obtidas através da infusão do IBO, são consideradas um aceitável modelo de estudo do nbm durante a idade e processos normais de aprendizado e memória. Experimentos utilizando IBO, AMPA e ácido quisquálico, demonstraram que enquanto o AMPA e o ácido quisquálico prejudicam o desempenho em tarefas comportamentais, o IBO causa grande déficit nas mesmas, causando menos alterações no córtex do que as outras toxinas (Toledano e Alvarez, 2004). Além disso, diversos pesquisadores sugerem que lesões colinérgicas sozinhas não prejudicam a performance em tarefas comportamentais realizadas pelos animais e sim, que outros sistemas neurotransmissores devem estar envolvidos (Nieto-Escámez et al., 2004).

Diversos modelos de lesão no nbm têm demonstrado alterações de marcadores colinérgicos como a colina acetil tranferase (ChAT) e alterações na expressão e

distribuição de AChE (diminuição de cerca de 75%) (Toledano e Alvarez, 2004). A AChE é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) e está diminuída ou é “perdida” em regiões específicas durante a DA, como amígdala, córtex, hipocampo e nbM. Esta enzima pode ser encontrada em sítios pré e pós-sinápticos (além das paredes dos vasos) e possui diversas isoformas. Na doença, há uma diminuição da isoforma tetramérica globular G4, aumento da isoforma monomérica G1 e assimetria da isoforma A16, que sugerem um envolvimento no processo patogênico da DA. Além disso, estudos mostram que depósitos de AChE estão colocalizados com A β (placas senis e vasos) na DA (Chacón et al., 2003; Pákási e Kálmán, 2008; Herholz e Kalbe, 2008).

A AChE também está envolvida em diversas ações não-colinérgicas incluindo resposta aguda ao estresse e estimulação do crescimento de neuritos (Kaufer et al., 1998). Experimentos utilizando a injeção de AChE no hipocampo *in vivo* demonstraram que seu aumento está diretamente relacionado ao aumento da neurotoxicidade e que seu conteúdo também reflete a maior ou menor ação glial no local da lesão (Chacón et al., 2003). Já em experimentos utilizando a infusão de A β 1-42 no nbm demonstram uma redução significativa na atividade da enzima (Pákási e Kálmán, 2008). Estes resultados fornecem mais dados para comprovar o envolvimento da AChE na DA.

3.5. Astrócitos e doenças neurodegenerativas

Na maioria das desordens encefálicas, alterações no estado funcional das células gliais são encontradas. Astrócitos, as células gliais mais abundantes, têm uma série de funções fisiológicas e estruturais importantes no SNC. Estas células estendem longos processos citoplasmáticos e encapsulam os vasos sanguíneos (pés terminais), contribuem para a integridade da barreira hemato-encefálica além de participar das trocas entre sangue e parênquima encefálico. Também fazem contato com a superfície dos neurônios adjacentes, envolvem sinapses, mantêm a homeostasia iônica extracelular, mantêm normais os níveis de glutamato e potássio (K⁺), controlando a excitotoxicidade, participam da plasticidade sináptica além de estabilizá-las (Nagele et al., 2004).

São células dinâmicas que expressam numerosos receptores que permitem com que respondam a compostos neuroativos, incluindo neurotransmissores, neuropeptídeos, citocinas, fatores de crescimento, pequenas moléculas e toxinas (Liberto et al., 2004). O

suprimento energético para seu funcionamento é obtido através da glicose, e o processo glicolítico no astrócito é necessário para transformar glutamato em glutamina no seu citosol, além da manutenção do gradiente de Na^+ através da atividade Na^+/K^+ ATPase (Cotter et al., 2001).

3.5.1. Metabolismo do glutamato

A captação de glutamato pelos astrócitos é uma função primária destas células e é realizada através de transportadores específicos dependentes de Na^+ (GLAST – transportador glutamato/aspartato e GLT-1 – transportador de glutamato). Alguns autores sugerem que o suprimento energético para a captação de glutamato é oriundo da glicose enquanto outros sugerem que o próprio metabolismo oxidativo do glutamato fornece energia para a captação do mesmo pelo astrócito (Swanson, 2005).

O glutamato captado pelos astrócitos, tem diversos destinos metabólicos. Um muito importante é a síntese de glutamina, que serve de substrato nos neurônios para síntese de glutamato (ciclo do glutamato-glutamina entre neurônios e astrócitos). A formação de glutamina é catalizada pela Glutamina sintetase (GS), enzima localizada nos astrócitos, presente em pequena quantidade nos oligodendrócitos e ausente nos neurônios (Cotter et al., 2001; Robinson, 2001; Swanson, 2005). A glutamina é então levada ao neurônio onde novamente é transformada em glutamato ou GABA (ácido gama-amino-butírico) para retornar ao *pool* de neurotransmissor.

Sonkusare e Ramarao (2005) propuseram uma hipótese para a patogenia da DA que inclui a excitotoxicidade glutamatérgica como resultado do bloqueio da captação de glutamato pelos astrócitos em função da presença de agregados de $\text{A}\beta$, pelo estresse oxidativo e peroxidação lipídica da membrana. Também tem sido atribuído a GS um papel importante na DA, pois estudos mostram uma diminuição da atividade desta enzima no córtex (Robinson, 2001). Mas, nenhum destes resultados apresentados refere-se a modelos de lesão com IBO no nbm.

3.5.2. Defesa antioxidante

Numerosos estudos demonstram que o estresse oxidativo (EO) tem envolvimento direto na DA, bem como em doenças neurodegenerativas (Van Eldik e Wainwright, 2003; Migliore et al., 2005). Recentes observações mostram que a produção de radicais livres (RL) está aumentada na neurodegeneração e em pacientes com DA, há a presença de marcadores de EO na urina bem como em modelos animais de placas senis (Gibson e Huang, 2005). Estudos clínicos mostram níveis elevados de peroxidação lipídica e das enzimas catalase, SOD (superóxido dismutase) e GPx (glutathione peroxidase) em várias regiões no cérebro de pacientes com DA (Migliore et al., 2005).

O cérebro por utilizar grande quantidade de oxigênio, é particularmente suscetível ao EO (Feeney e Stys, 2005). O metabolismo de glutamato, por exemplo, gera espécies reativas de oxigênio (ERO) (superóxido e peróxido de hidrogênio), que são capazes de consumir as defesas antioxidantes, em menor quantidade em regiões específicas do cérebro. Já as membranas neuronais contêm baixo nível de lipídios poliinsaturados, o que as torna mais suscetível a peroxidação lipídica. Os astrócitos são menos vulneráveis que os neurônios aos efeitos do EO, mas algumas de suas funções são comprometidas durante esta condição. Em experimentos em cultura, estas células demonstraram capacidade para remover o peróxido de hidrogênio. Além disso, demonstram ser mais resistentes ao peroxinitrito do que os neurônios. Esta maior resistência dos astrócitos deve-se a ao maior conteúdo de glutathione (GSH) e maior atividade da GPx, dois importantes sistemas antioxidantes utilizados como parâmetro para o EO (Feeney e Stys, 2005; Gibson e Huang, 2005). Em modelos animais de lesão no cérebro com IBO, não há na literatura resultados descritos.

3.5.3. Ativação glial e gliose

Uma das características da DA é a ativação glial de astrócitos e microglia, nas proximidades ou envolvendo as placas senis (Nagele et al., 2004). Dados mostram um sério comprometimento da função glial na neurodegeneração, levando estas células a apresentarem alterações na expressão de várias proteínas, incluindo proteínas de adesão celular, citoesqueleto, proteases e inibidores de proteases, citocinas e fatores de crescimento (Van Eldik, 2001). A GFAP é uma proteína marcadora de astrócitos,

componente principal dos filamentos intermediários do tipo III, que têm sua atividade/plasticidade modulada por fosforilação e desfosforilação (Pekny et al., 1998; Monzón-Mayor et al., 2000; Rakic, 2005).

Sabe-se que a injúria neuronal leva a ativação glial e segundo Van Eldik (2001), esta ativação pode ser benéfica ao encéfalo, servindo para que esta estrutura possa responder aos sinais que lhe são potencialmente danosos (Ahmed et al., 2004). Mas o que significa a ativação glial? Liberto e cols (2004), propuseram 2 formas de gliose conforme o tipo de lesão sofrida pelo tecido: a anisomórfica e a isomórfica. Ambas têm como característica a hipertrofia celular, modificação da forma e aumento da expressão de filamentos intermediários (sobretudo GFAP). O que difere uma da outra é o tipo de insulto e a resposta glial final. A anisomórfica resulta em uma escara ou cicatriz glial e está relacionada a insultos mais graves. A isomórfica acarreta na produção de citocinas e fatores de crescimento e são consideradas respostas adaptativas e benéficas.

Poucos estudos correlacionam lesões no nbm e a resposta glial. Ahmed e cols (2004) mostram que há um aumento da expressão de GFAP (indicativo de gliose) no estriado, mas não no hipocampo após infusão de IBO no nbm. A maioria dos autores relata um aumento na expressão desta proteína glial no córtex, assim como em exames *pós-mortem* de pacientes com DA, porém os resultados ainda são controversos e muitos estudos não informam a metodologia de quantificação da GFAP (Monzón-Mayor et al., 2000; Van Eldik, 2001; Ahmed et al., 2004, Parihar e Hemnani, 2004; Toledano e Alvarez, 2004).

3.5.4. Expressão e secreção de S100B

O envolvimento da S100B na DA foi sugerido em diversos estudos, já que há um aumento no conteúdo desta proteína astrocítica no soro e fluido cerebrospinal em condições de dano encefálico. Além disso, o aumento da sua expressão está correlacionado com a formação e progressão das placas senis (Van Eldik e Wainwright, 2003). A S100B é um membro da família de proteínas ligantes de Ca^{+2} , caracterizadas por dois sítios ligantes para este íon do tipo “*EF-hand*” e está relacionada a outras proteínas com mesma estrutura como a calmodulina, troponina C e a parvalbumina (Van Eldik e Wainwright, 2003; Donato, 2009). Ela pode ser encontrada em muitas células

além dos astrócitos como, por exemplo, hepatócitos, linfócitos, adipócitos, condrócitos, mioblastos entre outros, sendo considerado um bom marcador de lesão (Gonçalves et al., 2008).

