

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

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A EXPRESSÃO DAS
PROTEÍNAS S100B E GFAP NO *LOCUS COERULEUS*, CÓRTEX FRONTAL E
BULBO OLFATÓRIO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação de Mestrado

ANA RAQUEL MENEZES KARKOW

Porto Alegre
2007

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

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A EXPRESSÃO DAS
PROTEÍNAS S100B E GFAP NO *LOCUS COERULEUS*, CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E
BULBO OLFATÓRIO DE RATOS MACHOS E FÊMEAS

ANA RAQUEL MENEZES KARKOW

Orientador

Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Co-Orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Neurociências

Porto Alegre

2007

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion pela orientação, incentivo e pelo exemplo de professor e pesquisador que és. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves pela orientação e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena pela contribuição neste trabalho.

À Marina Leite por ser incansável e extremamente competente em seu trabalho.

Aos meus pais por me estimularem a estudar e questionar desde muito cedo.

Aos meus irmãos Maria Karkow e Alberto Karkow pelo apoio e carinho nas horas mais difíceis.

Aos meus tios Francisco Karkow e Elizabete Karkow pelo apoio, incentivo e generosidade.

Aos amigos do laboratório de neuroendócrinologia do comportamento: Márcia Scherem, Rosane Ribeiro, Gabriela Severino, Carmem Gomes, Tatiane Camozzato, Elisa Wilkelmann-Duarte, Charlis Rainecki, Anelise Todeschini, Ana Lúcia Cecconelo.

Aos grandes amigos que fiz nesta empreitada: Caroline Perinazzo, Camila Padilha, Fabiana Leopoldo, Lígia Centenaro, Marcelo Souza, Rosana Frey, Natália Uriarte, Vanise Seben, Maiara Lutz, e Osni Gonçalves.

Aos amigos Mara Matos, Maickel Andrade e Eduardo Lomando por estarem sempre prontos a me ajudar.

À Andréia Antunes pela assistência na parte burocrática.

À Ângela (bioterista) pelo excelente trabalho de manutenção dos animais.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Estresse Neonatal.....	8
1.2 A Proteína S100B.....	10
1.3 S100B e o Estresse	12
1.4 Proteína Fibrilar Ácida Glial (GFAP).....	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVO	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais.....	17
4.2 Estimulação Neonatal.....	17
4.3 Obtenção do Material Biológico.....	17
4.4 Líquor	18
4.5 Córtex Frontal e Bulbo Olfatório.....	18
4.6 Obtenção do Locus Coeruleus pela Técnica de “Punch”.....	18
4.7 Quantificação de S100B no Líquor	19
4.8 Quantificação da S100B no Bulbo Olfatório, Córtex Frontal e Locus Coeruleus	19
4.9 Quantificação da GFAP no Bulbo Olfatório, Córtex Frontal e Locus Coeruleus	19
4.10 Conteúdo Protéico Total	20
5 ANÁLISE DOS DADOS	21
6 RESULTADOS	22
6.1 Nível de S100B no Líquor	22
6.2 Nível de S100B no Locus Coeruleus.....	23
6.3 Nível de S100B em Fatia de Córtex Frontal.....	24
6.4 Nível de S100B em Fatia de Bulbo Olfatório	25
6.5 Nível de GFAP no Locus Coeruleus.....	26
6.6 Nível de GFAP em Fatia do Córtex Frontal	27
6.7 Nível de GFAP em Fatia do Bulbo Olfatório	28
7 DISCUSSÃO	29
8 CONCLUSÕES.....	35
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

Lista de Abreviaturas

- ACTH: hormônio adrenocorticotrófico
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid
ERK: cinase regulada por sinais extracelulares
GFAP: Proteína Fibrilar Ácida Glial
HPA: hipotálamo-hipófise-adrenal
LCR: líquido céfalo raquidiano
OPD: o-fenilenodiamina
PKC: proteína cinase C
PMSF: phenyl methyl sulphonyl fluoride
RAGE: receptor de produtos de glicação final
SNC: sistema nervoso central

Lista de Figuras

Figura 1: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no líquor.	22
Figura 2: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no <i>locus coeruleus</i>	23
Figura 3: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no córtex frontal.	24
Figura 4: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no Bulbo Olfatório.	25
Figura 5: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína GFAP no <i>locus coeruleus</i>	26
Figura 6: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína GFAP no córtex frontal.	27
Figura 7: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína GFAP no bulbo olfatório.	28

RESUMO

A estimulação neonatal ocasiona alterações no desenvolvimento neuroendócrino, morfológico e comportamental de ratos. O procedimento de manipulação neonatal promove uma ruptura na relação mãe-filhote que pode perturbar o desenvolvimento do SNC. Uma das alterações morfológicas apresentadas em ratos machos e fêmeas manipulados no período neonatal é a diminuição do número de neurônios no *locus coeruleus*. A S100B é uma proteína ligante de cálcio secretada por astrócitos que pode apresentar ações extracelulares neurotróficas e neurotóxicas. Diversos estudos relacionam alterações dos níveis de S100B a eventos estressores. O estudo objetivou avaliar o efeito da estimulação neonatal, através da manipulação repetida, em ratos machos e fêmeas de 10 dias de idade sobre a concentração das proteínas S100B e GFAP no *locus coeruleus*, córtex frontal e bulbo olfatório, além da secreção de S100B no líquido. Os resultados revelaram um aumento da concentração de S100B no líquido apenas nas ratas fêmeas manipuladas, e uma diminuição da concentração de S100B no *locus coeruleus* em ratos machos e fêmeas manipulados. Ocorreu também, uma diminuição da concentração de S100B no córtex frontal em ratos machos manipulados. Em relação à proteína GFAP foi verificado um aumento no seu conteúdo no *locus coeruleus* em ratos machos e fêmeas manipulados. Foram encontrados diferenças entre os sexos, os machos não-manipulados têm um maior nível de S100B comparados com fêmeas não-manipuladas no *locus coeruleus*. Os resultados sugerem que a manipulação neonatal pode interferir sobre o funcionamento das células gliais e através delas alterar o desenvolvimento das células nervosas. Além disso, os resultados mostram um efeito do sexo dos animais sobre as concentrações de S100B já no período neonatal.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse Neonatal

O desenvolvimento de um organismo pode ser influenciado por estímulos ambientais durante estágios precoces da vida, podendo resultar em mudanças permanentes no comportamento e fisiologia na idade adulta (Francis et al., 1999; Meerlo et al., 1999; Lucion et al., 2003; Gomes et al., 2005).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em ratos tem sua responsividade diminuída nas primeiras semanas de vida um período que é denominado hiporresponsivo ao estresse. A glândula adrenal é menos sensível ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e as concentrações, tanto basais quanto induzidas por estresse, de corticosterona, ACTH e hormônios secretados pelo hipotálamo estão diminuídas. Trabalhos mais recentes têm descrito que o eixo HPA de ratos neonatos é responsivo a estímulos ambientais de uma maneira peculiar, diferente de um animal adulto (Dent et al., 2000;).

