

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica*

*Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e
Morfológicos de Células Gliais Expostas a um
Meio com Alto Conteúdo de Glicose*

Patrícia Nardin

*Orientador
Carlos Alberto Saraiva Gonçalves
Co-orientador
Ana Maria Oliveira Battastini*

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

*Porto Alegre
2006*

*“AS PESSOAS QUE
VENCEM NESTE MUNDO
SÃO AS QUE PROCURAM
AS CIRCUNSTÂNCIAS
DE QUE PRECISAM E,
QUANDO NÃO
AS ENCONTRAM,
AS CRIAM”*

Bernard Shaw

Agradecimentos

Agradeço de forma muito especial ao meu orientador, Carlos Alberto Gonçalves, pela amizade, por acreditar em mim e pela oportunidade de ser sua aluna.

À Carmem, pelos ensinamentos, pelo apoio e amizade, e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Ana Battastini pela oportunidade e co-orientação.

À Andréia, pela grande e longa amizade, desde a graduação e, por todo apoio quando ingressei neste departamento.

À Francine, pela amizade, pela força, por toda ajuda com os experimentos e por todos os ensinamentos desde o início do Mestrado.

À Ana Cristina, pela grande amizade, companheirismo e apoio quando mais precisei. Obrigada Tina !!

Ao meu grande amigo André, pela força, amizade, apoio, pela torcida e pelo agradável convívio.

À Ana Carolina pela amizade, auxílio e pelo “acidente” com o DMEM.

À Elizandra pela amizade, pelas dicas e pela ajuda com as culturas de células de glioma C₆.

À Lúcia e à Marina pelas dicas, amizade e pelo trabalho em conjunto nas culturas de astrócitos.

À Daniela e à Letícia pela amizade, carinho e momentos de alegria.

Ao Lucas pela ajuda com as culturas de glioma C₆ e astrócitos, pela amizade e torcida.

À Ana Feoli, Rodrigo, Cris Netto, Cris Borowski, Mariane, Évelin, Juliana Frizzo, Juliana Rocha, Cristopher, Giovana, Rafael, e demais colegas do LabS100 pela

amizade e ótima convivência.

À Alessandra pelo suporte com o material da cultura e pela amizade.

À todos os amigos e colegas do Departamento de Bioquímica.

Aos meus pais, Cecília e Lourival, pelo constante apoio, pela torcida e pelo amor.

Aos meus irmãos, Leandra e Wagner, pela força e amizade.

Ao Departamento de Bioquímica pela oportunidade de concluir o Mestrado e pela estrutura oferecida.

Ao Rogério, por toda ajuda e apoio, pelo carinho e compreensão.

Dedicatória

*Dedico este trabalho ao meu marido, Rogério, pela força,
paciência e companheirismo.*

Índice Geral

RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I. INTRODUÇÃO	5
I.1. DIABETES MELITO E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	5
I.2. ASTRÓCITOS NA ORGANIZAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	7
I.3. MARCADORES GLIAIS EM ASTRÓCITOS E CÉLULAS DE GLIOMA C6	12
<i>I.3.1. S100B</i>	<i>12</i>
<i>I.3.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial</i>	<i>14</i>
I.4. CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO	16
I.5. OBJETIVOS.....	18
<i>I.5.1. Objetivo Geral.....</i>	<i>19</i>
<i>I.5.2 Objetivos Específicos</i>	<i>19</i>
II. RESULTADOS.....	20
III.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
IV. BIBLIOGRAFIA.....	59
V. ANEXO	75
V.1. LISTA DE FIGURAS	75
<i>V.1.1 Figuras da Introdução e Discussão</i>	<i>75</i>
<i>V.1.2. Figuras dos Resultados.....</i>	<i>75</i>

Resumo

A S100B é uma proteína ligante de cálcio astrocítica que, além de sua função intracelular sobre o citoesqueleto, tem um efeito trófico ou apoptótico sobre neurônios, dependendo de sua concentração. Esta proteína é marcadora de ativação glial durante dano ao sistema nervoso central. O dano neurológico associado ao Diabetes Melito está sendo investigado em modelos experimentais usando estreptozotocina e, alterações neuronais são atribuídas ao déficit insulínico resultante. Recentemente, o efeito neurotóxico da estreptozotocina foi caracterizado. Ratos hiperglicêmicos apresentam alterações no conteúdo de S100B e condições hiperglicêmicas prejudicam a viabilidade de astrócitos, mas não a de células de glioma. Neste trabalho nós investigamos as alterações bioquímicas e morfológicas de astrócitos e células de glioma C₆ cultivadas em um meio com alto conteúdo de glicose. Nossos resultados demonstraram uma diminuição no imunoc conteúdo de S100B (e de proteína ácida fibrilar glial) em astrócitos corticais e células de glioma C₆ de ratos expostas a um meio com alto conteúdo de glicose. Entretanto, astrócitos exibiram uma redução na secreção basal de S100B, enquanto, células de glioma C₆ demonstraram um aumento nesta secreção. Além disso, a captação de glutamato não foi modificada em astrócitos, mas aumentou significativamente em células de glioma C₆. Estas mudanças astrocíticas podem contribuir para a patofisiologia das desordens do sistema nervoso central induzidas pelo diabetes, bem como, para as alterações neuronais associadas às atividades de tumores derivados de astrócitos. Tais alterações específicas nas atividades astrocíticas são devido a um efeito direto do meio com elevada concentração de glicose e não de um efeito tóxico da estreptozotocina ou devido a um déficit de insulina, como observado em outros modelos de estudo.

Abstract

S100B is an astrocyte calcium-binding protein that, beyond its intracellular role in the cytoskeleton, has a trophic or apoptotic effect on neurones, depending on its concentration. This protein is a marker of glial activation during brain injury. Neurological damage associated with Diabetes mellitus has been commonly investigated in experimental models using the streptozotocin, and neural changes are attributed to the resulting insulin deficit. More recently, the direct neurotoxic effect of streptozotocin has also been characterized. Hyperglycaemic rats show changes in brain S100B content and a high-glucose supply impairs viability of astrocytes, but not of glioma cells. Here we investigated biochemical and morphological alterations in astrocytes and C6 glioma cells cultured in high-glucose medium. We found a decrease in the immunocontent of S100B (and glial fibrillary acidic protein) in both rat cortical astrocytes and C6 glioma exposed to high-glucose medium. However, astrocytes exhibited a decrease in basal S100B secretion, while glioma cells demonstrated an increment. Moreover, glutamate uptake was not modified in astrocytes, but was significantly increased in C6 glioma cells. These astrocyte changes may contribute to the underlying pathophysiology of diabetes-induced brain disorders, as well as neurological alterations associated with activities of astrocyte-derived tumors. Such specific alterations in astrocyte activities are due to a direct effect of high-glucose medium and not to a toxic effect of streptozotocin or to an insulin deficit, as observed in other models of investigation.

Lista de Abreviaturas

AGE	produto final de glicação avançada
AMPA	ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
Apo E	apolipoproteína E
ATP	adenosina trifosfato
AVC	acidente vascular cerebral
BHE	barreira hemato-encefálica
BrDU	bromo-deóxiuridina
DM	diabetes melito
EATT	transportador de aminoácido excitatório
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
GABA	ácido gama-aminobutírico
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador glutamato-aspartato
GLT-1	transportador de glutamato-1
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos
NMDA	N-metil-d-aspartato
NT	neurotransmissor
PKC	proteína cinase C
RAGE	receptor para produtos finais de glicação avançada
SNC	sistema nervoso central
STZ	estreptozotocina

I. INTRODUÇÃO

I.1. Diabetes Melito e Sistema Nervoso Central

Diabetes melito (DM) é uma desordem do metabolismo de carboidratos decorrente de um defeito na secreção de insulina e/ou de uma resistência à ação da insulina (Biessels, 2005; Brands, 2004). O DM caracteriza-se por hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada por dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. Os sintomas decorrentes de hiperglicemia acentuada incluem perda inexplicada de peso, poliúria, fadiga, polidipsia e infecções repetidas na pele ou mucosas. Mesmo em indivíduos assintomáticos poderá haver discreta hiperglicemia. (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2003).

O DM é um problema crescente em saúde pública. Sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas. A prevalência do diabetes em adultos foi estimada de 4% em 1995 e de acordo com projeções é esperada aumentar mais de 5% no ano de 2025 em todo mundo. Isto implica um aumento no número de diabéticos adultos de 135 milhões em 1995 para 300 milhões em 2025 (Brands *et al.*, 2004; King, 1998).

Diabetes melito resulta em numerosas complicações secundárias que afetam: retina, rins, coração, vasos sangüíneos, sistema nervoso central e periférico (Li & Sima, 2004; Gispen & Biessels, 2000). O desenvolvimento dessas complicações depende da duração do diabetes e de um controle metabólico adequado, embora, este controle não seja suficiente para preveni-las completamente (Biessels *et al.*, 2002).

Com relação ao sistema nervoso, neuropatia periférica era considerada a única complicação, acreditava-se que o sistema nervoso central (SNC) fosse relativamente poupado no diabetes (Li & Sima, 2004). Entretanto, nos últimos anos tornou-se evidente que o diabetes melito causa complicações primárias e secundárias ao SNC com

prejuízos funcionais (Sima *et al.*, 2004; Valastro *et al.*, 2002; Kamal *et al.*, 2000).

Complicações do diabetes no SNC são referidas como encefalopatia diabética. Encefalopatia diabética primária é resultante da ação direta da hiperglicemia e/ou da hipoinsulinemia, entretanto, encefalopatia diabética secundária resulta de doença vascular e hipoglicemia induzida pelo tratamento com insulina (Li & Sima, 2004; Biessels *et al.*, 2004).