A S100B está localizada no citoplasma dos astrócitos, onde é encontrada na forma solúvel, e em associação com membranas intracelulares, centrossomos, microtúbulos e com o filamento intermediário do tipo III (GFAP). Atua como um “sensor” de Ca^{+2} e após sua ligação com este íon, modifica sua conformação e expõe seus resíduos para proteínas intracelulares alvos (Donato et al., 2009). Em muitos casos, a S100B exerce seus efeitos intracelulares interagindo com outras proteínas atuando na proliferação, diferenciação e forma celular, homeostasia de Ca^{+2} , fosforilação, transcrição, atividade enzimática e metabolismo, além de interagir com a dinâmica dos microtúbulos e com os filamentos intermediários do tipo III (Donato, 2001; Donato, 2003, Van Eldik, 2003).

Esta proteína também tem alvos extracelulares e sua secreção pelos astrócitos pode ser modulada pela serotonina, ácido lisofosfatídico, citocinas pró-inflamatórias e também em situações de estresse metabólico (e.g. elevados níveis de glicose, glutamato ou amônia) (Tramontina et al., 2006; Leite et al., 2006; Nardin et al., 2007; Tramontina et al., 2008; Donato, 2009). Já está bem determinada na literatura, que esta proteína, dependendo dos níveis, pode ser tóxica ou trófica ao SNC. Em quantidades nanomolares, exerce efeitos tróficos ao tecido. Um dos mecanismos propostos para esta ação neuroprotetora é a interação da S100B com o RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada), estimulação do fator de transcrição NF κ B e regulação sobre a proteína anti-apoptótica Bcl-2 nos neurônios (Van Eldik e Wainwright, 2003). Em concentrações micromolares, produz efeitos tóxicos através da indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (como a interleucina 1 - IL-1), TNF- α (fator de necrose tumoral) e IL-6 nos neurônios (Mrak e Griffin, 2005). Cabe ressaltar que os resultados descritos sobre os efeitos tróficos e tóxicos da S100B são em estudos realizados *in vitro*.

Em resumo, embora a glia esteja envolvida nos processos neurodegenerativos, os mecanismos envolvidos não estão completamente entendidos, pois uma vez ativadas estas células podem produzir tanto efeitos benéficos quanto deletérios ao tecido (Ahmed et al., 2004; Van Eldik e Wainwright, 2003; Donato, 2009). Isto reforça a necessidade de

mais estudos para esclarecer a ativação glial durante os processos neurodegenerativos. Muitos aspectos do modelo de lesão no nbm através da infusão do IBO permanecem por ser elucidados. Interações desta estrutura com o hipocampo e seu papel nas diferentes tarefas comportamentais não estão bem caracterizados e ainda há resultados conflitantes na literatura sobre estes paradigmas.

Com base nos dados apresentados, este trabalho buscou avaliar e padronizar o modelo de lesão no nbm através da infusão de IBO em ratos Wistar machos adultos para investigar a resposta glial no hipocampo destes animais.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar as alterações astrogliais, particularmente no hipocampo, de ratos Wistar machos adultos submetidos à lesão do nbm 7 e 28 dias após infusão de ácido ibotênico.

Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de indução de demência em ratos Wistar machos adultos através de parâmetros comportamentais (déficit congitivo na esQUIVA inibitória) 7 e 28 dias após insulto com ácido ibotênico;
- Quantificar o imunocontéudo de GFAP no hipocampo 7 e 28 dias após insulto com ácido ibotênico;
- Quantificar o imunocontéudo de S100B no hipocampo 7 e 28 dias após insulto com ácido ibotênico;
- Quantificar o imunocontéudo de S100B no líQUOR 7 e 28 dias após infusão de ácido ibotênico no nbm;
- Medir a atividade da GS no hipocampo 28 dias após insulto com ácido ibotênico;
- Quantificar a secreção de S100B após insulto com alta e baixa concentração de potássio no hipocampo após 28 dias da infusão de ácido ibotênico no nbm;
- Investigar a captação de glutamato no hipocampo após 28 dias da infusão de ácido ibotênico no nbm;
- Medir o conteúdo de GSH total no hipocampo após 28 dias da infusão de ácido ibotênico no nbm;
- Medir a atividade da AChE no hipocampo após 28 dias da infusão de ácido ibotênico no nbm.

5. RESULTADOS

5.1. Artigo 1: *Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis*

Behavioral Brain Research, 190(2008):206-211.

5.2. Artigo 2: *S100B content, but not its secretion, decreases in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis.*

(A SER SUBMETIDO)

S100B content, but not its secretion, decreases in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis

Alessandra Swarowsky^a, Letícia Rodrigues^a, Regina Biasibetti^b, Paula Lunardi^a, André Quincozes-Santos^b, Marina C Leite^b, Patícia Nardin^b, Carmem Gottfried^{a,b}, Carlos-Alberto Gonçalves^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências and ^bDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Number of pages = 15

Figures = 2; Table = 1

Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax: 55-51-3308 5535

E-mail: casg@ufrgs.br

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP (IBN 01.06.0842-00) and INCT-National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

Keywords: acetyl cholinesterase; glutathione; hippocampus; ibotenic acid; nucleus basalis magnocellularis; S100B

Abstract

In Alzheimer's disease, the most prevalent type of dementia, severity of cognitive deficit is correlated to cholinergic neuron damage, particularly of those supplying the hippocampus and neocortex. One animal model used to study dementia consists of the induction of direct damage with ibotenic acid to cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis. Recently, using this model of dementia, we did not find any classical sign of astrogliosis in the hippocampus at four weeks after the lesion, but, rather, a reduced astroglial activity based on GFAP content. In the present study, we investigated the hippocampal content of GSH, acetyl cholinesterase activity and S100B secretion in acute slices. Our results confirm the hippocampal astroglial alterations, particularly a decrease in the antioxidant defense, by measurement of glutathione content, and a deficit in cholinergic communication, as indicated by a reduced acetyl cholinesterase activity. Moreover, we observed a decrease in hippocampal S100B content in ibotenic-treated rats that was not accompanied by alterations in its secretion (basal and K⁺-regulated) in acute hippocampal slices. These findings contribute to the understanding of diseases that are accompanied by cognitive deficits dependent on hippocampal integrity.

Introduction

In Alzheimer's disease, the most prevalent type of dementia, severity of cognitive deficits correlates best with synaptic loss and formation of neurofibrillary tangles [17], particularly in cholinergic neurons supplying neocortex, hippocampus, the olfactory bulb and the amygdala. Loss of cholinergic neurons is also observed in other brain disorders, including chronic ethanol intake traumatic brain injury (e.g. dementia pugilistic), however, the reasons for cholinergic vulnerability are not well understood [see[18] for a review].

One animal model used to study dementia consists of the induction of direct damage with ibotenic acid to cholinergic neurons of the nucleus basalis magnocellularis (nbm, equivalent to the human Meynert's nucleus) [26]. Recently, using this model in rats, we did not find any classical sign of astrogliosis in the hippocampus, but rather a reduced astroglial activity in the hippocampus [31]. Cognitive deficit, dependent on hippocampus integrity, was confirmed by the step-down inhibitory avoidance task. Beyond a decrease in GFAP content, we found a decrease in S100B content and glutamate uptake activity in the hippocampus on the 28th day after nbm lesion. No alterations were observed in glutamine synthetase activity or in the cerebrospinal fluid S100B content.

All these parameters (GFAP, S100B protein, glutamate uptake and glutamate synthetase activity) are useful to characterize astroglial activity. In fact, glutamate uptake and glutamine synthetase are, respectively, responsible for the removal of glutamate from the synaptic cleft and synthesis/ replacement of glutamine to neurons [38]. Other important roles of astrocytes in the brain tissue include antioxidant defense (e.g. synthesis and release of glutathione) and secretion of neurotrophic factors [32].

Among neurotrophic factors, the extracellular S100B protein has been proposed not only as an astrocyte-derived neurotrophic factor, but also as a peripheral marker of brain damage [8]. Much evidence suggests the involvement of this protein in neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's disease [see [5] for a review]. Moreover, S100B has been proposed to be involved in the hippocampal neurogenesis induced by antidepressants [16, 35] and cognitive activity dependent on hippocampus [13, 19]. Based on assays in neuron cultures, nanomolar concentrations of S100B in the medium are considered neurotrophic, while micromolar concentrations are toxic and apoptotic [5]. However, some *in vivo* studies

have suggested that acute elevations of extracellular S100B (considered toxic in cell cultures) could be beneficial for neuronal activity, particularly in the hippocampus [14].

In brain tissue, S100B is not restricted to astrocytes [30] and some cholinergic neurons could be expressing S100B and/or depend on its trophic activity [40]. Questions remain as to whether the decrease in hippocampal S100B content is associated with a decrease in S100B secretion in the hippocampus of rats submitted to nbm lesion with ibotenic acid? Furthermore, the possibility that cholinergic hippocampal neurons are less active in this experimental model should be examined.

As such, this study aims to investigate whether the low hippocampal glial activity that has been previously observed in rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis, is accompanied by a decrease in cholinergic activity (as measured by acetyl cholinesterase activity) and by changes in basal and K⁺-stimulated S100B secretion in acute hippocampal slices. Hippocampal glial activity was evaluated, in addition to S100B content and secretion, by measuring content of glutathione.

Material and methods

Material. Sodium carbonate, barbital, albumin, Tween-20, ibotenic acid, glutamylhydroxamate, 3,3-diaminobenzidine (DAB), o-phenylenediamine (OPD), acetylthiocholine iodide, 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phthaldialdehyde and monoclonal anti-S100B antibody were purchased from Sigma. Anti-S100 antibody conjugated with peroxidase was from Dako and peroxidase-conjugated secondary antibodies from Amersham.

