

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

**Ontogenia das Proteínas Aquaporina-4 e Kir 4.1 e o Efeito de  
Inibidores dessas Proteínas sobre a Secreção de S100B em Fatias  
Hipocâmpais de Rato**

**Caroline Zanotto**

**Orientador: Prof. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves**

Porto Alegre, março de 2011.

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

**Ontogenia das Proteínas Aquaporina-4 e Kir 4.1 e o Efeito de Inibidores dessas Proteínas sobre a Secreção de S100B em Fatias Hipocâmpais de Rato**

**Caroline Zanotto**

**Orientador: Prof. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, março de 2011.

“A mente que se abre a  
uma nova ideia jamais voltará  
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

## **Agradecimentos**

Ao CA, agradeço pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos, pela atenção, pela amizade e por ter acreditado em mim. Obrigada Chefe!

À Carminha, pelos ensinamentos, ajuda e amizade.

À Rê e Cris, minhas queridas bolsistas doutorandas. Agradeço de coração toda ajuda, não sei o que seria de mim sem o trabalho de vocês. Obrigada também pelo carinho, amizade e por tornarem os nossos dias de trabalho muito mais divertidos.

À Marina, obrigada pela amizade, ensinamentos e colaboração em todo o trabalho.

À Pati, Maria Cristina e Fê, obrigada pelas dicas, amizade, carinho e conversas compartilhadas.

Ao Lucas, obrigada por toda ajuda e ensinamentos, mas principalmente pela nossa amizade e por tu ser o responsável por hoje eu estar no laboratório.

À Nina e Lets agradeço pela amizade e pela enorme colaboração nesse trabalho.

Aos colegas do Lab 33: Ana Carolina, Beta, Ana Paula, Caren, Carol, Krista, Paula, Jô, Adri, Tamara, Márcio, Dani, Elisa, Fafá, Jaque, Paulo, Brisa, Maria da Graça, Núbia, André, Lari, Victório, Júlia, Emerson e demais colegas do Lab 33, obrigada pela ajuda, amizade e agradável convivência.

Às colegas e amigas do PPG Neuro, obrigada pela amizade e pelas risadas e problemas compartilhados.

Aos meus amigos, agradeço por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Obrigada por escutarem minhas reclamações com muita paciência e me convencerem que tudo daria certo. Vocês tornam minha vida muito mais alegre.

À minha família, em especial meus pais Rosi e Omar e minha irmã Marina, obrigada por sempre me apoiarem, me incentivaram, pela preocupação, pelo amor e por compartilharem comigo esse momento. Amo vocês.

## Sumário

Resumo .....	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas.....	3
I. Introdução.....	4
I.1 Astrócitos na Organização do Sistema Nervoso Central .....	4
I.2 Proteínas Aquaporinas .....	6
I.2.1 Proteína Aquaporina-4 .....	9
I.2.1.1 Aquaporina-4 no Desenvolvimento Cerebral.....	10
I.3 Canais de Potássio.....	11
I.3.1 Canais Kir 4.1 no SNC.....	12
I.3.1.1 Relação funcional entre Kir 4.1 e AQP-4 .....	13
I.4 Proteínas S100.....	14
I.4.1 Proteína S100B.....	14
I.4.1.1 Papéis Intracelulares.....	15
I.4.1.2 Papéis Extracelulares.....	15
II. Objetivos.....	18
III. Artigo a ser Submetido ao Periódico Journal of Neural Transmission: Inhibition of aquaporin-4 stimulates S100B secretion in hippocampal slices from young rats .....	19
IV. Discussão.....	48
V. Conclusões.....	58
VI. Referências Bibliográficas .....	59

## Resumo

A aquaporina-4 (AQP-4) é o principal canal de água localizado no sistema nervoso central (SNC). Durante o aumento do potássio ( $K^+$ ) extracelular, a captação de  $K^+$  pelos astrócitos está provavelmente associada com o co-transporte de água. Neste caso, a AQP-4 poderia servir como uma rota de saída para a água, e isto seria vantajoso para a liberação de  $K^+$  se a permeabilidade à água da AQP-4 fosse aumentada pela alta concentração de  $K^+$  extracelular. Diversos estudos demonstraram a sobreposição da expressão ontogenética de AQP-4 e do canal retificador interno de  $K^+$  Kir 4.1, sugerindo uma associação molecular da AQP-4 e Kir 4.1 no tamponamento espacial do  $K^+$ , o que facilitaria o movimento de água através da membrana plasmática.

A S100B é uma proteína expressa e secretada no SNC principalmente por astrócitos, que possui efeitos neurotróficos quando expressa em concentrações nanomolar (nM) e efeitos neurotóxicos quando presente em concentrações micromolar ( $\mu$ M). Foi demonstrado um aumento compensatório na AQP-4 em resposta a superexpressão de S100B, no entanto ainda não foi demonstrado se a AQP-4 ou os canais Kir 4.1 podem modular a secreção de S100B. Além disso, há poucos relatos sobre as alterações da expressão de AQP-4 e Kir 4.1 ao longo do desenvolvimento cerebral.

Nós investigamos se a secreção de S100B é alterada em fatias hipocâmpais de ratos com diferentes idades (15, 30, 45, 60 e 90 dias) expostas à inibidores de AQP-4 e Kir 4.1 e se ocorrem alterações na expressão de AQP-4 e Kir 4.1 em cérebros de ratos com 15, 30, 60 e 90 dias. Observamos um aumento na secreção de S100B em hipocâmpos de ratos mais jovens expostos a acetazolamida (AZA) e tetraetilamônio (TEA), inibidores de AQP-4, e uma diminuição na secreção de S100B em hipocampo de ratos expostos a cloreto de bário ( $BaCl_2$ ), inibidor de Kir 4.1. Também encontramos uma diminuição na expressão de AQP-4 nos hipocâmpos de ratos com 60 e 90 dias quando comparados com os mais jovens e uma diminuição na expressão de Kir 4.1 em animais de 90 dias. Apesar da AQP-4 e Kir 4.1 estarem co-localizadas e apresentarem um padrão de expressão similar, o mecanismo pelo qual estas proteínas modulam a secreção de S100B parece ser independente.

## Abstract

The aquaporin-4 (AQP-4) is the main water channel located in the central nervous system (CNS). During the increase of extracellular potassium ( $K^+$ ), this is taken up by astrocytes and probably is associated with the co-transport of water. In this case, the AQP-4 could serve as an exit route for the water, and it would be advantageous for the release of  $K^+$  if the permeability to water of AQP-4 was increased by high extracellular  $K^+$  concentration. Several studies have demonstrated the overlap between ontogenetic expression of AQP-4 and inwardly rectifying  $K^+$  channel Kir 4.1, suggesting a molecular association of AQP-4 and Kir 4.1 in the  $K^+$  spatial buffer, which facilitates the trespass of water across the plasma membrane.

The S100B protein is expressed and secreted by astrocytes in the CNS, which has neurotrophic effects when expressed in the nanomolar (nM) concentrations and neurotoxic effects when present at concentrations micromolar ( $\mu$ M). It has been shown a compensatory increase in AQP-4 in response to overexpression of S100B, but has not yet been demonstrated if the AQP-4 channels or Kir 4.1 may modulate the secretion of S100B. In addition, there are few reports showing changes in the expression of Kir 4.1 and AQP-4 along the developing brains.

We investigated whether S100B secretion is altered in hippocampal slices from rats with different ages (15, 30, 45, 60 and 90 days old) exposed to inhibitors of AQP-4 and Kir 4.1 and if there are changes in the expression of AQP-4 and Kir 4.1 in brain of 15, 30, 60 and 90-days old rats. We observed an increase in S100B secretion in hippocampus of younger rats exposed to tetraethylammonium (TEA) and acetazolamide (AZA), AQP-4 inhibitors and a decrease in the secretion of S100B in hippocampus of rats exposed to barium chloride ( $BaCl_2$ ), an inhibitor of Kir 4.1. We also found a decrease in AQP-4 expression in hippocampus of rats with 60 and 90 days old when compared with younger rats and a decrease in the expression of Kir 4.1 in 90-days old animals. Despite the Kir 4.1 and AQP-4 are co-located and present a similar pattern of expression, the mechanism by which these proteins modulate S100B secretion seems to be independent.

**Lista de Abreviaturas**

AQP-1-13, Aquaporina subtipos de 1 a 13

AZA, Acetazolamida

BHE, Barreira Hemato-encefálica

ERO, Espécie Reativa de Oxigênio

GFAP, Proteína Fibrilar Glial Ácida

IL-1 $\beta$ , Interleucina 1-beta

IL-6, Interleucina 6

ICV, Intracerebroventricular

Kir, Canais Retificadores Internos de Potássio

LCR, Líquido Cérebro-espinhal

NF- $\kappa$ B, Fator de Transcrição Nuclear kapa B

SNC, Sistema Nervoso Central

TEA, Tetraetilamônio

TNF- $\alpha$ , Fator de Necrose Tumoral-alfa



## **I. Introdução**

### **I.1 Astrócitos na Organização do Sistema Nervoso Central**

O sistema nervoso central (SNC) é constituído por dois grupos de células, os neurónios e as células gliais (Jessen 2004). Por muito tempo, as células gliais foram consideradas apenas um suporte neuronal, porém hoje se sabe que a glia possui um papel ativo e vital no SNC, não sendo apenas um apoio metabólico para os neurónios (Volterra & Meldolesi 2005). As células gliais são classificadas em dois grupos: a macroglia e a microglia. A microglia é composta por células de origem mesodérmica envolvidas na resposta inflamatória, já a macroglia é constituída pelos astrócitos, oligodendrócitos e células endimárias (Perea & Araque 2005). Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC (Gee & Keller 2005) e devido a um crescente interesse nestas células, pesquisas revelaram que os astrócitos são células multifuncionais, dentre essas funções podemos citar:

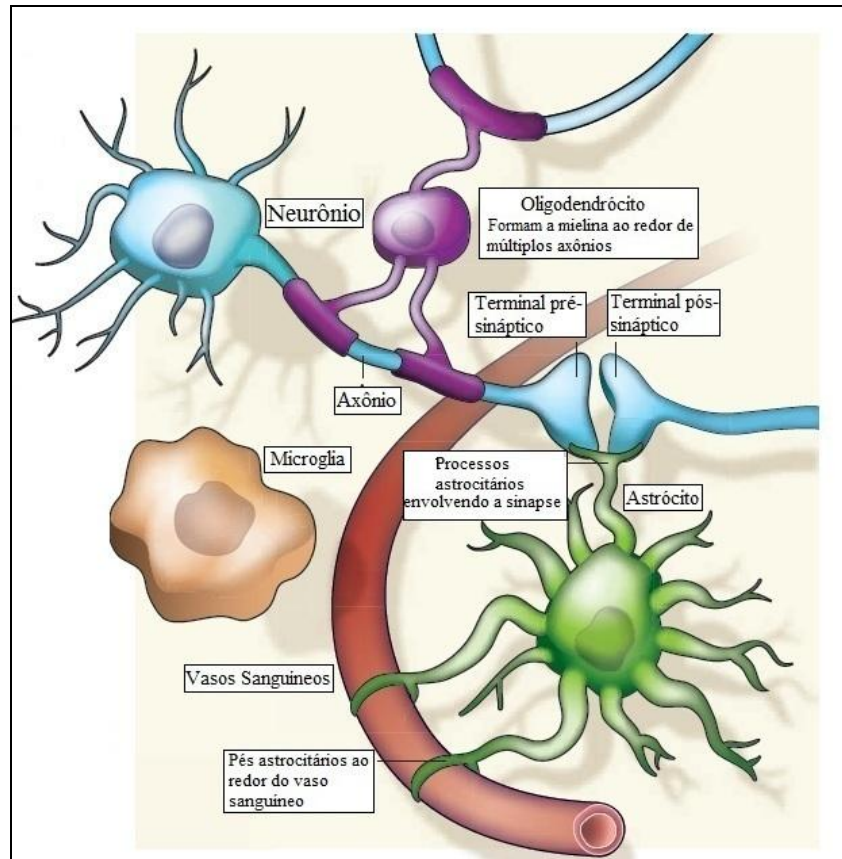
- a) Modulam a transmissão sináptica, exercendo papel no processamento de informações no cérebro (Allen & Barres 2005).
- b) Produzem e regulam fatores tróficos que regulam a morfologia, proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurónios e células gliais (Gee & Keller 2005).
- c) Atuam como suporte energético, estocando glicogénio, que é degradado e fornecido aos neurónios em situações de necessidade (Brown & Ransom 2007).
- d) No início do desenvolvimento do SNC, as células da glia auxiliam na migração dos neurónios até seu sítio definitivo (Jessen 2004).

- e) Direcionam e participam da formação das sinapses durante o desenvolvimento, produzem o refinamento das conexões sinápticas e promovem sinaptogênese por sinalização mediada por contato astrócito-neurônio (Jessen 2004).
- f) São essenciais no catabolismo e síntese de novos aminoácidos no cérebro (Maragakis & Rothstein 2006).
- g) Regulam níveis extracelulares de glutamato (Maragakis & Rothstein 2006).
- h) Participam da resposta imune central (Gee & Keller 2005).
- i) Resposta à injúria cerebral. Esta resposta glial é denominada gliose reativa ou “cicatriz glial” e inicia com o recrutamento de vários tipos celulares, sendo a constituição final predominantemente astrocítica. Além disso, essa resposta envolve a produção de fatores tróficos, citocinas, proteases, inibidores de proteases, moléculas da superfície e da matriz celular. Uma das características da gliose reativa é o aumento da síntese da proteína fibrilar glial ácida (GFAP) que compõe os filamentos intermediários dos astrócitos (Fawcett & Asher 1999).
- j) Tamponam o meio extracelular mantendo a homeostase iônica e da água, removendo o excesso de neurotransmissores da fenda sináptica e auxiliando na formação e manutenção da barreira hemato-encefálica (BHE) (Simard & Nedergaard 2004).

A manutenção da homeostase hidroiônica é essencial para o funcionamento normal do SNC. Ela mantém-se devido à presença de canais iônicos e/ou transportadores permeáveis nos astrócitos, o que possibilita o tamponamento de vários íons como potássio ( $K^+$ ), sódio ( $Na^+$ ), cloreto ( $Cl^-$ ), prótons ( $H^+$ ), bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) e de água (Simard & Nedergaard 2004).

