

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

***Alterações do conteúdo de S100B durante o
desenvolvimento em tecido encefálico, líquido e cultura
de astrócitos corticais de rato***

Francine Tramontina

Orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

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

Porto Alegre, 2002

***Tu te tornas eternamente responsável por tudo
aquilo que cativas.***

Saint Exupèri

Agradecimentos

Acredito que esta seja a parte mais difícil, pois ao longo destes 4 anos na Bioquímica, muitas pessoas passaram colaborando com o trabalho de todos nós.

Ao CA, agradeço pela oportunidade e compreensão nos meus momentos de ausência no Lab em função do curso de Análises Clínicas. Também agradeço ao exemplo de dedicação à pesquisa. Obrigada Chefe!

À Juliana, querida amiga, muito obrigada! Por me ensinar pacientemente as técnicas do laboratório desde a iniciação científica. Mas o mais importante é agradecer os seus conselhos nas horas difíceis. É muito bom poder contar contigo.

Sabrina, minha dedicada bolsista, o que seria de mim sem você? Obrigada por estar sempre disposta a trabalhar. O seu desempenho no laboratório foi excepcional, parabéns!

Dani G. e Marina, obrigada pela colaboração com o trabalho e principalmente pela amizade e torcida para que os experimentos dessem certo.

Érica, obrigada pela sua ajuda na cultura.

Carmem, obrigada pela amizade, colaboração e oportunidade de trabalhar contigo.

À professora Cristiane Salbego agradeço pela paciência e colaboração.

Dani O., a ti eu agradeço o exemplo de coragem!

Dioguinho, obrigada pelas dicas no computador.

Ao Rosca agradeço pela disposição em coletar o líquido.

Gostaria de fazer um agradecimento geral, pois não quero deixar ninguém de fora. Agradeço a todos os amigos dos laboratórios 33, 35 e 37.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Valmor, minha mãe Carmem, minha irmã Ana Carolina. Vocês são a minha fonte de energia e amor.

Não poderia deixar de dedicar este trabalho também ao Matheus, grande amor da minha vida.

Sumário

Lista de figuras.....	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	1
1.1.1 Gliogênese.....	2
1.1.2 Neurogênese e sinaptogênese.....	4
1.2 Ontogenia de proteínas gliais e neurais.....	7
1.2.1 Ontogenia da S100B.....	7
1.2.2 Ontogenia da GFAP.....	9
1.2.3 Ontogenia da GAP-43.....	9
1.3 Funções da proteína S100B.....	11
1.3.1 Funções intracelulares da S100B.....	11
1.3.2 Funções extracelulares da S100B.....	13
2. Objetivos.....	16
3. Materiais e métodos.....	17
3.1 Obtenção das microfatias.....	17
3.2 Eletroforese unidimensional.....	18
3.3 Eletrotransferência e imunodeteção da GFAP e GAP-43.....	19
3.3.1 Eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose.....	19
3.3.2 Imunodeteção.....	20
3.4 Cultura primária de astrócitos de córtex cerebral.....	21
3.5 Secreção de S100B em culturas de diferentes idades.....	23
3.6 Obtenção de líquido.....	24
3.7 Quantificação de S100B pelo método de ELISA.....	25
3.7.1 Soluções utilizadas.....	25
3.7.2 Amostras utilizadas.....	25
3.7.3 Processamento das amostras.....	25
3.7.4 Método.....	26
3.8 Dosagem de proteínas.....	27
4 Resultados.....	28
5 Discussão.....	46
6 Conclusões.....	53
7 Referências bibliográficas.....	54

Lista de figuras

Figura 1: Ontogenia da S100B em hipocampo.....	29
Figura 2: Ontogenia da S100B em córtex cerebral.....	31
Figura 3: Ontogenia da S100B em cerebelo.....	33
Figura 4: Ontogenia comparativa da S100B entre as áreas cerebrais.....	35
Figura 5: Ontogenia da S100B em líquor.....	37
Figura 6: Ontogenia da s100B em cultura primária de astrócitos de córtex.....	39
Figura 7: Secreção da S100B em cultura primária de astrócitos de diferentes idades.....	41
Figura 8: Ontogenia da Gap-43 em hipocampo, córtex frontal e cerebelo.....	43
Figura 9: Ontogenia da GFAP em diferentes regiões cerebrais.....	45

Resumo

A S100B é uma proteína ligante de cálcio expressa e secretada por astrócitos. Em culturas de neurônios a S100B estimula a sobrevivência e extensão de neuritos. Estudos de imunocitoquímica e hibridização do RNAm *in situ* indicaram um aumento pós-natal desta proteína num período coincidente com a sinaptogênese em ratos. Neste trabalho foi investigado o imunoconteúdo da S100B por ELISA no tecido cerebral e no líquido de ratos durante o desenvolvimento pós-natal bem como o conteúdo e secreção de S100B em culturas de astrócitos corticais de diferentes idades. Também foi avaliada a ontogenia da GFAP e GAP-43, dois possíveis alvos da S100B. Os resultados mostram um acúmulo de S100B em hipocampo, córtex cerebral e cerebelo entre a segunda e quarta semana pós-natal. Uma redução da S100B no líquido foi observada após um período considerado crítico para a sinaptogênese em roedores. Um perfil semelhante foi observado durante o envelhecimento das culturas. Este estudo contribui com a idéia de que a S100B é uma proteína glial importante durante o desenvolvimento cerebral e que alterações nos seus níveis extracelulares devem estar envolvidos com a plasticidade sináptica.

Abstract

S100B is a calcium binding protein expressed and secreted by astrocytes. In neuronal cultures S100B stimulates survival and extension of neurites. Immunocytochemistry and in situ mRNA hybridization studies indicated a post natal increase of this protein in a period coincident with synaptogenesis in rat. In the present work we investigated the immunoccontent of S100B by ELISA in brain tissue and in cerebrospinal fluid of rat during post natal development as well as content and secretion of S100B in pre and post confluent primary astrocyte cultures. We also investigated the ontogeny of two putative targets of S100B, the glial fibrillary acidic protein and the neuronal growth-associated protein of 43 kDa (GAP-43). Our data show an accumulation of S100B in hippocampus, cerebral cortex and cerebellum between second and fourth postnatal weeks. A decrease of the cerebrospinal fluid S100B was observed after the period assumed as critical for synaptogenesis in rodents. A similar profile of cell accumulation and decrease of basal secretion was observed during aging of astrocyte cultures. These data contribute to idea that S100B is an important glial derived protein during brain development and that changes in extracellular levels of S100B maybe involved in synaptic plasticity.

1 Introdução

1.1. Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

A maior parte das pesquisas sobre desenvolvimento tem avaliado os períodos precoces das intensas transformações associadas ao desdobramento de um organismo a partir de um simples ovo fertilizado, desde a embriogênese até a maturação pós-natal. Durante este período, no Sistema Nervoso, emergem diversos fenótipos neurais. O estudo dos processos moleculares e celulares que ocorrem durante o desenvolvimento ajuda a desvendar os mecanismos responsáveis pelos eventos que modulam os circuitos neurais. É importante lembrar que a forma pela qual o Sistema Nervoso desenvolve-se e funciona depende da interdependência dinâmica entre genes e ambiente, e também entre células neuronais e gliais. Subjacentes à grande complexidade do Sistema Nervoso maduro, ocorrem passos de transformações básicas comuns a todos os vertebrados (Arenander e de Vellis, 1994).

A origem do Sistema Nervoso nos vertebrados ocorre a partir de uma porção embrionária chamada ectoderma. Neste estágio inicial ocorrem três eventos importantes. O primeiro é a indução neural, um processo pelo qual o ectoderma é induzido pelo mesoderma a formar a placa neural na superfície dorsal do embrião (Kintner e Lumsden, 1999). Esta placa neural desenvolve-se em tecido neural, como é demonstrado por experimentos de transplante onde o ectoderma neural é cirurgicamente transferido para outras partes do embrião, produzindo tecido neural auxiliar (Arenander e de Vellis, 1994). O próximo evento denomina-se neurulação, um processo morfogênético durante o qual a

placa neural forma o tubo neural, posicionando o Sistema Nervoso no eixo dorsal do embrião . Também ocorre nesta fase a formação da crista neural (Kintner e Lumsden, 1999). O tubo neural origina o Sistema Nervoso Central (SNC) e a crista neural, o Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Alberts et al., 1997). Inicialmente, o desenvolvimento cerebral envolve a geração de células gliais e neuronais a partir da zona ventricular do tubo neural (Laming et al., 2000). Na próxima etapa, o modelamento neural, ocorre uma série de alterações em que o tubo neural é dividido em suas regiões distintas que levarão à formação das diferentes áreas do Sistema Nervoso (Kintner e Lumsden, 1999). Para tanto, as células epiteliais pseudo-estratificadas do tubo neural proliferam contínua e rapidamente, enquanto que o aumento da pressão dentro do canal central leva à “balonização” da região rostral do tubo para formar as principais divisões do cérebro: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Arenander e de Vellis, 1994).

1.1.1 Gliogênese

Inicialmente, o neuroepitélio contém somente uma população de células não diferenciadas: as células tronco. Estas células originam duas linhagens celulares: as células tronco gliais (linhagem glioblástica) e neuronais (linhagem neuroblástica) que iniciam uma etapa de proliferação. No SNC, a glia é constituída por astrócitos, oligodendrócitos e microglia enquanto que, no SNP, as células de Schwann constituem o principal componente glial (Hof et al., 1999). Acredita-se que a linhagem glioblástica possa dividir e originar três grupos de células precursoras/progenitoras: (a) o progenitor de astrócitos tipo

1, (b) precursor de oligodendrócito/astrocítico tipo 2 (O2A) e (c) progenitor da glia radial (Evans e Hutchins, 1997). A superfície ventricular do cérebro em desenvolvimento é considerada a origem destas células progenitoras. A separação destas linhagens ocorre durante o desenvolvimento embrionário (Arenander e de Vellis, 1994). Dentre as primeiras células geradas no desenvolvimento cerebral estão as células da glia radial. Estas células apresentam importantes características dos astrócitos: a expressão de marcadores celulares como proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina e proteína S100B (Laming et al., 2000). O corpo das células da glia radial primeiramente reside na zona ventricular, enquanto um processo apical expande-se levando ao espessamento do tubo neural servindo como substrato para a migração de neurônios (Rakic, 1971). Estas observações têm levado à hipótese de que o arranjo das células da glia radial talvez sirva como um andaime para a organização vertical de estruturas laminares como hipocampo, córtex e cerebelo. Destes, o hipocampo e o cerebelo são estruturas simples, possuindo apenas duas camadas neuronais. O córtex é mais complexo, sendo formado por seis camadas celulares (Hatten e Heintz, 1999).

Enquanto todos os outros tipos de células persistem no adulto ao longo do amadurecimento, as células da glia radial em muitas regiões cerebrais parecem ser convertidas a astrócitos e células endoteliais (Evans e Hutchins, 1997; Laming et al., 2000). Em cerebelo e retina, a glia radial conserva muito de suas características e persiste como glia de Bergmann e glia de Muller, respectivamente (Evans e Hutchins, 1997).

Os oligodendrócitos são gerados após o nascimento e passam por uma série de fenótipos desde células tronco indiferenciadas até células maduras formadoras de mielina (Hof et al., 1999). Em cultura, o progenitor O2A é dito uma célula bipolar. Estas células quando cultivadas em meio contendo baixas concentrações de soro, diferenciam-se rapidamente em oligodendrócitos maduros num período de 3 a 5 dias. Por outro lado, quando cultivadas com altas concentrações de soro, diferenciam-se em astrócitos tipo 2. *In vivo*, a interação célula-célula do Sistema Nervoso em desenvolvimento na forma de fatores de crescimento modula o desenvolvimento normal do progenitor incluindo a diferenciação em oligodendrócito ou astrócito tipo 2, a extensão da divisão celular e o tempo e razão da diferenciação celular (Arenander e de Vellis, 1994).