Animals and Surgery. Twenty four male Wistar rats, weighing 250 – 300 g, and housed with free access to food and water were maintained on a 12-h light/dark cycle, with lights on at 6:00 am, and at constant temperature (25°C). The animals were divided into 2 groups: control and ibotenic acid (IBO). On the day of surgery, the animals were anesthetized with ketamine/xylazine (50 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic apparatus (Kopf). The incisor bar was set –0.16 mm posterior and \pm 0.40 mm lateral to the bregma and –0.55 mm below the top of the skull ([1, 23, 39] to reach the nucleus basalis magnocellularis (nbm). Rats received bilateral infusions of 0.5 μ L volume of vehicle (NaCl 0.9%) or ibotenic acid (8 μ g/ μ L) using a 5 μ L Hamilton syringe. The injection was made over a period of 5 min and the needle was left in the injection site for a further 5 min [31]. The protocol

concerning this research was used according to the guidelines of the Committee on the Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo, Brazil.

Preparation and incubation of hippocampal slices for S100B secretion. Four weeks after surgery, rats were decapitated, their hippocampi were quickly dissected out and transverse sections (300 μ m) were rapidly obtained using a McIlwain tissue chopper. For S100B secretion assay, one slice was placed into each well of a 24-well culture plate. Slices were incubated in oxygenated physiological medium (120 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1 mM KH₂PO₄ and 10 mM glucose, pH 7.4) at room temperature, and the medium was changed every 15 min with fresh medium. After a 120 min equilibration period, slices were incubated for 30 min in saline medium with high potassium (30mM KCl), or with low potassium (0.2mM KCl). Hippocampal slices and collected media were stored at -20 °C until S100B measurement [21].

S100B measurement. ELISA for S100B was carried out, as described previously [15]. Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B. Polyclonal anti-S100 was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

Acetyl cholinesterase activity assay. Immediately after decapitation, hippocampi were dissected out and homogenized in ten volumes of cold 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) and centrifuged at 1000 g for 15 min at 4°C; supernatants for acetylcholinesterase assays were stored at - 20°C. Acetylcholinesterase activity was measured by the principle of the Ellman method [6]. Enzyme samples in 20mM phosphate buffer, pH 7.4 were incubated 150 s with 0.8 mM acetylthiocholine iodide in the presence of 10 mM DTNB for color development. Production of the yellow color was measured at 405 nm, in a plate reader.

Glutathione content. GSH content was determined as described by Browne and Armstrong [3, 28]. Briefly, immediately after decapitation, hippocampi were homogenized in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthaldialdehyde (1mg/mL of methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using

excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard GSH solutions (0-500 μ M). GSH concentrations were calculated as nmol/mg protein.

Protein concentration was measured with the Lowry method modified [24] using bovine serum albumin as standard.

Results and Discussion

Hippocampal glutathione content decreased at 4 weeks after ibotenic-induced lesion in the nbm (Fig 1A, Student's t test, $p < 0.01$), confirming the low glial activity and, particularly, reflecting the low antioxidant defense. This could explain, in part, the reduced glutamate uptake previously observed in these rats, assuming that this activity is very sensitive to oxidative stress [33]. In fact, glutathione content affects and depends on glutamate transporters [2]. Moreover, using our previous data, we investigated a possible correlation between glutamate uptake and S100B content (Table 1). Pearson's correlation is 0.29 in control rats and increases to 0.70 in ibotenic-treated rats, however, these correlations are not statistically non-significant. This apparent change is due to a differentiated decrease in glutamate uptake and S100B content. However, since extracellular S100B stimulates glutamate uptake [36], it may be hypothesized that decreased S100B content could, somehow, impair glutamate uptake. This possibility reinforces the necessity of measuring S100B secretion.

Confirming an impairment of cholinergic communication in the hippocampus of ibotenic-treated rats, we found a significant decrease in acetylcholinesterase (Fig 1B, Student's t test, $p < 0.01$). Damage of cholinergic pathways in hippocampus can be evaluated by a decrease of choline acetyltransferase and/or acetyl cholinesterase activities [25]. AChE-staining indicates that nbm lesion, using 192 IgG-saporine, induced neocortical (preferentially) and hippocampal denervation [12]. Although the nbm lesion has helped in our understanding of central cholinergic dysfunction, this model has also provided conflicting results with regard to biochemical and behavioral alterations, which could be justified, in part, by different models of injury, age of animals and post-lesion time analyzed [see [34] for a review]. Regardless of this, we confirmed a hippocampal cholinergic dysfunction, as evaluated by an acetyl cholinesterase enzymatic assay, in our injury model, i.e., at 4 weeks after ibotenic-induced lesion of nbm of adult Wistar rats.

Several changes in neurotransmitter systems are observed in Alzheimer's disease and at least three of these have been investigated in the model of dementia by nbm injury; acetylcholine [20, 22], glutamate [27, 31] and serotonin [11, 29]. Synaptic communication involving these transmitters can be affected by extracellular S100B [5, 35]. High extracellular levels of this protein are able to induce neuronal apoptosis, *in vitro*. In fact, elevated levels of S100B have been found in neuritic plaques [10], putatively accompanied by elevated local extracellular levels of the protein, but no measurement has been performed. It is important to mention that we did not observe changes in CSF S100B content in this model of injury [31], in contrast to the decrease observed in dementia models that employ chronic brain hypoperfusion [37] and intracerebroventricular infusion of streptozotocin [28].

A significant decrease in hippocampal S100B immunocontent (Fig 2, Student's t test, $p < 0.05$) was found in ibotenic-treated rats, but no changes were observed in the basal secretion of S100B in acute hippocampal slices of these rats (Two-way ANOVA). Moreover, changes in K^+ concentration of incubation medium caused alterations in S100B secretion, but these changes were not different between ibotenic and control rats. In fact, we have described that low concentrations of K^+ induce an increase in S100B in hippocampal slices [21], possibly mediated by mobilization of intracellular stores of Ca^{2+} in astrocytes [4]. On the other hand, high concentrations of K^+ induce a decrease in S100B secretion, possibly secondary to a influx of this ion [21]. These data indicate that S100B secretion (basal and K^+ -regulated) in hippocampal slices does not change in ibotenic-treated rats, suggesting that extracellular levels of this protein are not altered in the hippocampus during nbm injury. However, we cannot rule out alterations in neuronal signaling, mediated by S100B protein in this condition. Moreover, as occurs with NGF, extracellular S100B levels alone do not indicate its activity. In fact, NGF levels are apparently normal in Alzheimer's disease, but the cholinergic impairment mediated by NGF occurs via impairment of NGF signaling [e.g. [7]]. Apparently, extracellular S100B effect depends on the redox state of this protein [9]. In agreement, Donato's group has suggested that oxidative stress changes the trophic and toxic effects of this protein, at least those mediated by the receptor for advanced glycated end products (RAGE) [5]. In addition, fluoxetine has been reported to improve cognitive behavior in rats submitted to

nbm injury [11], which we know is able to increase S100B secretion in acute hippocampal slices [35]. Exogenous addition of S100B appears to improve cognitive performance dependent upon the hippocampus [14, 19], but a direct involvement of this protein in cognitive performance in this model of injury remains to be characterized.

Some limitations and perspectives of this study should be mentioned. Firstly, much evidence suggests that S100B is trophic for hippocampal neurons, but further studies involving exogenous addition of this S100B in nbm injury could be very useful. Secondly, extracellular S100B is possibly one neurotrophic factor for hippocampal neurons and its activity must be evaluated not alone, but integrated with other factors such as NGF and BDNF. Thirdly, it would be interesting to characterize, by immunohistochemistry, S100B-positive astrocyte populations and RAGE-positive cholinergic neurons in the hippocampus of rats submitted to nbm injury. These aspects together would appropriately allow the study of a possible correlation between hippocampal cognitive damage and neurotrophic activity mediated by S100B protein, in nbm injury and other models of dementia.

In summary, results acquired with the ibotenic-induced lesion of nbm of rats confirm the hippocampal astroglial alterations in this lesion and, particularly, a decrease in the antioxidant defense, as measured by glutathione content, as well as a deficit in cholinergic communication, as determined by the acetyl cholinesterase enzymatic assay. Moreover, we observed a decrease in hippocampal S100B content in ibotenic-treated rats that was not accompanied by alterations in its secretion (basal and K⁺-regulated) in acute hippocampal slices, in agreement with the idea that intracellular S100B accumulation (or decrease in this case) and S100B secretion are two independent events. These findings contribute to the understanding of diseases that are accompanied by cognitive deficits dependent on hippocampal integrity.

Table 1 *Pearson's correlation between glutamate uptake and S100B content in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of nbm*

	<i>R</i>	<i>p</i>
<i>Control</i>	0.29	0.16
<i>IBO</i>	0.70	0.09

Data for glutamate uptake (expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/h) and S100B (expressed in $\text{ng}/\mu\text{g}$ protein) in hippocampal slices from 6 rats/group were previously published by our laboratory[31].

Figure legends

Fig 1. *Glutathione content and acetyl cholinesterase in hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of nbm.* Adult rats were submitted to ibotenic-induced lesion (IBO) of nucleus basalis magnocellularis (nbm). Hippocampi were dissected out and the content of glutathione (in A) and activity of acetyl cholinesterase (in B) were measured at 28 days after nbm lesion. Values are mean \pm standard error of 6 rats in each group. * Significantly different from controls (Student's t test, $p < 0.05$).