Durante a atividade elétrica neuronal, o  $K^+$  é transferido dos neurônios para o espaço extracelular, onde, quando acumulado, pode alterar esta excitabilidade elétrica. Os

astrócitos, através de carreadores e canais de membranas, ajudam na remoção do  $K^+$ , já que a recaptção pelos neurônios e a difusão através do espaço extracelular não são suficientes para prevenir o acúmulo deste íon (Del Bigio 2001).



**Figura 1.** Interações entre neurônios e glia. Adaptado de (Allen & Barres 2009).

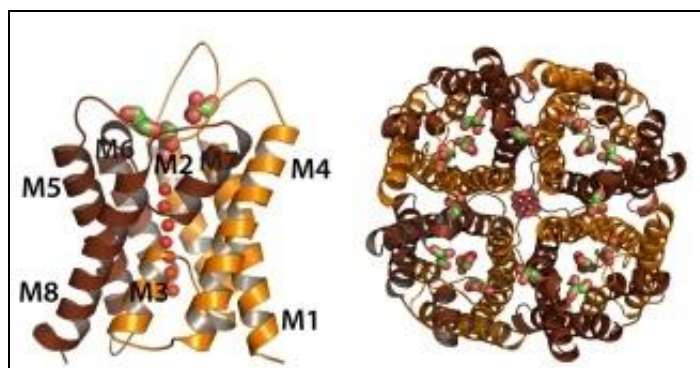
## I.2 Proteínas Aquaporinas

As aquaporinas (AQPs) representam uma família de proteínas de membrana que funcionam como canais de água. Possuem peso molecular em torno de 30 KDa e desempenham um papel crítico no controle do conteúdo de água das células e, em alguns casos, facilitam o transporte de outros pequenos solutos através das membranas. Esses

canais são amplamente distribuídos em todos os organismos e estão presentes, principalmente, onde uma rápida ou alta passagem de moléculas de água é necessária, permitindo que a função celular seja desempenhada. Estas observações demonstram o papel fundamental das AQPs na manutenção das funções fisiológicas normais dos organismos (Zheng et al. 2010).

O transporte de água e solutos via AQPs é bidirecional. Ele é guiado pela diferença das pressões osmótica e hidrostática, ou pela diferença das concentrações do soluto entre o espaço intracelular e extracelular. A intensidade do transporte é também determinada pela permeabilidade de um único canal de AQP e pela sua abundância na membrana celular (Zelenina 2010).

A maioria das AQPs apresenta uma organização estrutural comum. Esta estrutura consiste em 300 aminoácidos, com seis domínios transmembrana e terminais amino ( $\text{NH}_2$ -) e carboxila ( $\text{COOH}$ -) localizados intracelularmente. Em membranas biológicas, AQPs formam tetrâmeros (Zelenina 2010).



**Figura 2.** Estruturas monomérica e tetramérica da aquaporina-4. Adaptado de (Ho et al. 2009).

Já foram identificados 13 tipos de AQPs em mamíferos (AQP-0-AQP-12), e embora sua principal função seja transportar água, alguns tipos de AQPs, conhecidos como aquagliceroporinas, também aumentam a permeabilidade a pequenas moléculas, como glicerol (AQP-3, 7 e 9), uréia (AQP-3, 7, 8 e 9) e amônia (AQP-8). A maioria das AQPs está localizada na membrana plasmática (AQP-0, 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10), enquanto outras estão quase que exclusivamente em membranas intracelulares (AQP-6, 11, 12) (Liu et al. 2008).

As AQPs estão distribuídas amplamente pelo corpo, mas notavelmente nos rins, hemácias, pulmões e epitélios secretores, como as glândulas salivares (Owler et al. 2010).

No SNC há vários subtipos de AQPs identificadas em diferentes estruturas cerebrais, como nos plexos coróides (AQP-1), astrócitos (AQP-1, 3, 4, 5, 8, 9), oligodendrócitos (AQP-8), neurônios (AQP-1, 5 e 8), tanicitos (AQP-9) e células endoteliais (AQP-1, 4 e 9). As AQPs possuem diversos papéis, incluindo a via bidirecional de água entre o cérebro e os vasos sanguíneos encefálicos, formação do líquido cérebro-espinhal (LCR) e possuem funções em algumas condições patofisiológicas (Barbara 2010).

Embora tenham sido descritos seis subtipos de AQPs em células encefálicas de roedores, apenas três AQPs (AQP-1, 4 e 9) estão claramente identificadas em células cerebrais *in vivo* (Zheng et al. 2010). A AQP-4 é o canal de água predominante no cérebro, ela está envolvida na formação e resolução do edema cerebral e no tamponamento do  $K^+$  liberado durante a atividade neuronal. Os três subtipos de AQPs têm sua expressão fortemente aumentada em astrócitos reativos (em resposta a um dano encefálico) e em tumores cerebrais (Zelenina 2010).

### I.2.1 Proteína Aquaporina-4

A proteína AQP-4 é a principal AQP no cérebro de mamíferos, foi primeiramente clonada de pulmões de ratos e encontrada em tecidos eletricamente excitáveis, incluindo o encéfalo, medula espinhal, retina e músculo esquelético (Tait et al. 2008).

A AQP-4 pode espontaneamente reunir-se em arranjos regulares, que são chamados arranjos ortogonais de partículas. Esta proteína possui duas variações de *splice* alternativas, resultado da translação diferenciada das metioninas iniciantes, começando com Met1 (M1) ou Met23 (M23) (Zheng et al. 2010).

A AQP-4 cerebral é fortemente expressa nas bordas entre o parênquima cerebral e os principais compartimentos de fluidos, incluindo os processos dos pés astrocitários (cérebro-sangue), limitantes gliais (cérebro- LCR subaracnóideo), células ependimárias e astrócitos subependimais (cérebro- LCR ventricular) (Tait et al. 2008). Nos astrócitos, a AQP-4 está enriquecida em três localizações, o que irá determinar qual função esta proteína desempenhará: nos pés astrocitários, onde está envolvida com a função da BHE, nos processos perisinápticos, onde está implicada na liberação de neurotransmissores, e em processos que estão em contato com os nodos de Ranvier e axônios não-mielinizados, onde está envolvida no tamponamento de  $K^+$  (Zelenina 2010).

A AQP-4 expressa em astrócitos desempenha um importante papel no edema cerebral decorrente de isquemia, hipóxia, trauma (contusões e intervenções cirúrgicas), tumores, inflamações (meningites) e distúrbios metabólicos (hiponatremia, hiperamonemia e uremia) (Zelenina 2010).

As proteínas AQPs podem sofrer regulação de curta ou longa duração. A regulação de curta duração pode ser mediada por alterações conformacionais ou abertura e fechamento

de canais, como resultado desta regulação dinâmica, a permeabilidade ou a localização subcelular (abundância na membrana) dos canais de AQPs pode ser alterada em segundos ou minutos, levando a alterações imediatas na permeabilidade da membrana. Já a regulação de longa duração é mediada por alteração no RNAm de AQPs, síntese de proteínas ou grau de degradação. Estas mudanças alteram em horas ou dias a abundância de AQPs e, então, a permeabilidade da membrana onde as AQPs estão localizadas (Zelenina 2010).

No entanto, ainda não existem moduladores conhecidos e específicos para a AQP-4. Inibidores seriam esperados para a redução do edema cerebral citotóxico, enquanto ativadores de AQP-4 poderiam reduzir o edema vasogênico. Devido ao fato da AQP-4 facilitar a migração de astrócitos reativos em um sítio de injúria e a infiltração de astrócitos reativos num glioblastoma, sugere-se que inibidores de AQP-4 poderiam reduzir a gliose reativa, aumentar potencialmente a regeneração neuronal, e também poderiam limitar a infiltração de astrocitomas (Saadoun & Papadopoulos 2010).

### **I.2.1.1 Aquaporina-4 no Desenvolvimento Cerebral**

No início do desenvolvimento, o espaço extracelular ocupa uma grande fração do volume cerebral e permite a rápida difusão de água e  $K^+$ . Contudo, as células neurais proliferam, crescem, e o espaço extracelular diminui gradativamente para atingir o volume característico do encéfalo adulto. Este espaço extracelular restrito não pode acomodar o fluxo de íons e água que é gerado pela atividade neuronal, então estas células possuem mecanismos para o tamponamento de  $K^+$  e água que podem compensar a perda da grande distribuição de volume extracelular (Wen et al. 1999).

A AQP-4 pode servir como uma rota na redistribuição da água dependente da atividade por circundar agentes osmóticos e guiar o fluxo de água para compartimentos extracelulares específicos. Estudos demonstraram que a ontogenia da AQP-4 é temporariamente correlacionada com a maturação dos canais de  $K^+$  e a regulação do volume, atestando o papel crítico da AQP-4 na homeostase da água no SNC (Vajda et al. 2000).

### **I.3 Canais de Potássio**

Uma alta permeabilidade seletiva da membrana a íons  $K^+$  e um potencial de repouso da membrana fortemente negativo são consideradas propriedades fundamentais das células gliais (Butt & Kalsi 2006). Não apenas neurotransmissores, mas também o  $K^+$  liberado durante a atividade neuronal é removido do espaço extracelular pelos astrócitos (Zelenina 2010).

A regulação do balanço de água e íons é crucial para o funcionamento normal do SNC. Há indicações que o edema cerebral, como consequência de diversos estados patológicos, causa alterações nas concentrações de eletrólitos e no volume do espaço intersticial, o que altera criticamente a atividade fisiológica da rede neuronal (Benfenati & Ferroni 2010).

A homeostase do  $K^+$  é essencial para o controle da excitabilidade neuronal e está conectada com os mecanismos de controle do volume dos fluidos encefálicos. A captação de  $K^+$  pela glia ocorre através de captação ativa, co-transporte e principalmente por canais retificadores internos de  $K^+$  (Kir) (Kalsi et al. 2004).

A glia expressa uma ampla variedade de canais de  $K^+$ , porém os canais Kir são predominantemente responsáveis pela alta permeabilidade ao  $K^+$  e manutenção do potencial de repouso da membrana perto do potencial de equilíbrio do  $K^+$  (Butt & Kalsi 2006). Os



canais Kir possuem alta seletividade aos íons  $K^+$  e uma condutância muito melhor no potencial de membrana negativo do que no positivo (Yool 2007).

A família de canais Kir é geralmente dividida com base em seus atributos moleculares e eletrofisiológicos em sete subfamílias (Kir 1.0 – Kir 7.0), os quais têm mais de vinte membros. Além disso, esses canais possuem estruturas tetraméricas e podem ser formados pela união de subunidades Kir heteroméricas e homoméricas, as quais proporcionam aos canais propriedades distintas e aumentam sua diversidade funcional (Butt & Kalsi 2006).

Os canais Kir são efetivos no controle do potencial de membrana, estabilizando o estado de repouso das células, e servindo como alvos para a modulação da excitabilidade em uma variedade de tarefas fisiológicas incluindo a modulação da excitabilidade neuronal, o controle da frequência cardíaca, fluxo sanguíneo, liberação de insulina, entre outras funções (Yool 2007).

As subunidades Kir desempenham importantes papéis em doenças poligênicas do SNC, como na epilepsia e doença de Parkinson (Masaki et al. 2010).

### **I.3.1 Canais Kir 4.1 no SNC**

O canal retificador interno de potássio Kir 4.1 é grandemente responsável pelo estabelecimento e manutenção do potencial de repouso da membrana glial, e parece ser, mesmo que parcialmente, responsável pelo fluxo transmembrana de  $K^+$  no tamponamento espacial deste íon (Olsen & Sontheimer 2008).

Estes canais podem ser homoméricos Kir 4.1 ou heteroméricos Kir 4.1/5.1, os quais são distribuídos diferentemente em processos específicos (Hibino & Kurachi 2007). No SNC, observa-se a expressão de Kir 4.1 principalmente em astrócitos e oligodendrócitos

(Hartel et al. 2007), nos astrócitos sua expressão parece ocorrer nos processos ao redor das sinapses e nos domínios de membrana voltados para a pia mãe e vasos sanguíneos, onde estão envolvidos no tamponamento do elevado  $K^+$  extracelular liberado durante a atividade neuronal (Ohno et al. 2007). Sabe-se que a corrente iônica por esses canais pode ser inibida por cloreto de bário ( $BaCl_2$ ) (Hartel et al. 2007).

Em camundongos *knock-out* para Kir 4.1, a ausência deste canal resultou numa dramática redução das correntes Kir, despolarização e diminuição da capacidade das células gliais no tamponamento de  $K^+$ . Além disso, a localização subcelular dos canais Kir 4.1 é consistente com o papel específico da glia no transporte do  $K^+$  entre os neurônios e vasos sanguíneos (Butt & Kalsi 2006).

#### **I.3.1.1 Relação funcional entre Kir 4.1 e AQP-4**

Durante o aumento do  $K^+$  extracelular, que ocorre nos espaços ao redor dos nodos de Ranvier e axônios não-mielinizados, a captação de  $K^+$  pelos astrócitos é provavelmente associada com o co-transporte de água. Neste caso, a AQP-4 que é expressa nestes locais, poderia servir como uma rota de saída para a água, e isto seria vantajoso para a liberação de  $K^+$  se a permeabilidade a água da AQP-4 fosse aumentada pela alta concentração de  $K^+$  extracelular (Zelenina 2010).

Há evidências teóricas e experimentais em diversas regiões do SNC que a elevação da concentração de  $K^+$  causada pela atividade neuronal produz uma diminuição no espaço extracelular, isto devido ao aumento transitório no volume dos pés astrocitários, o qual é mediado por um alto índice de acúmulo de fluidos acompanhando a captação de  $K^+$ . Diversos estudos demonstraram a sobreposição da expressão ontogenética de Kir 4.1 e

AQP-4 tanto em astrócitos como nas células de Müller na retina, sugerindo uma associação molecular da AQP-4 e Kir 4.1 no tamponamento espacial do  $K^+$ , o que facilitaria o movimento de água através da membrana plasmática (Benfenati & Ferroni 2010).

#### **I.4 Proteínas S100**

As proteínas S100 são chamadas desta maneira por serem solúveis em solução 100% saturada de sulfato de amônio (Moore 1965). Essas proteínas são caracterizadas por serem ligantes de cálcio, do tipo EF-hand e por não apresentarem distribuição homogênea em todos os tipos celulares. Atualmente já foram identificadas 21 proteínas pertencentes a essa família. Elas são codificadas por genes distintos, localizados em diversos cromossomos e são expressas de forma específica por alguns tipos celulares. Por exemplo, no SNC neurônios expressam a S100A1, enquanto a S100B é expressa em astrócitos (Donato 2001).