As células microgliais por sua vez, seriam derivadas de monócitos que penetram no parênquima cerebral durante o desenvolvimento (Hof et al., 1999).

1.1.2 Neurogênese e sinaptogênese

No tubo neural, as células tronco neurais proliferam até que sinais desconhecidos induzam à saída do ciclo mitótico, estas células pós-mitóticas perdem o contato com a superfície ventricular e migram formando camadas celulares que darão origem ao SNC (Arenander e de Vellis, 1994). Quando os neurônios jovens saem do ciclo mitótico, eles movimentam-se a partir do sítio de origem até o seu destino final no cérebro e medula espinhal. Migrações radiais são guiadas pelos processos das células da glia radial, enquanto que migrações tangenciais possivelmente ocorrem ao longo dos neuritos.

Após a migração dos neurônios, ocorre a sua maturação. Isto envolve a diferenciação do fenótipo neural e o estabelecimento de processos dendríticos e axonais (Laming et al., 2000). Os processos de alongação e ramificação celular determinam o fenótipo final da célula e a sua participação no circuito neural local e global. Este processo de diferenciação morfológica requer o crescimento dirigido de um considerável número de processos celulares para múltiplos alvos específicos, muitas vezes distantes do corpo celular.

Os cones de crescimento são as estruturas capazes de realizar este processo de expansão. Estão localizados nas extremidades dos neuritos e exibem dois tipos de estruturas móveis, os filopódios, estruturas semelhantes a espinhos, e os lamelopódios, que constituem uma típica membrana franzida. O movimento do cone de crescimento pode ser influenciado por diversos fatores como gradiente de NGF (“Nerve Growth Factor”), neurotransmissores como a serotonina, atividade elétrica e moléculas de adesão da matriz extracelular (Arenander e de Vellis, 1994).

Nos roedores (e primatas) a formação de sinapses ocorre nos períodos pré e pós-natal (Laming et al., 2000). Duas idéias gerais têm sido propostas para explicar de que forma conexões apropriadas são estabelecidas no desenvolvimento do SNC: o crescimento do axônio pode ser altamente direcionado ou alternativamente ele pode ser menos específico e as conexões desfavoráveis podem ser eliminadas mais tarde. Agora está claro que os axônios seguem vias altamente específicas para alcançar seu campo alvo. Tendo atingido o alvo, os axônios podem arborizar-se amplamente para estabelecimento da via final de conexões envolvendo a expansão seletiva de

conexões corretas e retração de cones incorretos (Raper e Lavigne, 1999). O estabelecimento de uma sinapse seguindo o contato inicial entre um axônio em crescimento e a sua célula alvo envolve uma elaborada troca de sinais entre neurônio e alvo, em que cada célula sustenta e induz a diferenciação de sua companheira. Tal comunicação envolve fatores de crescimento como o já citado NGF e citocinas como a proteína S100B (Donato, 2001). A formação de sinapses não determina a história de como a via final da conexão sináptica é estabelecida. O sistema nervoso em desenvolvimento produz conexões em excesso e o refinamento de conexões funcionais específicas será efetuado pela eliminação de sinapses excedentes. Neurônios pré-sinápticos competem pelo alvo pós-sináptico, com a perda na competição retraem suas sinapses e alguns acabam morrendo. O processo de eliminação de sinapses refina um modelo de conexões inicialmente difuso em um modelo adulto, em que as sinapses são específicas entre elementos pré e pós-sinápticos (Lichtman et al., 1999).

Embora a densidade neuronal e as vias básicas de crescimento axonal e dendrítico sejam determinadas antes do nascimento, o remodelamento de conexões sinápticas continua ao longo da vida. Nesta etapa, um importante processo relacionado com o desenvolvimento da organização neuronal é a plasticidade, uma forma de regulação da comunicação sináptica (Evans e Hutchins, 1997). No remodelamento pós-natal estão envolvidos sinais de comunicação como NGF e S100B, também envolvidos na formação e conexão sináptica pré-natal. Novas evidências indicam que astrócitos alteram suas relações físicas com os neurônios para regular a comunicação neuronal. Isto

pode ser acompanhado pelos astrócitos rearranjando seus processos para modular contatos sinápticos e através do estabelecimento e manutenção de grupamentos neuronais. Por associar-se seletivamente a complexos sinápticos, os astrócitos podem, através de sua bem conhecida capacidade de regular o ambiente extracelular, modular a fisiologia sináptica (Laming et al., 2000). Fica clara a importância da relação neurônio-glia, seja durante as etapas iniciais de migração neuronal, como ao longo do desenvolvimento, quando os astrócitos fornecem ao neurônio um ambiente fisiologicamente propício para a sobrevivência e plasticidade.

1.2 Ontogenia de proteínas gliais (S100B e GFAP) e neurais (GAP- 43)

1.2.1 Ontogenia da S100B

A S100B faz parte de uma família de proteínas ligantes de Ca^{2+} do tipo “EF-hand”. Em mamíferos ela é mais abundante em células gliais do SNC e SNP, sendo considerada uma proteína marcadora de astrócitos. Também é expressa por melanócitos, condrócitos e adipócitos (Donato,1999). Esta proteína pode ser encontrada solúvel no citoplasma, associada à membrana plasmática, a outras membranas intracelulares e ao citoesqueleto, o que sugere seu papel em diversos processos celulares (Sorci et al., 1998). A literatura pouco nos informa sobre sua distribuição no SNC durante o desenvolvimento, embora a ela tenha sido postulada importante função na maturação astrocítica e migração neuronal (Tiu et al., 2000).

Em ratos, os estudos datam de 1972. Neste caso, foi possível medir a proteína logo após o nascimento e seu acúmulo iniciou a partir dos 14 dias

aumentando rapidamente até os 6 meses. A partir desta data iniciou-se um período de queda nas quantidades da proteína que foi constatado até os 30 meses. O prosencéfalo consiste na região cerebral em que os níveis da proteína começaram a diminuir consideravelmente antes das demais regiões, indicando que o desenvolvimento bioquímico e envelhecimento do SNC são processos regionalmente seletivos (Cícero et al., 1972).

Estudos de imunistoquímica demonstraram que em hipocampo de humanos, algumas células imunorreativas para S100B aparecem a partir da 12^a semana de gestação, sendo que este número aumenta significativamente na 25^a semana. Em adultos a imunorreatividade é semelhante à do recém-nascido na camada molecular do hipocampo, enquanto que as camadas polimórfica e piramidal apresentam um decréscimo do número de células positivas. No córtex entorrinal, a proteína mostrou-se imunorreativa a partir da 15^a semana de gestação e manteve-se na mesma intensidade durante o desenvolvimento, inclusive na idade adulta. Em córtex occipital o número de células positivas para todas as camadas, foi maior que o encontrado no hipocampo e córtex entorrinal, a imunorreatividade apareceu a partir da 21^a semana e atingiu um platô na 27^a semana. Adultos apresentaram valores semelhantes ao recém-nascido na camada subcortical, enquanto que na camada granular o número de células reativas aumentou (Tiu et al., 2000). A expressão diferenciada de S100B sugere que esta proteína apresenta diferentes funções durante o desenvolvimento e no adulto.

1.2.2 Ontogenia da GFAP

A GFAP é uma proteína marcadora de astrócitos presente em filamentos intermediários do grupo III. Exibe uma atividade dinâmica modulada por fosforilação e desfosforilação, efetuando um papel fundamental na plasticidade astrocítica (Rodnight et al., 1997). O seu estado de fosforilação é regulado, dentre outros fatores, pela proteína S100B (Ziegler et al., 1998).

Em ratos, o RNA mensageiro é detectado tardiamente durante a gestação, por volta do dia 15, e apresentando elevação até o dia 21 (Sancho-Tello et al., 1995). No 15º dia pós-natal ocorre um aumento transitório da proteína consistente com o aparecimento de astrócitos tipo 2 durante os eventos iniciais de mielinização (Landry et al., 1990). Em cultura primária de astrócitos o imunoconteúdo da proteína aumenta com o envelhecimento da cultura enquanto que os níveis de vimentina caem até que as duas proteínas apresentem um nível semelhante. Em tecido a quantidade de GFAP é muito maior que vimentina em animais adultos.

1.2.3 Ontogenia da GAP-43

A GAP-43 (também conhecida por neuromodulina e B-50) é uma fosfoproteína associada à extensão de neuritos conhecida por sua importante contribuição no desenvolvimento neuronal, regeneração axonal e modulação da função sináptica (Benowitz e Routenberg, 1987; Skene, 1989).

Durante o desenvolvimento, a GAP-43 é expressa seletivamente em associação com processos de crescimento, sua síntese e transporte axonal persistem em altos níveis durante a axogênese e sinaptogênese, e então

declina com o estabelecimento de conexões sinápticas estáveis (Skene e Willard,1981; Jacobson et al, 1986; Benowitz e Rutenberg, 1987). Além de estar envolvida nos processos citados acima, que são requeridos para o aprendizado e estabelecimento de memória, a proteína está associada a processos neurodegenerativos como a doença de Alzheimer, que apresenta crescimento neurítico aberrante acompanhado por reduzida plasticidade sináptica. Nestes pacientes a expressão da GAP-43 está diminuída (de la Monte et al., 1995).

Em cérebros humanos e de outros primatas, altos níveis de GAP-43 persistem em áreas de associação neocortical e do sistema límbico ao longo da vida, onde a proteína talvez exerça uma importante função ao mediar a plasticidade experiência-dependente (Benovitz e Routtemberg, 1997). Estudos de imunocitoquímica comparativos entre ratos jovens, adultos e velhos (respectivamente 3, 18 e 31 meses) demonstraram uma redução da proteína em ratos velhos comparados com adultos. Esta redução comparada com a queda na densidade neuronal sugere um importante papel da proteína como um marcador da deterioração da plasticidade sináptica idade-dependente, especialmente nas regiões cerebrais envolvidas com memória e comportamento emocional (Casoli et al, 1995).

Outros estudos ontogenéticos utilizando imunoistoquímica demonstraram que em animais embrionários, entre os dias embrionário 15 e embrionário 19 ocorreu um aumento da imunorreatividade da GAP-43 na placa cortical e primórdio hipocampal, já em primórdio cerebelar a intensidade foi semelhante. Após o nascimento, os animais demonstraram redução da

proteína em todas as áreas avaliadas a partir do dia pós-natal zero ao dia 90, as regiões cortical e cerebelar apresentaram intensa queda nos valores, enquanto que no hipocampo, a queda ocorreu, mas menos brusca no decorrer do desenvolvimento (Sugiura e Mori, 1995).

1.3 Funções da proteína S100B

1.3.1 Funções intracelulares da S100B

A proteína S100B possui várias funções intracelulares que estão sendo estudadas. Ela atua regulando a fosforilação de proteínas, de atividade enzimática, da homeostase do cálcio e da dinâmica do citoesqueleto.

A S100B reduz a fosforilação de algumas proteínas e esta inibição é devida à interação direta da proteína com substratos de cinases, bloqueando o acesso destas a seus substratos (Donato, 2001). Dentre as proteínas cuja fosforilação está inibida, estão GAP-43, GFAP e vimentina. A inibição da fosforilação de GFAP e vimentina deve refletir a interação da S100B com resíduos no domínio N-terminal destas proteínas (Bianchi et al., 1996). A fosforilação da GAP-43 pela proteína cinase C (PKC) é reduzida na presença de S100B purificada, sugerindo que esta proteína possa desempenhar função na plasticidade sináptica e extensão de neuritos (Sheu et al., 1994). Embora ainda não tenha sido estabelecida uma função para a regulação da fosforilação dependente de S100B, as pesquisas sugerem que proteínas S100, inclusive a S100B, talvez apresentem um papel na transdução de sinal, particularmente por ligar a elevação do cálcio citosólico ao estado de fosforilação de importantes proteínas alvo. Assim, a habilidade da S100B em modular a

fosforilação protéica pode representar um meio de regular passos específicos nas vias de sinalização (Donato, 2001).