Indivíduos diabéticos são 2 a 4 vezes mais propensos a sofrerem um acidente vascular cerebral (AVC) (Brands *et al.*, 2004; Fouyas *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004) e o prognóstico é pior em diabéticos do que em indivíduos normais pois, o diabetes aumenta o dano após AVC por acelerar a maturação do dano neuronal e aumentar a área isquêmica. (Muranyi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Um aumento na incidência de convulsões foi relatado em indivíduos diabéticos (Whiting *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos evidenciaram que o diabetes aumenta o risco de demência e disfunção cognitiva em aproximadamente duas vezes (Revsin *et al.*, 2005; Artola *et al.*, 2005; Trudeau *et al.*, 2004). Estudos recentes demonstraram uma associação entre diabetes melito, depressão e doença de Alzheimer (Anderson *et al.*, 2001; Gasparini *et al.*, 2002).

Resumindo, distúrbios vasculares e metabólicos agudos e crônicos podem prejudicar a integridade estrutural e funcional do cérebro de indivíduos diabéticos e os efeitos a longo prazo do diabetes sobre o SNC manifestam-se à nível estrutural, neurofisiológico e neuropsicológico (Biessels *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004).

I.2. Astrócitos na Organização do Sistema Nervoso Central

O SNC é constituído por dois grupos de células, os neurônios e as células gliais (Jessen, 2004). Inicialmente, os neurônios, por serem células eletricamente excitáveis, foram reconhecidos como elementos celulares responsáveis pela transmissão do impulso elétrico e pelo processamento da informação, enquanto que as células gliais foram consideradas apenas um suporte inerte para os neurônios (Volterra & Meldolesi, 2005).

As células gliais são classificadas em dois grupos: a macroglia e a microglia. A microglia são células fagocíticas envolvidas nas respostas inflamatórias. A macroglia é constituída pelos oligodendrócitos que formam a mielina, pelas células ependimárias que revestem os ventrículos cerebrais e, pelos astrócitos (Perea & Araque, 2005; Jessen, 2004). Os astrócitos compreendem aproximadamente 50% de toda massa cerebral e são as células gliais mais abundantes no SNC (Gee & Keller, 2005) (Figura 1). Apesar da importância das outras células gliais, os astrócitos são alvo de interesse neste trabalho e serão minuciosamente descritos a seguir.

Os astrócitos são classificados de acordo com a morfologia e a localização em: - astrócitos radiais que compreendem as células de Müller na retina e a glia de Bergmann no cerebelo; - astrócitos protoplasmáticos (tipo 1 em cultura) que estão localizados na substância cinzenta, apresentam numerosos processos curtos, bastante ramificados e de espessura variável que se estendem à longas distâncias; - astrócitos fibrosos (tipo 2 em cultura) localizados na substância branca, têm formato estrelar com processos longos, finos e pouco ramificados. Estes processos longos são emitidos em várias direções (Privat *et al.*, 1995).

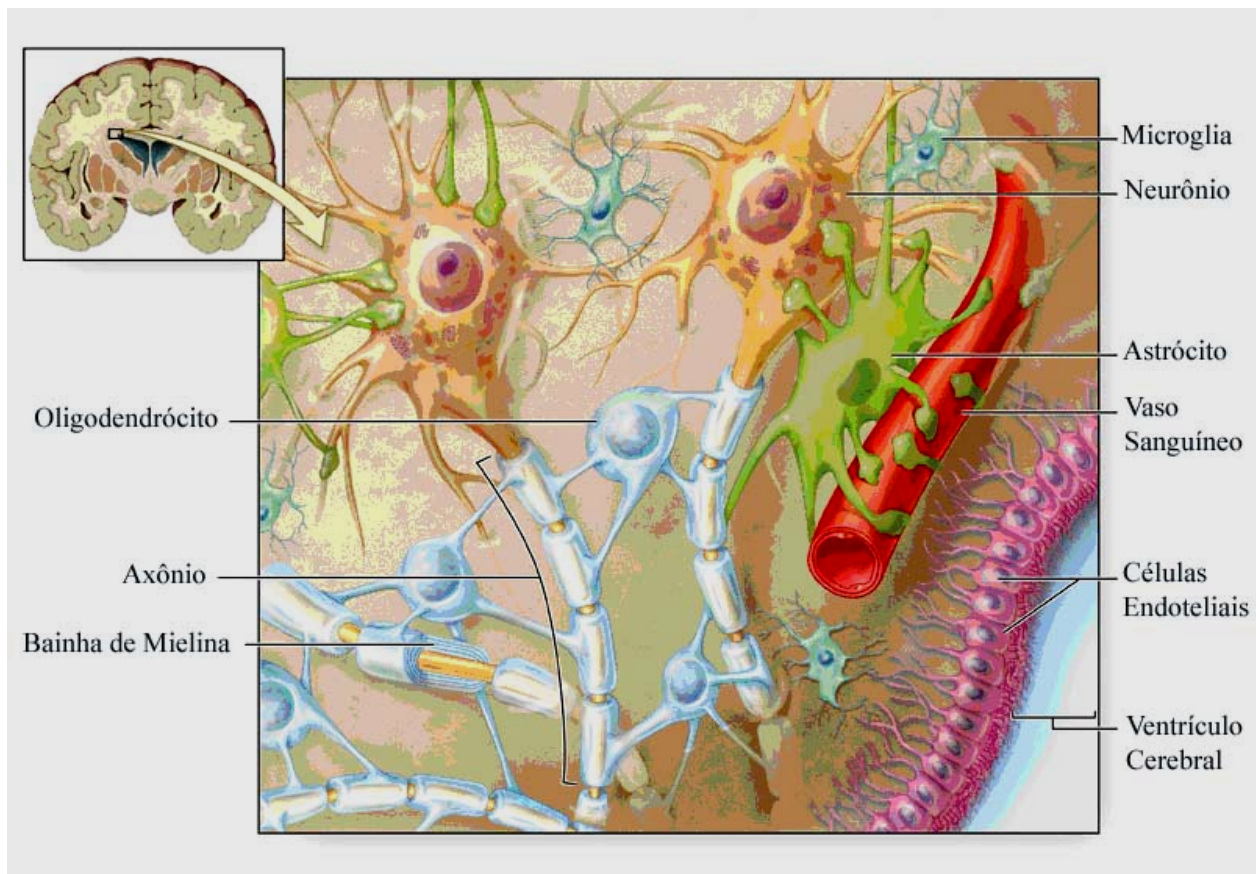


Figura 1: Os principais grupos celulares do SNC e suas inter-relações. Adaptado de www.indiana.edu

Atualmente, devido a um crescente interesse nestas células, inúmeras pesquisas revelaram que os astrócitos são células multifuncionais. Dentre as inúmeras funções, podemos citar:

- a) **Orientação:** no início do desenvolvimento do SNC, as células da glia radial agem como suporte, auxiliando na migração e no direcionamento dos neurônios até seu sítio definitivo (Jessen, 2004). Para realizar tal função, a glia emite processos, secreta proteínas de matriz extracelular e moléculas de adesão (Hof *et al.*, 1999).
- b) **Suporte Trófico:** os astrócitos regulam e produzem inúmeros fatores tróficos que regulam a morfologia, proliferação, diferenciação e a sobrevivência de

neurônios e outras células gliais inclusive dos próprios astrócitos (Hof *et al.*, 1999; Gee & Keller, 2005).

- c) **Tamponamento do meio extracelular:** os astrócitos tamponam o ambiente extracelular por manter a homeostase iônica e de água, por remover o excesso de neurotransmissores da fenda sináptica e por formar e manter a barreira hemato-encefálica.

Os astrócitos realizam o tamponamento de diversos íons como íon potássio, sódio, cloreto, hidrogênio, bicarbonato e da água por apresentarem canais iônicos e/ou transportadores permeáveis a estes íons e moléculas mantendo, desta forma, a homeostase essencial para o funcionamento normal do SNC (Simard & Nedergaard, 2004).

Astrócitos demonstraram remover o excesso de glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, norepinefrina, serotonina e acetilcolina da fenda sináptica após liberação do terminal sináptico. Cada transmissor têm sua própria via de captação e inativação (Gee & Keller, 2005; Jessen, 2004).

A barreira hemato-encefálica (BHE) é uma barreira que impede a difusão de substâncias indesejáveis entre os dois tecidos. O primeiro obstáculo é formado pelas estreitas junções entre as células endoteliais que formam a BHE. Os astrócitos envolvem os vasos sanguíneos com um grande número de *endfeets* e vários fatores por eles secretados, são importantes para a indução e manutenção da BHE (Nedergaard *et al.*, 2003).

- d) **Suporte Energético:** glicogênio é estocado predominantemente em astrócitos no SNC. Em situações onde o consumo excede a disponibilidade de glicose, o

glicogênio é degradado a glicose que pode ser metabolizada, via glicólise, a lactato que é fornecido e captado por neurônios (Pellerin & Magistretti, 2004).

e) Sinaptogênese: as sinapses são as unidades funcionais no SNC. Os astrócitos direcionam a formação das sinapses durante o desenvolvimento (Jessen, 2004; Nedergaard *et al.*, 2003), produzem o refinamento das conexões sinápticas através da redução do número de sinapses e de neurônios recém-formados e promovem sinaptogênese por sinalização mediada por contato astrócito-neurônio (Allen & Barres, 2005). Evidências recentes em culturas de células, demonstraram que não somente a formação, mas também a eficácia e a manutenção das sinapses dependem de sinais astrocíticos (Jessen, 2004).

f) Modulação Sináptica: os astrócitos expressam vários tipos de receptores para neurotransmissores incluindo receptores para glutamato, GABA, noradrenalina, acetilcolina e outros (Perea & Araque, 2005; Fellin & Carmignoto, 2004). Pesquisas recentes demonstraram que estes receptores são ativados durante atividade sináptica causando elevação nos níveis de Ca^{2+} intracelular e liberação de gliotransmissores, como por exemplo, glutamato e ATP, que modulam a transmissão sináptica e a excitabilidade neuronal (Bezzi & Volterra, 2001; Newman, 2003).