A estimulação neonatal pela manipulação tem sido utilizada como modelo experimental para examinar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais estáveis (Levine, 1962; Meerlo et al., 1999; Severino et al., 2004). Em ratos, a manipulação consiste em afastar os filhotes do ninho por 3-15 minutos, podendo incluir ou não a estimulação tátil do filhote feita pelo experimentador. Este procedimento deve ser realizado nas duas primeiras semanas de vida do animal, durante o período hiporresponsivo.

Os efeitos comportamentais da manipulação neonatal são diversos. Plotsky e Meaney (1993) relataram que ratos manipulados por 15 minutos durante as primeiras três semanas de vida possuem menor reatividade ao estresse quando adultos e menos "medo" a ambientes novos. A manipulação aparentemente é uma intervenção branda.

Conforme Padoin e colaboradores (2001), a estimulação neonatal pode afetar a interpretação de estímulos ambientais devido às alterações

comportamentais observadas em ratos adultos que foram manipulados no período neonatal. Estes animais, quando avaliados no teste de campo aberto, além de apresentarem um aumento geral da atividade de locomoção na ausência do predador, exploraram ativamente a área quando um gato é colocado na arena. No teste de labirinto em cruz elevado, os animais manipulados permanecem significativamente mais tempo nos braços abertos do que o grupo não-manipulado, o que é um indicativo de menor ansiedade (Severino et al., 2004, Pellow et al., 1985).

A estimulação neonatal também modifica padrão de comportamento alimentar em ratos adultos. Esses animais apresentam um apetite aumentado por alimento doce que não é modificado após a administração de diazepam, sugerindo que essa alteração comportamental não é devida à ansiedade aumentada (Silveira et al., 2005).

Conforme Rainecki (2006) a manipulação repetida no sétimo dia de idade induz em fêmeas uma diminuição no aprendizado olfatório. O reconhecimento do odor maternal é fundamental para sobrevivência de filhotes altriciais como ratos, pois eles dependem da mãe para proteção, manutenção da temperatura corporal e alimentação. Essa identificação da mãe ocorre devido ao aprendizado olfatório, que se dá pelo pareamento do cuidado maternal (estímulo tátil) com o cheiro da mãe (Leon, 1992).

Os ratos manipulados no período neonatal apresentam quando adultos alterações neuroendócrinas importantes como a redução na liberação de ACTH e corticosterona em resposta a eventos estressores, além do retorno mais rápido de corticosterona aos níveis basais (Plotsky et al., 1993). As concentrações basais do hormônio do estresse de ratos manipulados no período neonatal não são diferentes dos animais controles (Meaney et al., 1996), indicando que as alterações no SNC se encontrem em áreas que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Caldji et al., 1998a; 2000a; Kaufman et al., 2000).

Há estudos demonstrando que a manipulação neonatal em ratos pode influenciar o número de neurônios encontrados em diferentes áreas do sistema

nervoso central. A manipulação neonatal induz uma redução permanente em torno de 35% do número das células nervosas do *locus coeruleus* em ratos de 11, 26, 35 e 90 dias de idade, tanto em machos quanto em fêmeas (Lucion et al., 2003). A manipulação promove na amígdala medial, uma diminuição no número de neurônios aos 11 e 90 dias de idade, como também nos neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal no 11º dias de vida em ratos machos e fêmeas (Lucion et al., 1999).

Além disso, também foi constatada uma redução no número de neurônios na região parvocelular do núcleo paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, e um aumento na densidade de neurônios na área CA1 do hipocampo (lado esquerdo). No entanto, estudos anteriores não revelaram efeitos da manipulação neonatal sobre as células gliais da amígdala (Winkelmann-Duarte, 2004).

1.2 A Proteína S100B

Diversas alterações no SNC de ratos manipulados no período neonatal têm sido verificadas em neurônios e pouco tem sido relatado sobre o papel da glia nestes estudos. No sistema nervoso central há dois tipos de células gliais: a macroglia, constituída dos astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais e a microglia. Dentre as células gliais, os astrócitos são as que estão presentes em maior números. Os astrócitos liberam fatores neurotróficos e citocinas, orientam o desenvolvimento neuronal, direcionam o crescimento dos axônios, regulam o metabolismo dos neurotransmissores e os níveis de íons extracelulares (Dong; Benveniste, 2001).

A S100B é uma proteína ligante de cálcio secretada por astrócitos que tem sido relacionada a ações extracelulares neurotróficas e neurotóxicas (Donato, 2001). Os efeitos neurotróficos acontecem em concentração nanomolar estimulando a extensão de neuritos (Kligman; Marshak, 1985) e aumentando a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento (Van Eldik et al., 1991) e após lesão (Barger et al., 1992).

Elevados níveis de S100B, em concentração micromolar, pode ocasionar um efeito neurotóxico da proteína que pode ser atribuído à estimulação da óxido nítrico sintase induzível de astrócitos, resultando na morte celular por apoptose, tanto de neurônios quanto de astrócitos (Hu; Van Eldik, 1996; Hu et al., 1997; Donato 2001).

Conforme Huttunen e colaboradores (2000) nos efeitos neurotróficos e neurotóxicos, há evidências da participação do receptor RAGE (receptor de produtos de glicação final), no entanto é possível que haja a participação de outros receptores de membrana na transdução dos efeitos da S100B. 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 celular do sistema nervoso.

Conforme Gonçalves e colaboradores (2002) o tratamento de culturas de astrócitos com S100B em concentração nanomolar ativa ERK (cinase regulada por sinais extracelulares), uma proteína chave em processos de transdução de sinais regulando principalmente a proliferação celular. Em doses micromolares a S100B está relacionada a efeitos neurotóxicos podendo induzir apoptose em astrócitos e neurônios, estando envolvida na patogênese de doenças neurodegenerativas (Griffin et al., 1998).

Devido a esta ação trófica sobre os neurônios e astrócitos, a família da proteína S100 tem sido relacionada ao desenvolvimento e a manutenção do sistema nervoso (Marshak, 1990; Azmitia et al., 1992).

Os níveis da proteína S100B aumentados no sangue e no LCR podem indicar vários distúrbios agudos e crônicos envolvendo o SNC como o traumatismo craniano (Ingebrigtsen et al, 1999), a esquizofrenia (Lara et al, 2001), a síndrome de Down (Griffin et al., 1989) e a doença de Alzheimer (Sheng et al, 1996) o que permite sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano ou disfunção cerebral (Tramontina et al., 2002).

Tem sido sugerido um papel da S100B na plasticidade sináptica devido a um aumento desta proteína coincidente com a sinaptogênese pós-natal e para que isso aconteça é necessária a presença de uma quantidade suficiente desta proteína no ambiente extracelular. Conforme Tramontina e colaboradores (2002) ocorre um decréscimo do conteúdo de S100B neste fluido de acordo com a idade do rato, sendo que a secreção da proteína deve ser maior nos animais mais jovens reforçando sua função extracelular nas fases iniciais do desenvolvimento.