Nenhuma atividade enzimática é atribuída à S100B, porém tem sido demonstrado que proteínas da família S100 são capazes de regular atividades enzimáticas. Acredita-se que a S100B exerça alguma função no metabolismo energético por interagir com a frutose-1,6-bifosfato aldolase e estimular a fosfoglicomutase (Landar et al,1996). Outra enzima regulada pela S100B é a Ndr, uma proteína cinase nuclear importante na regulação da divisão celular e morfologia celular de forma cálcio dependente. Visto que a S100B tem sido implicada na regulação do ciclo celular, a interação S100B/Ndr deve ter importância fisiológica (Millward et al, 1998).

A S100B exerce efeito sobre a homeostase do cálcio. Sugere-se que esta ação ocorra devido à regulação pela S100B de proteínas efetoras que controlam os níveis de cálcio citosólico (Donato, 2001).

Funções sobre componentes do citoesqueleto celular também são efetuadas pela proteína S100B. Nos microtúbulos ela inibe a polimerização; filamentos intermediários, principalmente GFAP e vimentina, sofrem inibição da polimerização bem como a despolimerização é estimulada através do seqüestro de unidades não polimerizadas. Estas observações sugerem que a proteína possui função de regular a morfologia celular e a dinâmica do citoesqueleto (Donato,1999).

1.3.2 Funções extracelulares da S100B

A S100B é secretada por astrócitos (Shashoua et al., 1984; Van Eldik e Zimmer, 1987). Foi observado que culturas primárias de astrócitos tem a secreção estimulada em condições de ausência de soro (Pinto et al., 2000). A secreção é estimulada por agonistas de receptores 5-HT_{1A} (Whitaker-Azmitia et al., 1990) e BDNF (Nishi et al., 2000).

Pouco se conhece sobre o mecanismo pelo qual a secreção ocorre. Estudos recentes demonstraram que o BDNF poderia promover um processo de liberação através de vesículas, um mecanismo que não tinha sido proposto até então. De fato, a secreção de S100B continua sendo até certo ponto um enigma pois no gene desta proteína não existe um domínio sinalizando secreção (Nishi et al., 2000).

A ação extracelular da proteína depende da sua concentração, ela pode exercer efeitos tróficos ou tóxicos sobre o tecido no qual é secretada. Em concentração nanomolar ela exerce efeitos neurotróficos estimulando a extensão de neuritos (Kligman e Marshak, 1985), facilitando a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento (Van Eldik et al., 1991) além de estimular a proliferação de astrócitos (Selinfreud et al., 1991). Algumas especulações foram feitas a respeito da interação S100B/GAP-43, sugerindo que a S100B poderia interagir com grupamentos sulfidríla dos resíduos de cisteína 3 e 4 da GAP-43, os quais parecem ser importantes para a ligação da proteína à membrana neuronal (Skene e Virag, 1989). Isto nos leva a levantar a interessante possibilidade de que a S100B poderia regular a extensão do neurito por ação sobre a GAP-43 na membrana neuronal. Estudos mais

recentes apontam para o fato de que a atividade trófica ocorre pela ligação da S100B ao RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) promovendo a translocação nuclear de NF-KB e superregulação do fator anti-apoptótico Bcl-2 nos neurônios alvos (Alexanian e Bamburg, 1999; Huttunen et al., 2000). Até o presente momento, no entanto, não existem informações sobre a co-localização de GAP-43 e S100B e nem existem evidências de que o aumento da expressão da S100B seja acompanhado por um bloqueio da função sugerida para a GAP-43 na extensão do terminal sináptico (Donato, 2001). Por ser uma proteína neuronal, talvez a S100A1 poderia exercer esta função.

Concentrações em níveis micromolares podem exercer efeitos neurotóxicos. Algumas doenças neurodegenerativas apresentam elevados níveis de S100B, como Síndrome de Down e Doença de Alzheimer (Griffin et al., 1989). Estes dados sugerem que a S100B pode ter alguma função na patogênese destas doenças, uma vez que o gene que codifica S100B encontra-se na região cromossomal 21q22.3 (Allore et al., 1988); e que a proteína β -amilóide estimula a síntese de S100B e seu mRNA em cultura de astrócitos (Peña et al., 1995). Além disso, a produção da proteína β -amilóide pode ser estimulada em cultura de neurônios expostos à S100B (Li et al., 1998).

Camundongos transgênicos que expressam elevadas concentrações de S100B apresentam alterações comportamentais além de apresentar uma alta densidade de dendritos no hipocampo durante períodos precoces de desenvolvimento pós-natal e uma significativa perda de dendritos quando apresentam um ano de idade (Whitaker-Azmitia et al., 1997), sugerindo o efeito

deletério da proteína em elevadas concentrações. O efeito tóxico da S100B também ocorre por interação com RAGE aumentando as espécies oxigênio-reativas, liberação de citocromo C e ativação da via da caspase (Huttunen et al, 2000).

2 Objetivos

1- Avaliar o imunoconteúdo da S100B durante o desenvolvimento pós-natal em diferentes regiões cerebrais do rato: hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, utilizando animais de 2, 8, 15, 30 e 60 dias;

2- Avaliar o imunoconteúdo de S100B no líquido de ratos em diferentes idades;

3- Avaliar o imunoconteúdo da S100B em cultura primária de astrócitos corticais em diferentes tempos de cultivo bem como avaliar a sua secreção nestes tempos;

4- Avaliar a ontogenia da proteína GAP-43 em hipocampo, córtex e cerebelo de animais de diferentes idades;

5- Avaliar a ontogenia da GFAP em hipocampo, córtex e cerebelo de animais de diferentes idades.

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção das microfatias

Animais: Para os estudos ontogenéticos de S100B, GFAP e GAP-43 em tecido foram utilizados ratos Wistar machos das seguintes idades: 2,8,15,30 e 60 dias pós-natal.

Soluções utilizadas: Solução Krebs-Ringer composta por NaCl 124mM; KCl 4mM; MgSO₄ 1,3mM; CaCl₂ 1mM; glicose 1,2mM, Na-HEPES 25mM. Solução de amostra para eletroforese constituída por SDS 4%; EDTA 2mM e Tris-HCl 50mM (pH 6,8).

Método: Os animais foram mortos por decapitação e o encéfalo rapidamente removido e colocado sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo recoberta por papel filtro embebido em solução Krebs-Ringer. A seguir, com auxílio de material cirúrgico e pincéis, foram retiradas as estruturas de interesse: hipocampo, córtex cerebral e cerebelo. Cada estrutura foi colocada sobre papel filtro e este por sua vez fixado sobre a plataforma do fatiador (“choper”) de McIlwain. As estruturas foram então cortadas transversalmente em fatias de 0,4 mm de espessura. Estas por sua vez foram transferidas para um pequeno prato de plástico preto contendo tampão Krebs-Ringer, também sobre o gelo, e cuidadosamente separadas com finos pincéis. A partir destas, foram obtidas microfatias (0,5 mm de diâmetro e 0,4 mm de espessura) com o auxílio de um furador de aço inoxidável. As microfatias foram transferidas para um tubo “eppendorf” e um papel filtro (dobrado em forma de V) foi utilizado para secá-las com um leve toque. As avaliações de GAP-43 e GFAP foram efetuadas a partir das mesmas fatias, neste caso, duas microfatias de cada estrutura foram acondicionadas no “eppendorf” e sobre elas foram adicionados 60 µL de solução de amostra. As microfatias foram homogeneizadas com microseringa e congeladas a -20°C até o momento da eletroforese unidimensional. Já para os ensaios de quantificação de S100B, foi utilizada

apenas uma fatia que foi congelada a -70°C em média por uma semana para a dosagem da proteína pela técnica de ELISA.

3.2 Eletroforese unidimensional

Solução de glicerol: 40% de glicerol; 10% de mercaptoetanol; Tris-HCl 50 mM (pH 6,8) e azul de bromofenol.

Gel de separação (10%): 10% da mistura acrilamida/bis-acrilamida (39/1), tampão tris-HCl 370 mM (pH 8,0), 7,5% de glicerol e 0,1% de SDS. Para a polimerização do gel foi adicionado à mistura TEMED e persulfato de amônio nas concentrações de 0,06% e 0,045%, respectivamente.

Gel de entrada (4,5%): 4,5% da mistura acrilamida/bis-acrilamida (39/1); tampão Tris-HCl 123 mM (pH6,8); 0,1% de SDS; 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônio.

Tampão superior: Tris 25 mM (pH 8,8); glicina 190 mM e SDS 0,1%.

Tampão inferior: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0).

Método: As microfatias homogeneizadas foram descongeladas e duas alíquotas de 10 μl retiradas para dosagem de proteínas. Após, cada uma recebia 20 μL da solução de glicerol. As amostras foram inteiramente aplicadas no gel. Para cada experimento foram confeccionados 3 géis, um para cada estrutura, e as amostras foram sempre aplicadas no sentido crescente de idade dos animais, 2, 8, 15, 30 e 60 dias . A corrida eletroforética foi realizada em alta voltagem na câmara fria (4°C). A voltagem máxima foi fixada em 220V e a corrente inicial de 20 mA/placa. A corrida aconteceu até que a frente de corrida estivesse a 5 cm do início do gel de separação (Gower e Rodnight,1982).

3.3 Eletrotransferência e imunodeteccção da GFAP e GAP-43

3.3.1 Eletrotransferência para membrana de nitrocelulose

Solução Bjerrum: Tris 4,8 mM; glicina 39 mM e metanol 20% (Heegard e Bjerrum, 1988).

Antes de terminada a eletroforese, preparava-se o material para a eletrotransferência. Cortava-se a membrana de nitrocelulose e quatro folhas de papel filtro nº 3 nas mesmas dimensões que o gel seria cortado posteriormente. A nitrocelulose permaneceu imersa em solução Bjerrum por no mínimo dez minutos.

Ao final da corrida eletroforética, o gel foi cortado com 5 cm de altura e 6 de largura de modo que abrangesse todas as amostras. Feito isto, o gel foi lavado durante 1 minuto em solução Bjerrum e posteriormente colocado sobre a nitrocelulose entre folhas de papel filtro embebidas nesta mesma solução, formando um sanduíche entre o cátodo e o ânodo do aparelho de eletrotransferência. A voltagem máxima foi fixada em 15 V e a amperagem em 1,5 mA/cm² para 60 minutos de transferência. Terminada a corrida, a membrana foi corada com solução Ponceau durante 3-5 minutos e descorada com solução de ácido acético a 0,05% para a visualização das bandas.

3.3.2 Imunodeteccção

M-TBS: Tris 500 mM; NaCl 20 mM; pH 7,5 (TBS) e 5% de leite em pó desnatado.

T-TBS: TBS, sendo acrescido 0,05% de Tween-20.

Para iniciar a imunodeteccção para GAP-43 a membrana de nitrocelulose foi bloqueada por imersão em solução M-TBS sob agitação por no mínimo duas horas. Feito o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com T-TBS (5 minutos cada) e incubada com M-TBS contendo o anticorpo monoclonal anti-GAP-43 (1:1000) overnight à temperatura de 4 °C. A membrana foi novamente lavada com T-TBS e incubada com o segundo anticorpo conjugado à peroxidase (1:1000 em M-TBS) nas mesmas condições do primeiro anticorpo. Após esta incubação a membrana foi lavada três vezes com T-TBS e depois mais três vezes apenas com TBS para retirar o excesso de Tween 20. A membrana foi seca sobre papel filtro e a reacção com luminol/H₂O₂ ocorria na sala escura. As bandas imunodetectadas foram registradas em filmes de raio-X.