Fig 2. *S100B secretion in acute hippocampal slices of rats submitted to ibotenic-induced lesion of nbm.* Adult rats were submitted to ibotenic-induced lesion (IBO) of nucleus basalis magnocellularis (nbm). Acute hippocampal slices were obtained with a McIlwain chopper at 28 days after nbm lesion, and S100B secretion was measured in HEPES-buffered media containing 3 mM KCl (basal secretion), 0.3 mM KCl (Low-K⁺ modulated secretion) and 30 mM KCl (High-K⁺ modulated secretion). Values are mean \pm standard error of 6 rats in each group. * Significantly different from controls (Student's t test, $p < 0.05$); ^a and ^b Statistically different groups (Two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.05$)

Fig 1. *Glutathione content and acetyl cholinesterase in hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of nbm.*

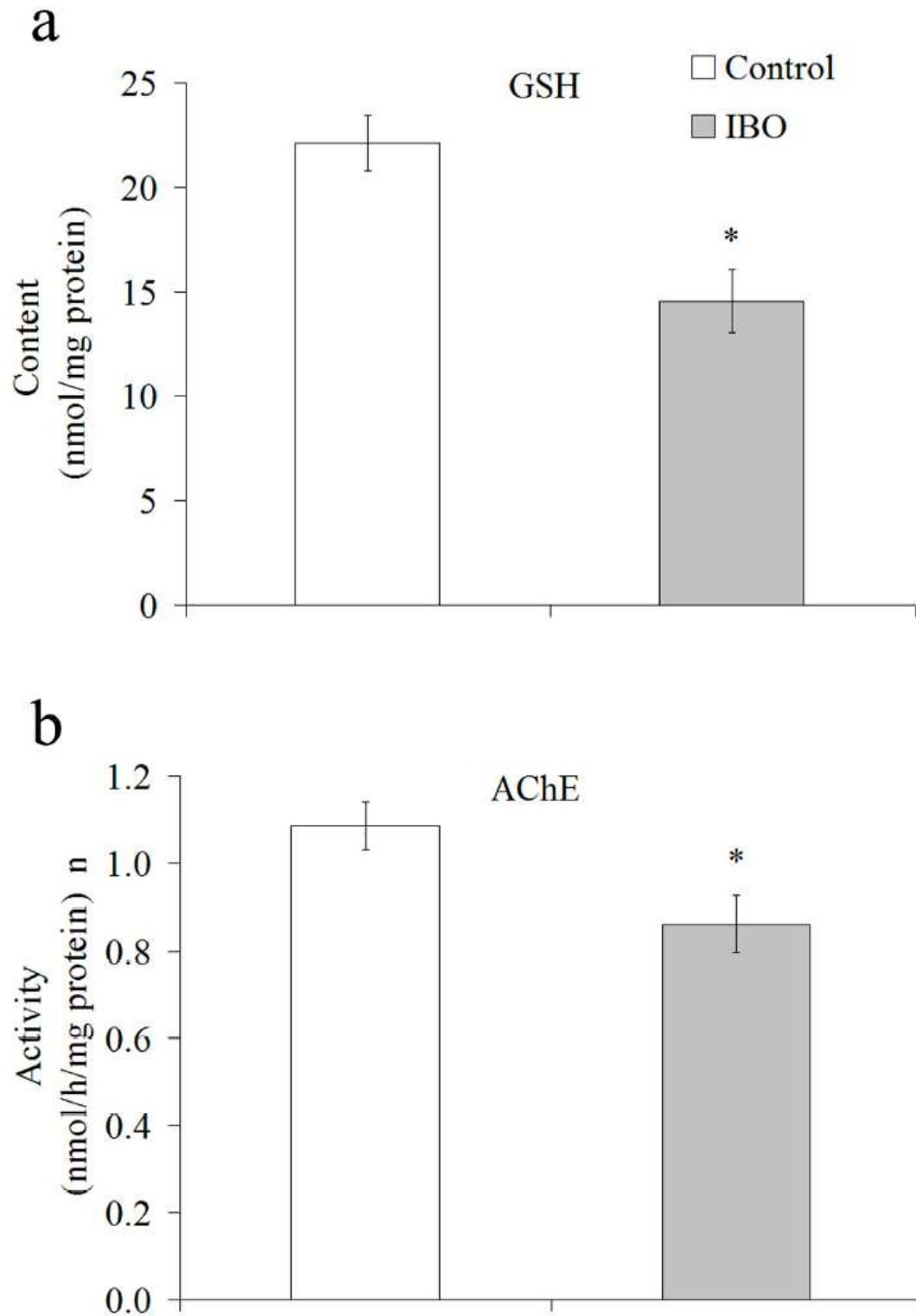
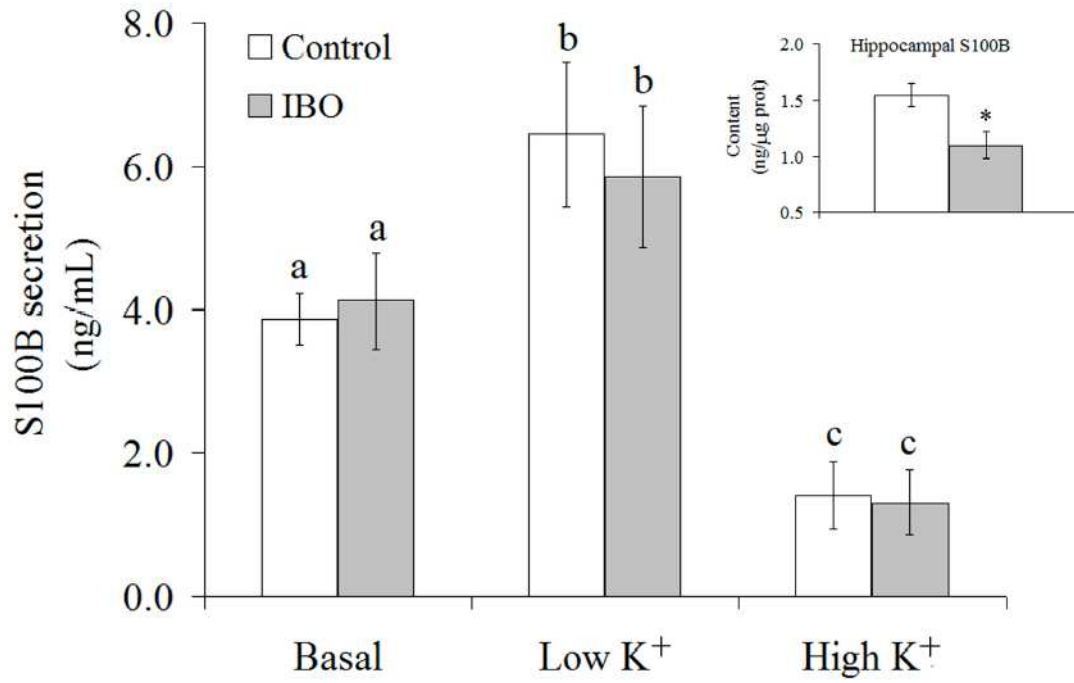


Fig 2. *S100B* secretion in acute hippocampal slices of rats submitted to ibotenic-induced lesion of nbm.



References

- [1] M.M. Ahmed, H. Hoshino, T. Chikuma, M. Yamada, T. Kato, Effect of memantine on the levels of glial cells, neuropeptides, and peptide-degrading enzymes in rat brain regions of ibotenic acid-treated alzheimer's disease model, *Neuroscience* 126 (2004) 639-649.
- [2] K. Aoyama, M. Watabe, T. Nakaki, Regulation of neuronal glutathione synthesis, *J Pharmacol Sci* 108 (2008) 227-238.
- [3] R.W. Browne, D. Armstrong, Reduced glutathione and glutathione disulfide, *Methods Mol Biol* 108 (1998) 347-352.
- [4] R. Dallwig, J.W. Deitmer, Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices, *J Neurosci Methods* 116 (2002) 77-87.
- [5] R. Donato, G. Sorci, F. Riuzzi, C. Arcuri, R. Bianchi, F. Brozzi, C. Tubaro, I. Giambanco, S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal, *Biochim Biophys Acta* (2008).
- [6] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, Jr., R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol* 7 (1961) 88-95.
- [7] S.D. Ginsberg, S. Che, J. Wu, S.E. Counts, E.J. Mufson, Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease, *J Neurochem* 97 (2006) 475-487.
- [8] C.A. Goncalves, M. Concli Leite, P. Nardin, Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury, *Clin Biochem* 41 (2008) 755-763.
- [9] D.S. Goncalves, G. Lenz, J. Karl, C.A. Goncalves, R. Rodnight, Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures, *Neuroreport* 11 (2000) 807-809.
- [10] W.S. Griffin, J.G. Sheng, M.C. Royston, S.M. Gentleman, J.E. McKenzie, D.I. Graham, G.W. Roberts, R.E. Mrak, Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression, *Brain Pathol* 8 (1998) 65-72.
- [11] M. Ivkovic, A. Damjanovic, M. Jasovic-Gasic, V.R. Paunovic, The effects of fluoxetine on cognitive functions in animal model of Alzheimer's disease, *Psychiatr Danub* 16 (2004) 15-20.
- [12] H. Jeltsch, C. Lazarus, B. Cosquer, R. Galani, J.C. Cassel, No facilitation of amphetamine- or cocaine-induced hyperactivity in adult rats after various 192 IgG-saporin lesions in the basal forebrain, *Brain Res* 1029 (2004) 259-271.
- [13] A. Kleindienst, H.B. Harvey, A.C. Rice, C. Muller, R.J. Hamm, M.R. Gaab, M.R. Bullock, Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat, *J Neurotrauma* 21 (2004) 541-547.
- [14] A. Kleindienst, M. Ross Bullock, A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury, *J Neurotrauma* 23 (2006) 1185-1200.
- [15] M.C. Leite, F. Galland, G. Brolese, M.C. Guerra, J.W. Bortolotto, R. Freitas, L.M. Almeida, C. Gottfried, C.A. Goncalves, A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein, *J Neurosci Methods* 169 (2008) 93-99.