Estima-se que cada astrócito faça contato com até 140.000 mil sinapses e, então, sugere-se que um astrócito possa integrar sinais de múltiplas sinapses e, da mesma forma, retornar o sinal para múltiplas sinapses (Allen & Barres, 2005). É bem estabelecido que astrócitos se comuniquem entre eles e com outras células através de ondas de Ca^{2+} (Nedergaard *et al.*, 2003). A extensão do sinal de Ca^{2+} astrocítico intracelular depende do nível da atividade sináptica, ou seja,

em baixos níveis de atividade sináptica, o sinal de Ca^{2+} permanece espacialmente restrito a um processo astrocítico e em altos níveis de atividade sináptica, o sinal de Ca^{2+} se propaga para outros processos astrocíticos em contato com diferentes neurônios, astrócitos, microglia ou células endoteliais (Fellin & Carmignoto, 2004). Estes achados sugerem que a sinapse seja vista como uma “entidade tripartite”, consistindo de três partes funcionais, os elementos pré e pós sinápticos e a glia circundante (Jessen, 2004).

g) Resposta Imunológica: devido à presença da BHE, células imunológicas periféricas não se difundem para o cérebro então, células gliais residentes, astrócitos e microglia, são responsáveis pela resposta imunológica no cérebro. Os astrócitos também são capazes de produzir numerosas citocinas pró e antiinflamatórias incluindo uma variedade de interleucinas, fator de necrose tumoral e interferons. Cada uma destas citocinas pode ter vários efeitos dependendo da célula alvo (Gee & Keller, 2005).

h) Controle da Microcirculação Cerebral: estudos recentes produziram evidências que o tônus microvascular cerebral e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo cerebral são modulados por astrócitos de maneira dependente da atividade sináptica (Anderson & Nedergaard., 2003; Zonta *et al.*, 2003).

i) Resposta à Injúria: no caso de dano agudo ao SNC, infecções virais (HIV), isquemia cerebral e doenças neurodegenerativas, a resposta glial no SNC à injúria é denominada gliose reativa ou “cicatriz glial”. Esta resposta inicia com eventos celulares envolvendo o recrutamento de várias células sendo que, a constituição final da “cicatriz glial” é predominantemente astrocítica e esta resposta envolve também eventos moleculares com produção de fatores tróficos,

citocinas, proteases, inibidores de proteases, moléculas da superfície e da matriz celular. Uma das principais características da gliose reativa é o aumento na síntese da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que compõe os filamentos intermediários dos astrócitos e será descrita com mais detalhes a seguir (Fawcett & Asher, 1999).

I.3. Marcadores Gliais em Astrócitos e Células de Glioma C6

Os astrócitos participam de vários processos fisiológicos e metabólicos responsáveis por manter a homeostase do SNC. Insultos físicos e metabólicos provocam alterações rápidas nas células gliais e este fenômeno é denominado astrogliose reativa que é caracterizado entre outras alterações, por um aumento na expressão de marcadores gliais tais como, GFAP e S100B (Baydas *et al.*, 2003).

I.3.1. S100B

S100B é um membro da família de proteínas S100 que foram assim designadas por serem solúveis em uma solução 100% de sulfato de amônio. É uma proteína ligante de Ca^{2+} do tipo EF-hand (hélice-loop-hélice) com dois sítios ligantes de Ca^{2+} (Fritz & Heizmann, 2004).

Estruturalmente, a proteína S100B forma homodímeros constituídos de duas subunidades β unidos por pontes de dissulfeto e capazes de se ligarem a proteínas alvos (Donato, 2003).

O gene que codifica a proteína S100B em humanos está localizado no cromossomo 21q22. A S100B é produzida e secretada principalmente por astrócitos e exerce efeitos autócrinos e parácrinos sobre outras células gliais e neurônios. Entretanto, outras fontes

extracerebrais como, células adiposas, também podem secretar S100B. O mecanismo de secreção da S100B ainda não foi identificado (Rothermundt *et al.*, 2003).

A S100B apresenta funções intracelulares e extracelulares. Intracelularmente, a S100B inibe a fosforilação de várias proteínas como, por exemplo, GFAP, p₅₃ e outras; está envolvida na regulação do metabolismo energético cerebral; modula a proliferação e diferenciação de neurônios e células gliais. Além disso, a S100B regula a homeostase do Ca²⁺, interage com muitas funções imunológicas do SNC e influencia a integridade do citoesqueleto (Rothermundt, 2003; Donato, 2003).

Dependendo da concentração que é secretada, a S100B exerce um efeito dual, ou seja, em baixas concentrações (doses nM), a S100B exerce um efeito neurotrófico promovendo o crescimento de neuritos, aumentando a sobrevivência de neurônios durante o desenvolvimento e após dano ao SNC (Huttunen *et al.*, 2000) e protegendo neurônios contra a excitotoxicidade do glutamato (Ahlemeyer *et al.*, 2000; Kögel *et al.*, 2004). Este efeito trófico também é exercido em astrócitos. E, ao contrário, em altas concentrações (doses µM), a S100B exerce um efeito neurotóxico por induzir apoptose (Van Eldik & Wainwright, 2003). Parece que ambos os efeitos, neurotróficos e neurotóxicos são mediados pelo receptor RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada) (Huttunen *et al.*, 2000).

A proteína S100B é considerada um marcador de lesão cerebral aguda ou crônica por ocorrer uma elevação em sua concentração no soro e no fluido cérebro-espinhal em resposta à ativação glial (Rothermundt *et al.*, 2003).

Cultura primária de astrócitos e células de glioma C₆ estão sendo comumente utilizadas para estudar a expressão e a secreção de S100B (Pinto *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2001). Entretanto, estas células apresentam diferentes mecanismos de expressão

para o gene da S100B (Castets *et al.*, 1997).

1.3.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a subunidade protéica de filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto glial e é expressa principalmente em astrócitos diferenciados no SNC (Rodnight *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 1999).

Inicialmente isolada de lesões cerebrais (placas) de pacientes com esclerose múltipla (Eng *et al.*, 2000), a GFAP é reconhecida e amplamente utilizada como um marcador de astrócitos e de tumores de linhagem astrocítica (Pekny & Pekna, 2004).

Estruturalmente, a GFAP é um polímero que consiste em uma região amino-terminal não-helicoidal altamente básica, uma região carbóxi-terminal não-helicoidal e responsável pela ligação entre os monômeros e uma região central formada por uma extensa α -hélice cuja sequência de aminoácidos é conservada em relação a outras proteínas filamentosas intermediárias. Diferenças na estrutura destas proteínas são normalmente evidenciadas nos aminoácidos da região amino-terminal (Alberts *et al.*, 2002).

A polimerização da GFAP envolve vários passos. Inicialmente, um dímero é formado através da pareação entre dois monômeros paralelos. Posteriormente, dímeros antiparalelos interagem através de resíduos na região central formando um tetrâmero ou protofilamento e, finalmente, vários protofilamentos se unem dando origem ao polímero (Rodnight *et al.*, 1997) (Figura 2).

A fosforilação de sítios específicos de proteínas de filamentos intermediários, como a GFAP, regula o equilíbrio dinâmico entre sua forma polimerizada e despolimerizada, desempenhando importante papel na mitose (Rodnight *et al.*, 1997).

Outros fatores como a presença ou ausência de determinados cátions, pH e força iônica do meio bem como, a disponibilidade de ATP, também podem influenciar o estado de polimerização *in vitro* destas proteínas (Eng & Lee, 1995). Foi demonstrado em frações citoesqueléticas de hipocampo de ratos imaturos que a proteína S100B inibe a fosforilação da GFAP (Ziegler *et al.*, 1998).

Durante o desenvolvimento do SNC e na gliose reativa ocorre um aumento na expressão de GFAP (Gomes *et al.*, 1999). Durante o desenvolvimento glial *in vivo*, ocorre uma transição na expressão dos genes de proteínas filamentosas intermediárias. No início do desenvolvimento, a glia radial e astrócitos imaturos expressam principalmente vimentina. Posteriormente, a vimentina é progressivamente substituída pela GFAP em astrócitos diferenciados ou maduros (Wofchuk *et al.*, 1995). Em culturas primárias de astrócitos, entretanto, a vimentina coexiste com GFAP durante todo tempo de cultivo (Gottfried *et al.*, 1996). Após dano ou trauma e em diversas patologias do SNC, os astrócitos tornam-se reativos e respondem de maneira característica denominada astrogliose reativa que é caracterizada por proliferação e hipertrofia astrocítica, aumento na síntese de GFAP e outras transformações bioquímicas e citológicas (Eng & Lee, 1995).

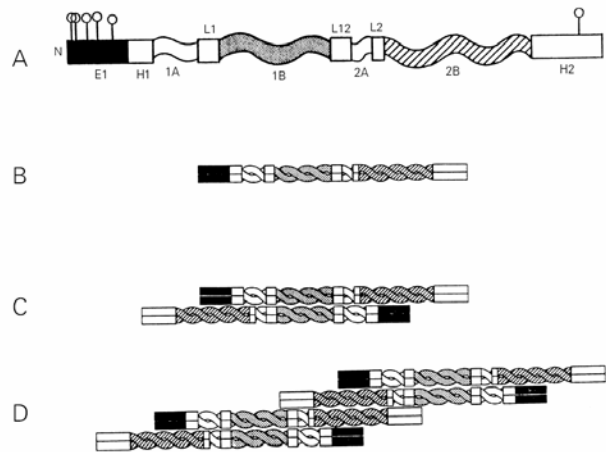


Figura 2: Ilustração esquemática da estrutura filamentosa da GFAP. Adaptado de Rodnight *et al.* (1997). Durante a polimerização da GFAP o monômero (A) associa-se a outro monômero formando um dímero (B). Este, por sua vez, associa-se de forma antiparalela a outro dímero formando um tetrâmero (C) dando origem ao filamento (D).