A imunodeteccção da GFAP foi realizada nas mesmas membranas que antes passavam por um processo de remoção dos anticorpos utilizados anteriormente com solução de NaOH 1N durante 10 minutos sob agitação. Após a membrana foi lavada com água destilada 5-6 vezes até que todo o excesso da base fosse removido. Feito isso, a membrana sofria o mesmo procedimento descrito para GAP-43, desde o bloqueio até a revelação do filme, sendo que o primeiro anticorpo anti-GFAP foi utilizado numa diluição de 1:2000, o segundo anticorpo conjugado à peroxidase numa diluição de 1:1000. As bandas da GAP-43 e GFAP foram passadas para o computador através de “scanner” e analisadas pelo programa do Optiquant.

3.4 Cultura primária de astrócitos de córtex cerebral

Animais: Foram utilizados ratos Wistar de 1 ou 2 dias pós-natal (P1 ou P2) obtidos no ratário do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Soluções utilizadas:

DMEM (meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco): Consiste numa mistura de sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos, glicose e vermelho de fenol. Adicionamos gamicina 0,032% (v/v), fungizona 1% (v/v) e os tampões HEPES (8,39 mM) e NaHCO_3 (23,8 mM) em água desionizada MilliQ. Para complementar o meio com fatores tróficos, hormônios e outros componentes essenciais às células foi adicionado soro fetal bovino numa concentração final de 10%.

CMF-BSS (solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio): É composta de NaCl (136,9 mM); KCl (5,36 mM); Na_2HPO_4 (0,27 mM); KH_2PO_4 (1,1 mM); glicose (6,1 mM) e vermelho de fenol (0,00025%).

Método: Os animais foram sacrificados por decapitação e as cabeças imediatamente colocadas em placa de Petry contendo CMF-BSS e levados para a capela de fluxo laminar. Os cérebros foram cuidadosamente removidos com auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas e colocados em uma segunda placa de Petry onde, ainda em presença de CMF-BSS, foram removidas as estruturas de interesse, no caso, o córtex cerebral. As estruturas foram partidas em alguns pedaços com uso de bisturi e transferidos para um tubo cônico de centrifuga fazendo-se uso de uma pipeta Pasteur de vidro.

Com pipetas Pasteur de vidro foram realizados repetidos movimentos leves de sucção do líquido mantendo a ponta da pipeta encostada no fundo do

tubo. O tubo ficava em descanso por 5 minutos para haver a sedimentação do material ainda não dissociado. Decorrido este tempo o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga vazio e o sedimento foi ressuspensão em mais CMF-BSS. Repetia-se o procedimento de dissociação e ao final de mais 5 minutos este segundo sobrenadante foi unido ao primeiro. Estas amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000xg sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento contendo as células ressuspensão em meio de cultura (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram contadas em câmara de Neubauer e a partir do valor encontrado foi calculado o volume de suspensão a ser semeado para a densidade final de 400 mil células por poço. Em cada poço foi colocado um volume adicional de meio de cultura.

As placas foram colocadas na estufa sendo mantidas em atmosfera úmida, a 37°C e com 5% de CO₂ (condições mantidas durante todo o desenvolvimento da cultura). Após 4 horas foi realizada uma primeira troca do meio de cultura. A finalidade desta troca seria remover grumos e restos celulares não aderidos uma vez que sua presença poderia tornar o meio tóxico para a cultura em desenvolvimento. Sucessivas trocas de meio foram realizadas a cada 5 dias onde, com a simples agitação da placa, foram removidas células que normalmente ficam aderidas sobre os astrócitos (neurônios, microglia e oligodendrócitos), além de renovados os nutrientes para as células.

O desenvolvimento das culturas foi acompanhado diariamente por observações no microscópio. Na densidade normalmente semeada por nós a cultura tornava-se confluenta ao final da segunda semana de cultivo, quando

também praticamente não foi mais detectada a presença de neurônios (Vinadé et al., 1997). A ausência de neurônios nesta fase deve-se principalmente ao fato de que estes tendem a ficar sobre a monocamada de astrócitos, e assim, como as células microgliais, são removidos nas sucessivas trocas de meio (Gottfried, 1996).

3.5 Secreção de S100B em culturas de diferentes idades

Soluções utilizadas: DMEM, na composição já citada anteriormente, contendo 1% de soro fetal bovino e também DMEM sem soro fetal bovino.

Cultura: Culturas de córtex de diferentes tempos de cultivo (1, 3 e 8 semanas).

Método: A cultura foi retirada da estufa e os poços cuidadosamente observados ao microscópio para que as células avaliadas fossem mais homogêneas possível, poços que apresentavam buracos ou cujas células estivessem inviáveis foram descartados. Feito isso, foi iniciado o processo de estímulo da secreção da S100B. O meio com 10% de soro onde as células estavam sendo cultivadas foi retirado cuidadosamente com uma pipeta Pasterur de plástico, evitando encostar a pipeta nas células, porém retirando-se ao máximo o meio. Às células foram adicionados 500 µl de DMEM sem soro que ficou em contato com as células durante trinta minutos, ao final deste tempo foi feita a primeira coleta de 50 µl do meio e este foi trocado por um meio com 1% de soro. Após esta troca foram efetuadas mais duas coletas de 50 µl ao final de uma e duas horas. Ao final deste tempo a cultura foi raspada em 250 µL de solução Krebs-Ringer com PMSF e EGTA 1 mM e

posteriormente homogeneizada com microsseringa para a ruptura celular. No mesmo experimento foram utilizados poços controle, com o mesmo procedimento, porém estas células não sofriam a deprivação inicial de soro. A quantidade de S100B secretada no meio, bem como a restante no meio intracelular, foi medida pela técnica de ELISA.

3.6 Obtenção do líquido

Animais: Ratos Wistar de 15, 30, 60 e 90 dias provenientes do ratário do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Método: Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg) e em seguida foram fixados no estereotáxico e o líquido extraído por punção da cisterna magna com microsseringa. Após este procedimento, os animais foram sacrificados e o encéfalo utilizado para a detecção de GAP-43 e GFAP. A quantidade de S100B foi avaliada pela técnica de ELISA.

3.7 Quantificação de S100B pelo método de ELISA

3.7.1 Soluções utilizadas

PBS (tampão fosfato): $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1M; KH_2PO_4 0,1M e NaCl 50 mM (pH 7,4).

Solução de lavagem: Tween-20 0,05% e albumina bovina 0,1% em PBS.

Tampão carbonato: Tampão carbonato-bicarbonato (Sigma) 50 mM (pH 9,5)

Tampão Barbital: Tampão barbital/sódio-barbital (Sigma) 60 mM (pH8,6) com CaCl₂ 0,2 mM.

3.7.2 Amostras utilizadas

- Microfatias de hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, obtidas de ratos Wistar de 2, 8, 15, 30 e 60 dias e congeladas a – 80°C.
- Meio de cultivo obtido a partir do estímulo da secreção de S100B.
- Lisado de cultura obtido após o experimento de secreção.
- Líquor obtido de ratos Wistar de 15, 30, 60 e 90 dias.

3.7.3 Processamento das amostras

Amostras de tecido: A cada microfatia foram adicionados 500 µl de PBS com 1mM de EGTA e 1mM de PMSF e esta foi homogeneizada com microseringa. Desta amostra foram retirados 10 µl que foram diluídos em 990 µl de albumina 0,2% em PBS (diluição final 1:100). Desta solução final foram aplicados 50 µl na placa de ELISA.

Amostras de meio de cultivo: As amostras sofriam uma diluição 1:2 com 0,2% de albumina em PBS. Foram aplicados 50 µl na placa de ELISA.

Amostras de lisado celular: As amostras foram diluídas 100 vezes com albumina 0,2% em PBS e 50 µL foram aplicados na placa de ELISA.

Amostras de líquido: A amostra foi diluída 4 vezes em albumina 0,2% em PBS e após foram aplicados 50µL na placa de ELISA.

3.7.4 Método

Inicialmente, placas de 96 poços para ELISA foram incubadas “overnight” com anticorpo para S100B (9,5 µg/ml) diluído em tampão carbonato. Os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem e bloqueados com 100 µL de albumina bovina 0,2 % em PBS durante uma hora e estavam prontos para receber as amostras. Sobre as amostras foram adicionados 50 µL de tampão barbital. A placa foi incubada por 3 horas a 37° C e após sofreu nova lavagem como descrito acima. O segundo anticorpo anti-S100B foi diluído 1:1000 em tampão barbital-cálcio e incubado a temperatura ambiente por uma hora.

Decorrido este tempo, uma nova etapa de lavagem foi efetuada sendo que uma última lavagem foi efetuada com PBS para retirar o excesso de Tween 20 presente na solução de lavagem. Foram adicionados 100 µl do substrato da peroxidase O-fenilenodiamina (um tablete de Fast-OPD dissolvido em água) e a placa permanecia no escuro por 30 minutos. Imediatamente a reação de cor foi parada com 50 µL de HCl 3 M. O produto desta reação tinha cor e a absorbância deste foi medida num comprimento de onda de 492 nm utilizando um leitor de placas de 96 poços. A curva padrão para S100B por este método foi linear entre 0.1 e 4 ng/ml (Tramontina et al., 2000).

3.8 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi feita segundo o método de Peterson (1977) utilizando albumina bovina (Sigma) como padrão.

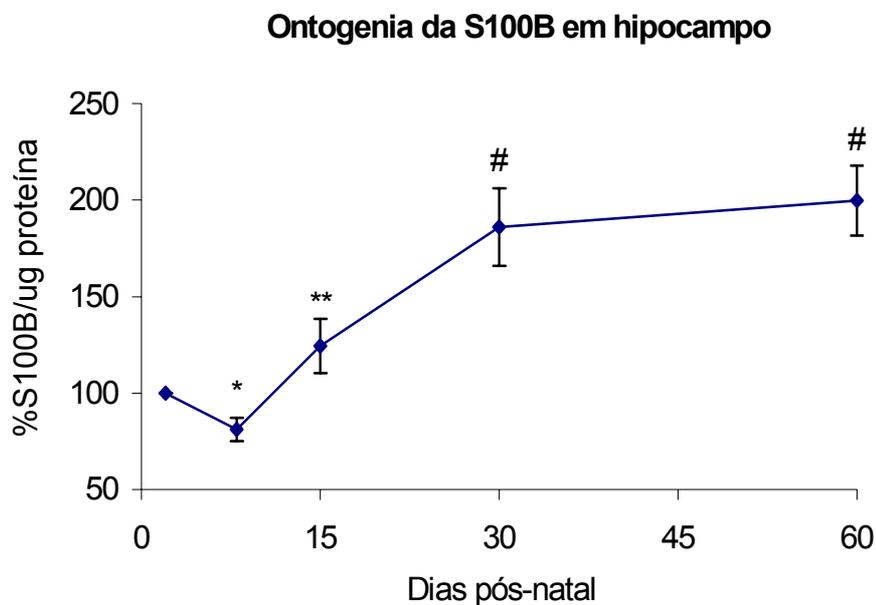
4 Resultados

4.1 Ontogenia da S100B em diferentes regiões cerebrais

Os resultados obtidos a partir da dosagem da S100B por ELISA foram avaliados igualmente para as três estruturas estudadas. Primeiramente, os valores obtidos foram divididos pela quantidade de proteína presente em cada fatia. A partir disso, as amostras do dia 2 corresponderam a 100% do conteúdo de S100B. Os resultados foram avaliados estatisticamente no programa InStat por ANOVA seguida por Tukey's test.

4.1.1 Ontogenia da S100B em hipocampo

Conforme a figura 1 foi observado um decréscimo significativo da S100B ao final da primeira semana ($P=0,0144$). A partir desta data a quantidade de proteína no tecido aumentou significativamente. No dia 15 a significância ocorreu apenas em relação ao dia 8 ($P=0,0198$) e não em relação ao dia 2, indicando que ao final da segunda semana os níveis de S100B voltam aos encontrados no animal recém-nascido. Ao final de um mês também é encontrada significância com relação aos dias 8 e 15 ($P=0,0006$ e $P=0,0325$ respectivamente). Valores entre 30 e 60 dias foram similares indicando que o modelo adulto é adquirido durante as primeiras quatro semanas pós-natal. Uma regressão linear foi aplicada demonstrando que existe uma correlação positiva entre a idade do animal e o conteúdo de S100B entre 8 e 60 dias ($R=0,7122$ e



$P<0,0001$).