A S100B tem ampla distribuição dentro do astrócito e pode ser encontrada no citoplasma, em associação com membranas ou proteínas do citoesqueleto (Bianchi et al.,1996) assim como no núcleo da célula, participando de eventos como a apoptose e a regulação do ciclo celular (Scotto et al.,1998). A atuação da proteína S100B no ambiente intracelular dos astrócitos é de regular a dinâmica do citoesqueleto, a atividade enzimática, a fosforilação de proteínas e a homeostase do cálcio (Donato, 2001). A S100B modula de forma inibitória a fosforilação de diversas proteínas como a GFAP, GAP-43 e vimentina (Donato,1998).

1.3 S100B e o Estresse

Os astrócitos são células extremamente plásticas alterando sua morfologia em resposta a injúria ao SNC ou mesmo durante o desenvolvimento cerebral, onde funcionam como guias para a migração neuronal (Garcia-Segura; McCarthy, 2004). Diversos estudos sobre estes processos têm consolidado o papel da S100B como importante modulador do citoesqueleto astrogliar, embora pouco se saiba a respeito de seus mecanismos de ação (Donato, 1999).

Muitos estudos têm sido realizados com a proteína S100B, no entanto, os efeitos de situações provocadores de estresse nos níveis desta proteína no líquido e tecidos cerebrais não são ainda bem conhecidos (Margis et al., 2004).

Insultos impostos no período pré, perinatal ou pós-natal podem estar associados a efeitos deletérios sobre células gliais, especialmente os astrócitos, que estão envolvidos na diferenciação neuronal, no suporte metabólico de

neurônios, captação de glutamato, secreção de fatores neurotróficos e defesa antioxidante (Takuma et al., 2004).

As células gliais são participantes ativas nos processos de formação e transmissão sináptica. Em situações de estresse, diferentes estudos em adultos têm demonstrado o aumento da atividade do glutamato e a toxicidade de elevados níveis de glutamato no cérebro (Volterra; Meldolesi, 2005).

Os astrócitos pela captação do glutamato podem proteger os neurônios de um potencial dano excitotóxico convertendo o glutamato em glutamina pela ação da glutamina sintetase sendo que esta enzima pode ser induzida por glicocorticóides (Pfrieger et al., 1997). Sob alta concentração, o glutamato pode ativar receptores glutamatérgicos em astrócitos levando a aumento da concentração de cálcio intracelular o que pode gerar danos celulares (Volterra; Meldolesi, 2005). A proteína S100B extracelular em concentração micromolar também pode levar a morte celular induzindo o aumento de influxo de cálcio citosólico e a depleção das reservas de cálcio intracelulares (Mariggio et al., 1997; Donato, 1999). Por outro lado, baixas concentrações de S100B estimulam, em cultura, a captação de glutamato (Tramontina et al., 2005)

1.4 Proteína Fibrilar Ácida Glial (GFAP)

A necessidade de alterações morfológicas que é característica dos astrócitos, a translocação de organelas, o transporte de vesículas e a divisão celular são apenas algumas situações em que o citoesqueleto sofre reorganização. Os filamentos intermediários, assim como os demais constituintes do citoesqueleto celular, estão constantemente respondendo a diferentes estímulos externos alterando seu estado de polimerização. A GFAP é a principal proteína dos filamentos intermediários, além disso, é considerada marcador específico para astrócitos maduros (Laping et al., 1994; Eng et al., 2000).

Os filamentos intermediários gliais no período pré-natal são formados exclusivamente por vimentina e após o nascimento a GFAP tem sua expressão

aumentada e substitui a vimentina no animal adulto (Liedtke et al., 1996). A proteína S100B se liga à GFAP e a maioria de seus outros alvos por um sítio localizado na sua porção C-terminal (Garbuglia et al., 1999).

A GFAP apresenta uma atividade dinâmica modulada por fosforilação e desfosforilação, efetuando um papel fundamental na plasticidade astrocítica (Rodnighe et al., 1997). O seu estado de fosforilação é regulado, dentre outros fatores, pela proteína S100B (Ziegler et al., 1998).

Diversos tipos de eventos cerebrais, como uma injúria cerebral (Hausmann et al., 2000), traumatismo (Hermann et al., 2000), ou crise induzida (Stringer, 1996) pode promover hipertrofia reativa e proliferação de células astrogliais, um processo conhecido como astrogliose. Em nível molecular esta gliose reativa é demonstrada por um aumento na expressão de GFAP. A expressão desta proteína é essencial para a arquitetura normal da substância branca e a integridade da barreira hematoencefálica (Liedtke et al., 1996).

Consideramos importante avaliar a atuação da manipulação neonatal na expressão da GFAP devido sua importância na maturidade do SNC e manutenção do funcionamento das funções encefálicas normais.

2 JUSTIFICATIVA

A manipulação neonatal induz alterações permanentes no SNC de ratos como a redução no número de células nervosas do *locus coeruleus* em diversas idades (Lucion et al., 2003) assim como uma diminuição nos neurônios das camadas 2 e 3 do córtex frontal no 11º dias de vida em ratos machos e fêmeas (Lucion et al, 1999).

O presente trabalho avalia a possibilidade da manipulação neonatal interferir sobre as células gliais e estas estarem envolvidas com as alterações morfológicas decorrentes deste procedimento. Para isso analisaremos a proteína S100B e GFAP.

Consideramos pertinente verificar estas alterações, pois conforme Barros e colaboradores (2006) ocorre um aumento na expressão de S100B e imunorreatividade de GFAP no córtex frontal de ratos adultos que foram submetidos a estresse por contenção durante a gestação. Além do trabalho de Margis e colaboradores (2004) que observaram alterações significativas no líquido de ratos adultos submetidos ao estresse por predador demonstrando uma responsividade a eventos estressores da proteína S100B no líquido.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da estimulação neonatal em ratos machos e fêmeas de 10 dias de idade sobre os níveis das proteínas S100B e GFAP no *locus coeruleus*, córtex frontal e bulbo olfatório, além do conteúdo extracelular de S100B no líquido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos no biotério sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase escura às 17 horas e 30 minutos.

Fêmeas prenhas foram trazidas do biotério central da UFRGS ao biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia. O momento do parto foi rigorosamente controlado. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram reduzidas a oito filhotes com um mínimo de quatro machos que foram utilizados para coleta do material biológico.

4.2 Estimulação Neonatal

Não-manipulados (controle): cujos filhotes não foram tocados pelo experimentador nem pelos tratadores durante os 10 primeiros dias de vida.

Manipulados crônicos: os animais foram retirados da caixa por 3 minutos e gentilmente manipulados pelo experimentador por 1 minuto uma vez por dia durante os dez primeiros dias de vida (manipulação repetida).