I.4. Captação de Glutamato

O aminoácido L-glutamato é o principal neurotransmissor (NT) excitatório do SNC de mamíferos. O glutamato apresenta diversas funções incluindo indução e eliminação de sinapses, migração, diferenciação e morte celular durante o desenvolvimento do SNC e, provavelmente, está envolvido em muitos aspectos funcionais como, cognição, memória e aprendizado (Danbolt, 2001).

O SNC contém uma grande quantidade de glutamato, mas somente uma pequena fração deste NT (aproximadamente $1\mu\text{M}$) está presente no espaço extracelular. As maiores concentrações são encontradas no interior dos terminais nervosos (Danbolt, 2001).

O glutamato exerce seus efeitos através da sua interação com receptores de glutamato localizados na superfície de células neuronais e gliais. Então, o glutamato ativa receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato) que são canais iônicos permeáveis a cátions e receptores metabotrópicos (mGluRs 1-8) que estão acoplados à proteínas G (Matute *et al.*, 2006).

A concentração de glutamato no espaço extracelular determina o grau de ativação de seus receptores, por isso, é essencial manter níveis extracelulares normais deste NT. A ativação excessiva ou prolongada dos receptores de glutamato leva à morte celular por um processo denominado excitotoxicidade. Então, o glutamato em altas concentrações é considerado uma potente neurotoxina. Estudos recentes demonstraram que o glutamato também pode ser tóxico para células gliais incluindo astrócitos e oligodendrócitos (Matute *et al.*, 2006).

A excitotoxicidade do glutamato está associada à patogênese de diversas doenças neurológicas como, por exemplo, epilepsia, isquemia cerebral, esclerose múltipla, doenças neurodegenerativas e outras (Anderson & Swanson, 2000).

A remoção do glutamato extracelular é realizada principalmente por captação mediada por proteínas transportadoras de glutamato (Danbolt, 2001). Vários tipos de células no SNC expressam transportadores de glutamato entre elas, astrócitos, neurônios, oligodendrócitos, microglia e células endoteliais. Destas células, a captação astrocítica é quantitativamente a mais eficiente para manter normal a concentração extracelular deste NT (Anderson & Swanson, 2000). Os astrócitos captam glutamato e intracelularmente, este NT é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase. O produto glutamina é liberado pelo astrócito e captado por neurônios para ser novamente convertido em glutamato. Este é o chamado ciclo glutamina-glutamato. O glutamato captado pode também ser metabolizado a α -cetoglutarato pela ação da glutamato desidrogenase ou de uma transaminase (Fonseca *et al.*, 2005).

A captação de glutamato astrocítica é mediada por sistemas dependentes e independentes de Na^+ . O primeiro, apresenta alta afinidade por glutamato e é o sistema predominante nestas células. Até agora, cinco transportadores de glutamato da família de X_{AG}^- (EAAT₁₋₅) foram clonados dentre os quais, o transportador de glutamato-1

(GLT-1 ou EAAT₂) e o transportador de glutamato-aspartato (GLAST ou EAAT₁) são os principais transportadores de glutamato dependentes de Na⁺ expressos por astrócitos (Anderson & Swanson, 2000). Em culturas de astrócitos, a expressão de GLT-1 é bastante reduzida então, culturas puras de astrócitos expressam basicamente GLAST (Gegelashvili *et al*, 1997). Os transportadores de glutamato da família X_c⁻ expressos por astrócitos são trocadores cistina-glutamato (McBean, 2002). Este sistema independente de Na⁺ representa uma pequena porcentagem da captação total de glutamato astrocítica (menos de 5%) sugerindo que a reversão deste sistema apresenta uma função limitada na captação de glutamato em condições fisiológicas, entretanto, a principal função deste sistema provavelmente seja a captação de cistina e manutenção dos níveis de glutathione intracelulares (Anderson & Swanson, 2000).

Dos dois transportadores de glutamato dependentes de Na⁺ citados acima, somente o GLAST (EAAT₁) é expresso por linhagens celulares de glioma em níveis comparáveis aos astrocíticos. Estas linhagens expressam também o trocador cistina-glutamato independente de Na⁺ (sistema X_c⁻) (Ye & Sontheimer, 1999a; Takano *et al.*, 2001).

1.5. Objetivos

Como mencionado anteriormente, o DM é uma desordem metabólica caracterizado por mudanças funcionais e estruturais no SNC (Biessels *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, pode induzir alterações nas células gliais. Até agora, pelo que sabemos, há poucos estudos de avaliação de parâmetros gliais em cultura de células mimetizando uma condição de hiperglicemia. Vários estudos utilizando um modelo de diabetes tipo I induzido por estreptozotocina relacionaram o diabetes com ambos marcadores gliais, S100B e GFAP. Neste trabalho, avaliamos estes marcadores

em cultura primária de astrócitos já que, mudanças astrocíticas podem contribuir para a patofisiologia das desordens do SNC induzidas pelo diabetes e, também, em cultura de células de glioma C₆, um modelo de tumor glial produzido em ratos e amplamente utilizado em pesquisas de sinalização celular. Ambos os tipos de culturas foram expostos a um meio com elevada concentração de glicose.

1.5.1. Objetivo Geral

Estudar parâmetros gliais em culturas de ratos expostas a um meio com alto conteúdo de glicose.

1.5.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o conteúdo intracelular de GFAP e S100B em astrócitos e células de glioma C₆ desenvolvidos num meio com alto conteúdo de glicose.
2. Avaliar a secreção de S100B em astrócitos e células de glioma C₆ desenvolvidas num meio com alto conteúdo de glicose.
3. Avaliar a captação de glutamato em astrócitos e células de glioma C₆ desenvolvidas num meio com alto conteúdo de glicose.
4. Estudar a morfologia em astrócitos e células de glioma C₆ desenvolvidas num meio com alto conteúdo de glicose.

III. DISCUSSÃO

O DM causa alterações no SNC, tanto em humanos como em modelos animais da doença (Revsin *et al.*, 2005). Ambos, diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2 estão associados à prejuízos cognitivos e demência (Gispen & Biessels, 2000).

O declínio cognitivo, relacionado ao diabetes, foi reconhecido na literatura médica desde 1922 e é paralelo a alterações estruturais e neurofisiológicas no SNC (Gispen & Biessels, 2000). Várias anormalidades estruturais foram descritas em pacientes diabéticos tais como: anormalidades degenerativas difusas e locais no córtex cerebral, morte neuronal, desmielinização, gliose reativa e, ainda, lesões isquêmicas secundárias à microangiopatia (Li & Sima, 2004). Atrofia cortical e subcortical parece serem mais pronunciadas em pacientes diabéticos do que em controles (Biessels *et al.*, 2002). Uma perda significativa de neurônios corticais em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), um modelo de diabetes tipo1, foi descrita quando comparada com ratos controles não-diabéticos (Sima *et al.*, 2004). Além disso, alterações significantes na BHE foram demonstradas em animais (Horani & Mooradian, 2003) e em pacientes diabéticos (Hovsepian *et al.*, 2004).

Dentre as alterações funcionais, diminuição na velocidade de condução do estímulo nervoso (Biessels *et al.*, 2002) e alterações na plasticidade sináptica hipocampal estão associadas com os déficits progressivos no aprendizado e memória que parece estarem relacionados com a duração e a severidade do diabetes (Kamal *et al.*, 2000; Artola *et al.*, 2005).

Recentes estudos epidemiológicos demonstraram uma associação entre diabetes e demência (Ott *et al.*, 1999). Isto não é surpreendente devido aos riscos de prejuízo cognitivo descritos acima. Existem outros fatores que associam o diabetes à demência como o risco aumentado de AVC resultando em múltiplas lesões isquêmicas ou lesões

silenciosas que progridem para doença de Alzheimer. Outros fatores, não especificamente vasculares, também podem estar envolvidos como, por exemplo, produtos finais de glicação avançada (AGEs) e fatores genéticos (Stewart & Liolitsa, 1999).

A sobrevivência neuronal depende da interação neurônio-glia e astrócitos desempenham funções fisiológicas e metabólicas essenciais para manter a homeostase do SNC. Dano ou injúria e patologias do SNC, incluindo o diabetes, causam alterações no SNC, especialmente em células gliais. Tais alterações foram descritas em inúmeros trabalhos sobre retinopatia diabética onde, as lesões clinicamente importantes envolvem os vasos sangüíneos. Entretanto, evidências demonstraram que as células nervosas e as células gliais da retina também são afetadas no início do diabetes em humanos e modelos experimentais (Asnaghi *et al.*, 2003; Rungger-Brändle *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2000).

A patogênese da encefalopatia diabética não está completamente elucidada, entretanto, um comprometimento de células gliais foi caracterizado utilizando marcadores específicos tais como, GFAP (Barber *et al.*, 2000; Baydas *et al.*, 2003; Coleman *et al.*, 2004), S100B (Baydas *et al.*, 2003; Coleman *et al.*, 2004), Apo E (Revsin *et al.*, 2005) e receptores e transportadores de glutamato (Valastro *et al.*, 2002; Coleman *et al.*, 2004). Estas alterações gliais estão sendo atribuídas a um desequilíbrio hormonal.