- [16] R. Manev, T. Uz, H. Manev, Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100beta in the rat hippocampus, *Eur J Pharmacol* 420 (2001) R1-2.
- [17] E. Masliah, M. Mallory, L. Hansen, R. DeTeresa, M. Alford, R. Terry, Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease, *Neurosci Lett* 174 (1994) 67-72.
- [18] M. McKinney, M.C. Jacksonville, Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease, *Biochem Pharmacol* 70 (2005) 1115-1124.
- [19] T. Mello e Souza, A. Rohden, M. Meinhardt, C.A. Goncalves, J.A. Quillfeldt, S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation, *Physiol Behav* 71 (2000) 29-33.
- [20] J.L. Muir, Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease, *Pharmacol Biochem Behav* 56 (1997) 687-696.
- [21] P. Nardin, L. Tortorelli, A. Quincozes-Santos, L.M. de Almeida, M.C. Leite, A.P. Thomazi, C. Gottfried, S.T. Wofchuk, R. Donato, C.A. Goncalves, S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca²⁺ and K⁺. *Neurochem Res* (2009).
- [22] M. Ogawa, Y. Iida, M. Nakagawa, Y. Kuge, H. Kawashima, A. Tominaga, M. Ueda, Y. Magata, H. Saji, Change of central cholinergic receptors following lesions of nucleus basalis magnocellularis in rats: search for an imaging index suitable for the early detection of Alzheimer's disease, *Nucl Med Biol* 33 (2006) 249-254.
- [23] G. Paxinos, *The Rat Nervous System*, Academic Press, San Diego, 1997.
- [24] G.L. Peterson, A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable, *Anal Biochem* 83 (1977) 346-356.
- [25] P. Piovesan, G. Quatrini, L. Pacifici, G. Tagliatela, L. Angelucci, Acetyl-L-carnitine restores choline acetyltransferase activity in the hippocampus of rats with partial unilateral fimbria-fornix transection, *Int J Dev Neurosci* 13 (1995) 13-19.
- [26] M. Popovic, M. Caballero-Bleda, N. Popovic, L. Puelles, T. van Groen, M.P. Witter, Verapamil prevents, in a dose-dependent way, the loss of ChAT-immunoreactive neurons in the cerebral cortex following lesions of the rat nucleus basalis magnocellularis, *Exp Brain Res* 170 (2006) 368-375.
- [27] G. Reine, D. Samuel, A. Nieoullon, L. Kerkerian-Le Goff, Effects of lesion of the cholinergic basal forebrain nuclei on the activity of glutamatergic and GABAergic systems in the rat frontal cortex and hippocampus, *J Neural Transm Gen Sect* 87 (1992) 175-192.
- [28] L. Rodrigues, R. Biasibetti, A. Swarowsky, M.C. Leite, A. Quincozes-Santos, J.A. Quillfeldt, M. Achaval, C.A. Goncalves, Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine., *J Alzheimers Dis* (2009).
- [29] A.C. Santucci, V. Haroutunian, p-Chloroamphetamine blocks physostigmine-induced memory enhancement in rats with unilateral nucleus basalis lesions, *Pharmacol Biochem Behav* 77 (2004) 59-67.
- [30] J. Steiner, H.G. Bernstein, H. Biela, A. Berndt, R. Brisch, C. Mawrin, G. Keilhoff, B. Bogerts, Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain, *BMC Neurosci* 8 (2007) 2.
- [31] A. Swarowsky, L. Rodrigues, R. Biasibetti, M.C. Leite, L.F. de Oliveira, L.M. de Almeida, C. Gottfried, J.A. Quillfeldt, M. Achaval, C.A. Goncalves, Glial

- alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis, *Behav Brain Res* 190 (2008) 206-211.
- [32] K. Takuma, A. Baba, T. Matsuda, Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection, *Prog Neurobiol* 72 (2004) 111-127.
- [33] S. Tilleux, E. Hermans, Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders, *J Neurosci Res* 85 (2007) 2059-2070.
- [34] A. Toledano, M.I. Alvarez, Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease models: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models, *Curr Alzheimer Res* 1 (2004) 189-214.
- [35] A.C. Tramontina, F. Tramontina, L.D. Bobermin, C. Zanotto, D.F. Souza, M.C. Leite, P. Nardin, C. Gottfried, C.A. Goncalves, Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32 (2008) 1580-1583.
- [36] F. Tramontina, A.C. Tramontina, D.F. Souza, M.C. Leite, C. Gottfried, D.O. Souza, S.T. Wofchuk, C.A. Goncalves, Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes, *Cell Mol Neurobiol* 26 (2006) 81-86.
- [37] E. Vicente, D. Degerone, L. Bohn, F. Scornavaca, A. Pimentel, M.C. Leite, A. Swarowsky, L. Rodrigues, P. Nardin, L.M. de Almeida, C. Gottfried, D.O. Souza, C.A. Netto, C.A. Goncalves, Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat, *Brain Res* 1251 (2009) 204-212.
- [38] A. Volterra, J. Meldolesi, Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues, *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 626-640.
- [39] M. Yamamoto, T. Chikuma, T. Kato, Changes in the levels of neuropeptides and their metabolizing enzymes in the brain regions of nucleus basalis magnocellularis-lesioned rats, *J Pharmacol Sci* 92 (2003) 400-410.
- [40] Q. Yang, A. Hamberger, N. Khatibi, T. Stigbrand, K.G. Haglid, Presence of S-100 beta in cholinergic neurones of the rat hindbrain, *Neuroreport* 7 (1996) 3093-3099.

6. DISCUSSÃO

6.1. Sumário dos resultados

Embora a glia esteja envolvida nos processos neurodegenerativos, seus mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos. Para tanto, medimos alguns parâmetros astrogliais no hipocampo 7 e 28 dias após lesão no nbm com infusão de IBO.

↓ redução significativa; - não modificado.

Parâmetros hipocampais avaliados 7 dias após infusão de IBO no nbm	
GFAP	-
S100B	-
S100B líquido	-
Cognição, dependente de hipocampo (Esquiva inibitória)	↓
Parâmetros hipocampais avaliados 28 dias após infusão de IBO no nbm	
GFAP	↓
S100B	↓
S100B líquido	-
Secreção de S100B fatias ($\uparrow K^+$ e $\downarrow K^+$)	-
Captação de glutamato	↓
GS	-
GSH	↓
AChE	↓
Cognição, dependente de hipocampo (Esquiva inibitória)	↓

6.2. Lesão do nbm causa gliose hipocampal?

Uma importante característica dos astrócitos é sua resposta em condições patológicas. Alterações no seu estado funcional têm sido observadas na maioria das injúrias encefálicas (Van Eldik, 2001; Ahmed et al., 2004). Nestas condições, os astrócitos se proliferam e/ou alteram sua morfologia e características funcionais, originando um conjunto de elementos caracterizados pela hipertrofia da célula e

aumento das organelas citoplasmáticas, além do aumento da síntese de proteínas específicas (Monzón-Mayor et al., 2000).

Del Rio-Hortega (1927) e Penfield (1932) caracterizaram classicamente a gliose por hipertrofia, hiperplasia e produção aumentada de gliofibrilas. Atualmente, além do conceito de Liberto e cols (2004) (gliose anisomórfica e isomórfica), Wilhelmsson e cols (2006) propõem uma redefinição do termo “astrócitos reativos” em função dos resultados encontrados. Em experimentos utilizando lesão elétrica do córtex entorrinal de ratos, os autores demonstraram que 4 dias após insulto, há aumento do diâmetro dos processos GFAP positivos que partem do soma, sem aumento de volume (sem hipertrofia celular), e sem aumento de interdigitações entre os astrócitos reativos quando comparados aos não reativos. Ou seja, sugerem que há uma mudança na morfologia do astrócito, tomando um aspecto espongiforme, sem alteração do citoesqueleto de filamentos intermediários (Wilhelmsson et al., 2006).

Estudos demonstram que há gliose na DA e que esta se comprovaria pelo aumento principalmente do conteúdo de GFAP (Van Eldik, 2001; Liberto et al., 2004; Toledano e Alvarez, 2004; Monzón-Mayor et al., 2004; Ahmed et al., 2004; Parihar e Hemnani, 2004). Ahmed e cols (2004) realizaram infusões bilaterais de IBO (1 μ L - 8 μ g/ μ L) no nbm e encontraram aumento da imunorreatividade da GFAP no estriado e córtex frontal, mas não no hipocampo após 1 semana de lesão. Porém não menciona o método de quantificação utilizado. Este mesmo autor mensurou a atividade da β -D-glucuronidase (enzima lisossomal associada à gliose e quando aumentada indica proliferação glial) e encontrou alterações significativas no estriado, porém não no córtex frontal nem no hipocampo, mostrando que embora não haja alterações em áreas mais remotas à lesão, o IBO produz efeitos na expressão dos astrócitos.

Monzón-Mayor e cols (2000) utilizaram infusões unilaterais de IBO e de ácido quisquálico no nbm em diferentes concentrações e demonstram um aumento da imunorreatividade da GFAP na área da lesão (nbm), em áreas próximas (cápsula interna e globo pálido) e em áreas remotas (córtex frontal, somatosensorial e motor), em diferentes janelas de tempo, porém não quantificada. O pico de máxima gliose foi aos 45 dias, observada no nbm e no córtex frontoparietal, em discordância com outros estudos

que mostram aumento de ativação glial entre os dias 4 e 14 de lesão (Arendash et al., 1987; Eddleston et al., 1992). Diversos autores relatam o início da resposta glial com o início do dano/morte neuronal. Dados mostram que após 1 dia de lesão os marcadores colinérgicos apresentam-se diminuídos significativamente, porém apenas alguns astrócitos estão alterados em sua morfologia, demonstrando o quão heterogênea pode ser a resposta glial (Monzón-Mayor et al., 2000).

Nossos resultados demonstram uma diminuição, porém não significativa do imunoconteúdo de GFAP no hipocampo após 7 dias de insulto e significativa ($p < 0,05$) após 28 dias da infusão de IBO ($0,5 \mu\text{L} - 8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) no nbm.