4.3 Obtenção do Material Biológico

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Cristália) na dose de 50 mg/Kg, via intraperitoneal.

4.4 Líquor

Amostras de líquido foram obtidas por uma punção da cisterna magna conforme Consiglio e Lucion (1999) e sacrificados por decapitação com uso da guilhotina após o procedimento. Em seguida, o líquido coletado foi armazenado em temperatura de 70°C negativos para quantificação de S100B.

4.5 Córtex Frontal e Bulbo Olfatório

Os animais foram sacrificados por decapitação com uso da guilhotina sendo rapidamente removido o cérebro o qual foi colocado sobre placa de Petri invertida sobre gelo. A seguir com auxílio de material cirúrgico uma fatia de bulbo olfatório e do córtex pré-frontal foi removida e congelada e mantidas a -70°C.

4.6 Obtenção do *Locus Coeruleus* pela Técnica de “Punch”

Após a decapitação, os cérebros foram retirados e congelados no isopentano 99% p.a (Vetec) em gelo seco e armazenados em -70°C.

Para retirar o *locus coeruleus* foi utilizada a técnica de *punch* descrita por Palkovits (1973). As coordenadas para localização dos núcleos foram obtidas com o auxílio do atlas para o cérebro de ratos Paxinos & Watson (1997). Os cérebros dos ratos foram fixados pela parte posterior no criostato e os cortes foram realizados da região anterior para a posterior. A temperatura interna do criostato foi mantida em $-15 \pm -1^\circ\text{C}$.

Para a retirada da *locus coeruleus* se localizou-se o ponto - 9.16 mm do Bregma e se fez um corte de 10 μm . Dessa fatia foi retirado um *punch* da *Locus coeruleus* com o auxílio de uma agulha (0.60x25).

4.7 Quantificação de S100B no Líquor

O imunoconteúdo de proteína foi determinado por ELISA. As placas utilizadas para a dosagem de S100B foram previamente incubadas com 100 ul de anti-S100B monoclonal (clone SH-B1) em tampão carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9,5), em uma diluição de 1:1000, durante 16 h a 4 °C. Após esse período, as placas foram bloqueadas com 100 ul de solução de ovoalbumina 2% durante 1 h a temperatura ambiente. Então, 50 ul de amostra foram incubados sobre 50 ul de um tampão tris-cálcio (pH 8,6), durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, a placa foi incubada com 100 ul de anticorpo anti-S100 policlonal em diluição 1:5000, durante 30 minutos a 37 °C, seguida de uma incubação com 100 ul de anticorpo anti-rabbit conjugado a peroxidase diluído 1:5000, durante 30 minutos a 37 °C. Ao término desse intervalo, a revelação foi feita com 200 ul de solução de OPD durante 30 minutos no escuro. A reação de cor foi estabilizada com a adição de 50 ul de HCL 3 N e a leitura dos valores de absorbância foi feita em 492 nm.

4.8 Quantificação da S100B no Bulbo Olfatório, Córtex Frontal e *Locus Coeruleus*

O tecido foi homogeneizado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo PMSF (1 mM) e EGTA (1 mM). 50uL de homogenato diluído 1:100 em PBS foi processado como descrito no item 4.7.

4.9 Quantificação da GFAP no Bulbo Olfatório, Córtex Frontal e *Locus Coeruleus*

O imunoconteúdo de proteína foi determinado por ELISA. A placa foi incubada com 100 µL de amostra, contendo 500 ng de proteína, durante 24 h a 4°C. Após, a placa foi incubada durante 1 h com anticorpo policlonal anti-GFAP (Dako), seguida de incubação com segundo anticorpo conjugado a peroxidase (Amersham). A reação de cor foi realizada com OPD (o-fenilenodiamina) durante 30 min no escuro e a leitura das absorbâncias foi realizada em 492 nm.

4.10 Conteúdo Protéico Total

O conteúdo protéico nas amostras do tecido foi determinado pelo método de Lowry (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

5 ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados foram analisados através do teste da ANOVA de duas vias comparando-se as médias através do teste de Newman-Keuls. O nível de significância assumido foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Nível de S100B no Líquor

A concentração da proteína S100B foi expressa em ng/mL de líquido. A média dos níveis da proteína S100B no líquido de fêmeas manipuladas foi de 8,56 ng/mL, sendo que fêmeas não-manipuladas foi de 2,41 ng/mL. A diferença entre estes os dois grupos, fêmeas manipuladas e não-manipuladas, foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). A média dos níveis de S100B dos machos manipulados foi de 4,60 ng/mL e a diferença da média deste grupo comparada com as fêmeas manipuladas também foi estatisticamente diferente.

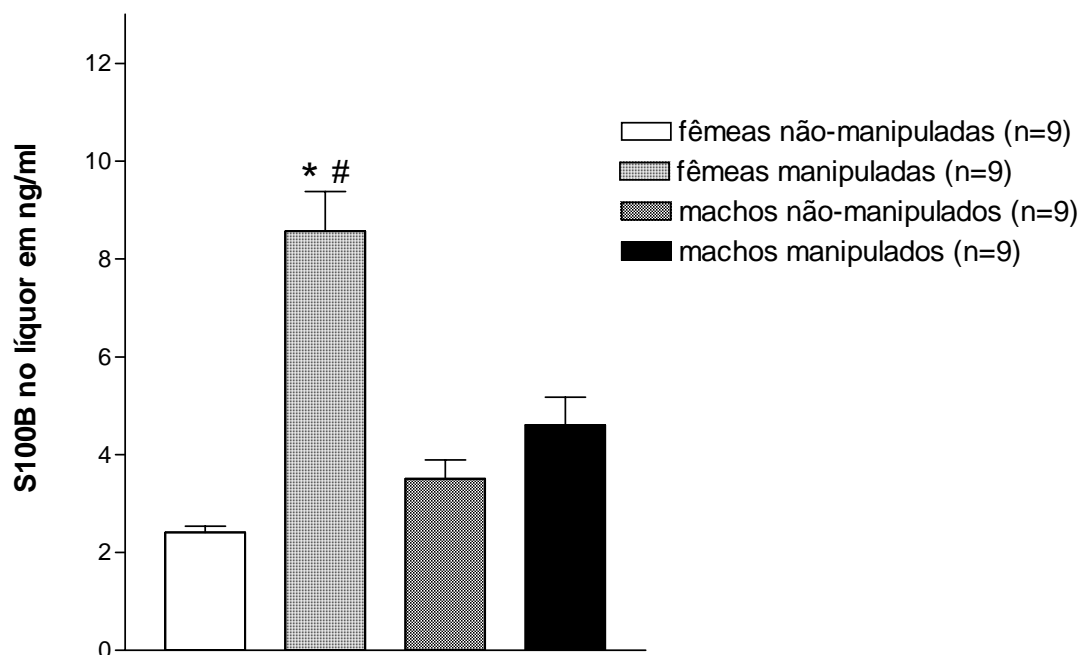


Figura 1: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no líquido. Média (+EPM) das concentrações da proteína S100B no líquido de ratos machos e fêmeas não-manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

* Comparação com o grupo não-manipulados do mesmo sexo.