Pelo que sabemos, não há relatos de pesquisas sobre alterações de células gliais em culturas de células mimetizando condições hiperglicêmicas então, neste trabalho, investigamos alterações gliais em cultura de astrócitos e células de glioma C₆ cultivadas em meio com alto conteúdo de glicose.

Estudos prévios demonstraram uma relação entre morfologia glial e atividade ou

dano, *in vitro* e *in vivo* (Gottfried *et al.*, 2003; Catania *et al.*, 2003). Entretanto, enquanto o significado das mudanças morfológicas observadas nas células cultivadas em meio com alto conteúdo de glicose, neste trabalho, é discutível, sua presença não é.

Todos os componentes do citoesqueleto (microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos) tem funções específicas nos astrócitos e outros tipos celulares e são modulados por vários estímulos externos através de GTPases monoméricas, fosforilação de proteínas e proteínas ligantes de Ca^{2+} (Safavi-Abbasi *et al.*, 2001).

A família Rho de pequenas GTPases apresenta três isoformas, a Rho A, B e C. Das três isoformas, a Rho A GTPase é abundantemente expressa e é ubíqua em células de mamíferos. A proteína Rho A participa da regulação do citoesqueleto de actina de uma grande variedade de células e, conseqüentemente, está envolvida com a morfologia bem como, com a adesão celular (Jaffe & Hall, 2005).

Mudanças na morfologia de astrócitos ocorrem durante o desenvolvimento do SNC, em resposta a atividade neuronal e em condições patológicas. Os astrócitos tornam-se reativos e há um aumento na expressão de GFAP em resposta ao dano cerebral (Höltje *et al.*, 2005). Em cultura, os astrócitos apresentam um formato achatado e poligonal com os filamentos de actina polimerizados em bandas (fibras de *stress*) e, na presença de um estímulo, como por exemplo, agentes que aumentam os níveis de AMPc, os astrócitos mudam sua morfologia para um formato estelado caracterizado pela despolimerização das fibras de *stress* e adesões focais, retração do citoplasma para a área perinuclear e pela formação de finos processos que se estendem do soma até os limites originais da célula (Ramakers & Moolenaar, 1998).

Estudos recentes demonstraram que o alto conteúdo de glicose induz a regulação positiva da Rho A GTPase na artéria basilar de ratos diabéticos induzidos por STZ

(Miao *et al.*, 2002) e também a ativação da via Rho/Rock em culturas de células musculares lisas da aorta de ratos expostas a um meio com elevada concentração de glicose (Kawamura *et al.*, 2004). O meio com alto conteúdo de glicose também causa um aumento nos níveis de AMPc (Rojas *et al.*, 2003) e, conseqüentemente, induziria estelação se a Rho A não estivesse ativa neste ambiente. Aqui, estamos especulando que a elevada concentração de glicose (talvez via GLUT) em astrócitos, ative a Rho A contribuindo para a manutenção da forma poligonal.

A S100B, uma proteína ligante de Ca^{2+} , também está associada com a modulação do citoesqueleto devido a sua interação com CapZ (proteína ligante de actina) (Ivanekov *et al.*, 1995), microtúbulos (Sorci *et al.*, 2000) e GFAP (Sorci *et al.*, 1998). *In vitro*, a polimerização da GFAP foi inibida por S100B e seu efeito foi bloqueado por TRTK-12, um peptídeo da seqüência consenso encontrada na CapZ que liga S100B (Frizzo *et al.*, 2004b). Além disso, a adição deste peptídeo juntamente com S100B a frações do citoesqueleto de astrócitos bloqueou a capacidade da S100B de despolimerizar microtúbulos citoplasmáticos (Sorci *et al.*, 2000). Este peptídeo inibitório também foi capaz de bloquear a estelação de astrócitos induzida por AMPc e isto sugere a participação da S100B no processo de estelação (Frizzo *et al.*, 2004a). Esta possibilidade está de acordo com estudos prévios que demonstraram que a inibição da expressão de S100B em células de glioma C₆ resultou em uma morfologia mais poligonal (Selinfreund *et al.*, 1990). Neste sentido, a redução de S100B também contribuiria para manter o formato poligonal (Figura 3).

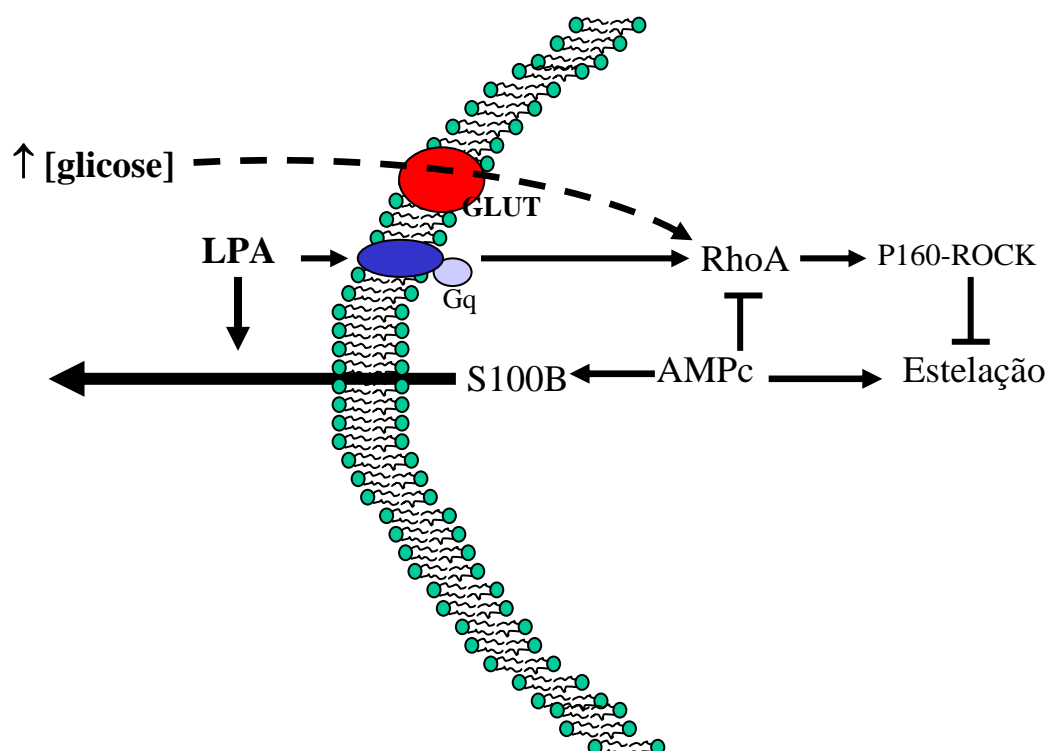


Figura 3: Modulação da morfologia astrocítica e da secreção de S100B pelo AMPc.
A linha pontilhada sugere que a elevado conteúdo de glicose extracelular (talvez via GLUT) ative a RhoA. LPA: ácido lisofosfatídico.

Menor densidade celular e confluência foram devido a menor velocidade de proliferação de astrócitos e células de glioma C₆ sugerido por experimentos adicionais com bromo-deóxiuridina (BrDU, dados preliminares). De acordo com nossos resultados, um estudo prévio demonstrou uma redução na densidade de astrócitos na retina de ratos diabéticos induzidos por STZ (Rungger-Brändle *et al.*, 2000). Nesta mesma linha, outros dois grupos independentes, demonstraram que uma elevada concentração de glicose inibe a proliferação em culturas de células endoteliais de cordão umbilical humano (Rojas *et al.*, 2003; McGinn *et al.*, 2003). Estes grupos atribuíram a inibição da proliferação a um aumento na atividade da proteína cinase C (PKC) e da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), dos níveis de AMPc e de GMPc e à fosforilação da MAPK (Rojas *et al.*, 2003; McGinn *et al.*, 2003). Outro trabalho recente demonstrou uma diminuição na proliferação de células do bulbo olfatório de ratos diabéticos

induzidos por STZ (Dennis *et al.*, 2005).

Conforme mencionado anteriormente, a ativação glial ocorre após um dano ou injúria e em condições patológicas do SNC. A glia ativada altera a expressão de diversas proteínas incluindo proteínas de adesão focal e do citoesqueleto, proteases e inibidores de proteases, citocinas, neuropeptídios e fatores de crescimento. Um indutor da ativação glial é a disfunção ou dano neuronal que produz uma rápida e vigorosa ativação glial que é transitória e reversível (Van Eldik & Wainright, 2003). Então, um aumento nos níveis de S100B no líquido e no soro é uma das respostas bioquímicas da glia ativada. Sabe-se que em cultura de células, dependendo da concentração que é secretada, a S100B exerce efeitos neurotróficos ou neurotóxicos (Donato, 2003).

O mecanismo de secreção da proteína S100B de astrócitos e células de glioma ainda permanece desconhecido (Davey *et al.*, 2001). Sabe-se que a secreção de S100B por astrócitos não confluentes depende da elevação da concentração de Ca^{2+} citoplasmático e não é afetada pelo inibidor da via clássica de secreção que envolve o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, brefeldina-A (Donato, 2003).

Várias funções extracelulares para a proteína S100B foram propostas (Donato, 2003; Van Eldik & Wainright, 2003). Em relação à glicose extracelular, há evidências que a S100B secretada poderia proteger neurônios hipocâmpais da privação de glicose (Barger *et al.*, 1995). Além disso, S100B extracelular também é capaz de protegê-los contra a toxicidade do glutamato (Ahlemeyer *et al.*, 2000; Kegel *et al.*, 2004). E ao contrário, níveis elevados de S100B podem induzir apoptose glial e neuronal. De fato, um aumento na susceptibilidade a isquemia-hipóxia pré-natal foi recentemente observado em camundongos transgênicos que superexpressam S100B (Wainwright *et al.*, 2004). Os efeitos da S100B sobre células neuronais parecem ser mediados, pelo menos em parte, pelos receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE)

(Huttunen *et al.*, 2000).