Figura 1. Ontogenia da S100B em hipocampo: O imunoconteúdo da S100B foi avaliado pela técnica de ELISA em microfatias de hipocampo de ratos de 2, 8, 15, 30 e 60 dias pós-natal. Cada valor corresponde a uma média de 6 experimentos. * Estatisticamente significativo em relação ao 2º dia. ** Estatisticamente significativo em relação ao 8º dia. # Estatisticamente significativo em relação aos dias 2, 8 e 15 ($P < 0.03$ para todos os valores).

4.1.2 Ontogenia da S100B em córtex cerebral

O perfil ontogenético do córtex frontal (observado na figura 2) foi semelhante ao encontrado em hipocampo uma vez que também apresentou uma queda significativa da proteína ao final da primeira semana pós-natal ($P < 0,0001$) e ao final da segunda semana os valores se igualaram aos do nascimento. Porém, um aumento significativo da proteína em relação ao 8º dia só ocorreu após 30 dias ($P = 0,0046$). Entre 30 e 60 dias, assim como em hipocampo, os valores foram similares. A regressão linear aplicada indicou uma correlação positiva entre a idade do animal e o conteúdo de S100B a partir do 8º dia pós-natal até o 60º dia ($R = 0,8054$ e $P < 0,0001$).

Ontogenia da S100B em córtex cerebral

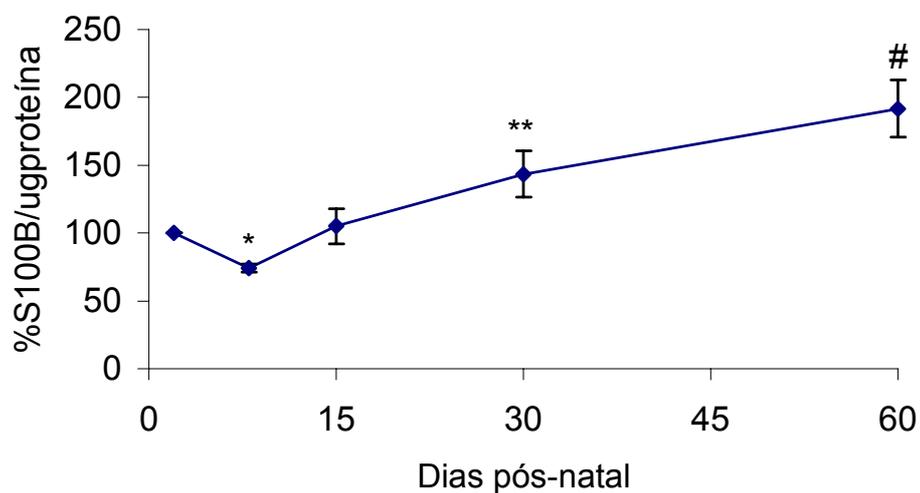


Figura 2. Ontogenia da S100B em córtex cerebral: O imunocnteúdo de S100B foi avaliado pela técnica de ELISA em microfatias de córtex frontal de ratos nas idades de 2, 8, 15, 30 e 60 dias pós-natal. Os valores resultam da média de 6 experimentos. * Estatisticamente significante em relação ao 2º dia ($P < 0,0001$). ** Estatisticamente significante em relação ao 2º e 8º dias ($P = 0,0269$ e $0,0046$ respectivamente). # Estatisticamente significativo em relação 2º, 8º e 15º dias ($P = 0,0015$; $0,0007$ e $0,0058$ respectivamente).

4.1.3 Ontogenia da S100B em cerebelo

Nesta estrutura o perfil foi semelhante ao encontrado em hipocampo. Também foi observada uma queda significativa no 8º dia em relação ao nascimento ($P=0,017$). Ao final da segunda semana o conteúdo de S100B foi semelhante ao encontrado no animal recém-nascido. Diferentemente de córtex frontal, houve significância entre 15 e 30 dias ($P=0,0238$), assim como 15 e 8 dias ($P=0,0358$). Da mesma forma que hipocampo e córtex frontal, 30 e 60 dias apresentaram valores semelhantes.

Ontogenia da S100B em cerebelo

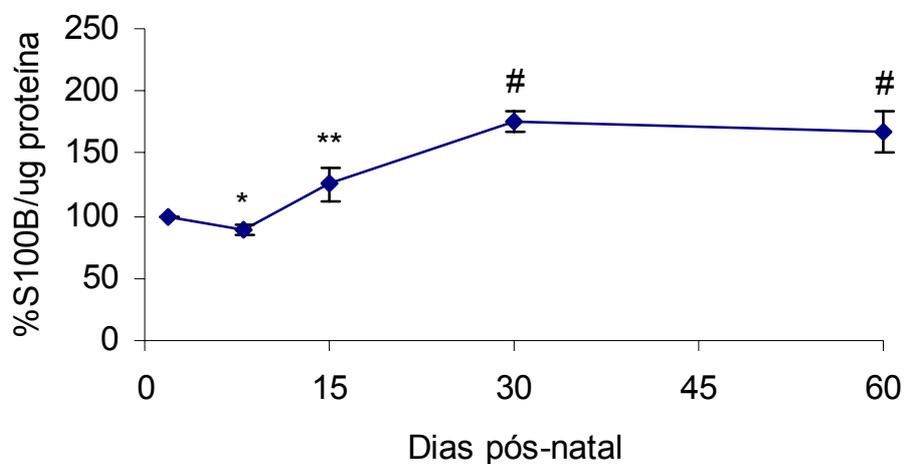


Figura 3. Ontogenia da S100B em cerebelo: O imunoconteúdo de S100B foi avaliado segundo o teste de ELISA em microfatias de cerebelo de ratos de 2, 8, 15, 30, e 60 dias. O valor de cada idade corresponde à média de 6 experimentos. * Estatisticamente significativo em relação ao 2º dia ($P < 0,005$). ** Estatisticamente significativo em relação ao 8º dia ($P = 0,0358$). # Estatisticamente significativo em relação ao 2º, 8º e 15º dia ($P < 0,03$ para todos os valores).

4.2 Quantidade de S100B nas diferentes regiões cerebrais

Analisando os dados segundo a quantidade de S100B obtidos na técnica de ELISA é possível comparar as estruturas entre si e não apenas entre as idades numa única estrutura. Estes valores mostram que a S100B apresenta-se em níveis mais elevados em cerebelo seguido por hipocampo e córtex frontal. Não foi observada diferença significativa entre hipocampo e córtex frontal em nenhuma idade avaliada. Estes dados são compatíveis aos encontrados em cultura primária de astrócitos, onde cerebelo é a estrutura que apresenta maiores quantidades da proteína (Pinto et al., 2000).

Ontogenia comparativa da S100B entre as áreas cerebrais

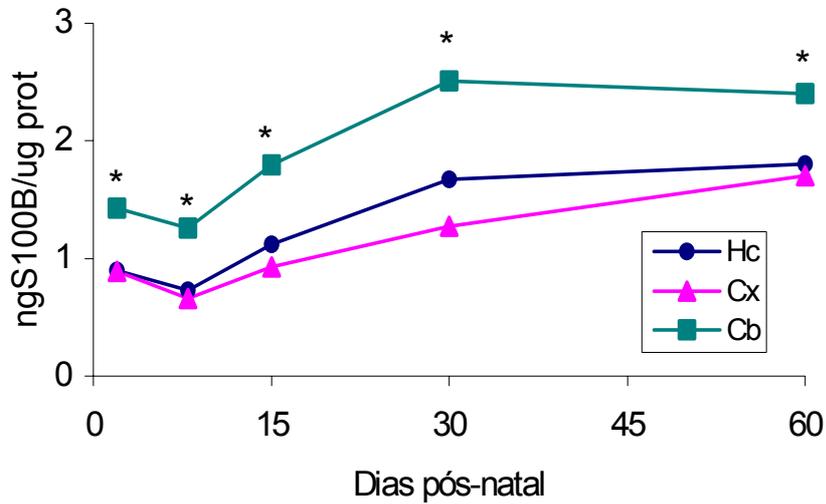


Figura 4. Ontogenia comparativa da S100B entre as áreas cerebrais: Como parâmetro comparativo do imunoconteúdo de S100B entre as diferentes estruturas foi utilizada a quantidade de S100 obtido pelo teste de ELISA a partir de microfatias de hipocampo, córtex frontal e cerebelo de ratos de 2, 8, 15, 30 e 60 dias pós-natal. * Estatisticamente diferente de hipocampo e córtex cerebral ($P < 0,001$).

A ontogenia da secreção da S100B pelo tecido foi estudada através da medida desta proteína em líquido de ratos de 15, 30, 60 e 90 dias pós-natal. Não foi possível obter amostras de animais menores que 15 dias sem que algum dano no SNC fosse acarretado. O valor encontrado para o animal de 15 dias foi avaliado como 100% e relacionadas a este valor, as percentagens das demais idades foram calculadas. Ao contrário do acúmulo intracelular no tecido, em líquido foi observado um decréscimo médio de 30% na quantidade de S100B nos animais de 30, 60 e 90 dias comparados com animais de 15 dias. Este decréscimo foi significativo ($P < 0,001$ para todas as idades). Os valores obtidos para 30, 60 e 90 dias não foram diferentes entre si.

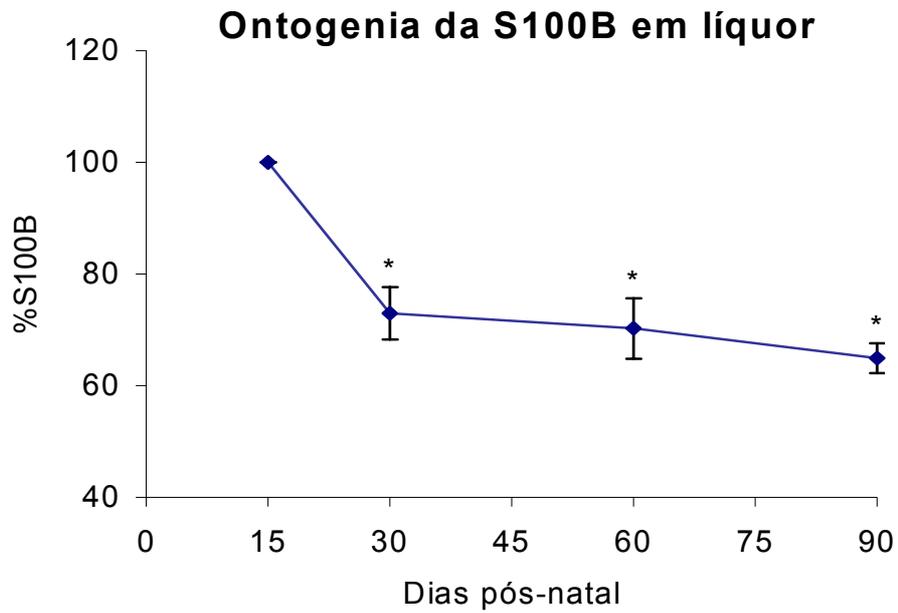


Figura 5. Ontogenia S100B em líquido: O líquido de ratos de 15, 30, 60 e 90 dias foi extraído e a quantidade de S100B medida pela técnica de ELISA.

* Estatisticamente diferente do dia 15 ($P < 0,002$).