Dados na literatura demonstram que há uma diminuição da imunorreatividade e do RNAm da GFAP em pacientes com distúrbios de humor em algumas regiões encefálicas além de redução no número de astrócitos GFAP positivos em pacientes com depressão maior (Webster et al., 2001). Em experimentos utilizando modelo de depressão em roedores, há uma diminuição significativa do número de astrócitos no hipocampo após 28 dias (quantificado por cromatografia - HPLC) além de mudanças na sua morfologia (Banar e Duman, 2008). Lesões no estriado produzem uma resposta glial local de mais de 6 meses de duração, mas não em áreas de projeção (Isacson et al., 1987). Estudos com modelo de lesão no nbm (com infusão de IBO) de longa duração mostram que apenas uma gliose restrita ocorre no nbm 14 meses após insulto ou não gliose após 12 meses, sem mencionar alterações gliais no córtex, embora houvesse uma involução neuronal significativa nesta região (Mahy et al., 1995). Há ainda outro aspecto que deve ser levado em conta. Wang e Bardey (2008) sugerem que baixos níveis de GFAP podem não ser detectáveis nas técnicas de imunistoquímica e demonstrou ser possível uma célula não expressar GFAP mesmo tendo características de astrócito.

Apesar de demonstrar déficit cognitivo aos 7 e 28 dias após lesão no nbm com IBO, em tarefa comportamental que depende da integridade do hipocampo, nossos resultados não o correlacionam com a astrogliose nesta região e, ao contrário, sugerem uma hipofunção celular, não descartando a possibilidade desta ser momentânea. Mas qual o objetivo da e para a célula? Sugerimos que os astrócitos numa tentativa de defesa contra o insulto “regrediriam” seus mecanismos intracelulares, passando a expressar menos

GFAP, além de S100B. Esta diminuição da expressão de GFAP pode caracterizar esta célula como imatura, em estado indiferenciado, o que explicaria em parte os resultados encontrados. Astrócitos também tem íntima ligação com as células endoteliais que expressam fatores que podem induzir a expressão de GFAP (através da ativação da Janus cinase - JAK), tornando o astrócito maduro (Yanagisawa et al., 2001). Possivelmente, este processo também poderia acarretar modificações na morfologia do astrócito, porém, estes dados não foram analisados. Portanto seria interessante analisar a morfologia dos astrócitos no hipocampo, particularmente em CA1 e Giro denteado através de imunistoquímica com dupla marcação (GFAP e Vimentina). Em dados não publicados em nosso laboratório, lesões no nbm com IBO após 70 dias de insulto apresentam níveis de GFAP iguais ao controle. Sugerimos duas hipóteses para os resultados encontrados: ou os astrócitos se diferenciaram nesta janela de tempo (28 – 70 dias) e passaram a expressar GFAP em níveis normais ou ainda a lesão com IBO no nbm poderia ser reversível, como mostram diversos trabalhos descritos por Toledano e Álvarez (2004). Embora concordando com os autores, o déficit cognitivo ainda permanece aos 70 dias após lesão. Esta resposta glial teria um caráter adaptativo e poderia ser considerado um indício de apoptose celular com reversão da função astrocitária.

Concordando com Monzón-Mayor e cols (2000), se o aumento da imunoreatividade da GFAP fosse uma simples consequência da liberação de fatores necróticos pelas células vizinhas, todas as regiões encefálicas iriam responder da mesma maneira assim como células em cultura. Porém, os astrócitos respondem de uma forma muito heterogênea em diferentes regiões e situações de insulto, provando que há grupos de células com diferentes graus de reatividade além de diferentes fatores que regulam o estado funcional do astrócito (repouso – ativado e vice-versa). Esses dados se somam a outros que apontam a necessidade de revisar o conceito de gliose, se esta é realmente uma resposta glial prejudicial, tanto para neurônios quanto para a própria glia como é mais comumente descrito na literatura.

6.3. Lesão no nbm leva a hipofunção astrogliar no hipocampo?

O pico de resposta glial encontrada em nosso modelo foi aos 28 dias, onde encontramos diminuição de todos os parâmetros analisados (GFAP, S100B, GSH e captação de glutamato). Além disso, o déficit cognitivo aos 28 dias tem uma maior significância do que aos 7, embora ambos sejam significativos ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente). Ou seja, o déficit cognitivo parece acompanhar a hipofunção astrocítica sugerida no nosso trabalho.

Outra hipótese possível para a hipofunção dos astrócitos, que explicaria em parte todos os resultados encontrados em relação aos parâmetros astrocitários, seria a via apoptótica. Pensamos que esta hipofunção poderia representar uma via de morte celular para os astrócitos. Em experimentos realizados por García-Cáceres e cols (2008) utilizando infusão de estreptozotocina i.p, demonstraram que astrócitos do hipotálamo (GFAP positivos) expressam mais caspase-3, embora não haja fragmentação de seu núcleo. Porém, a translocação nuclear do fator indutor de apoptose (AIF) aumenta significativamente nos astrócitos 1 semana após insulto correlacionando-se com o aumento de morte destas células. Os autores ainda sugerem que a caspase-3 poderia estar envolvida com as mudanças morfológicas sofridas pelos astrócitos hipotalâmicos e o AIF com o aumento da morte celular.

Estudos realizados por Raghupathi (2004), demonstram que tanto a lesão excitatória quanto o aumento de ERO podem levar as células à via apoptótica e que de certa maneira, pode ter um papel protetor em situação de injúria encefálica. Sulejczak e cols (2008) em estudos realizados demonstram que em modelo animal de lesão cirúrgica, observaram dano maciço de células corticais e intensa astrogliose. Após 4 dias de lesão a apoptose prevaleceu, com envolvimento de fatores como a Bax e a caspase-3 e sugeriram a possibilidade de ocorrer apoptose nos astrócitos analisados. Em modelo de isquemia focal transitória em ratos, Matsuda e cols (2008) demonstraram que após 3 dias de lesão, astrócitos e microglia sofrem um dano oxidativo no seu DNA no estriado ipsilateral a lesão. Dano este observado pelo aumento da imunorreatividade a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), um marcador de dano de DNA, em astrócitos e microglia, além de em neurônios, que demonstram características de morte celular por apoptose.

Não há dados na literatura que correlacionem hipofunção ou morte de astrócitos por apoptose em modelo de lesão no nbm através da infusão de IBO, por isso a necessidade de dar continuidade a estudos envolvendo este modelo, podendo ser realizado a dupla marcação de caspase-3 e GFAP em astrócitos hipocampais em CA1 e Giro Denteado como sinal de apoptose para fundamentar e hipótese proposta.

Corroborando com esta hipótese, estão os resultados encontrados em relação à GSH, que diminuiu significativamente no hipocampo após 28 dias de lesão no nbm. Este resultado significa que houve uma diminuição das defesas antioxidantes dos astrócitos, que poderia ser causada pela lesão excitotóxica provocada pelo IBO (agonista NMDA), causando aumento do estresse oxidativo (com aumento de produção de espécies reativas de oxigênio – ERO) além do aumento da quantidade de Ca^{+2} intracelular. Há evidências que sugerem que o IBO atue nos receptores de glutamato presentes nos astrócitos e tanicitos (GluR5-7 e GluR6/7). Porém os mecanismos envolvendo a resposta glial em animais lesionados com IBO ainda não estão completamente esclarecidos (Ahmed et al., 2004). Além disso, pensamos que os efeitos do IBO sobre os receptores glutamatérgicos astrocitários seriam locais (no nbm) e não nos astrócitos do hipocampo. Outra hipótese, mais evidente em função das correlações anatômicas, seria a diminuição de fatores tróficos ocasionado pela perda neuronal colinérgica no nbm (já bem descrita na literatura). Uma vez interrompida a via nbm-amígdala-hipocampo, haveria uma diminuição de fatores tróficos, sobretudo de NGF para o hipocampo, o que também poderia influenciar o metabolismo de glutamato nestes astrócitos e até mesmo iniciar a via apoptótica, como ocorre em *knock-out* para NGF e p75NGFr (Toledano e Álvarez, 2004). Segundo Friedman e Dreyfus (2004) os astrócitos do EB são fontes locais de neurotrofinas para os neurônios colinérgicos e as interações entre neurônio e glia são fundamentais para o funcionamento destes neurônios e vias ascendentes colinérgicas.

O astrócito capta glutamato através de transportadores específicos (GLAST e GLT1) acompanhado da entrada de um íon Na^+ . O glutamato dentro da célula pode ter pelo menos 4 vias de metabolização: ou é transformado em glutamina pela GS para voltar ao neurônio; ou volta ao espaço extracelular por um trocador de membrana (troca cisteína pelo glutamato); ou é transformado em GSH (cisteína + glicina + glutamato) para defesa antioxidante; ou ainda é utilizado no Ciclo de Krebs para formar NADH e

ATP (Nedergard et al., 2002). Todos estes mecanismos são sensíveis ao aumento de ERO, além deste aumento também influenciar diretamente as células a tomarem a via apoptótica numa tentativa de adaptação ao insulto. Estas mudanças também corroboram para explicar a diminuição de GSH e da captação de glutamato encontrada em nosso trabalho. Ainda, situações de insulto podem alterar a expressão de GLAST e GLT1 e podem ser regulados por citocinas liberadas pelos astrócitos e células vizinhas (Liberto et al., 2004). Quanto a atividade da GS mensurada aos 28 dias, não foram encontradas diferenças significativas. Correlacionando a diminuição significativa da captação de glutamato (também aos 28 dias) com a atividade da GS, poderíamos pensar que se a captação diminuiu, a GS também poderia estar diminuída. Porém, pensamos que o glutamato captado pelo astrócito pode seguir outra via de metabolização e não transformar-se em glutamina para suprir os neurônios. Embora Liberto e cols (2004) cite trabalhos que demonstram a regulação dos níveis de GS através de fatores como o NGF, por exemplo, que pensamos estar diminuídos em função do prejuízo da via colinérgica nbm-amígdala-hipocampo, sobre esta enzima a lesão com IBO parece não provocar efeito.