##### **I.4.1 Proteína S100B**

A S100B possui peso molecular de 21 KDa e apresenta estrutura homodimérica, na qual cada monômero possui dois sítios EF-hand de ligação para o cálcio e também sítios independentes de ligação para o zinco. A S100B apresenta duas pontes dissulfeto, mas sua estrutura dimérica é mantida independentemente (Goncalves et al. 2008).

No SNC, a S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos, onde exerce efeitos autócrinos. Ela também desempenha papéis parácrinos em neurônios e microglia (Goncalves et al. 2008).

O mecanismo de secreção da S100B ainda não está elucidado, porém são conhecidos diversos moduladores desta proteína, como a serotonina, amônia, altas concentrações de glicose, altas concentrações de glutamato, forskolina, ácido lisofosfatídico e beta-hidroxibutirato (Goncalves et al. 2008).

Níveis elevados de S100B são observados no soro de pacientes portadores de Síndrome de Down e no líquido de pacientes com a Doença de Alzheimer, sugerindo que a S100B pode ter um papel na patogênese de distúrbios cerebrais (Esposito et al. 2008, Peskind et al. 2001). Quando atua como citocina, a S100B pode participar da fisiologia de doenças neurodegenerativas típicas ou de situações inflamatórias, que provavelmente irão gerar uma distúrbio do tipo Alzheimer (Donato 2001).

#### **I.4.1.1 Papéis Intracelulares**

Intracelularmente, a proteína S100B pode regular a polimerização do citoesqueleto celular, inibindo a fosforilação da GFAP, vimentina e também da GAP-43, uma proteína específica de neurônios, modulando dessa maneira a plasticidade, metabolismo energético e proliferação celular (Van Eldik & Wainwright 2003). A S100B também é capaz de se ligar a várias proteínas alvo, como a proteína cinase C (PKC), fator anti-apoptótico Bcl-2 ou à proteína supressora tumoral p53 (Donato 2001).

#### **I.4.1.2 Papéis Extracelulares**

A proteína S100B pode ter efeitos extracelulares tóxicos ou tróficos dependendo da concentração em que é secretada. Quando expressa na ordem de nanomolar possui efeitos

neurotróficos, promovendo o crescimento de neuritos, aumentando a sobrevivência neuronal, modulando as sinapses e exercendo um papel neuroprotetor após dano cerebral. A S100B exerce seu papel neurotrófico possivelmente por mecanismos de interação com o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), estimulação do fator de transcrição NF $\kappa$ B e por promover o aumento da expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2 nos neurônios (Van Eldik & Wainwright 2003).

Em concentrações na ordem de micromolar, a S100B tem efeitos neurotóxicos, possivelmente por mecanismos dependentes da indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) em células gliais e neurônios (Van Eldik & Wainwright 2003) e por estimular a secreção de óxido nítrico por astrócitos e microglia (Donato 2001). Os efeitos neurotóxicos da S100B também parecem ser mediados pelo receptor RAGE (Huttunen et al. 2000).

A proteína S100B pode ser considerada um marcador de lesão cerebral aguda ou crônica por ocorrer uma elevação em sua concentração no soro e no LCR em resposta à ativação glial (Rothermundt et al. 2003).

A S100B apresenta alterações na sua expressão e secreção durante o desenvolvimento cerebral. Sabe-se que ocorre um aumento na expressão desta proteína duas semanas após o nascimento, sugerindo o possível envolvimento da S100B na proliferação glial e plasticidade sináptica durante o desenvolvimento precoce (Tramontina et al. 2002).

Talvez haja uma relação entre a proteína S100B e proteínas expressas em outros cromossomos, como a AQP-4. O gene para a proteína S100B está localizado no cromossomo 21, em situações nas quais a expressão dos genes desse cromossomo é aumentada, como por exemplo na Síndrome de Down, ocorrem alterações na regulação

transcricional de vários outros genes, podendo modificar a expressão de proteínas localizados em outros cromossomos, como a AQP-4 que está localizada no cromossomo 18. Na condição anteriormente mencionada, o aumento na expressão de S100B poderia induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ativar cinases que respondem ao estresse, isto provocaria um aumento compensatório na expressão de AQP-4 (Esposito et al. 2008).

## II. Objetivos

- ✓ Verificar a relação funcional existente entre AQP-4, Kir 4.1 e a secreção da proteína S100B em fatias hipocâmpais de ratos Wistar machos com idade de 15, 30, 45, 60 e 90 dias através da inibição da AQP-4 com AZA ou TEA e do bloqueio de Kir 4.1 com BaCl<sub>2</sub>.
  
- ✓ Verificar as mudanças na expressão ontogenética de AQP-4 e Kir 4.1 em cérebros de ratos Wistar machos com idade de 15, 30, 60 e 90 dias.

**III. Artigo a ser Submetido ao Periódico Journal of Neural Transmission**

**Inhibition of aquaporin-4 stimulates S100B secretion in hippocampal slices from young rats**



**Inhibition of aquaporin-4 stimulates S100B secretion in hippocampal slices from young rats**

Caroline Zanotto<sup>1</sup>, Renata Torres Abib<sup>1</sup>, Cristiane Batassini<sup>1</sup>, Lucas Silva Tortorelli<sup>1</sup>, Regina Biasibetti<sup>1</sup>, Letícia Rodrigues<sup>1</sup>, Maria Cristina Barea Guerra<sup>1</sup>, Carmem Gottfried<sup>1</sup>, Marina Concli Leite<sup>1</sup>, Carlos-Alberto Gonçalves<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brazil

E-mail: [casg@ufrgs.br](mailto:casg@ufrgs.br)

Fax: 55-51-3308 5535

## **Abstract**

Aquaporin-4 (AQP-4) is the principal brain water channel and is predominantly expressed in astrocytes, surrounding synapses and capillary vessels, suggesting its dynamic involvement in water homeostasis in brain tissue. Due to the co-localization of AQP-4 and inward rectifier K<sup>+</sup> channels Kir 4.1, a functional coupling between these proteins has been proposed. AQP-4 has a putative role in the physiopathology of brain disorders including ischemia, epilepsy and trauma. S100B is a calcium-binding protein expressed and secreted by astrocytes, and commonly used as a parameter of astroglial activation. Here, we investigate a possible link between AQP-4 activity (and Kir 4.1) and S100B secretion in hippocampal slices of rats of different ages (15, 30, 60 and 90-days old) using inhibitors of AQP-4 (AZA, acetazolamide and TEA, tetraethylammonium) and Kir 4.1 (barium chloride). We found that blockade of AQP-4 with TEA and AZA produced an increase in S100B secretion in young rats, compatible with an astroglial activation observed in many conditions of brain injury. On the other hand, BaCl<sub>2</sub> induced Kir 4.1 inhibition caused a decrease in S100B secretion, at any age analyzed. Both channels, AQP-4 and Kir 4.1, exhibited a similar ontogenetic profile, in spite of the functional uncoupling, in relation to S100B secretion. These data, together with previous observations from gap junctions and glutamate transport of astrocytes, contribute to characterize the operational system involving astroglial activation, particularly on S100B secretion, in brain disorders.

**Key words:** aquaporin-4, hippocampus, inwardly rectifier K<sup>+</sup> channel Kir 4.1, S100B.

## Introduction

Aquaporin-4 (AQP-4) is the principal brain water channel, and is predominantly expressed in astrocytes and ependymal cells (Yool 2007). The elevated expression of AQP-4 in astrocytes surrounding synapses and capillary vessels suggests its dynamic involvement in water homeostasis in the brain tissue. This aquaporin has gained much attention due to its putative role in the pathophysiology of brain disorders including ischemia, epilepsy and traumatic brain disease, tumor-induced brain swelling, infections and hydrocephalus (Papadopoulos & Verkman 2007).

Due to the co-localization between the AQP-4 and potassium channels, particularly subtype 4.1 of the inwardly rectifier K<sup>+</sup> channels (Kir 4.1), a functional coupling between these proteins has been proposed (e.g Nagelhus et al. 2004). Astrocytes express multiple Kir channel subtypes, however Kir 4.1 is predominantly expressed in these cells and it seems to be the primary mechanism in maintaining the extracellular K<sup>+</sup> homeostasis needed for sustained neuronal excitability (see Olsen & Sontheimer 2008 for a review). There is some evidence of the coupling between Kir 4.1 and AQP-4. For example, a mislocalization of AQP-4 in transgenic mice was accompanied by a delayed K<sup>+</sup> clearance (Amiry-Moghaddam et al. 2003). In spite of this close functionality, the mechanism that allows an interaction between these channels remains poorly understood. Moreover, the coupling between these channels was not found in cultured hippocampal astrocytes (Zhang & Verkman 2008).

Three years ago, it was proposed that S100B, a calcium-binding protein also expressed in astrocytes, could modulate the expression of AQP-4 (Esposito et al. 2008). S100B is a very soluble protein of 21 kDa (Donato et al. 2009). Intracellularly, many putative protein

targets of S100B have been characterized, particularly modulating cytoskeleton plasticity and cell proliferation. At sub-nanomolar concentrations, extracellular S100B stimulates *in vitro* neurite growth, glial proliferation and promotes neuronal survival. However, elevated levels of this protein (particularly in cerebrospinal fluid and serum) have been associated with astroglial activation in conditions of brain injury (Goncalves et al. 2008). Although the mechanism of S100B secretion remains unknown, some secretagogues [e.g. gap-junction inhibitors (Leite et al. 2009)] have been identified and these help us to interpret changes in the extracellular content of this protein.

Beyond the data suggesting an AQP-4- induced expression by S100B (Esposito et al. 2008), other clues reinforce a putative connection between S100B and AQP-4. For example, interleukin 1-beta increases the expression of AQP-4 (Ito et al. 2006) and it is able to modulate S100B secretion in astrocytes and hippocampal slices (de Souza et al. 2009). Interestingly, in neuromyelitis optica (NMO), a severe auto-immune demyelinating disease, in which anti-AQP-4 antibodies are produced (Jarius et al. 2008), an increase in cerebrospinal fluid S100B was observed in relapsing patients (Misu et al. 2009). However, no data are available regarding any direct connection between AQP-4 (or its co-operant channel Kir 4.1) and S100B secretion.

Herein, we investigated whether changes in AQP-4 and/or Kir 4.1 activity, using classical inhibitors of these channels, could modulate S100B secretion in hippocampal slices, and whether such modulation would be related to the age-dependent expression of these channels.

## **Material and Methods**

**Animals** Wistar rats were obtained from our breeding colony, maintained under controlled light and environmental conditions (12 hour light/12 hour dark cycle at a constant temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, following the regulations of the local animal house authorities.

**Material** Polyclonal anti-S100 antibody and anti-rabbit peroxidase-conjugated anti-IgG were purchased from DAKO and Amersham, respectively. Polyclonal anti-aqp4 antibody was obtained from Chemicon, and Polyclonal anti-Kir 4.1 from Santa Cruz. The antibodies Alexa fluor (568) and Alexa fluor (488) were purchase from Invitrogen. Monoclonal anti-S100B antibody (SH-B1), 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) and o-phenylenediamine were purchased from Sigma. Tetraethylammonium chloride (TEA) and barium chloride ( $\text{BaCl}_2$ ) were obtained from Merck, and acetazolamide (AZA) from Alfa-aesar.

**Preparation of hippocampal slices** Wistar rats (15, 30, 45, 60 and 90 days-old) were killed by decapitation, the brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgSO}_4$ ; 25 HEPES; 1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 10 glucose, adjusted to pH 7.4 and previously aerated with  $\text{O}_2$ . The hippocampi were dissected and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain

Tissue Chopper. Slices were then transferred immediately into 24-well culture plates, each well containing 0.3 mL of physiological medium and only one slice. The medium was changed every 15 min with fresh saline medium at room temperature. Following a 120 min equilibration period, slices were incubated in the absence or present of TEA, BaCl<sub>2</sub> or AZA, as indicated in the results for 1 h at 30°C.

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

***Immunohistochemistry for AQP4 and Kir 4.1*** Rats were anesthetized using ketamine/xylazine and were perfused through the left cardiac ventricle with 200 mL of saline solution, followed by 20 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed and left for post-fixation in the same fixative solution at 4°C for 2 h. After this, the material was cryoprotected by immersing the brain in 30% sucrose in phosphate buffer at 4°C (Rodrigues et al. 2009). The brains were sectioned (50 µm) on a cryostat (Leitz) and sections were then pre-incubated in 2% bovine serum albumin in phosphate buffered saline containing 0.3% Triton X-100 for 30 min. The sections were incubated with polyclonal anti-AQP4 from rabbit, diluted 1:300 in 2% bovine serum albumin in phosphate buffer-Triton X-100, for 48 h at room temperature. After washing

several times, tissue sections were incubated with polyclonal anti-Kir 4.1 from goat, diluted 1:300 for 48 h. Subsequently, an Alexa fluor (568) secondary antibody, diluted 1:200 in phosphate buffer was incubated at room temperature for 2 h and then Alexa fluor (488) for a further 2 h. Afterwards, the sections were mounted on slides with Fluor save and covered with coverslips. Immunoreactions for AQP-4 and Kir 4.1 in the striatum radiatum of the CA1 hippocampal region (identified based on intraural coordinates 5.86 to 4.16 mm, bregma -3.14 to -4.16 mm) (Paxinos & Watson, 1998) were analyzed using the Scion Image software. Picture elements (pixels) were obtained from squares with  $11484.46 \mu\text{m}^2$  (our area of interest, AOI). Six sections per animal, from 5 animals per age were analyzed. At least, 6 readings were performed in each analyzed section.

***Other measurements*** Extracellular S100B content was referred to as “secretion”, based on the cell integrity measurement (data not shown), by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity with a colorimetric commercial kit (from Doles, Brazil) and colorimetric MTT method (Hansen et al. 1989).