O conteúdo intracelular da S100B foi medido em culturas com 1, 3 e 8 semanas de cultivo. Nestas datas as culturas foram raspadas e o conteúdo de S100B foi medido pela técnica de ELISA. Os valores encontrados (nanogramas (ng) de S100B) foram divididos pelo valor de proteína total (microgramas (ug)) de cada poço. Foi observado um aumento do imunoc conteúdo de S100B de acordo com a idade da cultura. A quantidade de S100 encontrada na primeira semana ficou em torno de 7,95 ng S100B/ug de proteína, ao final da terceira semana cada poço apresenta em média 35,92 ngS100B/ug proteína e ao final de dois meses de cultivo cada poço apresenta em média 59,81 ng S100B/ ug proteína. A diferença foi significativa entre todas as idades ($P < 0,01$).

Ontogenia da S100B em cultura de astrócitos de córtex cerebral

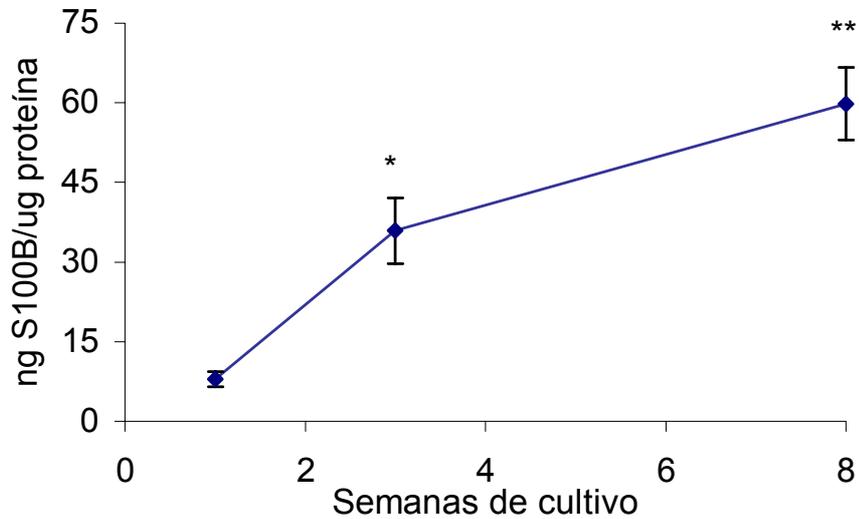


Figura 6. Ontogenia da S100B em cultura primária de astrócitos de córtex:

Foram utilizadas culturas de córtex frontal nas idades de 1, 3 e 8 semanas de cultivo. As células foram raspadas e o conteúdo de S100B foi avaliado pela técnica de ELISA. * Estatisticamente diferente de 1 semana ($P < 0,001$).

** Estatisticamente diferente de 1 ($P < 0,001$) e 3 semanas ($P < 0,01$).

Foram utilizadas culturas de 1 (pré-confluentes), 3 e 8 semanas. A secreção da S100B foi estimulada pela deprivação de soro durante 30 minutos. A percentagem de secreção foi calculada de acordo com o valor de S100B encontrado no meio de cultivo destas células uma hora após a privação de soro com relação ao conteúdo intracelular da proteína. Células controle foram mantidas com 1% de soro sofrendo as mesmas trocas no meio, esta secreção é dita basal. Como pode ser observado na figura 7, a secreção da S100B foi maior na cultura pré-confluente em relação às culturas com 3 e 8 semanas, tanto na secreção basal como na estimulada.

Secreção da S100B em cultura de astrócitos de córtex

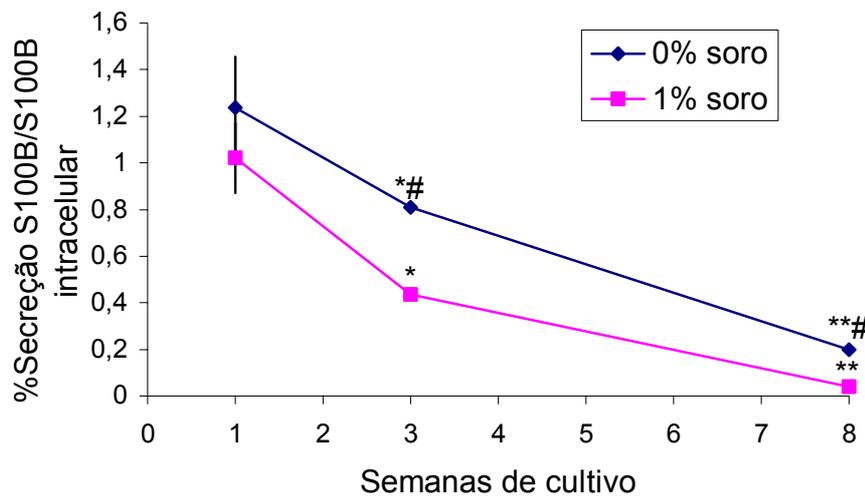


Figura 7. Secreção da S100B em cultura primária de astrócitos de diferentes idades: Foram utilizadas culturas de córtex com 1, 3 e 8 semanas de cultivo. A secreção da S100B foi estimulada pela deprivação de soro durante 30 minutos. Uma hora após o estímulo, foi coletada uma alíquota de 50 μ L do meio de cultivo. A quantidade de S100B foi medida segundo o teste de ELISA. *Estatisticamente diferente de uma semana de cultivo ($P<0,01$). **Estatisticamente diferente de 1 e 3 semanas de cultivo ($P<0,01$). #Estatisticamente diferente de cultura da mesma idade com 1% de soro ($P<0,01$).

4.6 Ontogenia da GAP- 43

Para o estudo da ontogenia da GAP- 43 foram utilizados ratos de 2, 8, 15, 30 e 60 dias pós-natal. Os resultados obtidos na imunodeteção foram quantificados pelo programa de computador Opti Quanti. A quantidade da proteína obtida no 2º dia pós-natal foi considerada como 100% e a partir daí foram calculadas as percentagens dos demais dias. A avaliação estatística foi realizada através da ANOVA seguida por Tukey's test. Foram realizados em média cinco experimentos com animais de todas as idades. Observando a figura 8 observa-se que em hipocampo e córtex a GAP- 43 apresenta um perfil semelhante. Nestas estruturas ocorre um aumento significativo no imunoconteúdo da proteína ao final da primeira semana ($P < 0,005$) e estes níveis caem após esta data voltando a níveis semelhantes ao nascimento em 30 e 60 dias. Cerebelo apresentou um perfil diferente, desde o nascimento ocorreu uma queda que foi máxima aos 15 ($P < 0,001$) dias e manteve-se nos mesmos níveis em 30 e 60 dias.

Ontogenia da GAP-43 em diferentes regiões cerebrais

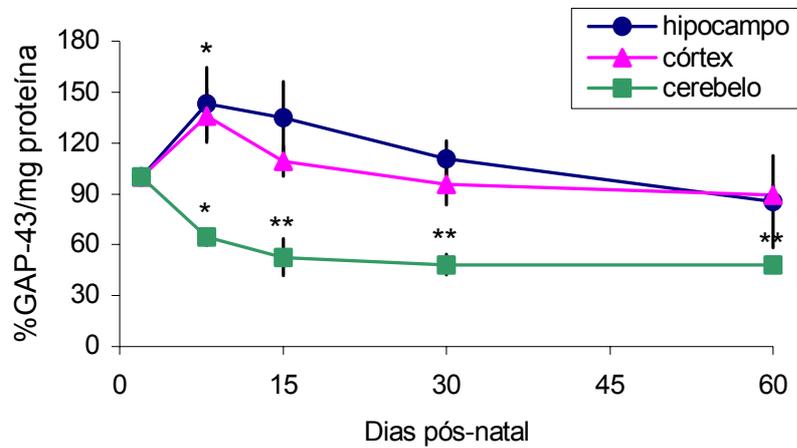


Figura 8. Ontogenia da GAP-43 em hipocampo, córtex frontal e cerebelo: O imunoconteúdo da GAP-43 foi avaliado Ratos de 2, 8, 15, 30 e 60 dias. * Significativamente diferente de 2 dias ($P < 0,005$). ** Estatisticamente significativo em relação ao 8º dia ($P < 0,001$).

4.7 Ontogenia da GFAP nas diferentes regiões cerebrais

As condições de estudo da GFAP foram as mesmas utilizadas para GAP-43, inclusive a avaliação dos resultados. A GFAP apresentou uma curva ontogenética diferente de S100B. Um decréscimo aparente ($P > 0,05$) foi observado durante a primeira semana pós-natal em córtex frontal com posterior aumento do imunoconteúdo nas idades subseqüentes. Em hipocampo e cerebelo um aumento linear da proteína foi observado a partir do nascimento. Nas três estruturas, aos 15 dias, os valores não são estatisticamente diferentes daqueles encontrados para 60 dias. Em geral, aumento linear foi observado para todas as estruturas do nascimento aos 60 dias. A aplicação de um teste de regressão linear demonstrou uma significância menor que 0,05 para hipocampo e córtex cerebral e menor que 0,001 para cerebelo.

Ontogenia da GFAP em diferentes regiões cerebrais

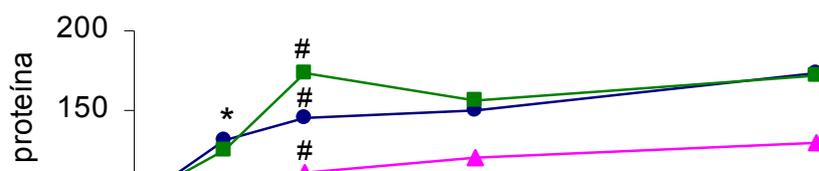


Figura 9: Ontogenia da GFAP em diferentes regiões cerebrais. O imunoconteúdo da GFAP foi avaliado em ratos de 2, 8, 15, 30 e 60 dias pós-natal. * Estatisticamente diferente de 2 dias ($P < 0,05$). # Estatisticamente diferente de 2 e 8 dias ($P < 0,05$).

5 Discussão

A S100B tem sido encontrada no tecido cerebral de mamíferos, mas sua distribuição no Sistema Nervoso Central em desenvolvimento tem sido pouco descrita. Esta proteína está presente em astrócitos em proliferação (Marshak, 1990) mas também é produzida por células maduras (Ueda et al., 1995). Dentre as principais funções extracelulares propostas para a S100B, as seguintes tem atraído maior atenção: facilitação da extensão de neuritos tanto em neurônios corticais como em espinhais (Kligman, 1982; Kligman e Marshak 1985; Kligman e Hsieh, 1987; Marshak, 1990), estímulo da proliferação de células gliais (Selinfreud et al., 1991), participação da maturação de células gliais (Kato et al, 1984), promoção da captação de serotonina em neurônios serotoninérgicos e aumento da capacidade de sobrevivência e extensão de neuritos especialmente sob condições de hipóxia (Jaw et al., 1995). Por outro lado, tem sido demonstrado que a S100B pode inibir a fosforilação *in vitro* da proteína associada ao crescimento GAP-43 pela proteína cinase C no desenvolvimento. No envelhecimento, um aumento da S100B tem sido observado em camundongos com senescência acelerada (Katoh-Semba e Kato, 1994) e em pacientes com doença de Alzheimer (Van Eldik e Griffin, 1994). Recentes estudos demonstraram que o tratamento de células de neuroblastoma (células B104) ou co-cultivo de neurônios hipocâmpais com astrócitos com altas concentrações de S100B levaram à potente ativação da Oxido Nítrico Sintase induzível e subsequente produção de óxido nítrico

levando à morte neuronal tanto por necrose como por apoptose (Hu et al., 1997).