Comparação com outro sexo no mesmo grupo (não-manipulados ou manipulados).

6.2 Nível de S100B no *Locus Coeruleus*

A média do nível da proteína do grupo fêmeas manipuladas foi de 0,14 ng/ug, sendo que a média do grupo fêmeas não-manipuladas foi de 0,37 ng/ug. A diferença entre estes os dois grupos, fêmeas manipuladas e não-manipuladas, foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$). A média do grupo machos manipulados foi de 0,31 ng/ug e também é estatisticamente diferente das fêmeas manipuladas ($p < 0,05$). A média do nível da proteína do grupo machos não-manipulados foi de 0,54 ng/ug, que comparada com a média do grupo fêmeas não-manipuladas foi estatisticamente diferente. A média do nível da proteína do grupo machos manipulados foi estatisticamente diferente da média do grupo machos não-manipulados.

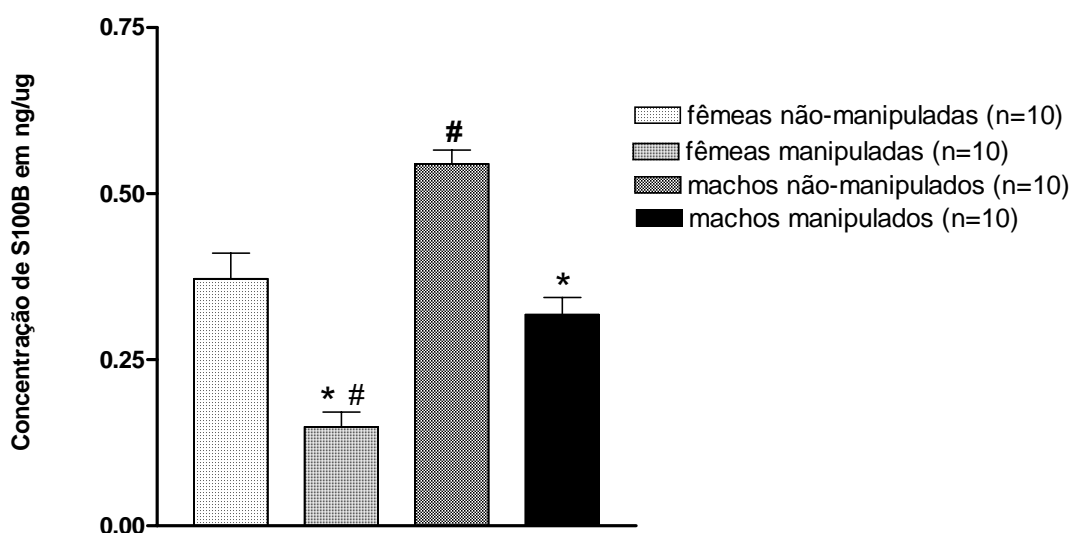


Figura 2: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no *locus coeruleus*. Média (+EPM) das concentrações da proteína S100B no *Locus coeruleus* de ratos machos e fêmeas não-manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

* Comparação com o grupo não-manipulados do mesmo sexo

Comparação com outro sexo no mesmo grupo (não-manipulados ou manipulados).

6.3 Nível de S100B em Fatia de Córtex Frontal

A média dos machos manipulados foi de 0,07 ng/ug sendo que a média do grupo machos não-manipulados foi de 0,19 ng/ug.

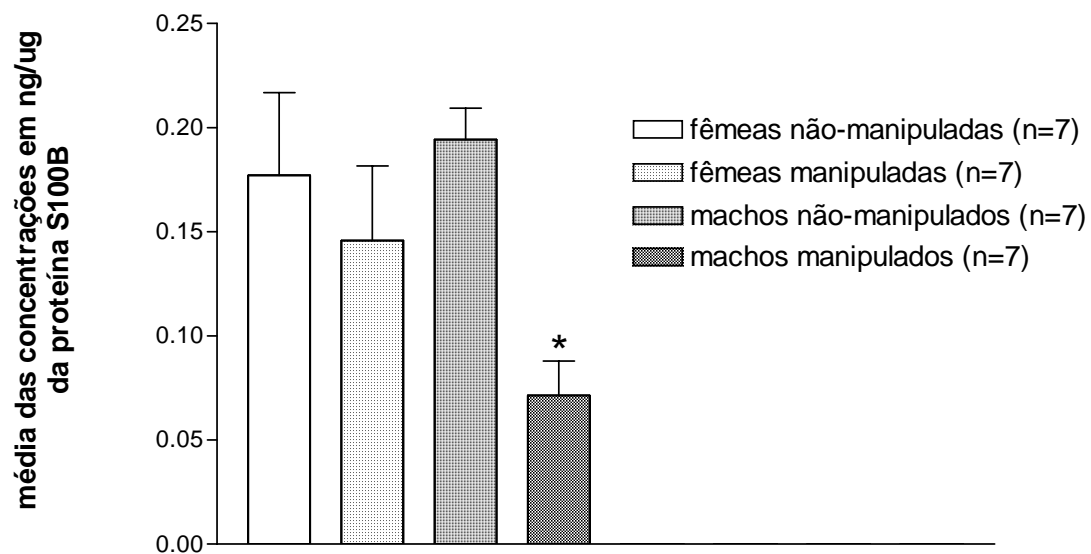


Figura 3: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no córtex frontal. Média (+EPM) das concentrações da proteína S100B em fatia de córtex frontal de ratos machos e fêmeas não manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

* Comparação com o grupo não manipulados do mesmo sexo.

6.4 Nível de S100B em Fatia de Bulbo Olfatório

Não foi observada diferença significativa entre os grupos de ratos machos e fêmeas avaliados no que se refere à quantificação de proteína S100B expressa em ng/mg de proteína total na fatia de bulbo olfatório.