***Statistical analysis*** Data from the experiments are presented as means  $\pm$  standard error and were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by posthoc analyzes (Tukey’s test). Results from control conditions (0.01% dimethyl sulfoxide) used in the figures were not different from those obtained under basal conditions without dimethyl sulfoxide. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant. All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

## Results

As shown in Fig. 1, hippocampal slices from 15 or 30-days old rats incubated with AQP4 inhibitor, TEA, at 10 (Fig 1A) or 1000  $\mu$ M (Fig 1B) demonstrated an increase in S100B secretion. However, S100B secretion from hippocampal slices of older animals (45, 60 or 90-days old rats) was not affected by the presence of this inhibitor. The integrity and viability of these slices were evaluated by LDH and MTT reduction activity assays, respectively (data not shown).

Using AZA, another inhibitor of AQP4, we also observed an increase in S100B secretion (Fig. 2). At 1  $\mu$ M AZA, S100B secretion significantly increased only in hippocampal slices of 15-day old rats (Fig 2A). However, at 100  $\mu$ M AZA, the increase in S100B secretion was observed in 15, 30 and 45-days old rats (Fig. 2B). It is important to mention that DMSO at 0.01%, the vehicle for AZA, did not alter the basal S100B secretion at any age analyzed (data not shown).

Due to the functional connection between AQP4 and potassium channels, we investigated a possible effect of barium on S100B secretion in hippocampal slices of rats of different ages (Fig 3). When hippocampal slices were incubated with 100  $\mu$ M barium chloride, we observed a decrease in S100B secretion in the younger rats (15-45-days old rats) (Fig. 3A). However, at 1000  $\mu$ M, barium was able to decrease S100B secretion in the hippocampal slices of rats at all ages analyzed (Fig. 3B).

We then investigated the effects of both TEA (positive effect) and barium chloride (negative effect) on S100B secretion (Fig 4). When TEA (at 10  $\mu$ M) and barium chloride (also at 10  $\mu$ M) were administered, an increase of S100B secretion was observed only in



hippocampal slices of 15-day old rats (Fig 4A). However, when hippocampal slices were incubated TEA (at 1000  $\mu$ M) and barium chloride at 1000  $\mu$ M, the negative effect on S100B secretion was predominant and observed for all ages analyzed (Fig 4B).

In order to evaluate the immunoreactivity for AQP4 and Kir 4.1, we carried out an AQP4 and Kir 4.1 immunohistochemical study. The photomicrographs of AQP4 and Kir 4.1 indicate the immunofluorescence for these proteins (Fig. 5A, B, D and E) and when we analyzed these images by confocal microscopy, we observed the co-localization of AQP4 and Kir 4.1 in an astrocyte (Fig 5C and F).

Subsequently, we quantified the immunofluorescence for these proteins in rats of 15, 30, 60 and 90 days old. We observed a decrease in AQP4 expression in 60 and 90-days old rats when compared with the younger animals (Fig. 6A). The immunofluorescence for Kir 4.1 was decreased in 90-days old rats, compared with 15, 30 and 60-day old animals (Fig. 6B).

## **Discussion**

Aquaporin-4, the main water channel of astrocytes, is localized in the plasmatic membrane surrounding capillaries and synapses, and is a key component in the pathogenesis of brain edema, commonly associated with ischemic and traumatic brain injury (Papadopoulos & Verkman 2007). During acute transient arterial occlusion in rats, a rapid loss (about 2 h) of AQP-4 was observed in a specific area of vascular damage (Friedman et al. 2009). Other studies in trauma models of brain injury also showed a decrease in AQP-4, followed by an increase in this protein (e.g. Ke *et al.* 2001). Apparently this initial decrease could reflect a mechanism of self-protection avoiding the brain swelling

(Friedman et al. 2009). On the other hand, the recovery of brain tissue seems to involve the up-regulation of AQP-4 observed later on.

Commonly, many clinical and experimental conditions of brain injury are accompanied by elevation of peripheral S100B, which in turn are interpreted as being due to the astroglial activation (Goncalves et al. 2008). In fact, acute S100B release could work as a neurotrophic factor to neighbor cells (Donato et al. 2009) and/or as an alarmin, i.e., a warning signal of danger (Bianchi et al. 2007). However, to date, no direct link between the decrease in AQP-4 function and the increase in extracellular S100B has been investigated. Our results in hippocampal slices from young rats show that a decrease in AQP-4 activity (induced by specific inhibitors) was accompanied by an increase in S100B secretion. An initial increase of S100B in brain injury has been proposed not only as a warning signal for newborn cells, but also as a factor released for protection and neural survival (Donato et al. 2009, Goncalves et al. 2010). Therefore, we may suppose that S100B release from astrocytes, at least in part, could result from decreased AQP-4 activity. The mechanism involved in the S100B secretion is unclear, as well as the signaling involved. However, the interaction maybe involve a calcium-mediated signaling pathway initiated by water influx through the AQP-4 (Thrane et al. 2011), assuming that S100B secretion seems to be an event that is dependent on calcium (Nardin et al. 2009, Davey et al. 2001).

In this study, we used two classes of aquaporin-4 inhibitors: TEA (from class of quaternary ammonium salts) and AZA (from class of sulfonamides) (Haddoub et al. 2009). Although these are more specific for sub-type 4 aquaporins, molecular targets other than aquaporins have been described for these compounds. We cannot rule out that other targets of these compounds are involved in the secretion of S100B. Nevertheless, both TEA and

AZA, at concentrations used for AQP-4 inhibition, stimulated S100B secretion in hippocampal slices from young rats.

Interestingly, in agreement with the stimulatory effect on S100B secretion observed in young rats, the ontogeny of AQP-4, evaluated by immunohistochemistry, was found to be more elevated in young rats (15-30-days old) than in adult rats (90-days old). This result was confirmed by Western blotting (data not shown). This link, observed *in vitro*, between AQP-4 inhibition and S100B secretion cannot help to explain the unchanged levels of serum S100B that we observed in relapsing NMO patients, where elevated levels of anti-AQP-4 antibodies are produced (Robinson-Agramonte et al. 2010). However, conversely and in agreement with our present data, other studies found increased levels of cerebrospinal fluid S100B in NMO disease (e.g. Misu et al. 2009). This discrepancy between serum and cerebrospinal fluid samples reinforces the idea that other cell sources of S100B, beyond astrocytes, contribute to serum S100B (Goncalves et al. 2008, Goncalves et al. 2010).

Another aspect investigated in this work was the putative functional association of glial  $K^+$  channel Kir 4.1 with AQP-4. In fact, the ontogeny of these proteins, investigated here by immunohistochemistry and Western blotting, reinforces the idea of a close interaction between them. The idea of a structural and functional interaction between Kir 4.1 and AQP-4 is supported by some evidence (see Nagelhus et al. 2004). For example, membrane co-localization (Nagelhus et al. 1999) and delayed  $K^+$  clearance in transgenic mice exhibiting mislocalization of AQP-4 (Amiry-Moghaddam et al. 2003). However, some controversy surrounds these findings. For example, no changes in the electrophysiology of Muller cells were observed in AQP-4 knockout mice (Ruiz-Ederra et al. 2007) and no changes in water permeability were observed in hippocampal astrocytes

incubated with BaCl<sub>2</sub> (Zhang & Verkman 2008). The inhibition of Kir 4.1 (by BaCl<sub>2</sub>), in contrast to the inhibition of AQP-4, caused a decrease in S100B secretion in hippocampal slices from young rats. This argues against a functional coupling between Kir 4.1 and AQP-4. Notice that at high concentrations of BaCl<sub>2</sub> (1 mM) the inhibition of S100B secretion was predominant over the TEA stimulatory effect.

Assuming acute S100B release as being a warning signal or a protective factor to neighboring cells, it is difficult to conceive that an impairment of Kir channels results in a decrease of S100B. In fact, the inhibition of two important astrocyte activities such as glutamate transport and gap junctions resulted in S100B release (Tramontina et al. 2006, Leite et al. 2009). Moreover, Kir inhibition by BaCl<sub>2</sub> is accompanied by a reduction of glutamate uptake (Kucheryavykh et al. 2007), and glutamate uptake was reduced in Kir 4.1 knockout mice (Djukic et al. 2007). These data, together, could suggest that Kir inhibition may result in an increase in S100B release. In addition, our findings demonstrate that inhibition of aquaporin-4, which functionally interacts with gap junctions and Kir channels (Lichter-Konecki et al. 2008), also resulted in increased S100B release. A possible explanation for this would be that Kir channel impairment directly affects the mechanism of S100B secretion, which remains unknown (Leite et al. 2009). Further experiments will confirm, or not, this possibility. Moreover, the effect of BaCl<sub>2</sub> is not limited to Kir channels and BaCl<sub>2</sub> could be affecting S100B secretion, independently of an effect on Kir channels.

However, it is important to mention that, in two other conditions that could result from neuronal hyperactivity, elevated glutamate (e.g. 1 mM) or K<sup>+</sup> (e.g. 30 mM) also leads to a decrease in S100B release in brain slices (Nardin et al. 2009, Buyukuysal 2005). In support of these findings, accumulation of K<sup>+</sup> in hippocampal slices after traumatic brain

injury attributed to a decrease in Kir currents was also observed in control slices incubated with BaCl<sub>2</sub> (D'Ambrosio et al. 1999).

Finally, it is important to comment that a connection between astrocyte S100B release and AQP-4 activity could be clinically useful in the future and could allow the correlation of these *in vitro* and *in vivo* parameters of S100B release, considering the necessity for the development of therapeutic AQP-4 inhibitors and the current limitations of measurements of water permeability (Haddoub et al. 2009). In summary, we show that blockade of AQP-4 with TEA and AZA in hippocampal slices from young rats produced an increase in S100B secretion, compatible with the astroglial activation observed in many conditions of brain injury. Conversely, inhibition of Kir 4.1 channels with BaCl<sub>2</sub> resulted in a decrease in the secretion of S100B. Both AQP-4 and Kir 4.1 channels exhibited a similar ontogenetic profile, in spite of the functional uncoupling in relation to S100B secretion. These data, together with other observations from gap junctions and glutamate transport of astrocytes, contribute to characterize the operational system involving astroglial activation, particularly in S100B secretion during conditions of brain injury.

## References

Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M. et al. (2003) Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13615-13620.

Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I. and Donato, R. (2007) S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol*, 81, 108-118.

Buyukuysal, R. L. (2005) Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*, 47, 580-588.

D'Ambrosio, R., Maris, D. O., Grady, M. S., Winn, H. R. and Janigro, D. (1999) Impaired K<sup>(+)</sup> homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci*, 19, 8152-8162.

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

de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B. and Goncalves, C. A. (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol*, 206, 52-57.

Djukic, B., Casper, K. B., Philpot, B. D., Chin, L. S. and McCarthy, K. D. (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci*, 27, 11354-11365.

Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1008-1022.

Esposito, G., Imitola, J., Lu, J. et al. (2008) Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Hum Mol Genet*, 17, 440-457.

Friedman, B., Schachtrup, C., Tsai, P. S., Shih, A. Y., Akassoglou, K., Kleinfeld, D. and Lyden, P. D. (2009) Acute vascular disruption and aquaporin 4 loss after stroke. *Stroke*, 40, 2182-2190.

Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Guerra, M. C. (2010) Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2010, 790431.

Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, 41, 755-763.

Haddoub, R., Rutzler, M., Robin, A. and Flitsch, S. L. (2009) Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors. *Handb Exp Pharmacol*, 385-402.

Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119, 203-210.

Ito, H., Yamamoto, N., Arima, H. et al. (2006) Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes. *J Neurochem*, 99, 107-118.

Jarius, S., Paul, F., Franciotta, D., Waters, P., Zipp, F., Hohlfeld, R., Vincent, A. and Wildemann, B. (2008) Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Pract Neurol*, 4, 202-214.

Ke, C., Poon, W. S., Ng, H. K., Pang, J. C. and Chan, Y. (2001) Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett*, 301, 21-24.



Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N. and Eaton, M. J. (2007) Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia*, 55, 274-281.

Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*, 169, 93-99.

Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*, 87, 2439-2446.

Lichter-Konecki, U., Mangin, J. M., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E. P. and Gallo, V. (2008) Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia*, 56, 365-377.

Misu, T., Takahashi, T., Nakashima, I., Fujihara, K. and Itoyama, Y. (2009) [Neuromyelitis optica and anti-aquaporin 4 antibody--distinct from multiple sclerosis]. *Rinsho Byori*, 57, 262-270.

Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kurachi, Y. and Ottersen, O. P. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26, 47-54.

Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M. and Ottersen, O. P. (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 129, 905-913.

Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A. et al. (2009) S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. *Neurochem Res*, 34, 1603-1611.

Olsen, M. L. and Sontheimer, H. (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem*, 107, 589-601.

Papadopoulos, M. C. and Verkman, A. S. (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*, 22, 778-784.

Paxinos, G. and Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic, San Diego; London.

Robinson-Agramonte, M. A., Goncalves, C. A., Portela, L. V., Saiz-Hinarejos, A., Oses, J. P., Motta, L. S., Muller, A. P., Marquez Gonzalez, M. E. and Souza, D. O. (2010)

Differential regulation of IgG-NMO autoantibodies on S100Beta protein and disability in relapsing neuromyelitis optica. *Neuroimmunomodulation*, 17, 177-179.

Rodrigues, L., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J. A., Achaval, M. and Goncalves, C. A. (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis*, 17, 193-202.

Ruiz-Ederra, J., Zhang, H. and Verkman, A. S. (2007) Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Muller cells. *J Biol Chem*, 282, 21866-21872.

Thrane, A. S., Rappold, P. M., Fujita, T. et al. (2011) Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling events elicited by cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 846-851.

Tramontina, F., Leite, M. C., Goncalves, D. et al. (2006) High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*, 31, 815-820.

Yool, A. J. (2007) Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist*, 13, 470-485.

Zhang, H. and Verkman, A. S. (2008) Aquaporin-4 independent Kir4.1 K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci*, 37, 1-10.