Produtos finais de glicação avançada (AGEs) são produtos de glicação não-enzimática e da oxidação de proteínas e lipídios que após sofrerem rearranjos químicos lentos e progressivos, acumulam-se em vários tecidos e no sangue (Park *et al.*, 2004; Ramasamy *et al.*, 2005). Os AGEs estão relacionados com a patogênese de diversas doenças, como a de Alzheimer e com as complicações crônicas do diabetes melito (Sasaki *et al.*, 1998). Os receptores RAGE são receptores transmembrana multi-ligantes que pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são expressos em muitos tecidos (Park *et al.*, 2004). A S100B extracelular pode interagir com RAGE e a concentração no meio extracelular desta proteína determina o efeito sobre a homeostase cerebral, com baixas concentrações induzindo efeitos benéficos e altas concentrações, efeitos prejudiciais, ou seja, a ativação de RAGE pela S100B promove efeitos tróficos e a superativação de RAGE sinaliza vias de transdução que levam à apoptose (Ding & Keller, 2005).

Nossos resultados demonstraram uma diminuição na secreção de S100B em astrócitos corticais primários cultivados com altos níveis de glicose. A S100B, secretada no meio com concentração elevada de glicose, tem uma concentração equivalente a aquela proposta como neurotrófica em culturas, embora seja significativamente menor do que os níveis secretados em meio com conteúdo normal de glicose. Entretanto, considerando o aumento quantitativo de AGE's nesta condição (e, conseqüentemente, o aumento da expressão de RAGE) (Hudson *et al.*, 2003), pode ser postulado que, apesar da diminuição na secreção de S100B, esta proteína mantém sua potencial toxicidade. Mais estudos, incluindo os níveis de RAGE, são necessários para avaliar esta possibilidade.

Se a diminuição da secreção observada em astrócitos é devido a um conteúdo

intracelular de S100B reduzido não sabemos, embora outros dados demonstraram que secreção e alterações no conteúdo intracelular são eventos independentes (Tramontina *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2004). Além disso, células de glioma C₆ demonstraram um aumento na secreção de S100B em meio com alta concentração de glicose, apesar da redução no conteúdo intracelular desta proteína. Os elevados níveis extracelulares de S100B induzidos por um ambiente com alto conteúdo de glicose poderiam favorecer a morte de células vizinhas (Donato, 2003) e angiogênese (Okamoto *et al.*, 2002) mediadas pelos receptores RAGE. Seria interessante ressaltar que restrição calórica foi proposta para a terapia de tumores cerebrais (Mukherjee *et al.*, 2004).

Nossos resultados indicam que astrócitos e células de glioma C₆ expostas a um ambiente com alto conteúdo de glicose demonstraram níveis intracelulares da proteína S100B reduzidos. Uma redução na S100B também foi observada no tecido adiposo de ratos diabéticos induzidos por STZ (Suzuki & Kato, 1985). E ao contrário, outro estudo observou um aumento na proteína S100B no tecido nervoso e adiposo em ratos hiperglicêmicos, apesar da diminuição dos níveis de RNAm para a S100B (Zimmer *et al.*, 1997). Não é possível, entretanto, dizer que o único efeito da estreptozotocina é a indução de hiperglicemia. Um efeito direto da STZ sobre o tecido nervoso foi proposto como um modelo de demência (Blokland & Jolles, 1993; Grunblatt *et al.*, 2004). A administração intracerebroventricular de STZ em doses sub-diabetogênicas causam prejuízos no metabolismo energético do SNC. Isto é acompanhado por prejuízos no aprendizado e na memória no hipocampo (Sharma & Gupta, 2002).

Os efeitos da STZ sobre marcadores astrocíticos em regiões cerebrais específicas estão sendo mais estudados recentemente. Um aumento nas proteínas S100B e GFAP analisado por *western blotting*, foi observado no córtex e no hipocampo de ratos diabéticos induzidos por STZ (Baydas *et al.*, 2003). E ao contrário, e de acordo

com nossos resultados, uma diminuição no conteúdo de GFAP hipocampal analisado por imunocitoquímica e por *western blotting* foi recentemente descrito (Coleman *et al.*, 2004).

Uma comparação direta de nossos dados com resultados prévios que fizeram uso de STZ deveria, entretanto, ser evitada. Como mencionamos anteriormente, STZ e hiperglicemia não são sinônimos e, altos níveis de glicose podem mediar o efeito sobre a S100B intracelular observado em ratos expostos a STZ. Além disso, nós utilizamos astrócitos e células de glioma privadas de comunicações naturais com neurônios e outras células do SNC, e, o tempo de exposição ao ambiente com alto conteúdo de glicose foi diferente: uma semana (no caso de glioma C₆), duas semanas (no caso de astrócitos) e quatro a oito semanas (no caso de ratos tratados com STZ). Finalmente, deveria ser mencionado que ratos alimentados por seis semanas com uma dieta hipercalórica (alto conteúdo de carboidratos) não exibiram alterações no conteúdo de S100B no hipocampo e no córtex cerebral, mas houve uma diminuição no conteúdo de S100B no fluido cérebro-espinhal (DR Ziegler, resultados não publicados).

Níveis elevados de glicose em astrócitos não afetaram a atividade de captação de glutamato astrocítica. Entretanto, um aumento nesta atividade foi induzido em células de glioma C₆. É bem estabelecido que células de glioma C₆ não apresentam o transporte de glutamato dependente de Na⁺ suficientemente funcional (capaz de transportar também cistina). Dos dois transportadores de glutamato dependentes de Na⁺ gliais, GLT-1 e GLAST, somente o GLAST é expresso em células de glioma em níveis comparáveis aos astrocíticos. Entretanto, o transportador GLAST parece acumular na membrana nuclear com pouca expressão na superfície celular. Em células de glioma, mais de 50% do transporte de glutamato é mediado pelo trocador cistina-glutamato independente de Na⁺ (Ye *et al.*, 1999). Aparentemente, a captação de cistina (para a

síntese de glutathione) em células de glioma C₆ depende principalmente deste antiporte cistina-glutamato que contribui para o dano excitotóxico de neurônios (McBean, 2002) já que a L-cistina induz a liberação de glutamato de células de glioma (Figura 4). Isto deveria ser um aspecto favorável do ambiente com elevada concentração de glicose. A S100B, liberada de células de glioma, poderia contribuir também para atenuar o provável dano excitotóxico. Entretanto, estas possibilidades não podem ser generalizadas para outros tumores e, possivelmente, aspectos negativos (incluindo elevação crônica dos níveis de glicose) são mais relevantes nestes casos.

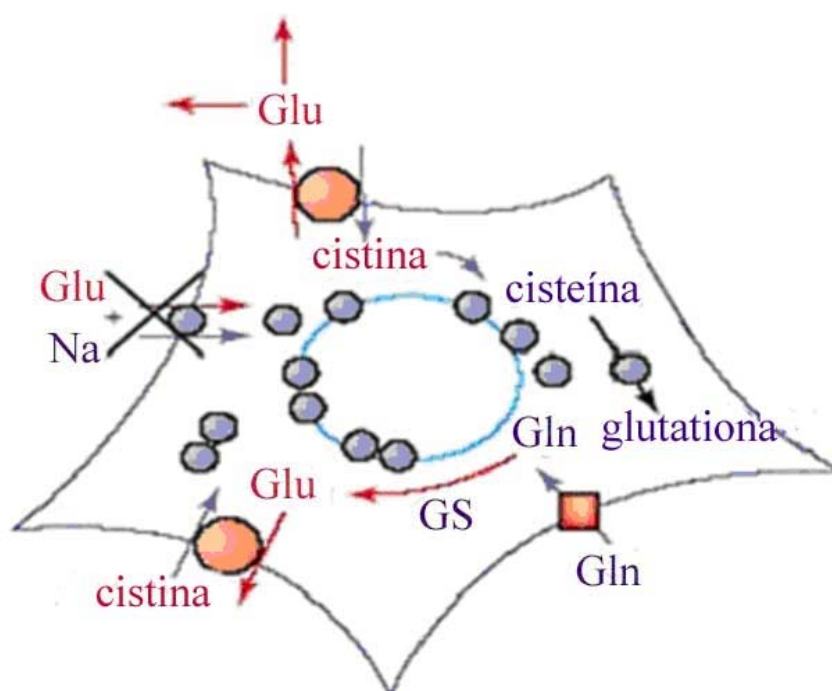


Figura 4: Liberação de glutamato de células de glioma. Adaptado de Sontheimer, 2003. A liberação de glutamato (Glu) é provavelmente um subproduto da captação de cistina para a síntese de glutathione. Diferentemente dos astrócitos, que expressam transportadores de glutamato dependentes de Na^+ (círculos azuis escuros) para a captação de glutamato do meio extracelular, as células de glioma parecem acumular estes transportadores na membrana nuclear. Trocadores cistina-glutamato realizam o efluxo de glutamato e a captação de cistina a partir da L-cistina extracelular.

Em resumo, nossos resultados demonstram que astrócitos e células de glioma C₆ apresentam uma diminuição no conteúdo intracelular das proteínas S100B e GFAP quando cultivados em um ambiente com alto conteúdo de glicose. Estas células demonstram um perfil oposto de secreção de S100B *in vitro*: uma diminuição em astrócitos primários e um aumento em células de glioma C₆. Estes dados contribuem para a compreensão dos efeitos de fatores ambientais sobre a atividade astrocítica, particularmente sobre a secreção de S100B em função do fornecimento de glicose. Baseados nos possíveis efeitos autócrinos/parácrinos da S100B, nossos resultados reforçam o conceito que níveis crônicos de glicose elevada afetam a atividade glial e, portanto, a sobrevivência neuronal. Tais alterações específicas nas atividades astrocíticas são devido ao efeito direto do meio com elevada concentração de glicose e não de um efeito da STZ ou da ausência ou redução dos níveis de insulina.