A S100B apresenta também funções intracelulares como regulação de fosforilação de proteínas, dentre elas a GFAP, regulação da atividade enzimática incluindo enzimas que fazem parte do metabolismo energético e regulação do ciclo de divisão e morfologia celular, regulação da dinâmica do citoesqueleto de forma que a GFAP está incluída em seus alvos como componente dos filamentos intermediários tipo III (Donato, 2001)

Os resultados em tecido mostram que a S100B apresenta um perfil semelhante nas três regiões cerebrais estudadas: um decréscimo ao final da primeira semana, seguido por aumento linear de acordo com a idade, atingindo um máximo em 30 dias. Como as mais importantes funções da S100B na morfogênese têm sido na proliferação e maturação de células gliais, extensão de neuritos e formação de sinapses (Marshak, 1990; Selinfreud et al., 1991) é postulado que um aumento da S100B primeiramente promova a proliferação de células gliais e posteriormente leva à extensão de neuritos, formação de sinapses e maturação de células gliais (Tiu et al., 2000). Tem sido sugerido um papel da S100B na plasticidade sináptica devido a um aumento desta proteína coincidente com sinaptogênese pós-natal. Para que isto aconteça é necessária a presença de um “pool” extracelular da proteína. De fato a S100B é secretada pelos astrócitos e é possível avaliar a extensão desta secreção através dos níveis desta proteína no líquido. Os resultados demonstram um decréscimo no conteúdo da S100B neste fluido de acordo com a idade do animal. Desta forma, a secreção da proteína é maior nos animais

mais jovens, reforçando sua função extracelular nas fases iniciais do desenvolvimento.

Recentemente, um receptor de superfície celular (RAGE) foi identificado (Hofmann et al., 1999) para a S100B levando mais luz ao papel extracelular da proteína na extensão do neurito no sistema nervoso em desenvolvimento. Tem sido proposto que moléculas de S100B liberadas no espaço extracelular ativam vias de sinalização que modulam a expressão gênica e amplificam mecanismos efetores nas células que carregam o RAGE. De fato, neuritos apresentam uma grande expressão do RAGE durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso.

Tem sido postulado que a expressão da S100B deve estar relacionada à manutenção das sinapses. Durante o envelhecimento, uma reorganização das sinapses que incluem o desaparecimento destas e alterações regressivas é bem documentado (Wolff e Missler, 1992). Se a S100B está envolvida na manutenção das sinapses, então uma “downregulation” da S100B seria esperada durante o envelhecimento (Tiu et al., 2000). Esta “downregulation” não foi observada no tecido aos 60 dias, mas sim na sua secreção, sendo observado um decréscimo na quantidade da S100B em Líquor, assim como na secreção em astrócitos de córtex cultivados por 8 semanas.

Também foi observado que em cerebelo, assim como em cultura primária de astrócitos cerebelares (Pinto et al., 2000), a S100B apresenta-se em níveis mais elevados em todas as idades avaliadas. Nesta estrutura existe uma razão de cinco a seis neurônios por célula glial enquanto que nas demais a razão é de 1:1 (Ghandour et al., 1980). Talvez por isso a S100B apresenta-se

em maior nível, para cumprir suas funções extracelulares junto à extensão de neuritos e formação das sinapses.

Altos níveis de GAP-43 são encontrados durante a primeira semana pós-natal (Oestreicher e Gispen, 1986), um período em que algum crescimento axonal ainda está ocorrendo e muitas relações sinápticas estão em desenvolvimento e começam a ser modificadas, sugerindo a hipótese de que esta proteína está relacionada com a extensão do neurito e reorganização sináptica (Skene, 1989). Nossos resultados em hipocampo e córtex mostram que ocorre uma queda no imunoconteúdo da S100B ao 8^o dia pós-natal. Ao mesmo tempo em que nestas estruturas a GAP-43 apresenta um aumento significativo. A queda na quantidade de S100B encontrada sugere um atraso na maturação astrogliar. Desta forma, uma redução da quantidade de S100B poderia resultar num atraso da extensão de neuritos e decréscimo da proliferação glial. Isto talvez seja a causa do aumento da imunodeteção da GAP-43 nesta idade, já que altos índices desta proteína indicam imaturidade.

De forma oposta, cerebelo, a área que apresenta maiores níveis de S100B também apresenta uma redução nos níveis de GAP-43 desde o nascimento. A S100B elevada nesta estrutura poderia provocar um desenvolvimento neuronal mais acelerado, o que é observado pelos níveis de Gap-43 que estão em queda desde o nascimento, diferente das demais estruturas. De fato, neurônios cujos processos de maturação/migração estão completos apresentam baixas quantidades de proteínas associadas ao crescimento, como a GAP-43 (Clarke et al., 1996). Animais acima de 30 meses apresentam baixos níveis de GAP-43 em hipocampo e córtex frontal. O

hipocampo está envolvido na aquisição e consolidação da memória enquanto o córtex é reportado ser um centro para a expressão de comportamento emocional : as duas funções são marcadamente alteradas em sujeitos idosos, indicando que no envelhecimento a função intracelular de permitir o crescimento do axônio para adaptar a alterações ambientais está prejudicada nestas áreas cerebrais (Casoli et al., 1995). Alguns estudos também sugerem uma possível ligação entre extensão de neurito e brotamento com expressão de S100B e GAP-43. Por exemplo, níveis aumentados de S100B, fosforilação diminuída da GAP-43 e brotamento anormal tem sido encontrados em tecido cerebral de indivíduos com doença de Alzheimer (McAdory et al., 1988).

A S100B deve apresentar diferentes funções durante o desenvolvimento neuronal (onde ela induz a extensão de neuritos e promove a sobrevivência neuronal) e durante o envelhecimento (onde acelera a morte celular). Consistentemente, a adição de S100B em cultura primária de neurônios corticais aumentou a viabilidade celular e extensão de neuritos mas também aumentou três vezes a quantidade de proteína precursora β amilóide (Li et al., 1998) cujo produto da clivagem exerce efeito deletério no envelhecimento e na doença de Alzheimer. Estudos em animais transgênicos demonstraram que um aumento nos níveis de S100B no cérebro deve levar a um acelerado desenvolvimento seguido por acelerado envelhecimento (Whitaker-Azmitia et al., 1997). Então, o efeito da S100B parece depender do estágio de desenvolvimento dos neurônios (aumentada diferenciação em neurônios embrionários e acelerado envelhecimento em neurônios maduros) e dependendo das concentrações (inibição de apoptose em concentrações

nanomolar , efeitos indutores de apoptose em concentrações micromolar) (Ahlmeyer et al., 1999).

O estágio de desenvolvimento do sistema nervoso de um animal pode ser avaliado segundo a relação Vimentina/GFAP presente nas células gliais . Em fases iniciais da astrogliogênese altos níveis de vimentina são encontrados no tecido cerebral acompanhados de baixa imunorreatividade para GFAP. A expressão de vimentina declina durante o desenvolvimento pós-natal em contraste com o aumento da GFAP que por volta do 21^o dia aproxima-se dos valores encontrados na vida adulta (Sancho-Tello et al., 1995). Um decréscimo da GFAP foi observado durante a primeira semana pós-natal em córtex frontal com posterior aumento do imunoconteúdo nas idades subseqüentes.

Em hipocampo e cerebelo foi observado um aumento constante no imunoconteúdo da GFAP a partir do nascimento. Um aumento linear foi observado para todas as estruturas do nascimento aos 60 dias, sendo que após o 15^o dia pós-natal não ocorreu diferença significativa no imunoconteúdo da proteína.

Avaliando somente o perfil ontogenético de GFAP e GAP-43 pode-se assumir que a maturação do cerebelo ocorre mais cedo que córtex cerebral uma vez que a redução da GAP-43 indica um avançado desenvolvimento neuronal e aumento do imunoconteúdo da GFAP indica desenvolvimento glial. A GFAP é o principal componente dos filamentos intermediários em astrócitos maduros a acredita-se que exerça um papel fundamental na plasticidade destas células. A GFAP polimerizada existe em equilíbrio dinâmico com GFAP solúvel (Inagaki et al., 1994) e o ciclo de polimerização/despolimerização é

regulado pela fosforilação em sítios localizados no segmento N-terminal. Esta proteína é um alvo bem caracterizado da S100B (Bianchi et al., 1996 ; Bianchi et al.,1993). A S100B atua inibindo a fosforilação da GFAP (Ziegler et al., 1998). A ligação da S100B ao N-terminal da GFAP promove um seqüestro de subunidades despolimerizadas bloqueando o processo de alongação de filamentos intermediários (Bianchi et al.,1993; Garbuglia et al., 1996, Bianchi et al., 1996). O sítio de ligação S100/GFAP é bloqueado pelo peptídeo TRTK-12, uma seqüência complementar ao alvo da S100B sobre a proteína CapZ α (Ivanekov et al., 1995, Ivanekov et al., 1996). Este peptídeo compete com a S100B pelo sítio de ligação à GFAP e bloqueia a capacidade da GFAP polimerizar-se. Estas observações sugerem que aquelas proteínas que possuem a seqüência consenso CapZ α devem ser proteínas alvos da S100B. De fato, outras proteínas alvo como GAP-43, neurogranina, p53 e caldesmina contêm a seqüência concenso (Donato, 1999), sugerindo que a S100B use os mesmos sítios para reconhecimento destas proteínas.

Este estudo confirma a utilidade de marcadores protéicos na avaliação do estágio de desenvolvimento do sistema nervoso, que podem prover um importante elo no estudo de desordens do desenvolvimento do Sistema Nervoso considerando a sua íntima relação com doenças cerebrais neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

6 Conclusões

1- A S100B apresenta um perfil ontogenético pós-natal semelhante em hipocampo, córtex e cerebelo. Nestas estruturas, apresenta uma queda no imunoconteúdo ao final da primeira semana, com posterior aumento até os 30 dias, mantendo-se constante até 60 dias.

2- O conteúdo de S100B no líquido diminui com a idade. Líquor de animais de 30, 60 e 90 dias apresentaram uma redução de 30% no conteúdo da proteína quando comparados com animais de 15 dias.

3- Um aumento na quantidade intracelular da S100B não indica necessariamente uma maior secreção. Em cultura de astrócitos corticais, assim como ocorre no período pós-natal do rato, o conteúdo intracelular da S100B aumenta com o tempo enquanto a secreção diminui.

4- A ontogenia da GAP-43 não é igual em todas as regiões estudadas. Em hipocampo e córtex ocorre um pico do imunoconteúdo ao final da primeira semana e estes valores voltam aos níveis do nascimento. Em cerebelo os níveis de GAP-43 estão em declínio desde o nascimento, apresentando uma queda máxima em 15 dias.

5- Os níveis de GFAP em todas as regiões cerebrais apresentaram aumento no imunoconteúdo desde o nascimento. Aos 15 dias os valores são semelhantes aos encontrados em animais de 60 dias.

7 Referências Bibliográficas

AHLMAYER B., GLASSER A., SCHAPER C., SEMKOVA I., KRIEGLSTEIN J. (1999) The 5-HT_{1A} receptor agonist, Bay X 3702 inhibited apoptosis induced by serum deprivation in cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 370:211-216.

ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. (1997) Mecanismos Celulares de Desenvolvimento: Desenvolvimento neural. *In Biologia Molecular da Célula*, Artes Médicas, Porto Alegre, 3^a ed, pp 1119-1131.

ALEXANIAN A.R., BAMBURG J.R. (1999) Neuronal survival activity of S100BB is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-KB. *FASEB Journal* 13:1611-1620.

ALLORE R., O'HANLON D., PRICE R., NEILSON K., WILLARD H.F., COX D.R., MARKS A., DUNN R.J. (1988) Gene encoding the B subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down's syndrome. *Science* 239: 1311-1313.

ARENANDER A.T., DE VELLIS J. (1994) Development of the nervous system. *In Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, editado por J.G. Siegel et al, Raven Press, New York, 5^a ed, pp 573-606.

BENOWITZ L.I., ROUTTEMBERG A. (1987) A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 10: 527-532.

BENOWITZ L.I., ROUTTENBERG A. (1997) Gap-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84-91.

BIANCHI R., GIAMBANCO I., DONATO R. (1993) S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca (2+)-dependent manner. *J Biol Chem* 268:12669-12674.

BIANCHI R., GARBUGLIA M., VERZINI M., GIAMBANCO V.V., IVENENKOV R.V.W., DIMLICH G.A., JAMIESON Jr., DONATO R. (1996) S100 (α and β)-binding peptide (TRTK-12) blocks S100/GFAP interaction: identification of a putative S100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim Biophys Acta* 1313 : 258-267.