## Figure Legends

Figure 1. ***Effect of TEA on S100B secretion in hippocampal slices.*** Hippocampal slices from Wistar rats of different ages (15, 30, 45, 60 and 90-days old) were exposed to TEA at concentrations of 10  $\mu$ M (A) and 1000  $\mu$ M (B) for 1 h. S100B was determined by ELISA. The line indicates basal secretion, assumed as 100%, in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion  $p < 0.05$  compared to control (ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 2. ***Effect of AZA on S100B secretion in hippocampal slices.*** Hippocampal slices from Wistar rats of different ages (15, 30, 45, 60 and 90-days old) were exposed to AZA at concentrations of 1  $\mu$ M (A) and 100  $\mu$ M (B) for 1 h. S100B was measured by ELISA. The line indicates basal secretion, assumed as 100%, in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion  $p < 0.05$  compared to control (ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 3. ***Effect of BaCl<sub>2</sub> on S100B secretion in hippocampal slices.*** Hippocampal slices from Wistar rats of different ages (15, 30, 45, 60 and 90-days old) were exposed to BaCl<sub>2</sub> at concentrations of 100  $\mu$ M (A) and 1000  $\mu$ M (B) for 1 h. S100B was measured by ELISA. The line indicates basal secretion, assumed as 100%, in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 6 independent experiments performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion  $p < 0.05$  compared to control (ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 4. ***Effect of TEA + BaCl<sub>2</sub> on S100B secretion in hippocampal slices.*** Hippocampal slices from Wistar rats of different ages (15, 30, 45, 60 and 90-days old) were exposed to TEA and BaCl<sub>2</sub> at concentrations of 10  $\mu$ M (A) and 1000  $\mu$ M (B) for 1 h. S100B was measured by ELISA. The line indicates basal secretion, assumed as 100%, in each experiment. Each value is a mean ( $\pm$  standard error) of 6 independent experiments

performed in triplicate. \* Significantly different from basal secretion  $p < 0.05$  compared to control (ANOVA followed by the Tukey's test).

Figure 5. *Immunohistochemistry for AQP-4 and Kir 4.1. Dentate gyrus of hippocampal sections* of 30-days old rats were analyzed by immunohistochemistry for AQP-4 (green) and Kir 4.1 (red). Panels A, B and C are photomicrographs of immunofluorescence for AQP-4, Kir 4.1 and AQP-4 + Kir 4.1 (merged image), respectively. Arrows in A, B and C panels indicate blood vessels, which are detailed in panels D, E and F, respectively. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  are indicated in panels C and F.

Figure 6. *Ontogenetic immunocontent of AQP-4 and Kir 4.1 in rat hippocampus.* Dentate gyrus of hippocampal sections of Wistar rats (from 15, 30, 60 and 90-days old) were analyzed by immunohistochemistry for AQP-4 (panel A) and Kir 4.1 (panel B). The images were processed in a software Scion. Values are mean  $\pm$  standard errors of 5 rats in each group. One-way ANOVA was performed followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). a and b indicate different statistical groups.