Outro parâmetro glial investigado foi a S100B. A S100B é produzida e secretada pelos astrócitos e está envolvida na regulação, diferenciação e plasticidade do citoesqueleto celular. Além disso, atua como fator neurotrófico para neurônios, protegendo-os contra a excitotoxicidade, dano oxidativo, estresse e toxicidade beta-amilóide (Nardin et al., 2009). Nossos resultados demonstram que após 7 dias de lesão com IBO no nbm, houve uma tendência de aumento ($p=0,10$) no imunocontéudo desta proteína no hipocampo, embora não significativo. Pensamos que esta tendência de aumento de S100B pós-lesão possa ter um caráter protetor, tanto para os astrócitos, quanto para os neurônios hipocampais, objetivando reparar neurônios e até mesmo astrócitos. Já aos 28 dias, quando há uma diminuição significativa do conteúdo de S100B, que acompanha a diminuição de GFAP, pensamos estar relacionadas à hipofunção celular e mudanças adaptativas no astrócito. Sabemos que a S100B está localizada no citoplasma celular (na forma solúvel) e associada com a membrana intracelular, centrossomos, microtúbulos e filamentos intermediários do tipo III (GFAP) e podem influenciar diretamente a expressão desta proteína (Donato et al., 2009). Além

disso, a S100B induz a expressão de IL-6 e IL-1, citocinas pró-inflamatórias que poderiam aumentar o dano sofrido (Li et al., 2000).

Embora descrito na literatura por vários autores, que o aumento de S100B é deletéria ao tecido e a diminuição é benéfica, pensamos que esta correlação é dependente do meio e do tipo de insulto sofrido pelo tecido. Em situações de estresse oxidativo, podem ocorrer mudanças nos efeitos tróficos e tóxicos da S100B, mediados pelo RAGE e a diminuição de S100B poderia significar uma diminuição do controle de fatores tróficos para as demais células ou poderia ser positiva, já que o aumento crônico dos níveis desta proteína tende a ser prejudicial (Peskind et al., 2001; Donato et al., 2009). No caso do nosso modelo, pensamos que esta diminuição nesta janela de tempo tende a ser prejudicial, se correlacionarmos os fatores gliais mensurados e o déficit cognitivo encontrado. Donato e cols (2009) sugerem que mesmo em concentrações consideradas neuroprotetoras, a S100B pode ter efeito tóxico em quantidades aumentadas de ERO. Embora não tenhamos medido os níveis de ERO em nosso modelo, sugerimos que eles estejam aumentados, já que as defesas antioxidantes dos astrócitos estão diminuídas.

Uma das hipóteses para explicar o envolvimento da S100B na hipofunção celular ou apoptose supostamente sofrida pelo astrócito, poderia ser a diminuição da supra-regulação exercida por esta proteína no controle do fator anti-apoptótico Bcl-2. Van Eldik e Wainwright (2003) descrevem que um dos mecanismos pelo qual a S100B exerce atividade neuroprotetora é através da interação com o RAGE, além da estimulação do fator de transcrição NFκB e do Bcl-2. Estes mesmos autores descrevem que esta proteína pode induzir apoptose em cultura de células tipo PC12, possivelmente pela regulação dos genes apoptóticos e regulação de canais de Ca^{+2} de maneira S100B dependentes quando este processo está desregulado.

Gonçalves e cols (2008) sugerem que o conteúdo de S100B no líquido pode ser usado como marcador para vários tipos de insulto. De fato, Peskind e cols (2001) demonstraram um aumento significativo dos níveis de S100B no líquido de pacientes com Alzheimer, numa primeira fase da doença. Em trabalhos realizados em nosso laboratório utilizando modelo de hipoperfusão crônica (Vicente et al., 2008) e infusão de

estreptozotocina i.c.v (Rodrigues, *in press*) em ratos, houve uma diminuição significativa no conteúdo de S100B no líquido desses animais. Porém, em nosso modelo animal, não houve diferenças neste parâmetro. Para tanto, mais estudos devem ser feitos, já que não há na literatura dados sobre a S100B no líquido em nosso modelo.

Em relação à secreção hipocampal de S100B, dados mostram que não houve diferenças significativas tanto após insulto com altas ou baixas concentrações de K^+ . Nardin e cols (2009) demonstraram aumento da secreção de S100B em fatias hipocâmpais em meio com alta concentração de K^+ (secundário ao influxo de K^+) e diminuição da secreção quando baixa concentração (possivelmente pela mobilização do Ca^{+2} intracelular). Talvez o dano causado pela infusão de IBO no nbm no hipocampo seja só em função da diminuição de NGF e outros fatores tróficos causados pelo prejuízo da via nbm-amígdala-hpc e não pelo dano excitotóxico com consequente aumento da entrada de Ca^{+2} .

Estes dois mecanismos (secreção e expressão de S100B) são completamente distintos. Donato e cols (2009) sugerem que a secreção de S100B pode ter um efeito benéfico aos neurônios numa fase inicial de insulto. Como não encontramos diferença na quantidade secretada pelo astrócito, sugerimos que este mecanismo ou função está preservado em nosso modelo. A secreção de S100B está envolvida com a melhora do desempenho de animais em tarefas envolvendo memória e aprendizado, e parece afetar a atividade elétrica da célula pela modulação das correntes de K^+ , porém, embora não haja diferenças em relação ao controle, o déficit comportamental é bem significativo. Sugerimos que apesar do mecanismo de secreção não estar alterado em nosso modelo, estudos adicionais devem ser feitos em diferentes janelas de tempo, para tentar elucidar seu envolvimento nas tarefas comportamentais e neste modelo animal.

6.4. Lesão no nbm serve como modelo de demência?

Buscando validar nosso modelo, como sendo um modelo de lesão colinérgica, avaliamos seu comprometimento através da medida da atividade da AChE no hipocampo. Embora já bem descrito na literatura, nossos resultados concordam com os demais, mostrando uma diminuição significativa desta enzima após 28 dias de lesão. Embora muitos estudos afirmem que o grau de comprometimento colinérgico não se

correlaciona com o grau de demência, sugerimos uma ligação entre o déficit comportamental e a diminuição desta no hipocampo após 28 dias de lesão. Segundo Toledano e Alvarez (2004), utilizando lesão no nbm com IBO e ácido quisquálico do 1° ao 14° dia é difícil de inferir se há uma involução celular ou hipofunção colinérgica ou os dois. Sugerimos que esta diminuição de atividade é resultado do prejuízo da via nbm-amígdala-hipocampo e também da possível diminuição de sinapses utilizando a ACh nesta região, com possível involução colinérgica, e que a AChE poderia assumir outra função que não a de degradação enzimática. Por exemplo, Talesa e cols (2001) sugerem que a AChE possa estar envolvida na resposta a vários tipos de insulto, proliferação celular, além da formação de placas amilóides na DA.

Em vários modelos animais para DA, todos os resultados encontrados dependem do grau de prejuízo celular, adaptação e plasticidade exibida pela célula ou grupo celular, em cada animal e em cada modelo de lesão. As respostas celulares têm características espaciais e temporais e temos que considerar a toxina utilizada e a dose, o que pode aumentar ou diminuir os níveis de resposta. Estes são fatores importantes a serem considerados neste modelo de lesão já que o nbm não é uma região anatomicamente bem definida (Toledano e Alvarez, 2004). Nenhum modelo de lesão no nbm, apresenta formação de placa amilóide em ratos. Embora alguns resultados encontrados no nosso estudo não corroboram com os descritos na literatura, pensamos que este é um bom modelo para estudar as alterações resultantes do dano colinérgico que sugerimos poder preceder a formação de placas amilóides na doença de Alzheimer.

7. CONCLUSÕES

No modelo de lesão com IBO no nbm em ratos Wistar machos adultos há uma diminuição de vários parâmetros gliais no hipocampo (S100B, GFAP, GSH e captação de glutamato) após 28 dias. Além disso, há uma diminuição significativa da atividade da AChE no hipocampo destes animais através deste parâmetro, pode ser considerado um modelo animal de disfunção colinérgica. Quanto ao déficit cognitivo, este também foi confirmado através da realização da tarefa de Esquiva Inibitória após 7 e 28 dias da infusão de IBO no nbm, demonstrando que este modelo de lesão pode ser utilizado como modelo de demência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (referentes à introdução e discussão)

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

Ahmed, M.M., Hoshino, H., Chikuma, T., Yamada, M., Kato, T. (2004). Effect of memantine on the levels of glia cells, neuropeptides, and peptide-degrading enzymes in rat brain regions of ibotenic acid-treated Alzheimer's disease model. *Neuroscience*, 126:639-649.

Alhei, G.F., Heimer, L. (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatry disorder: the striatopallidal, amygdaloid and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*, 27:1-39.

Banasr, M., Duman, R.S. (2008) Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biology Psychiatry* 64:863-870.

Chacón, M., Reyes, A.E., Inestrosa, N.C. (2003) Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 87:195-204.

Cotter, D.R., Pariante, C.M., Everall, I.P. (2001) Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Research Bulletin*, 35(5):585-595.

Donato, R. (2001) S100B: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33:637–668.

Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubarão, I. (2009) S100B's double life: Intracellular regulator and extra cellular signal. *Biochimica & Biophysica Acta*, 2009.

Feeney, C.J., Stys, P.K. (2005) Astrocyte injury, *in* Neuroglia. 2^oed., New York, Oxford University Press.

Friedman, W.H., Dreyfus, C.F. (2004) Differential regulation of neurotrophin expression in basal forebrain astrocytes by neuronal signals. *Journal of Neuroscience Research*, 76(1):76-85.

Garbuglia, M., Verzini, M., Hofmann, A., Huber, R., Donato, R. (2000) S100A1 and S100B interactions with annexins. *Biochimica & Biophysica Acta* 1498:192-206.

García-Cáceres, C., Lechuga-Sancho, A., Argente, J., Frago, L.M., Chowen, J.A. (2008) Death of hypothalamic astrocytes in poorly controlled diabetic rats is associated with nuclear translocation of apoptosis inducing factor. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(12):1348-1360.