CASOLI T., SPAGNA C., FATTORETTI P., GESUITA R., BERTONI-FREDDARI B. (1995) Neuronal plasticity in aging: a quantitative immunohistochemical study of Gap-43 distribution in discrete regions of the rat brain. *Brain Res* 714:111-117.

CICERO T.J., FERRENDELLI J.A., SUNTZEFF V., MOORE B.W. (1972) Regional changes in CNS levels of the S-100 and 14-3-2 proteins during development and aging of the mouse. *J Neurochem* 19:2191-2125.

CLARKE C., CLARKE K., MUNEYYIRICI J., AZMITIA E., WHITAKER-AZMITIA P.M. (1996) Prenatal cocaine delays astroglial maturation: immunodensitometry shows increased markers of immaturity (vimentin and GAP-43) and decreased proliferation and production of the growth factor S-100. *Brain Res Dev Brain Res* 91:268-273.

DONATO R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim et Biophys Acta* 1450:191-231. Review article.

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

DE LA MONTE S.M., NG S.C., HSU D.W. (1995) Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 147:934-946.

EVANS O.B., HUTCHINS J.B. (1997) Development of the Nervous System, In *Fundamental Neuroscience* editado por Duane E. Haines Churchill Livingstone pp 65-83.

GHANDOUR M.S., VINCENDON G., GOMBOS G. (1980) Astrocyte and oligodendrocyte distribution in adult rat cerebellum – an immunohistological study. *J Neurocytol* 9:637-646.

GARBUGLIA M., VERZINI M., GIAMBANCO I., SPRECA A., DONATO R. (1996) Effects of calcium-binding proteins (S-100a(o), S-100a, S-100b) on desmin assembly in vitro. *FASEB J.* 10:317-324.

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.

GOWER H., RODNIGHT R. (1982) Intrinsic protein phosphorylation in synaptic plasma membrane fragments from the rat. General characteristics and migration behaviour on polyacrylamide gels of the main phosphate acceptors. *Biochim Biophys Acta* 716:45-52.

GRIFFIN W.S.T., STANLEY L.C., LING C., WHITE L., McLEOD W., PERROT L.J., WHITE III C.L., ARAOZ C. (1989) Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Dow's syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Aca Sci USA* 86:7611-7615.

HATTEN M.E., HEINTS N., (1999) Neurogenesis and Migration. In, *Fundamental Neuroscience*, editado por M.J. Zigmond et al, Academic Press, pp 451-479.

HEEGARD H., BJERRUM O.J. (1988) Immunoblotting: General principles and procedures. In, *Handbook of Immunoblotting of Proteins*, edited by O.J. Bjerrum e N.H. Heegard, Boca Raton, Florida, vol.1,pp.1-15.

HOF P.R., TRAPP B.D., DE VELLIS J., CLAUDIO L., COLMAN D.R., (1999) The Cellular Components of Nervous Tissue. In, *Fundamental Neuroscience*, editado por M.J. Zigmond et al, Academic Press, pp 41-70.

HOFMANN M.A., DRURY S., FU C., QU W., TAGUCHI A., LU Y., AVILA C., KAMBHAM N., BIERHAUS A., NAWROTH P., NEURATH M.F., SLATTERY T., BEACH D., McCLARY J., NAGASHIMA M., MORSER J., STERN D., SCHMIDT A.M. (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901.

HU J., FERREIRA A., VAN ELDIK L.J. (1997) S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69:2294-301.

HUTTUNEN H.J., KUJA-PANULA J., SORCI G., AGNELETTI A.L., DONATO R., RAUVALA H. (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem* 267:14998-15004.

INAGAKI M., NAKAMURA Y., TAKEDA M., NISHIMURA T., INAGAKI N. (1994) Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Path* 4:239-243.

IVANENKOV V.V., JAMIESON G.A. Jr, GRUENSTEIN E., DIMLICH 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.

IVANENKOV V.V., DIMLICH R.V., JAMIESON G.A. Jr. (1996) Interaction of S100a0 protein with the actin capping protein, CapZ: characterization of a putative S100a0 binding site in CapZ alpha-subunit. *Biochem Biophys Res Commun.* 221:46-50

JACOBSON R.D., VIRÁG I., SKENE J.H.P. (1986) A protein associated with axon growth, Gap-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. *J Neurosci* 6:1843-1855.

JAW S.P., DANG T., TRUONG D.D. (1995) Chronic treatments with 5-HT1A agonists attenuate posthypoxic myoclonus in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 52:577-80.

KATO T., ITO J., ISHIKAWA K., MIZUTANI K., TANAKA R., WAKABAYASHI S., HORIUCHI I., KATO K., KANO-TANAKA K. (1984) The absence of differentiation-promoting response of astrogloma cells to glia maturation factor. *Brain Res* 301:83-93.

KATOH-SEMBA R., KATO K.(1994) Age-related changes in levels of the beta-subunit of nerve growth factor in selected regions of the brain: comparison between senescence-accelerated (SAM-P8) and senescence-resistant (SAM-R1) mice. *Neurosci Res* 20:251-256.

KINTNER C., LUMSDEN A. (1999) Neural Induction and Pattern Formation. *In, Fundamental Neuroscience*, editado por M.J. Zigmond et al, Academic Press, pp 417-448.

KLIGMAN D. (1982) Isolation of a protein from bovine brain which promotes neurite extension from chick embryo cerebral cortex neurons in defined medium. *Brain Res* 250:93-100.

KLIGMAN D., HSIEH L.S. (1987) Neurite extension factor induces rapid morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells in defined medium.

KLIGMAN D., MARSHAK D.R. (1985) Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7136-7139.

LAMING P.R., KIMELBERG H., ROBINSON S., SALM A., HAWRYLAK N., MÜLLER C., ROOTS B., NG K. (2000) Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 24:295-340.

LANDAR A., CADDELL G., CHESSHER J., ZIMMER D.B. (1996) Identification of a S100a1/S100B target protein: phosphoglucomutase. *Cell Calcium* 20: 279-285.

LANDRY C.F., IVY G.O., BROWN I.R. (1990) Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization. *J Neurosci* 25:194-203.

LI Y., BARGER S.W., LIU L., MRAK R.E., GRIFFIN W.S.T. (2000) S100B induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. *J Neurochem* 74:143-150.

LI Y.K., WANG J.Z., SHENG J.G., LIU L., BARGER S.W., JONES R.A., VAN ELDIK L.J., MRAK R.E., GRIFFIN S.T. (1998) S100B increases levels of b-amiloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem* 58: 1421-1428.

LICHTMAN J.W., BURDEN S. J., CULICAM S. M., WONG R.O.L. (1999) Synapse Formation and Elimination. *In, Fundamental Neuroscience*, editado por M.J. Zigmond et al, Academic Press, pp 547-580.

McADORY B.S., VAN ELDIK L., NORDEN J. (1988) S100B, a neurotropic protein that modulates neuronal protein phosphorylation, is upregulated during lesion-induced collateral sprouting and reactive synaptogenesis. *Brain Res* 813:211-217.

MARKS A., O'HANLON D., LEI M., PERCY M.E., BECKER L.E. (1996) Accumulation of S100 beta mRNA and protein in cerebellum during infancy in Down syndrome and control subjects. *Brain Res Mol Brain Res* 36:343-8.

MARSHAK D.R. (1990) S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Research* 86:169-181.

MILLWARD T.A., HEIZMANN C.W., SCHÄFER B.W., HEMMINGS B.A. (1998) Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO J* 17:5913-5922.

NISHI M., KAWATA M., AZMITIA E.C. (2000) Trophic interactions between brain-derived neurotrophic factor and S100B on cultured serotonergic neurons. *Brain Res* 868:113-118.

OESTREICHER A.B., GUISPEN W.H., (1986) Comparison of the immunocytochemical distribution of the protein B-50 in the cerebellum and hippocampus of immature and adult rat brain. *Brain Res* 375:267-279.

PEÑA L.A., BRECHER C.W., MARSHAK D.R. (1995) Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100B in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 34: 118-126.

PETERSON G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.

PINTO S.S., GOTTFRIED C., MENDEZ A., GONCALVES D., KARL J., GONCALVES C.A., WOFCHUK S., RODNIGHT R. (2000) Immunoccontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486:203-207.

RADOJCIC P., PENTREATH V.W. (1971) Invertebrate glia. *Progr Neurobiol*12:115-179.

RAKIC P. (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol* 141:283-312.

RAPER J. A., LAVIGNE T.M., (1999) Growth Cones and Axonal Pathfinding. In, *Fundamental Neuroscience*, editado por M.J. Zigmond et al, Academic Press, pp 519-546.

RODNIGHT R., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S.T., 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 Biolo Res* 30:1-14.

SANCHO-TELLO M., VALLES S., MONTOLIU C., RENAUI-PIQUERAS J., GUERRI C. (1995) Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* 15:157-166.

SELINFREUD R.H., BARGER S.W., PLEDGER W.J., VAN-ELDIK L. (1991) Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:3554-3558.

SHASHOUA V.E., HESSE G.W., MOORE B.W. (1984) Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S100 protein. *J Neurochem* 42: 1536-1541.

SHEU F.S., AZMITIA E.C., MARSHAK D.R., PARKER P.J., ROUTTENBERG A. (1994) Glial-derived S100b protein selectively inhibits recombinant beta protein kinase C (PKC) phosphorylation of neuron-specific protein F1/GAP-43. *Brain Res Mol Brain Res* 21: 62-66.

SIGIURA Y., MORI N. (1995) SCG10 express growth-associated manner in developing rat brain, but shows a different pattern to p19/stathmin or Gap-43. *Devel Brain Res* 9 0:73-91.

SKENE J.H.H.P., WILLARD M. (1981) Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central nervous and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 89:96-103.

SKENE J.H.P., (1989) Axonal growth-associated proteins. *Ann Rev Neurosci* 12:127-156.

SKENE J.H.P., VIRAG I. (1989) Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neural growth cone protein, GAP-43. *J Cell Biol* 108:613-624.

SORCI G., AGNELETTI A.L., BIANCHI R., DONATO R. (1998) Association of S100 with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim et Biophys Acta* 1448:227-289.

TIU S.C., CHAN W.Y., HEIZMANN C.W., SHÄFER B.W., SHU S.Y., YEW D.T. (2000) Differential expression of S100B and S100A6 in the human fetal and aged cerebral cortex. *Develop Brain Res* 119 :159-168.

TRAMONTINA F., KARL J., GOTTFRIED C., MENDEZ A., GONÇALVES D., PORTELA L.V., GONÇALVES C. A. (2000) Digitonin-permeabilization of astrocytes on culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Prot* 6:86-90.

UEDA S., KOKOTOS LEONARDI E.T., BELL J. 3RD, AZMITIA E.C. (1995) Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S-100 beta antisense gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 29:365-8.

VAN ELDIK L.J., CHRISTIE-POPE B., BOLIN L.M., SHOOTER E.M., WHETSELL Jr. W.O., (1991) Neurotrophic activity of S100B in cultured dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res* 542: 280-285.

VAN ELDIK L.J., GRIFFIN W.S. (1994) S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions.

VAN ELDIK L.J., ZIMMER D.B. (1987) Secretion of S100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res* 436:367-370.

VINADÉ L., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S., GOTTFRIED C., RODNIGHT R. (1997) Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Brain Res Devel Brain Res* 104:11-17.

WHITAKER-AZMITIA P.M., MURPHY R., AZMITIA E.C. (1990) Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S100B, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528:155-158.

WHITAKER-AZMITIA P.M., WINGATE M., BORELLA A., GERLAI R., RODER J., AZMITIA E.C. (1997) Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S100B show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* 776:51-60.

WOLFF J.R., MISSLER M. (1992) Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems. *Anat Anz* 174:393-403. Review

ZIEGLER D.R., INNOCENTE C.E., LEAL R.B., RODNIGHT R., 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.