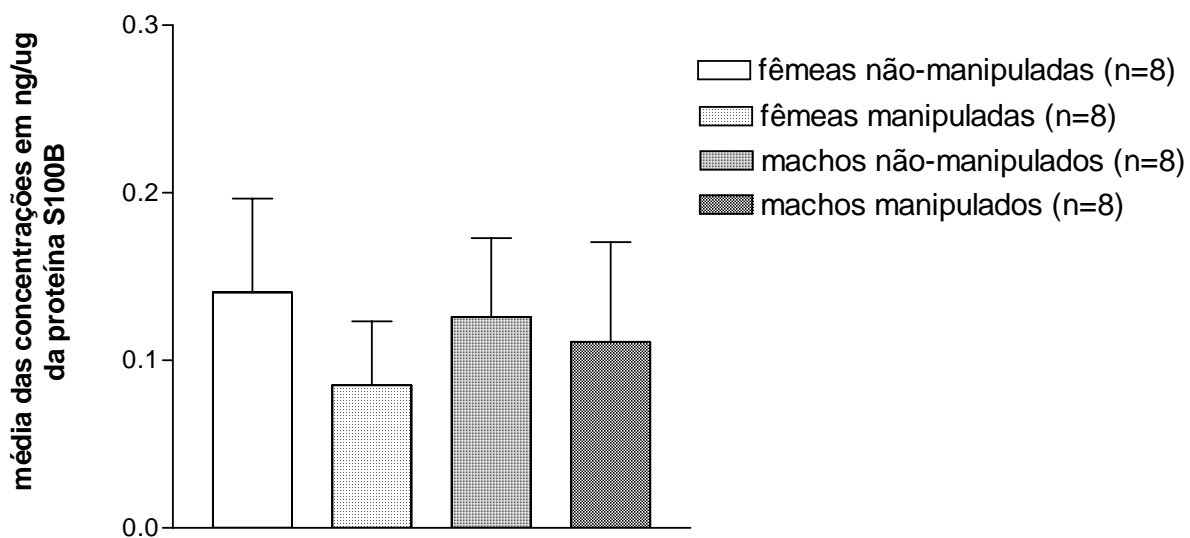


Figura 4: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína S100B no Bulbo Olfatório. Média (+EPM) das concentrações da proteína S100B em fatia de bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas não-manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

6.5 Nível de GFAP no *Locus Coeruleus*

A média do nível da proteína do grupo fêmeas manipuladas foi de 5,57 ng/ug, sendo que a média do grupo fêmeas não-manipuladas foi de 2,12 ng/ug. A diferença entre estes os dois grupos, fêmeas manipuladas e não-manipuladas, é estatisticamente diferente ($p < 0,05$). A média do nível da proteína do grupo fêmeas manipuladas foi estatisticamente diferente do grupo dos machos manipulados que têm a média de 8,12 ng/ug.

A média do nível da proteína do grupo dos machos manipulados foi estatisticamente diferente do grupo machos não-manipulados cuja média é 2,49 ng/ug.

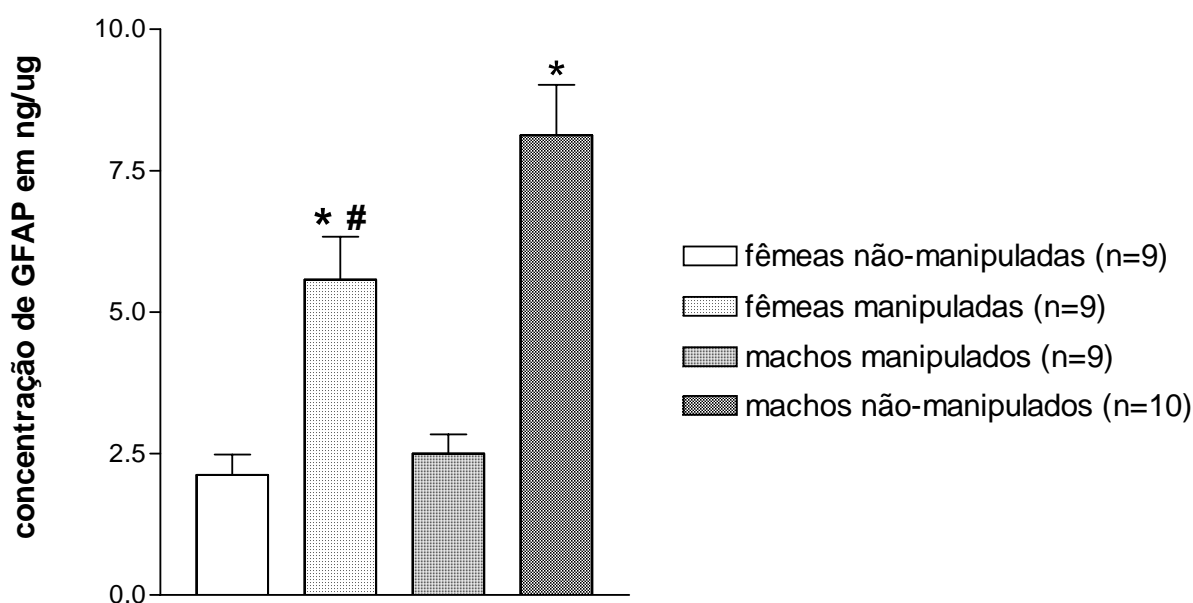


Figura 5: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína GFAP no *locus coeruleus*. Imunoconteúdo de GFAP no *Locus coeruleus* de ratos machos e fêmeas não-manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

* Comparação com o grupo não manipulados do mesmo sexo

Comparação com outro sexo no mesmo grupo (não-manipulados ou manipulados).

6.6 Nível de GFAP em Fatia do Córtex Frontal

Não foi observada diferença significativa entre os grupos de ratos machos e fêmeas avaliados no que se refere à quantificação de proteína GFAP expressa em ng/mg de proteína total nas fatias de córtex.

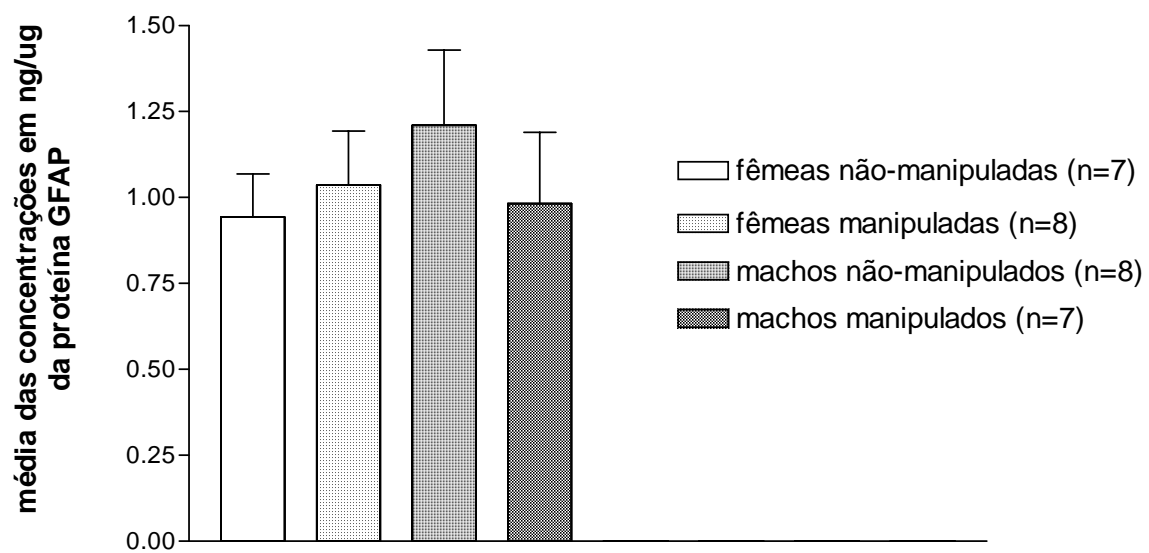


Figura 6: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína GFAP no córtex frontal. Média (+EPM) das concentrações da proteína GFAP em fatia de córtex pré-frontal de ratos machos e fêmeas não manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

6.7 Nível de GFAP em Fatia do Bulbo Olfatório

Não foi observada diferença significativa entre os grupos de ratos machos e fêmeas avaliados no que se refere à quantificação de proteína GFAP expressa em ng/mg de proteína total nas fatias de bulbo olfatório.