III.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos podem ser assim resumidos:

1. Alterações morfológicas são observadas em culturas de astrócitos e células de glioma C₆ expostas a um meio com alto conteúdo de glicose.
2. Menor densidade celular e confluência foram devidas à menor velocidade de proliferação de astrócitos e células de glioma C₆ na presença do meio com elevada concentração de glicose.
3. Astrócitos e células de glioma C₆ apresentam uma diminuição no conteúdo intracelular das proteínas S100B e GFAP quando cultivados em um ambiente com alto conteúdo de glicose.

4. Astrócitos e células de glioma C₆ também apresentam um perfil oposto de secreção de S100B *in vitro* na presença de um meio com altos níveis de glicose.
5. Níveis elevados de glicose em astrócitos não afetam a atividade de captação de glutamato astrocítica. Entretanto, um aumento nesta atividade foi induzido em células de glioma C₆.

Os dados apresentados nesta dissertação confirmam as alterações no SNC induzidas pela hiperglicemia no DM. Estas alterações afetam a atividade astrocítica e são devido aos elevados níveis de glicose que encontramos nesta condição metabólica e não devido a outros fatores propostos em outros modelos de DM, como, a falta de insulina ou a toxicidade da STZ.

IV. BIBLIOGRAFIA

Ahlemeyer, B., Beier, H., Semkova, I., Schaper, C. e Krieglstein, J. (2000) S100 β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine- induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5-HT $_{1A}$ - receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858: 121-128.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Walter, P. (2002) The cytoskeleton. *In: Molecular Biology of the Cell*, editado por Garland Publishing, New York, p. 780-820.

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

Anderson, C.M. e Nedergaard, M. (2003) Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosc.*, 26: 340-344.

Anderson, C.M. e Swanson, R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and functions physiological. *Glia*, 32: 1-14.

Anderson, R.J., Freedland, K.E., Clouse, R.E. e Lustman, P.J. (2001) The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a metaanalysis. *Diabetes Care*, 24: 1069-1078.

Artola, A., Kamal, A., Ramakers, G.M.J., Biessels, G.J. e Gispen, W.H. (2005) Diabetes mellitus concomitantly facilitates the induction of long-term depression and inhibits that of long-term potentiation in hippocampus. *Eur. J. Neurosc.*, 22: 169-178.

Asnaghi, V., Gerhardinger, C., Hoehn, T., Adeboje, A. e Lorenzi, M. (2003) A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes*, 52: 506-512.

Barber, A.J., Antonetti, D.A. e Gardner, T.W. (2000) Altered Expression of retinal occluding and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 41: 3561-3568.

Barger, S.W., Van Eldik, L.J. e Mattson, M.P. (1995) S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res.*, 677:167-170.

Baydas, G., Nedzvetskii, V.S., Tuzcu, M., Yasar, A. e Kirichenko, S.V. (2003) Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin Eur. J. Pharmacol., 462: 67-71.

Bezzi, P. e Volterra, A. (2001) A neuron-glia signaling network in the active brain. *Curr. Op. Neurobiol.*, 11: 387-394.

Biessels, G.J., ter Laak, M.P., Kamal, A. e Gispen, W.H. (2005) Effects of the Ca^{2+} antagonist nimodipine on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.*, 1035: 86-93.

Biessels, G.J., Van der Heide, L.P., Kamal, A., Bleys, R.L.A.W. e Gispen, W.H. (2002) Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.*, 441: 1-14. *Biochim. Biophys. Acta* 845: 311-316.

Blokland, A. e Jolles, J. (1993) Spatial learning deficit and reduced hippocampal ChAT activity in rats after an ICV injection of streptozotocin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 491-494.

Brands, A.M.A., Kessels, R.P.C., de Haan, E.H.F., Kappelle, L.J. e Biessels, G.J. (2004) Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and blood-glucose levels. *Eur. J. Pharmacol.*, 490: 159-168.

Castets, F., Griffin, W.S.T., Marks, A. e Van Eldik, L.J. (1997) Transcriptional regulation of the human S100 β gene. *Mol. Brain Res.*, 46: 208-216.

Catania, M.V., Giuffrida, R., Seminara, G., Barbagallo, G., Aronica, E., Gorter, J.A., Dell'Albani, P., Ravagna, A., Calabrese, V. e Giuffrida-Stella, A.M. (2003) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in vitro stellate astrocytes and in vivo reactive astrocytes after electrically induced status epilepticus. *Neurochem. Res.*, 28: 607-615.

Coleman, E., Judd, R., Hoe, L., Dennis, J. e Posner, P. (2004) Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia*, 48:166-178.

Danbolt, N.C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, 65: 1-105.

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

Dennis, J.C., Coleman, E.S., Swyers, S.E., Moody, S.W., Wright, J.C., Judd, R., Zhong, Q. e Morrison, E.E. (2005) Changes in mitotic rate and GFAP expression in the primary olfactory axis of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Neurocytol.*, 34: 3-10.

Ding, Q. e Keller, J.N. (2005) Evaluation of RAGE isoforms, ligands and signaling in the brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1746: 18-27.

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

Eng, L.F. and Lee, Y.L. (1995) Intermediate filaments in astrocytes. *In: Neuroglia*, editado por Kettenmann, H. e Ransom, B.R., Oxford University Press, New York, p. 650-666.

Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. e Lee, Y.L. (2000) Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP- Thirty- One Years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25: 1439-1451.

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

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

Fonseca, L.L., Monteiro, M.A.R., Alves, P.M., Carrondo, M.J.T. e Santos, H. (2005) Cultures of rat astrocytes challenged with a steady supply of glutamate: new model to study flux distribution in the glutamate-glutamine cycle. *Glia*, 51: 286-296.

Fouyas, I.P., Kelly, P.A.T., Ritchie, I.M., Lammie, G.A. e Whittle, I.R. (2003) Cerebrovascular responses to pathophysiological insult in diabetic rats. *J. Clin. Neurosc.*, 10: 88-91.

Fritz, G. e Heizmann, C.W. (2004) 3D structures of the calcium and zinc binding S100 proteins. *In: Handbook of Metalloproteins.* W. Bode, A. Messerschmidt, M. Cygler editors, Toronto p. 1-12.

Frizzo, J.K., Tramontina, A.C., Tramontina, F., Gottfried, C., Leal, R.B., Donato, R. e Gonçalves, C.A. (2004a) Involvement of the S100B in AMPc-induced cytoskeleton remodeling in astrocyte: a study using TRTK-12 in digitonin-permeabilized cells. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 24: 833-840.

Frizzo, J.K., Tramontina, F., Bortoli, E., Gottfried, C., Leal, R.B., Lengyel, I., Donato, R., Dunkley, P.R. e Gonçalves, C.A. (2004b) S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem. Res.*, 29: 735-740.

Gasparini, L., Netzer, W.J., Greengard, P. e Xu, H. (2002) Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol. Sci.*, 23: 288-293.

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

Gegelashvili, G., Danbolt, N.C. e Schousboe, A. (1997) Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J. Neurochem.*, 69: 2612-2615.

Gispen, W.H. e Biessels, G.J. (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosc.*, 23: 542-549.

Gomes, F.C.A., Paulin, D. e Moura Neto, V. (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. Braz. J. Med. Biol. Res. 32: 619-631.

Gottfried, C. (1996) Dissociação celular e cultura de astrócitos de hipocampo: padronização metodológica e análise eletroforética do perfil fosfoprotéico. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre.

Gottfried, C., Cechin, S.R., Gonzalez, M.A., Vaccaro, T.S. e Rodnight, R. (2003) The influence of the extracellular matrix on the morphology and intracellular pH of cultured astrocytes exposed to media lacking bicarbonate. Neurosci., 121:553-62.

Grünblatt, E., Hoyer, S. e Riederer, P. (2004) Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease. J. Neural. Transm. 111:367-386.

Hof, P.R., Trapp, B.D., deVellis, J., Luz, C. e Colman, D.R. (1999) The cellular components of nervous tissue *In: Fundamental Neuroscience*, editado pelos autores, Academic Press, San Diego p. 41-70.

Höltje, M., Hoffmann, A., Hoffmann, F., Mucke, C., Große, G., Van Rooijen, N., Kettenmann, H., Just, I. e Anhert-Hilger, G. (2005) Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during *in vitro* wound healing. J. Neurochem., 95: 1237-1248.

Horani, M.H. e Mooradian, A.D. (2003) Effect of diabetes on the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.*, 9: 833-840.

Hovsepian, M.R., Haas, M.J., Boyajyan, A.S., Guevorkyan, A.A., Mamikonyan, A.A., Myers, S.E. e Mooradian, A.D. (2004) Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neurosc. Lett.*, 369: 224-227.

Hudson, B.I., Bucciarelli, L.G., Wendt, T., Sakaguchi, T., Lalla, E., Qu, W., Lu, Y., Lee, L., Stern, D.M., Naka, Y., Ramasamy, R., Yan, S.D., Yan, S.F., D'Agati, V. e Schmidt, A.M. (2003) Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. *Arch. Biochem. Biophys.*, 419: 80-88.

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

Ivanekov, V.V., Jamieson, G.A., Dimlich, R.V. e Gruenstein, R.V. (1995) Characterization of S-100b binding epitopes. Identification of a novel target, the actin capping protein, CapZ. *J. Biol. Chem.*, 270: 14651-14658.