Figure 1

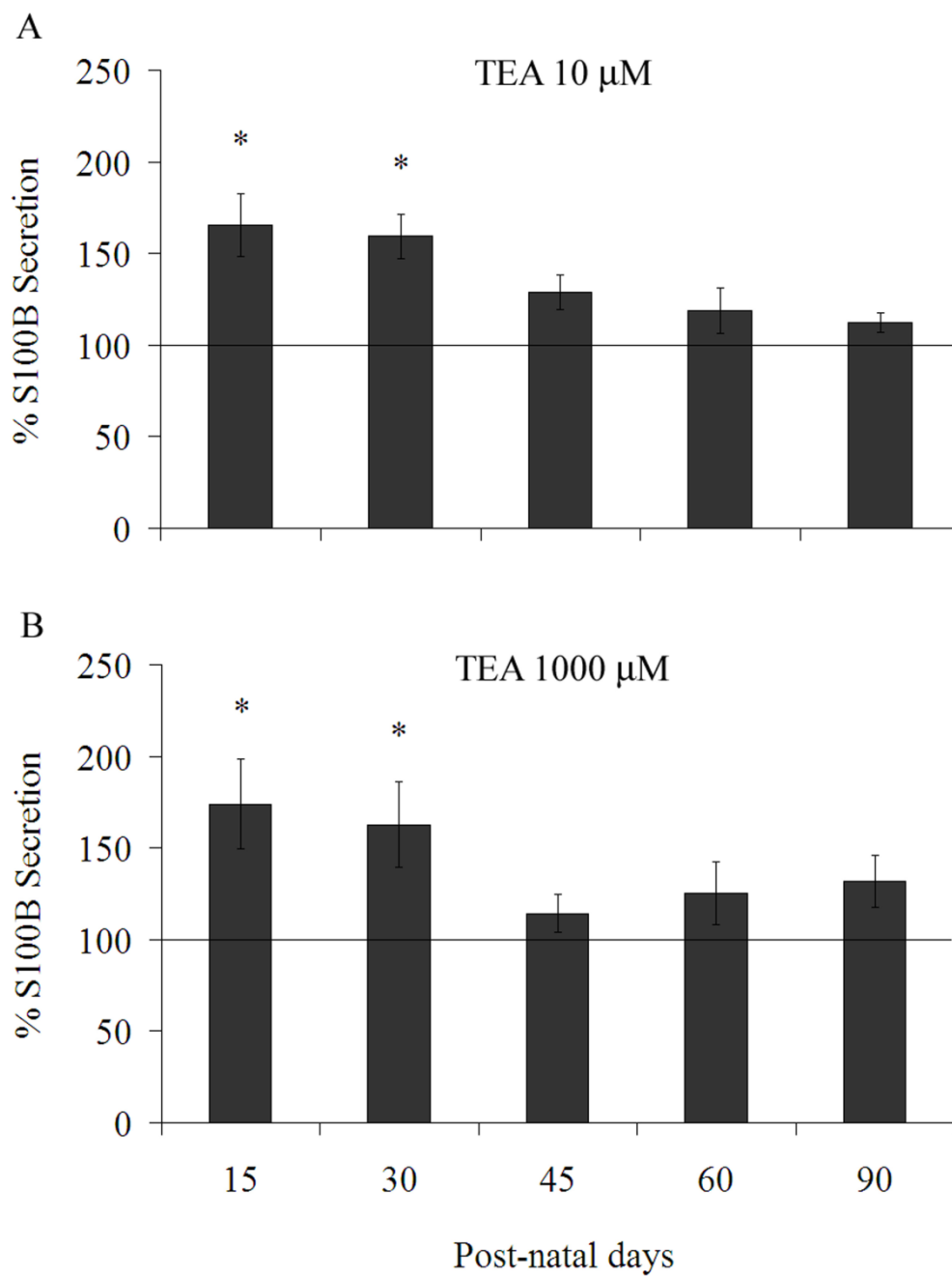


Figure 2

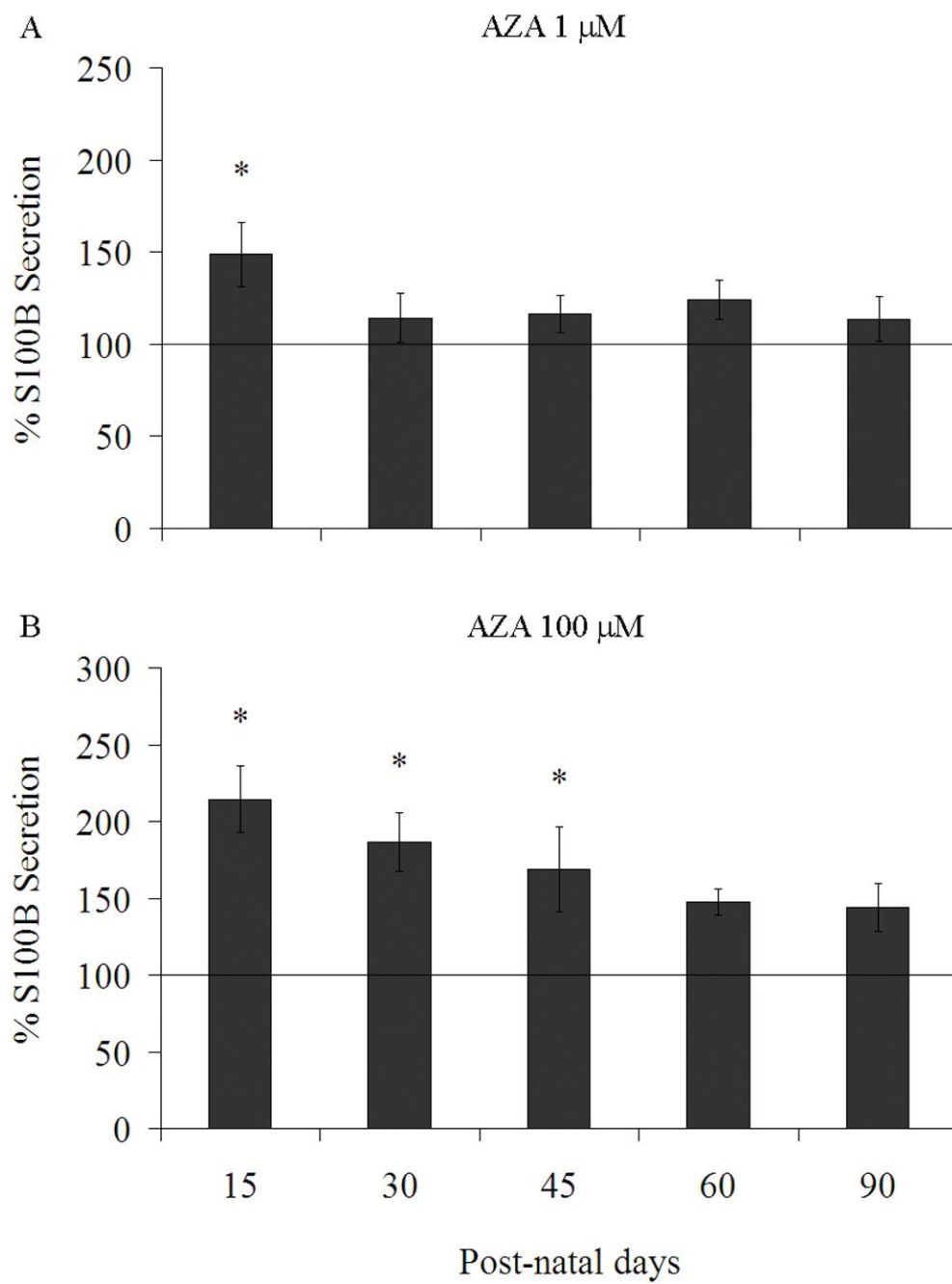




Figure 3

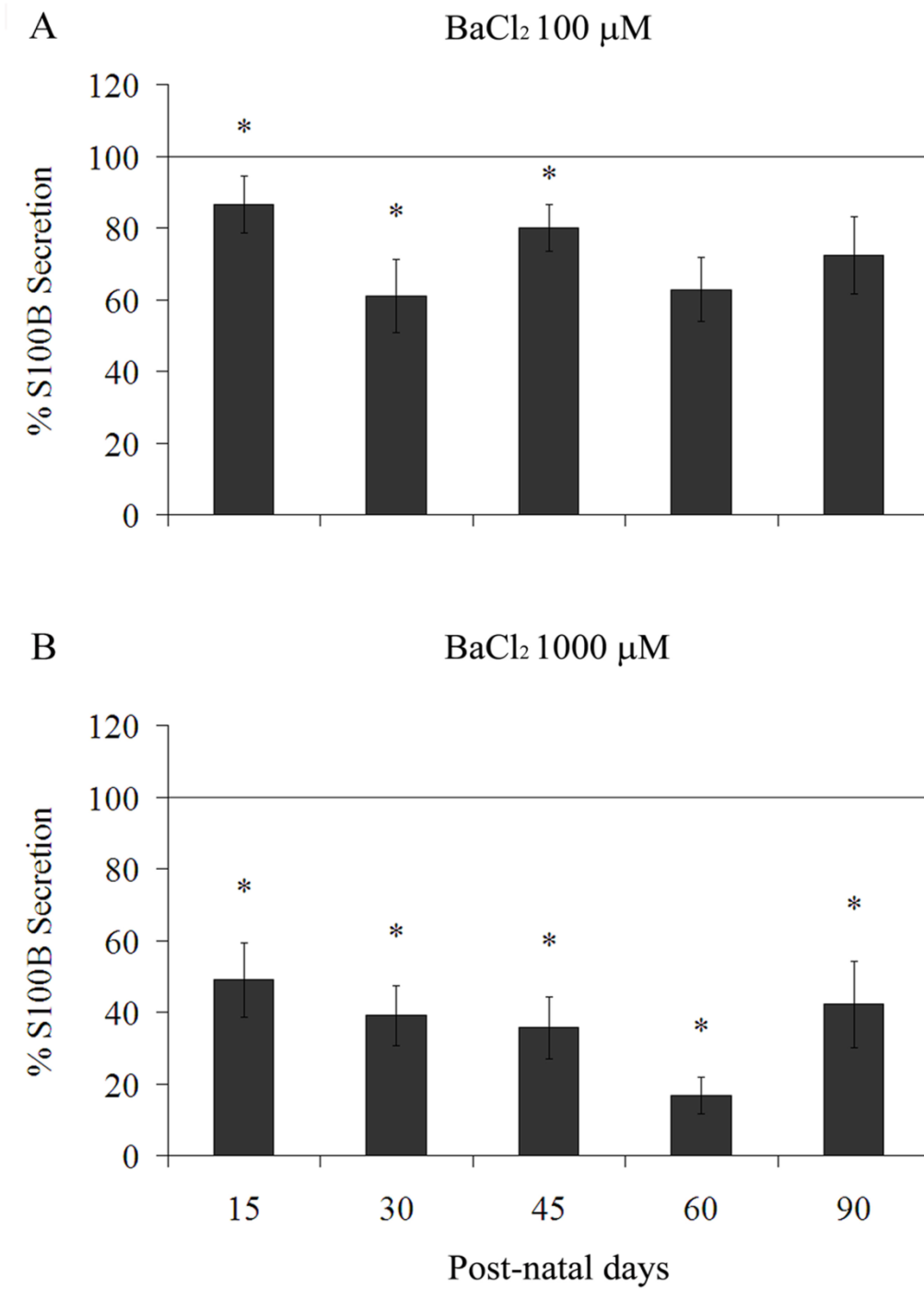


Figure 4

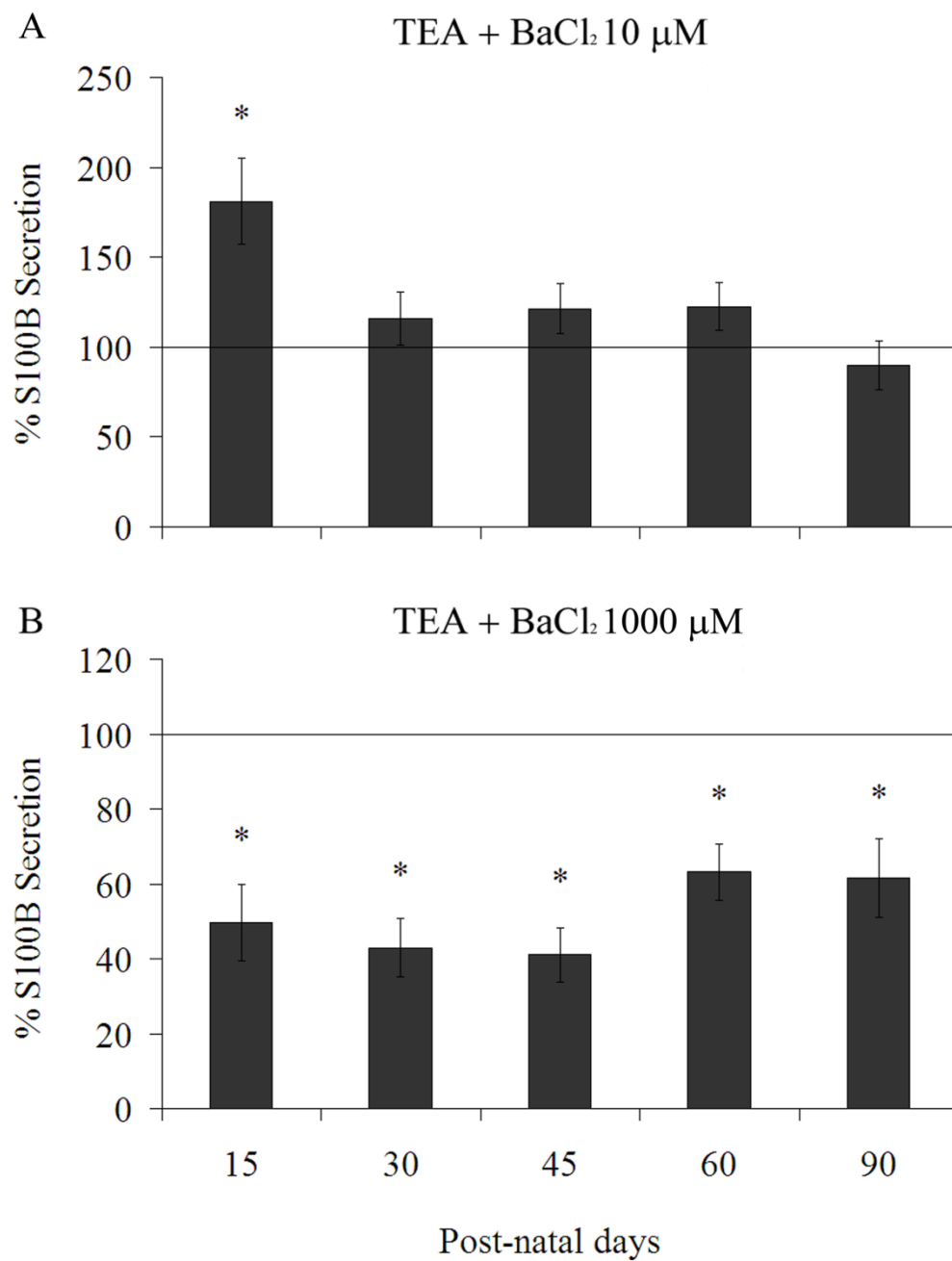
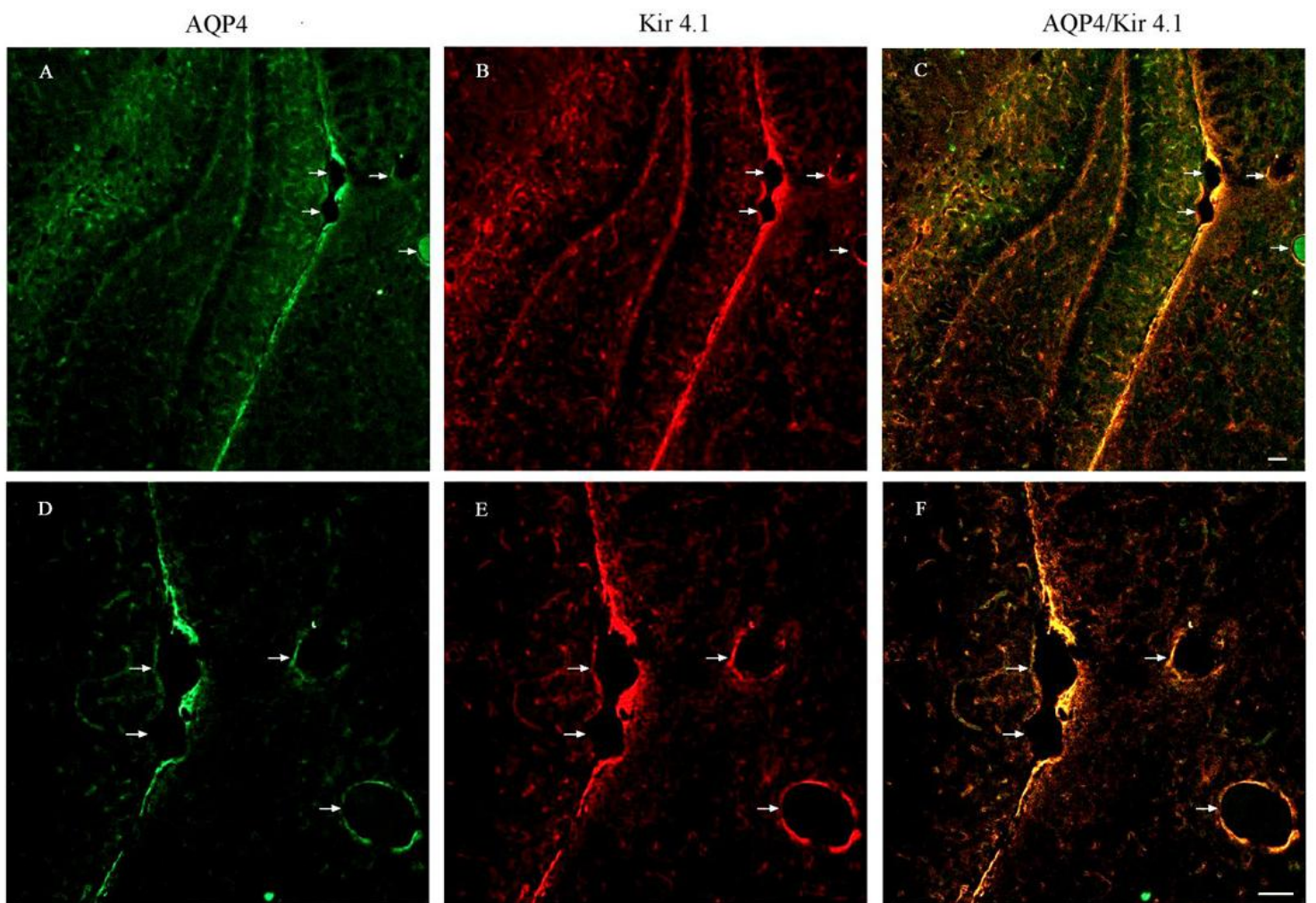
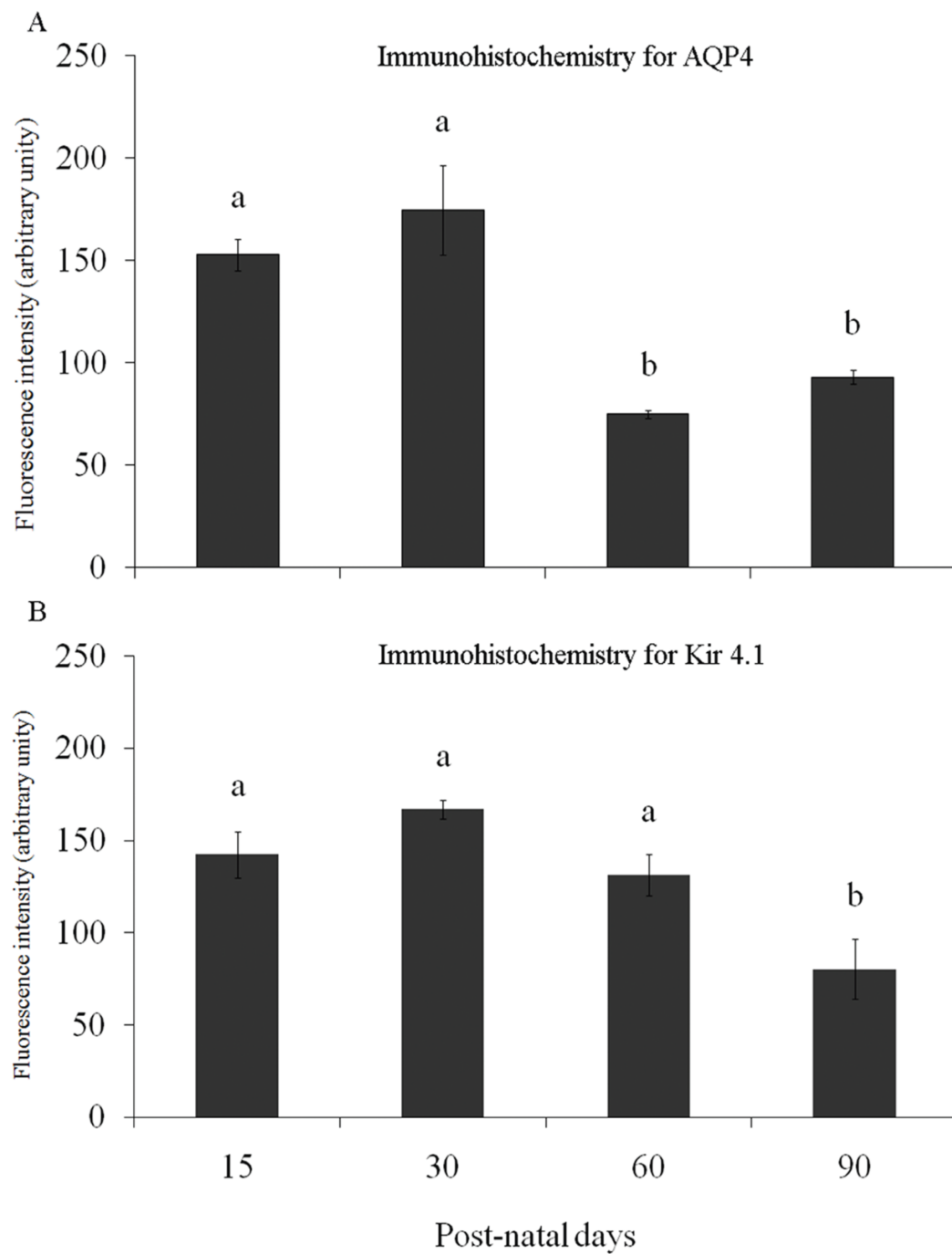


Figure 5



**Figure 6**

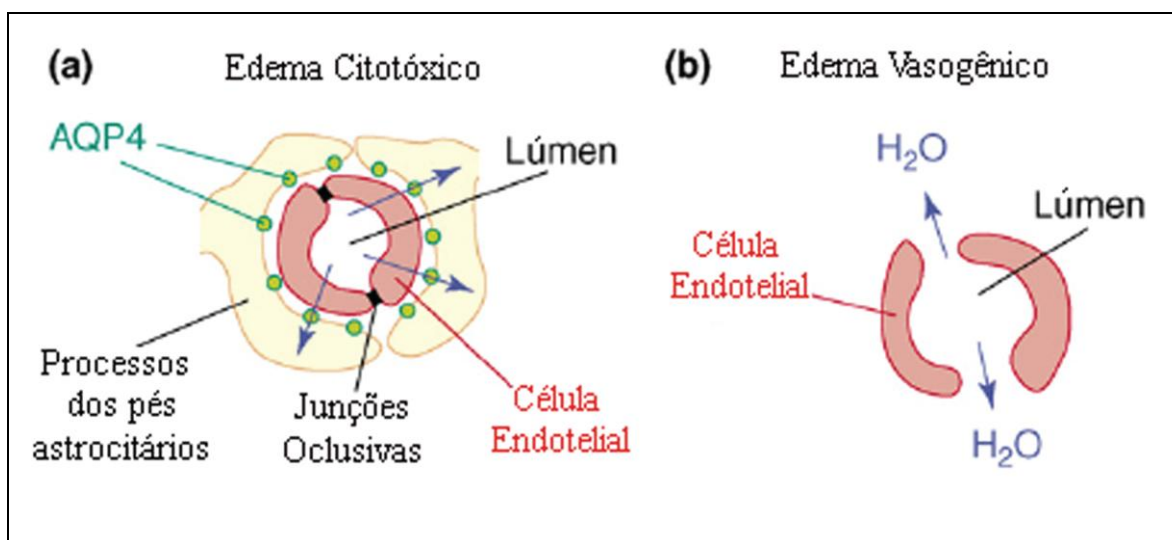
#### IV. Discussão

A proteína AQP-4 desempenha funções no encéfalo tanto em condições fisiológicas como na patofisiologia de diversas desordens cerebrais. Em condições fisiológicas, a AQP-4 exerce um importante papel protetor por facilitar a entrada de água e o tamponamento de  $K^+$  que ocorre após estimulação neuronal. A eficácia reduzida do tamponamento de  $K^+$  poderia aumentar a vulnerabilidade a crises epiléticas (Zelenina et al. 2005). Em geral, a expressão de AQP-4 é alterada em astrócitos em situações associadas com edema cerebral, mas essa proteína também pode facilitar a migração astrocitária e alterar a atividade neuronal (Tait et al. 2008).