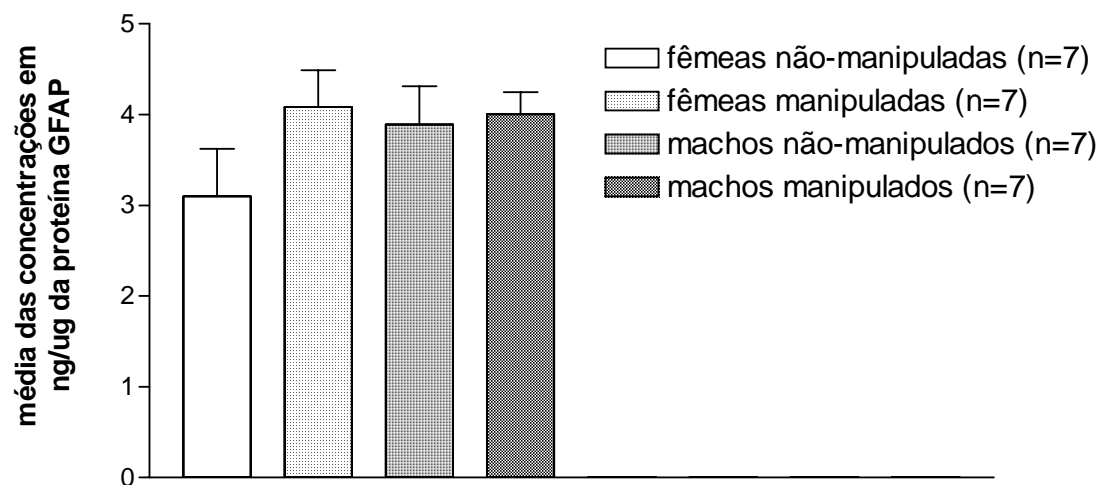


Figura 7: Efeito da manipulação neonatal sobre os níveis da proteína GFAP no bulbo olfatório. Média (+EPM) das concentrações da proteína GFAP em fatia de bulbo olfatório de ratos machos e fêmeas não manipulados e manipulados aos 10 dias de idade

7 DISCUSSÃO

O período logo após o nascimento é crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso em ratos. Interferências ambientais neste período, como o procedimento de manipulação neonatal, têm sido amplamente utilizadas para avaliação do mecanismo pelo qual intervenções no período neonatal podem modificar estruturas neurais que, por sua vez, atuam sobre o desenvolvimento neuroendócrino, morfológico e comportamental de ratos (Meerlo et al., 1999; Lucion et al., 2003). A intervenção neonatal utilizada neste trabalho foi a manipulação neonatal, no qual a ninhada composta de oito filhotes foi submetida à manipulação diária pelo pesquisador, durante um minuto, nos dez primeiros dias de vida. Dentre os sistemas alterados pela manipulação neonatal, a atividade das células gliais têm sido pouco investigada.

O nível das proteínas astrogliais S100B e GFAP é um parâmetro importante, pois nos permite avaliar indiretamente se a proliferação e sobrevivência das células gliais está ocorrendo de maneira adequada. O presente trabalho investigou a atuação da manipulação neonatal sobre os níveis de S100B e GFAP e verificou que ocorrem diversas alterações devido a este procedimento em ratos de machos e fêmeas aos 10 dias de idade pós-natal.

Nossos resultados apresentados na figura 1 mostram que a manipulação neonatal em ratas fêmeas aos 10 dias de idade induz um aumento dos níveis da proteína S100B no líquido. A presença de S100B no líquido durante o desenvolvimento reflete predominantemente a secreção da proteína nas diversas regiões encefálicas. Em cultura, uma secreção mais acentuada tem sido observada nas fases mais imaturas e pré-confluentes de astrócitos (Tramontina et al, 2002). A secreção astrocítica de S100B é estimulada por agonistas dos receptores 5-HT_{1A}, adenosina e ácido lisofosfatídico (Donato, 2003). Conforme Smythe e colaboradores (1994), a manipulação neonatal aumenta o *turnover* de serotonina em regiões do encéfalo do neonato, portanto o aumento de

S100B encontrado do líquido de ratas manipuladas de 10 dias pode estar relacionado aos níveis de serotonina no cérebro destes animais.

Estudos prévios encontraram um aumento da expressão da S100B com a maturidade glial e, em paralelo, uma redução da quantidade secretada (Tramontina et al, 2002; Netto et al, 2005). Portanto, este aumento na secreção de S100B verificado em fêmeas manipuladas de 10 dias se caracteriza como uma alteração do desenvolvimento glial, pois o esperado seria um nível proporcional na secreção desta proteína no líquido como ocorre com os animais não-manipulados. Margis e colaboradores (2004) encontraram uma significativa redução dos níveis de S100B no líquido de ratos adultos após 24 horas de exposição ao gato em relação aos ratos Wistar não expostos sugerindo uma responsividade desta proteína ao estresse. Assim, a manipulação neonatal por induzir também uma alteração nos níveis de S100B no líquido de fêmeas poderia ser considerada uma perturbação ao sistema nervoso semelhante à exposição a situações estressoras em ratos adultos.

Verificamos que a manipulação neonatal induz uma diminuição dos níveis de S100B no *locus coeruleus* em ratos machos e fêmeas de 10 dias (figura 2). O *locus coeruleus* é uma estrutura bastante sensível a estímulos do meio ambiente no período neonatal e há ativação de neurônios desta estrutura em resposta a privação materna em filhotes (Deng et al., 2001) o que sugere que este sistema pode participar na modulação de respostas ao estresse durante o desenvolvimento. Conforme Lucion e colaboradores (2003) a manipulação neonatal induz a uma redução permanente no número de células nervosas do *locus coeruleus* de ratos machos e fêmeas. Esta alteração neuromorfológica em ratos manipulados pode estar relacionada com esta diminuição dos níveis de S100B neste núcleo, já que esta proteína em níveis ideais estimula a extensão de neuritos e aumenta a sobrevivência de neurônios e astrócitos durante o desenvolvimento (Selinfreund., 1990). Um déficit nos níveis de S100B indica que há um prejuízo na proliferação e sobrevivência de neurônios e astrócitos no *locus coeruleus* de ratos que foram manipulados no período neonatal. Van den Hove e

colaboradores (2006) demonstraram que o estresse pré-natal reduz a expressão da proteína S100B no hipocampo de rato neonato (1º dia de vida) indicando que intervenções no período crítico após o nascimento induzem alterações na expressão desta proteína.