Gee, J.R., Keller, J.N. (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37:1145-1150.

Gevorkian, G., Gonzalo-Noriega, A., Acer, G., Ordóñez, J., Michalak, C., Munguia, M.E., Govezensky, T., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K. (2008) Amyloid-beta peptide binds to microtubule-associated protein 1B (MAP1B). *Neurochemistry International*, 52:1030-1036.

Gibson, G.E., Huang, H.M. (2005) Oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 26:575-578.

Hanin, I. (1996) The AF64A model of cholinergic hypo function: an update. *Life Science*, 58:1955-1964.

Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problem on the road to therapeutics. *Science*, 297: 353-356.

Harkany, T., Grosche, J., Mulder, K., Horvath, M., Keijser, J., Hortobágyi, T., Luiten, P.M.G., Hartig, W. (2001) Short term consequences of N-Methyl-D-Aspartate excitotoxicity in rat magnocellular nucleus basalis: effects on in vivo labeling of cholinergic neurons. *Neuroscience*, 108 (4):611-627.

Herholz, K., Weisenbach, S., Kalbe, E. (2008) Deficits of the cholinergic system in early AD. *Neuropsychologia*, 46:1642-1647.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000) *Fundamentos da Neurociência e do comportamento*. Guanabara-koogan, Rio de Janeiro, RJ.

Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S. (1998) Acute stress facilitates long lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*, 393:373-377.

Leite, M.C., Brolese, G., de Almeida, L.M., Piñero, C.C., Gottfried, C., Gonçalves, C.A. (2006) Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Research Bulletin*, 70(2):179-185.

Li, Y., Qin, H.Q., Chen, Q.S., Wang, J.J. (2005) Neurochemical and behavioral effects of the intrahippocampal co-injection of β -amyloid protein 1-40 and ibotênic acid in rats. *Life Sciences*, 76:1189-1197.

Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W. (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 89:1092-1100.

Matsuda, S., Umeda, M., Kto, H., Araki, T. (2008) Glial damage after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, *Correct Proof*.

Mesulan, M.M., Geula, C. (1988) Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of

acetylcholinesterase and choline acetyl transferase. *Journal of Comparative Neurology*, 275:216-240.

Metzner, W., Juranek, J. (1997) A method to biotinylate and histochemically visualize ibotenic acid for pharmacological inactivation studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 76:143-150.

Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppede, F., Siciliano, G., Murri, L. (2005) Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress. *Neurobiology of Aging*, 26:587-595.

Monzón-Mayor, M., Álvarez, M.I., Galván, J.F.A., Romero-Alemán, M., Yanes, C., Plaza, M.L., Rodríguez, J.R., Rodríguez, J.J., Toledano, A. (2000) Long-term evolution of local, proximal and remote astrocytes responses after diverse nucleus basalis lesioning (an experimental Alzheimer model): GFAP immunocytochemical study. *Brain Research*, 865:245-258.

Mrak, R.E., Griffin, W.S.T. (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*, 26:349-354.

Mufson, E.J., Ginsberg, S.D., Ikonomic, M.D., Dekosky, S.T. (2003) Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26:233-242.

Nagele, R.G., Wigiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K.C., Wegiel, J. (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 25:663-674.

Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M.C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Battastin, A.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A. (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high glucose medium. *Neurochemistry International*, 50(5): 774-782.

Nardin, P., Tortelli, L., Quincozes-Santos, A, Almeida, L.M., Leite, M.C., Thomazi, A.P., Gottfried, C., Wofchuck, S.T., Donato, R., Gonçalves, C.A. (2009) S1—B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca^{++} and K^{+} . *Neurochemistry Research*, 12:122-133.

Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J. (2002) Beyond role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature*, 3:748-755.

Nieto-Escámez, F.A., Sánchez-Santed, F., Bruin, J.P.C. (2004). Pretraining or previous non-spatial experience improves learning in the Morris water maze of nucleus basalis lesioned rats. *Behavioural Brain Research*, 148: 55-71.

Okamoto, I. (2002) Doença de Alzheimer. *Revista de Psiquiatria Médica*, 34(4):25-28.

Pákáski, M., Kálmán, J. (2008) Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 53:103-111.

Parihar, M.S., Hemnani, T. (2004). Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal Clinical Neuroscience*, 11(5): 456-467.

Pavia, J., Albrech, J., Alvarez, I., Toledano, A., de Ceballos, M.L. (2002) Repeated intracerebroventricular administration of β -amuloid (25-35) to rats increases muscarinic receptors in cerebral córtex. *Neuroscience Letters*, 13:1376-1387.

Paxinos, G. (1997) *The rat nervous system*. Academic Press, San Diego.

Pekny, M., Eliasson, C., Chien, C.L., Kindblom, L.G., Liem, R., Hamberger, A., Betsholtz, C. (1998) GFAP deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when co-cultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Experimental Cell Research*, 239:332-343.

Peskind, E.R., Griffin, W.S.T., Akama, K.T., Raskind, M.A, Van Eldik, L.J. (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 39:409-413.

Petito, C.K.; Chung, M.C.; Verkhovisky, L.M.; Cooper, A .J.L. (1992). Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Research*, 569:275-280.

Popovic, M., Caballero-Belda, M., Popovic, N., Puelles, L., Van Groen, T., Witter, M.P. (2006) Verapamil prevents, in a dose dependet way, the loss of ChaT-immunoreactive neurons in the cerebral cortex following lesions of the rat nucleus basalis magnocelularis. *Exp. Brain. Res.*, 170:368-375.

Quillfeldt, J.A. (2006) Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. *Manuscrito do Autor*.

Raghupathi, R. (2004) Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathology*, 14(2):215-222.

Rakic, P. (2005) Radial glial cells: scaffolding for cortical developmental and evolution, *in Neuroglia*. 2°ed., New York, Oxford University Press.

Ridley, R.M., Barefoot, H.C., Maclean, C.J., Pugh, P., Baker, H.F. (1999) Different effects on learning ability after injection of the cholinergic imunotoxin ME20. *Behavioural Neuroscience*, 113:303-315.

Robinson, S.R. (2000) Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochemistry International*, 36:471-482.

Sato, A., Sato, Y., Uchida, S. (2004) Activation of the intraceebral cholinergic nerve fibers originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters*, 36:90-93.

Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298:789-791.

Selkoe, D.J. (2004). Alzheimer disease: mechanicist understanding predicts novel therapies. *Annals of Internal Medicine* 140:627-638.

Skoog, I. (1998) Status of risk factors for vascular dementia. *Neuroepidemiology*, 17(1):2-9.

Sonkusare, S.K., Kaul, C.L., Ramarao, P. (2005) Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: memantine, a new hope. *Pharmacological Research*, 51:1-17.

Stepanichev, M.Y., Onufriev, M.V., Yakovlev, A.A., Khrenov, A.I., Peregud, D.I., Vorontosa, O.N., Lazareva, N.A., Gulyaeva, N.V. (2008) Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochemistry International*, 52:1114-1124.

Sulejczack, D., Grieb, P., Walski, M., Front-Czack-Baniewicz, M. (2008) Apoptotic death of cortical neurons following surgical brain injury. *Folia Neuropathology*, 46:213-219.

Swanson, R.A. (2005) Astrocyte neurotransmitter uptake, *in Neuroglia*. 2^oed., New York, Oxford University Press.

Tian, Q., Lin, Z.Q., Wang, X.C., Chen, J., Gong, C.X., Wang, J.Z. (2004). Injection of Okadaic acid into the Meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience*, 126: 277-284.

Toledano, A., Álvarez, M.I. (2004) Lesions and dysfunctions of the nucleus basalis as Alzheimer's disease model: general and critical overview and analysis of the long-term changes in several excitotoxic models. *Current Alzheimer's Research*, 1:189-214.

Tramontina, A.C., Tramontina, F.C., Bobermin, L.D., Zanotto, C., Souza, D.F., Leite, M.C., Nardin, P., Gottfried, C., Gonçalves, C.A. (2008) Secretion of S100B, an astrocytes-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry*, 32:1580-1583.

Tramontina, F., Tramontina, A.C., Souza, D.F., Leite, M.C., Gottfried, C., Souza, D.O., Wofchuck, S.T., Gonçalves, C.A. (2006) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Molecular Neurobiology*, 26(1):81-86.

Tramontina, F., Karl, J., Gottfried, C., Medez, A, Gonçalves, D., Portela, D.V., Gonçalves, C.A . (2000) Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss S100B by ELISA. *Brain Research Protocols*, 6:86-90.

Van der Zee, C.E., Ross, G.M., Riopelle, R.J., Hagg. (1996) Survival cholinergic forebrain neurons in developing p75NGF deficient mice. *Science*, 274:1729-1732.

Van Eldik, L. (2001) Glia and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 39:329-331.

Van Eldik, L., Wainwright, M.S. (2003) The Janus face of glial derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 21: 97-108.

Vicente, E., Degerone, D., Bohn, L., Scornavaca, F., Pimentel, A., Leite, M.C., Swarowsky, A., Rodrigues, L., Nardin, P., Almeida, L.M., Gottfried, C., Souza, D.O., Netto, C.A., Gonçalves, C.A. (2009) Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Research*, 1251:204-212.

Wanamacher, L. (2005) Demência: evidências contemporâneas sobre a eficácia dos tratamentos. *Revista de Psiquiatria Clínica, Faculdade de Medicina/USP*, 2(4):1-6.

Wendel A (1981): Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.

Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., Pekny, M. (2006) Redefining of concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *PNAS*, 103(46): 17513-17518.

Yamamoto, M., Chikuma, T., Kato, T. (2003) Changes in the levels of neuropeptides and their metabolizing enzymes in the brain regions of nucleus basalis magnocellularis lesioned rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 92:400-410.

Zlokovic, B. (2005) Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in Neuroscience*, 28(4):202-208.

World Health Organization - www.who.int/en

North American Mycological Association – www.nama.com