O edema cerebral citotóxico é o acúmulo intracelular de água devido à falha energética e inabilidade das células em regular o seu volume. Isto resulta em uma troca da água do compartimento intersticial para o intracelular e uma absorção de água da corrente sanguínea para o parênquima cerebral (Papadopoulos & Verkman 2007). O edema citotóxico é associado com uma redução do volume do espaço extracelular e BHE intacta. A água flui da vasculatura para os compartimentos cerebrais intracelulares quando a bomba  $Na^+/K^+$  ATPase falha ou a concentração de  $Na^+$  extracelular diminui. Este tipo de edema ocorre, por exemplo, na fase precoce da isquemia cerebral, hipóxia e hiponatremia (Tait et al. 2008). Trabalhos demonstraram que ratos *knock-out* para AQP-4 no modelo de edema cerebral citotóxico tiveram uma melhora na absorção e reduziram o acúmulo de água encefálica quando comparados com ratos com edema citotóxico expressando normalmente a AQP-4 (Manley et al. 2000, Papadopoulos & Verkman 2005). A água move-se do sangue para o cérebro através da BHE por três membranas celulares: membranas endoteliais luminal e basal, que não possuem AQP-4, e membrana dos processos dos pés astrocitários,

que contém AQP-4. As três membranas são equivalentes a três resistores em série, na qual a resistência da membrana astrocitária aumenta em ratos deficientes de AQP-4, já que a água atravessa a membrana astrocitária primariamente através desta AQP (Tait et al. 2008).

No entanto, no edema cerebral vasogênico as forças hidrosmóticas causam um extravasamento do exsudato rico em proteínas do plasma, o que provoca o rompimento da BHE para dentro do espaço extracelular encefálico e, então, a expansão deste compartimento (Tait et al. 2008). Neste caso a AQP-4 facilita a eliminação de água. O excesso de água move-se dentro do cérebro por um mecanismo de fuga pela BHE e a água deixa o encéfalo através do movimento para dentro do LCR por meio da glia limitante repleta de AQP-4, localizada ao redor dos ventrículos cerebrais e na superfície encefálica (Verkman 2009). Este tipo de edema foi observado em casos de tumores e edema decorrente de abscessos cerebrais (Papadopoulos & Verkman 2007).



**Figura 3.** Edema cerebral citotóxico e vasogênico. Adaptado de (Tait et al. 2008).

Existem evidências de alterações na expressão de AQP-4 em casos de neuromielite óptica (Jarius et al. 2008, Robinson-Agramonte et al. 2010), esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica (Nesic et al. 2010), isquemia, trauma, tumores, inflamação e distúrbios metabólicos (hiponatremia, hiperamonemia e uremia) (Zelenina 2010).

O mecanismo de regulação da AQP-4 é de grande interesse, no entanto ainda não está bem esclarecido. Sabe-se que a modulação da expressão desta proteína pode ocorrer por substâncias exógenas ou pela liberação de citocinas, como por exemplo, a proteína S100B (Esposito et al. 2008). Já foi proposto que em células precursoras neurais com Síndrome de Down, onde há uma superexpressão de S100B, consequente geração de ERO e ativação de cinases que respondem ao estresse, ocorre um aumento compensatório na expressão de AQP-4. Este aumento na regulação da AQP-4 pela S100B poderia ser útil já que a AQP-4 mantém a homeostase cerebral por facilitar a liberação de água para o espaço extravascular e também por a AQP-4 transferir as ERO intracelulares para o espaço extracelular (Esposito et al. 2008).

Embora já tenha sido proposto que a S100B poderia modular a expressão de AQP-4 (Esposito et al. 2008), ainda não foi investigado se a regulação da AQP-4 poderia, por sua vez, alterar a secreção de S100B. Neste estudo nós verificamos se fatias hipocâmpais de ratos jovens expostas aos inibidores de AQP-4 têm sua secreção de S100B aumentada.

Além da S100B, outros compostos como a dopamina (Kuppers et al. 2008) e a IL-1 $\beta$  (Ito et al. 2006) já foram descritos como capazes de alterar a expressão de AQP-4. A dopamina reduz a proliferação celular e foi capaz de diminuir a expressão de AQP-4 em astrócitos estriatais, sugerindo um possível envolvimento da AQP-4 na diminuição da proliferação astrocitária regulada pela dopamina (Kuppers et al. 2008). A IL-1 $\beta$  provocou um aumento na expressão de AQP-4 em culturas de células astrocitárias e no cérebro de

ratos após administração intracerebroventricular (ICV) de IL-1 $\beta$ , efeito este mediado pela via do fator de transcrição nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B) (Ito et al. 2006). Além disso, sabe-se que a IL-1 $\beta$  modula a secreção de S100B em fatias hipocampais e culturas de astrócitos (de Souza et al. 2009).

Estudos demonstraram que inibidores de AQP-4 poderiam reduzir o edema cerebral citotóxico, enquanto ativadores desta proteína poderiam ser úteis em situações de edema vasogênico e hidrocefalia (Tait et al. 2008). Já foi demonstrado que a AQP-4 pode ser dinamicamente regulada de diversas maneiras: abertura de canais, distribuição subcelular, fosforilação, interações proteínas-proteínas e formação de arranjos ortogonais (Zelenina 2010).

Ainda não existe a disponibilidade de ativadores ou inibidores desta proteína para uso clínico, no entanto diversos compostos foram identificados como inibidores da AQP-4, como por exemplo, arilsulfonamidas (Tanimura et al. 2009), drogas anti-epiléticas (Yukutake & Yasui 2010), e compostos como zinco (Yukutake *et al.* 2009) e tetraetilamônio (TEA) (Detmers *et al.* 2006).

O TEA é um bloqueador de canais de K<sup>+</sup> em concentrações milimolar (mM), no entanto mostrou-se capaz de inibir AQPs em concentrações muito menores, na ordem de  $\mu$ M. O mecanismo de ação do TEA é possivelmente pela interação deste composto com aminoácidos localizados na face extracelular da AQP, especialmente nos *loops* A, C e E. Este composto mostrou-se eficaz na inibição de diversas AQPs, contudo não é específico para um único tipo de AQP. Trabalhos demonstram uma diminuição significativa da passagem de água pelas AQP-1, AQP-2 e AQP-4 expostas ao TEA (Detmers et al. 2006).

A classe de arilsulfonamidas tem se mostrado promissora para o desenvolvimento de agentes farmacológicos para AQPs. A estrutura molecular deste grupo é caracterizada pela



presença de um anel aromático de benzeno ligado ao grupo sulfonamida,  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  (Yool et al. 2009). Um importante integrante do grupo das sulfonamidas é a acetazolamida (AZA), um inibidor da anidrase carbônica. A AZA inibe a AQP-4 e não tem efeitos na AQP-1, demonstrando dessa maneira sua seletividade em relação às AQPs. No entanto, o mecanismo de ação da AZA ainda é desconhecido, mas a análise estrutural da AQP-4 ligada à AZA poderia revelar o mecanismo pelo qual a AZA inibe a condução de água através da AQP-4 (Tanimura et al. 2009).

Como o TEA (Detmers et al. 2006) e AZA (Tanimura et al. 2009) podem ser quimicamente modificados, são compostos promissores para o desenvolvimento de bloqueadores específicos e seletivos para AQPs.

O zinco foi demonstrado como inibidor de AQP-4 em proteolipossomas, o que não garante sua eficácia em outras preparações celulares e em modelos *in vivo*. O zinco interage com diferentes proteínas alvo modulando a plasticidade sináptica, incluindo receptores para neurotransmissores particularmente receptores glutamatérgicos e purinérgicos, e canais de estoque de cálcio. Além disso, resultados do nosso grupo demonstraram que o zinco é capaz de modular negativamente a secreção de S100B em hipocampo de ratos (Nardin et al. dados não publicados). Devido a sua baixa especificidade e como ainda há poucas evidências da modulação da AQP-4 pelo zinco, não utilizamos este composto como modulador da AQP-4 em nosso trabalho.

Em nosso estudo verificamos se fatias hipocâmpais de ratos com diferentes idades tratadas com os inibidores de AQP-4 (AZA e TEA) apresentavam alterações na secreção de S100B. Encontramos um aumento na secreção de S100B em fatias hipocâmpais de ratos com 15 e 30 dias de idade tratadas com TEA, em fatias de ratos de 15 dias tratadas com AZA  $1\mu\text{M}$  e fatias de 15, 30 e 45 dias tratadas com AZA  $100\mu\text{M}$ .

As diferenças encontradas na secreção de S100B em ratos com diferentes idades podem refletir as alterações na expressão de AQP-4 ao longo do desenvolvimento. Já foi demonstrada uma baixa expressão da AQP-4 no cerebelo de ratos logo após o nascimento, com um aumento significativo na segunda semana pós-natal (Wen et al. 1999). Nosso trabalho demonstrou níveis aumentados de AQP-4 no hipocampo de ratos com 15 e 30 dias quando comparados com animais de 60 e 90 dias de idade. Este aumento da AQP-4 nos ratos mais jovens poderia explicar porque a secreção de S100B está aumentada nos animais com menor idade. Onde há uma maior expressão de AQP-4, há um aumento na secreção de S100B possivelmente regulada pela AQP-4. Nesses animais mais jovens, a AQP-4 parece estar relacionada com a maturação dos processos envolvendo  $K^+$  e homeostase da água (Vajda et al. 2000). Quando utilizamos inibidores de AQP-4, ocorre um aumento na secreção de S100B possivelmente como uma resposta compensatória a uma desregulação na homeostase de água encefálica.

Além disso, sabe-se que na doença inflamatória do SNC neuromielite óptica (NMO), os auto-anticorpos anti-NMO (NMO-IgG) ligam-se seletivamente à AQP-4, resultando na perda da função destes canais de água. Pacientes com NMO tiveram um aumento nas proteínas S100B e GFAP no LCR, sugerindo que esta elevação em paralelo com a gravidade da doença esteja relacionada com a auto imunidade anti-AQP-4 que afeta os astrócitos na NMO (Jarius et al. 2008, Robinson-Agramonte et al. 2010). No entanto, outros resultados mostraram que a S100B no soro de pacientes com NMO tende a diminuir (Robinson-Agramonte et al. 2010), sugerindo que mais estudos são necessários para compreender o papel da S100B na NMO.

No início do desenvolvimento, o espaço extracelular ocupa uma grande fração do volume cerebral, o que permite a difusão de água e  $K^+$ . Contudo, quando as células

neurais proliferam e crescem, o espaço extracelular gradativamente diminui para alcançar o volume característico do cérebro adulto. Este espaço extracelular restrito não pode acomodar o fluxo de íons e água que são gerados pela atividade neuronal, então é essencial que as células neurais possuam mecanismos de tamponamento de  $K^+$  e manuseio de água, como os canais Kir e as AQPs, para compensar a perda do grande volume extracelular. As falhas na manutenção da homeostase de água e  $K^+$  em locais de alta atividade neuronal poderiam causar despolarizações celulares excessivas e descargas neuronais (Wen et al. 1999). A ontogenia da AQP-4 e Kir 4.1 está relacionada com os processos envolvendo  $K^+$  e regulação do volume, então é essencial entender como a expressão destas proteínas é alterada durante o desenvolvimento para relacionar com possíveis falhas na homeostase de água e  $K^+$  no SNC.

Há uma co-localização da AQP-4 e do canal retificador interno de potássio Kir 4.1 na membrana dos pés astrocitários, sugerindo que o tamponamento de  $K^+$  mediado por Kir 4.1 está acoplado com o transporte de água através da AQP-4 (Vajda et al. 2000). Em nossos resultados confirmamos esta co-localização da AQP-4 e do Kir 4.1 nos astrócitos. A expressão ontogenética deste canal de  $K^+$  seguiu um padrão similar com a expressão de AQP-4, ou seja, níveis mais elevados em hipocampus de ratos com 15 e 30 dias, ocorrendo um leve decréscimo nos animais de 60 dias e atingindo uma diminuição significativa nos animais de 90 dias quando comparados com os de 15, 30 e 60 dias.

Quando incubamos fatias hipocampais de ratos com diferentes idades com o inibidor de canais de  $K^+$ , cloreto de bário ( $BaCl_2$ ), obtivemos uma diminuição na secreção de S100B em todas as idades avaliadas. No entanto, o efeito do  $BaCl_2$  começou a aparecer em animais mais jovens quando utilizamos uma concentração de 100  $\mu M$ , e pode ser notado em todas as idades analisadas quando aumentamos a dose de  $BaCl_2$  para 1000  $\mu M$ . Existem diversos

subtipos de canais Kir, no entanto, os canais Kir do tipo 4.1 são predominantemente expressos nas células gliais no encéfalo e tem sido aceitos como principal mecanismo na manutenção da homeostase extracelular de  $K^+$  necessária para a sustentação da excitabilidade neuronal (Yool 2007). Como a proteína S100B é secretada principalmente por astrócitos, acreditamos que o efeito do  $BaCl_2$  na secreção de S100B possa ser devido a inibição do canal retificador interno de  $K^+$  Kir 4.1.

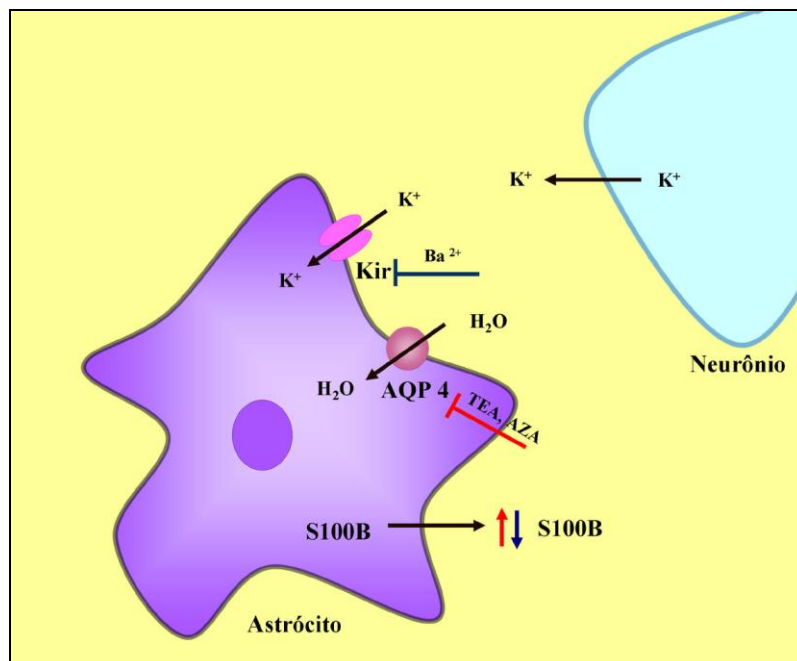
A inibição dos canais Kir 4.1 poderia resultar num aumento do  $K^+$  intracelular e consequente despolarização. Além disso, resultados do nosso grupo demonstraram que fatias hipocâmpais tratadas com alto  $K^+$  extracelular têm uma diminuição na secreção de S100B. Esta diminuição pode ser mediada por um fator neuronal liberado (ainda não identificado) durante a despolarização neuronal decorrente do alto  $K^+$ , como por exemplo, o neurotransmissor glutamato (Nardin et al. 2009). Porém, não sabemos se a quantidade de  $K^+$  acumulada resultante da inibição dos canais Kir é suficiente para causar uma alteração equivalente a um aumento do  $K^+$  extracelular sobre a secreção de S100B.