Jaffe, A.B. e Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 247-269.

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

Kamal, A., Biessels, G.J., Duis, S.E.J. e Gispen, W.H. (2000) Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia*, 43: 500-506.

Kawamura, H., Yokote, K., Asaumi, S., Kobayashi, K., Fujimoto, M., Maezawa, Y., Saito, Y. e Mori, S. (2004) High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase Pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24: 276-281.

King, H., Aubert, R.E. e Herman, W.H. (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21: 1414-1431.

Kögel, D., Peters, M., König, H.G., Hashemi, S.M.A., Bui, N.T., Arolt, V., Rothermundt, M. e Prehn, J.H.M. (2004) S100B potently activates p₆₅/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neurosci.*, 127: 913-920.

Leite, M., Frizzo, J.K., Nardin, P., de Almeida, L.M., Tramontina, F., Gottfried, C. e Gonçalves, C.A. (2004) Beta-hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res. Bull.*, 64: 139-143.

Li, Z-G. e Sima, A.A.F. (2004) C-peptide and central nervous system complications in diabetes. *Exp. Diab. Res.*, 5: 79-90.

Li, Z-G., Britton, M., Sima, A.A.F. e Dunbar, J.C. (2004) Diabetes enhances apoptosis induced by cerebral ischemia. *Life Sci.*, 76: 249-262.

Matute, C., Domercq, M. e Sánchez-Gómez, M.V (2006) Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia*, 53: 212-224.

McBean, G.J. (2002) Cerebral cystine uptake: a tale of two transporters. *Trends Pharmacol. Scien.*, 23: 299-302.

McGinn, S., Saad, S., Poronnik, P. e Pollock, C.A. (2003) High-glucose mediated effects on endothelial cell proliferation occur via p38 MAP kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285: E708-E717.

Miao, L., Calvert, J.W., Tang, J. e Zhang, J.H. (2002) Upregulation of small GTPase Rho A in the basilar artery from diabetic (mellitus) rat. *Life Sci.*, 71: 1175-1185.

Mukherjee, P., Abate, L.E e Seyfried, T.N. (2004) Antiangiogenic and proapoptotic effects of dietary restriction on experimental mouse and human brain tumors. *Clin. Cancer Res.*, 10: 5622-5629.

Muranyi, M., Fujioka, M., He, Q., Han, A., Yong, G., Csiszar, K. e Li, P-A (2003) Diabetes, 52: 481-486.

Nedergaard, M., Ransom, B. e Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosc., 26: 523-530.

Newman, E.A. (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. Trends Neurosc., 26: 536-542.

Okamoto, T., Tanaka, S., Stan, A.C., Koike, T., Kase, M., Makita, Z., Sawa, H. e Nagashima, K. (2002) Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. Microvasc. Res. Mar., 63:186-95.

Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A. e Breteler, M.M. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. Neurology, 53:1937-1942.

Park, I.H., Yeon, S.I., Youn, J.H., Choi, J.E., Sasaki, N., Choi, I.H. e Shin, J.S. (2004) Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocyte and peripheral blood mononuclear cells. Mol. Immunol., 40: 1203-1211.

Pekny, M. e Pekna, M. (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. J. Pathol. 204: 428-437.

Pellerin, L. e Magistretti, P.J. (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *The Neuroscientist*, 10: 53-62.

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

Pinto, S., Gottfried, C., Mendez, A., Gonçalves, D., Karl, J., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S. e Rodnight, R. (2000) Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *Febs Lett.* 486: 23-207.

Privat, A., Gimenez-Ribotta, M. e Ridet, J-L. (1995) Morphology of astrocytes. In: *Neuroglia*, editado por Kettenmann, H. e Ransom, B.R. Oxford University Press, New York, p. 58-84.

Ramakers, G.J.A. e Moolenaar, W.H. (1998) Regulation of astrocyte morphology by Rho A and lysophosphatidic acid. *Exp. Cell Res.*, 245: 252-262.

Ramasamy, R., Vannucci, S.J., Du Yan, S.S., Herold, K., Yan, S.F. e Schimdt, A.M. (2005) Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiol.*, 15: 16R-28R.

Revsin, Y., Saravia, F., Roig, P., Lima, A., de Kloet, R., Homo-Delarche, F. e De Nicola, A.F. (2005) Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Res.*, 1038: 22-31.

Rodnight, R., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S.T. e Leal, R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 325-338.

Rojas, S., Rojas, R., Lamperti, L., Casanella, P. e Sobrevia, L. (2003) Hyperglycaemia inhibits thymidine incorporation and cell growth via protein kinase C, mitogen-activated protein kinases and nitric oxide in human umbilical vein endothelium. *Exp. Physiol.*, 88: 209-219.

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

Rungger-Brändle, E., Dosso, A.A. e Leuenberger, P.M. (2000) Glial Reactivity, an Early Feature of Diabetic Retinopathy. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, 41: 1971-1980.

Safavi-Abbasi, S., Wolff, J.R. e Missler, M. (2001) Rapid morphological changes in astrocytes are accompanied by redistribution but not by quantitative changes of cytoskeletal proteins. *Glia*, 36: 102-115.

Sasaki, N., Fukatsu, R., Tsuzuki, K., Hayashi, Y., Yoshida, T., Fujii, N., Koike, T., Wakayama, I., Yanagihara, R., Garruto, R., Amano, N. e Makita, Z. (1998) Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Am. J. Pathol.*, 153: 1149-1155.

Selinfreund, R.H., Barger, S.W., Welsh, M.J. e Van Eldik, L.J. (1990) Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. *J. Cell Biol.*, 111: 2021-2028.

Sharma, M. e Gupta, Y.K. (2002) Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life Sci.*, 71: 2489-2498.

Sima, A.A.F., Kamiya, H. e Li, Z.G. (2004) Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.*, 490: 187-197.

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

Sociedade Brasileira de Diabetes (2003) Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. *In: Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002*, editado e produzido por Diagraphic Editora, Rio de Janeiro, p. 1-73.

Sorci, G., Agneletti, A.L. e Donato, R (2000) Effects of S100A₁ and S100B on microtubule stability: an *in vitro* study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. *Neurosc.*, 99: 773-783.

Sorci, G., Agneletti, A.L., Bianchi, A.L. e Donato, R. (1998) Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1448: 277-289.

Stewart, R. e Liolitsa, D. (1999) Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabetic Medicine*, 16: 93-112.

Suzuki, F. e Kato, K. (1985) Inhibition of adipose S-100 protein release by insulin.

Takano, T., Lin, J.H., Arcuino, G., Gao, Q. Yang, J. e Nadergaard, M. (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Medicine*, 7: 1010-1015.

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

Valastro, B., Cossette, J., Lavoie, N., Gagnon, S., Trudeau, F. e Massicotte, G. (2002) Up-regulation of glutamate receptors is associated with LTP defects in the early stages of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 45: 642-650.

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

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

Wainwright, M.S., Craft, J.M., Griffin, W.S., Marks, A., Pineda, J., Padgett, K.R. e Van Eldik, L.J. (2004) Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann. Neurol.*, 56: 61-67.

Whiting, S., Camfield, P., Arab, D. e Salisbury, S. (1997) Insulin-dependent diabetes mellitus presenting in children as frequent, medically unresponsive, partial seizures. *J. Child. Neurol.*, 12: 178-180.

Wofchuk, S.T. e Rodnight, R. (1995) Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slices of rat hippocampus. *Develop. Brain Res.*, 85: 181-186.

Ye, Z.; Rothstein, J.D. e Sontheimer, H. (1999a) Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* 19: 10767-10777.

Ziegler, D.R., Innocente, C.E., Leal, R.B., Rodnight, R. e Gonçalves, C.A. (1998) The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 23: 1259-1263.

Zimmer, D.B., Chessher, J., Wilson, G.L. e Zimmer, W.E. (1997) S100A1 and S100B expression and target proteins in type I diabetes. *Endocrinology* 138: 5176-5183.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K-A., Pozzan, T. e Carmignoto, G. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neurosci.*, 6: 43-50.

V. Anexo

V.1. Lista de Figuras

V.1.1 Figuras da Introdução e Discussão

<i>FIGURA 1: OS PRINCIPAIS GRUPOS CELULARES DO SNC E SUAS INTER-RELAÇÕES</i>	<i>8</i>
<i>FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA FILAMENTOSA DA GFAP.</i>	<i>16</i>
<i>FIGURA 3: MODULAÇÃO DA MORFOLOGIA ASTROCÍTICA E DA SECREÇÃO DE S100B PELO AMP_C</i>	<i>51</i>
<i>FIGURA 4: LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO DE CÉLULAS DE GLIOMA</i>	<i>56</i>

V.1.2. Figuras dos Resultados

<i>FIGURA 1: MORPHOLOGY AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY FOR GFAP IN CORTICAL ASTROCYTES AND C6 GLIOMA CELLS CULTURED IN A HIGH-GLUCOSE MEDIUM.....</i>	<i>47</i>
<i>FIGURA 2: S100B SECRETION IN ASTROCYTES AND C6 GLIOMA CELLS CULTURED IN HIGH- GLUCOSE MEDIUM.....</i>	<i>48</i>
<i>FIGURA 3: S100B CONTENT IN ASTROCYTES AND C6 GLIOMA CELLS CULTURED IN HIGH- GLUCOSE MEDIUM.....</i>	<i>49</i>
<i>FIGURA 4: GFAP CONTENT IN ASTROCYTES AND C6 GLIOMA CELLS CULTURED IN HIGH- GLUCOSE MEDIUM</i>	<i>50</i>
<i>FIGURA 5: GLUTAMATE UPTAKE IN ASTROCYTES AND C6 GLIOMA CELLS CULTURED IN HIGH-GLUCOSE MEDIUM</i>	<i>51</i>