Em fatias hipocâmpais incubadas simultaneamente com TEA e  $BaCl_2$  nas mesmas concentrações (10 ou 1000  $\mu M$ ), observamos que na menor concentração utilizada prevaleceu o efeito do TEA, ou seja, obtivemos um aumento na secreção de S100B. Já quando utilizamos os dois inibidores em doses de 1000  $\mu M$ , o efeito do  $BaCl_2$  foi mais acentuado, ocorrendo uma diminuição na secreção de S100B.

O tamponamento do  $K^+$  espacial é acompanhado por alterações no volume do espaço extracelular, indicando um rápido transporte transmembrana de água através da membrana plasmática de astrócitos expressando AQP-4. Além disso, a captação de  $K^+$  é mais lenta em animais sem a expressão de AQP-4 (Nagelhus et al. 2004).

A expressão das proteínas AQP-4 e Kir 4.1 mantêm um padrão similar no hipocampo de ratos, um aumento até os 30 dias de idade com posterior diminuição nos 60 e 90 dias. Isto reforça nossa ideia de que estas proteínas estão relacionadas na regulação do volume extracelular e tamponamento de água e  $K^+$ , sugerindo que a co-localização destas proteínas seja decorrente da relação entre suas funções.

No entanto, quando observamos o efeito dos inibidores de AQP-4 e Kir 4.1 na secreção de S100B, encontramos resultados opostos. Enquanto os inibidores de AQP-4 provocaram um aumento na secreção de S100B nos animais mais jovens, o inibidor de Kir 4.1 causou uma diminuição na secreção de S100B em todas as idades avaliadas. Estes resultados sugerem que a AQP-4 e Kir 4.1 modulam de maneiras diferentes a secreção de S100B.



**Figura 4.** Efeitos dos inibidores de AQP-4 e Kir 4.1 na secreção de S100B.

Enquanto o aumento da secreção de S100B parece ser uma resposta compensatória ao desbalanço na homeostase de água quando inibimos a AQP-4 em ratos mais jovens, a diminuição na S100B pode ser consequência de fatores neuronais liberados em consequência do acúmulo de  $K^+$  devido à inibição dos canais Kir.

## V. Conclusões

Nossos dados demonstraram um aumento na secreção de S100B em fatias hipocampais de ratos jovens tratadas com inibidores de AQP-4, possivelmente este aumento na S100B seja uma resposta compensatória ao desbalanço na homeostase de água causada pela inibição da AQP-4. Além disso, nosso trabalho demonstrou uma diminuição na secreção de S100B em fatias hipocampais tratadas com um inibidor de canais de  $K^+$ , neste caso, a diminuição na S100B possivelmente seja consequência do aumento na concentração de  $K^+$  intracelular, provocando a liberação de um fator neuronal ainda indeterminado.

Foi observada uma expressão aumentada de AQP-4 em ratos com 15 e 30 dias quando comparados com animais de 60 e 90 dias. Além disso, a expressão de Kir 4.1 também foi maior em ratos mais jovens quando comparados com animais de 90 dias.

Embora a AQP-4 e Kir 4.1 estejam co-localizadas e apresentam um padrão de expressão similar, o mecanismo pelo qual estas proteínas modulam a secreção de S100B parece ser independente.

## VI. Referências Bibliográficas

Allen, N. J. and Barres, B. A. (2005) Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 542-548.

Allen, N. J. and Barres, B. A. (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457, 675-677.

Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M. et al. (2003) Delayed K<sup>+</sup> clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13615-13620.

Barbara, B. (2010) Aquaporin biology and nervous system. *Curr Neuropharmacol*, 8, 97-104.

Benfenati, V. and Ferroni, S. (2010) Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience*, 168, 926-940.

Bianchi, R., Adami, C., Giambanco, I. and Donato, R. (2007) S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression. *J Leukoc Biol*, 81, 108-118.

Brown, A. M. and Ransom, B. R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55, 1263-1271.



Butt, A. M. and Kalsi, A. (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med*, 10, 33-44.

Buyukuysal, R. L. (2005) Protein S100B release from rat brain slices during and after ischemia: comparison with lactate dehydrogenase leakage. *Neurochem Int*, 47, 580-588.

D'Ambrosio, R., Maris, D. O., Grady, M. S., Winn, H. R. and Janigro, D. (1999) Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *J Neurosci*, 19, 8152-8162.

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

de Souza, D. F., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Nardin, P., Tortorelli, L. S., Rigo, M. M., Gottfried, C., Leal, R. B. and Goncalves, C. A. (2009) S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol*, 206, 52-57.

Del Bigio, M. R. (2001) Pathophysiologic consequences of hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am*, 12, 639-649, vii.

Detmers, F. J., de Groot, B. L., Muller, E. M., Hinton, A., Konings, I. B., Sze, M., Flitsch, S. L., Grubmuller, H. and Deen, P. M. (2006) Quaternary ammonium compounds as water channel blockers. Specificity, potency, and site of action. *J Biol Chem*, 281, 14207-14214.

Djukic, B., Casper, K. B., Philpot, B. D., Chin, L. S. and McCarthy, K. D. (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci*, 27, 11354-11365.

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

Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 1008-1022.

Esposito, G., Imitola, J., Lu, J. et al. (2008) Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Hum Mol Genet*, 17, 440-457.

Fawcett, J. W. and Asher, R. A. (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*, 49, 377-391.

Friedman, B., Schachtrup, C., Tsai, P. S., Shih, A. Y., Akassoglou, K., Kleinfeld, D. and Lyden, P. D. (2009) Acute vascular disruption and aquaporin 4 loss after stroke. *Stroke*, 40, 2182-2190.

Gee, J. R. and Keller, J. N. (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1145-1150.

Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Guerra, M. C. (2010) Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2010, 790431.

Goncalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, 41, 755-763.

Haddoub, R., Rutzler, M., Robin, A. and Flitsch, S. L. (2009) Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors. *Handb Exp Pharmacol*, 385-402.

Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119, 203-210.

Hartel, K., Singaravelu, K., Kaiser, M., Neusch, C., Hulsmann, S. and Deitmer, J. W. (2007) Calcium influx mediated by the inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel Kir4.1 (KCNJ10) at low external K<sup>+</sup> concentration. *Cell Calcium*, 42, 271-280.

Hibino, H. and Kurachi, Y. (2007) Distinct detergent-resistant membrane microdomains (lipid rafts) respectively harvest K<sup>(+)</sup> and water transport systems in brain astroglia. *Eur J Neurosci*, 26, 2539-2555.

Ho, J. D., Yeh, R., Sandstrom, A., Chorny, I., Harries, W. E., Robbins, R. A., Miercke, L. J. and Stroud, R. M. (2009) Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 7437-7442.

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

Ito, H., Yamamoto, N., Arima, H. et al. (2006) Interleukin-1 $\beta$  induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor- $\kappa$ B pathway in rat astrocytes. *J Neurochem*, 99, 107-118.

Jarius, S., Paul, F., Franciotta, D., Waters, P., Zipp, F., Hohlfeld, R., Vincent, A. and Wildemann, B. (2008) Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Pract Neurol*, 4, 202-214.

Jessen, K. R. (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1861-1867.

Kalsi, A. S., Greenwood, K., Wilkin, G. and Butt, A. M. (2004) Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J Anat*, 204, 475-485.

Ke, C., Poon, W. S., Ng, H. K., Pang, J. C. and Chan, Y. (2001) Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats. *Neurosci Lett*, 301, 21-24.

Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Nichols, C. G., Maldonado, H. M., Baksi, K., Reichenbach, A., Skatchkov, S. N. and Eaton, M. J. (2007) Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia*, 55, 274-281.

Kuppers, E., Gleiser, C., Brito, V., Wachter, B., Pauly, T., Hirt, B. and Grissmer, S. (2008) AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine--implications for proliferation of astrocytes. *Eur J Neurosci*, 28, 2173-2182.

Leite, M. C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M. C., Bortolotto, J. W., Freitas, R., Almeida, L. M., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods*, 169, 93-99.

Leite, M. C., Galland, F., de Souza, D. F., Guerra, M. C., Bobermin, L., Biasibetti, R., Gottfried, C. and Goncalves, C. A. (2009) Gap junction inhibitors modulate S100B secretion in astrocyte cultures and acute hippocampal slices. *J Neurosci Res*, 87, 2439-2446.

Lichter-Konecki, U., Mangin, J. M., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E. P. and Gallo, V. (2008) Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia*, 56, 365-377.

Liu, H., Zheng, Z. and Wintour, E. M. (2008) Aquaporins and fetal fluid balance. *Placenta*, 29, 840-847.

Manley, G. T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A. W., Chan, P. and Verkman, A. S. (2000) Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*, 6, 159-163.

Maragakis, N. J. and Rothstein, J. D. (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 679-689.

Masaki, H., Wakayama, Y., Hara, H. et al. (2010) Immunocytochemical studies of aquaporin 4, Kir4.1, and alpha1-syntrophin in the astrocyte endfeet of mouse brain capillaries. *Acta Histochem Cytochem*, 43, 99-105.

Misu, T., Takahashi, T., Nakashima, I., Fujihara, K. and Itoyama, Y. (2009) [Neuromyelitis optica and anti-aquaporin 4 antibody--distinct from multiple sclerosis]. *Rinsho Byori*, 57, 262-270.

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

Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kurachi, Y. and Ottersen, O. P. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26, 47-54.

Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M. and Ottersen, O. P. (2004) Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 129, 905-913.

Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A. et al. (2009) S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>. *Neurochem Res*, 34, 1603-1611.

Nesic, O., Guest, J. D., Zivadinovic, D., Narayana, P. A., Herrera, J. J., Grill, R. J., Mokkalapati, V. U., Gelman, B. B. and Lee, J. (2010) Aquaporins in spinal cord injury: the janus face of aquaporin 4. *Neuroscience*, 168, 1019-1035.

Ohno, Y., Hibino, H., Lossin, C., Inanobe, A. and Kurachi, Y. (2007) Inhibition of astroglial Kir4.1 channels by selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res*, 1178, 44-51.

Olsen, M. L. and Sontheimer, H. (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K<sup>+</sup> buffering to cell differentiation. *J Neurochem*, 107, 589-601.

Owler, B. K., Pitham, T. and Wang, D. (2010) Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res*, 7, 15.

Papadopoulos, M. C. and Verkman, A. S. (2005) Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem*, 280, 13906-13912.

Papadopoulos, M. C. and Verkman, A. S. (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*, 22, 778-784.

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

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



Robinson-Agramonte, M. A., Goncalves, C. A., Portela, L. V., Saiz-Hinarejos, A., Oses, J. P., Motta, L. S., Muller, A. P., Marquez Gonzalez, M. E. and Souza, D. O. (2010) Differential regulation of IgG-NMO autoantibodies on S100Beta protein and disability in relapsing neuromyelitis optica. *Neuroimmunomodulation*, 17, 177-179.

Rodrigues, L., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Leite, M. C., Quincozes-Santos, A., Quilfeldt, J. A., Achaval, M. and Goncalves, C. A. (2009) Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine. *J Alzheimers Dis*, 17, 193-202.

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

Ruiz-Ederra, J., Zhang, H. and Verkman, A. S. (2007) Evidence against functional interaction between aquaporin-4 water channels and Kir4.1 potassium channels in retinal Muller cells. *J Biol Chem*, 282, 21866-21872.

Saadoun, S. and Papadopoulos, M. C. (2010) Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience*, 168, 1036-1046.

Simard, M. and Nedergaard, M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, 129, 877-896.

Tait, M. J., Saadoun, S., Bell, B. A. and Papadopoulos, M. C. (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci*, 31, 37-43.

Tanimura, Y., Hiroaki, Y. and Fujiyoshi, Y. (2009) Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4. *J Struct Biol*, 166, 16-21.

Thrane, A. S., Rappold, P. M., Fujita, T. et al. (2011) Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling events elicited by cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 846-851.

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

Tramontina, F., Leite, M. C., Goncalves, D. et al. (2006) High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*, 31, 815-820.

Vajda, Z., Promeneur, D., Doczi, T., Sulyok, E., Frokiaer, J., Ottersen, O. P. and Nielsen, S. (2000) Increased aquaporin-4 immunoreactivity in rat brain in response to systemic hyponatremia. *Biochem Biophys Res Commun*, 270, 495-503.

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

Verkman, A. S. (2009) Aquaporins: translating bench research to human disease. *J Exp Biol*, 212, 1707-1715.

Volterra, A. and Meldolesi, J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6, 626-640.

Wen, H., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Agre, P., Ottersen, O. P. and Nielsen, S. (1999) Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal expression of the aquaporin-4 water channel. *Eur J Neurosci*, 11, 935-945.

Yool, A. J. (2007) Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *Neuroscientist*, 13, 470-485.

Yool, A. J., Brown, E. A. and Flynn, G. A. (2009) Roles for novel pharmacological blockers of aquaporins in the treatment of brain oedema and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37, 403-409.

Yukutake, Y., Hirano, Y., Suematsu, M. and Yasui, M. (2009) Rapid and reversible inhibition of aquaporin-4 by zinc. *Biochemistry*, 48, 12059-12061.

Yukutake, Y. and Yasui, M. (2010) Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience*, 168, 885-891.

Zelenina, M. (2010) Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int*, 57, 468-488.

Zelenina, M., Zelenin, S. and Aperia, A. (2005) Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. *Pediatr Res*, 57, 47R-53R.

Zhang, H. and Verkman, A. S. (2008) Aquaporin-4 independent Kir4.1 K<sup>+</sup> channel function in brain glial cells. *Mol Cell Neurosci*, 37, 1-10.

Zheng, G. Q., Li, Y., Gu, Y., Chen, X. M., Zhou, Y., Zhao, S. Z. and Shen, J. (2010) Beyond water channel: aquaporin-4 in adult neurogenesis. *Neurochem Int*, 56, 651-654.