O aumento encontrado no líquido de ratas manipuladas juntamente com diminuição de S100B verificada no *locus coeruleus* pode indicar que há uma redução de S100B intracelular de astrócitos devido à secreção aumentada no líquido, visto que na proximidade do local onde realizamos a punção da cisterna magna para coleta de líquido encontra-se o *locus coeruleus*. Estes dados associados podem indicar que a manipulação neonatal induz uma alteração na quantidade de S100B sintetizada e secretada pelo astrócito neste núcleo.

Observamos no presente estudo que a manipulação neonatal induz um aumento nos níveis da proteína GFAP no *locus coeruleus* (figura 5) em ratos machos e fêmeas de 10 dias de idade. Por outro lado, observamos uma redução no conteúdo de S100B no *locus coeruleus* aos 10 dias, tanto em machos quanto em fêmeas. A S100B regula polimerização da GFAP, tanto por seqüestrar monômeros e dímeros bloqueando o processo de alongação dos filamentos intermediários (Bianchi et al., 1996), quanto por diminuir a fosforilação da GFAP (Ziegler et al., 1998). Portanto a mudança na relação GFAP/S100B talvez implique na mudança da organização dos filamentos intermediários. Estudos envolvendo imunistoquímica para GFAP no *locus coeruleus* poderiam confirmar essa possibilidade.

É importante salientar que GFAP e S100B têm mecanismos independentes de expressão gênica e que as variações na expressão não são necessariamente paralelas em diversas situações. Por exemplo, ratos submetidos à intoxicação pré-natal com metil-mercúrio têm uma redução GFAP e aumento de S100B no hipocampo ao nascimento (Vicente et al., 2004). Atualmente não sabemos se essa diferença de comportamento específica no *locus coeruleus* de animais manipulados (aumento de GFAP e redução de S100B) envolve diferentes

populações de células gliais ou não. O exato significado destas variações e suas implicações permanecem ainda não esclarecidos.

O bulbo olfatório é a estrutura principal no aprendizado olfatório e uma alteração nos níveis de S100B e GFAP poderia justificar o resultado de Raineki (2006) que encontrou que a manipulação repetida no sétimo dia de idade induz em fêmeas uma diminuição no aprendizado olfatório. Entretanto, não encontramos diferenças significativas nos níveis de S100B e GFAP nesta estrutura (figura 4 e 7).

Observamos que a manipulação neonatal induz uma diminuição dos níveis de S100B no córtex frontal de ratos machos (figura 3). Esta diminuição dos níveis de S100B pode estar relacionada com a diminuição do número de neurônios do córtex frontal no 11º dias de vida em ratos machos e fêmeas indicada por Lucion et al; (1999) já que a S100B tem atuação neurotrófica. Desta forma, uma redução da quantidade de S100B poderia resultar num atraso da extensão de neuritos e decréscimo da proliferação glial no córtex frontal.

Conforme Barros e colaboradores (2006) o estresse por contenção durante a gestação de ratos induziu na ninhada diversas alterações nos filhotes quando adultos, como o aumento nos níveis de S100B e a imunorreatividade GFAP, além de uma redução na arborização dendrítica e diminuição no número de sinapses no córtex frontal. Portanto, podemos verificar que o córtex frontal é uma estrutura susceptível a intervenções no início do desenvolvimento pós-natal que podem ser detectadas na avaliação dos níveis de S100B.

A diminuição dos níveis da S100B verificado no córtex frontal de ratos machos manipulados pode estar relacionado com o baixo desempenho em tarefas de aprendizado verificado em ratos manipulados (Anisman et al.,1998) e a interpretação inadequada do ambiente como o comportamento de exploração da área do gato no teste de campo-aberto com gato (Padoin, 2001). Conforme Mello e Souza e colaboradores (2000) há relação da S100B extracelular nos processos associados à memória assim como na modulação da plasticidade sináptica, porém, os mecanismos que abrangem este processo ainda não foram elucidados.

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

A alteração dos níveis da proteína S100B é relacionada com as características cognitivas deficitárias dos portadores da síndrome de Down (Griffin et al., 1989). O gene que codifica a proteína S100B está localizado no cromossomo 21 e na síndrome de Down esta região cromossômica apresenta uma cópia extra, o que determina um aumento constitutivo na expressão e nos níveis extracelulares da S100B (Donato, 2001). Portanto, alterações nos níveis de S100B podem indicar repercussões deficitárias no desenvolvimento cognitivo e comportamental como as que são verificadas em ratos que foram manipulados no período neonatal.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram diferenças sexuais nos níveis da expressão de S100B. Foi verificado que machos não-manipulados têm um maior nível de S100B comparados com fêmeas não-manipuladas no *locus coeruleus* (figura 2). Este dado pode estar relacionado com a atuação dos esteróides gonadais no período neonatal sobre o *locus coeruleus* que é um núcleo sexualmente dimórfico (Deng et al., 2001). Neste período crítico do desenvolvimento, os machos, diferentemente das fêmeas, estão submetidos à atuação da testosterona que é convertido em estradiol no encéfalo (Benton et al., 1995).

As células gliais demonstram uma responsividade a esteróides gonadais que tem sido bem caracterizada por mudanças físicas em sua morfologia e os efeitos da testosterona sobre os astrócitos são provavelmente mediados pela conversão da testosterona em estradiol (Garcia-Segura & McCarthy, 2004).

Mong e Blutstein (2006) demonstraram que o estradiol aumenta a atividade da expressão gênica na neuroglia, incluindo glutamina sintetase. Este dado sugere que a regulação da neurotransmissão de glutamato envolve uma responsividade

glial a esteróides gonadais. Portanto, é consistente a hipótese de que a expressão e secreção da proteína S100B possa ser modulada pelos esteróides gonadais, assim como o aumento dos níveis de S100B verificado em machos seja consequência da maior quantidade de estradiol no encéfalo dos ratos machos de 10 dias.

Com os experimentos realizados no presente trabalho podemos concluir que a manipulação neonatal induz alterações na atividade astrocítica que podem estar relacionadas com as diversas modificações no SNC observadas nos animais que foram submetidos a este procedimento. As repercussões dos resultados obtidos estão relacionados principalmente com as funções da proteína S100B no SNC como a proliferação e sobrevivência de neurônios e glias.

8 CONCLUSÕES

A interpretação dos resultados deste estudo encaminham para as seguintes conclusões:

A manipulação neonatal induz um aumento da proteína S100B no líquido em ratas fêmeas aos 10 dias de idade.

A manipulação neonatal induz uma diminuição na expressão de S100B no *locus coeruleus* em ratos machos e fêmeas aos 10 dias de idade.

A manipulação neonatal induz uma diminuição na expressão de S100B no córtex frontal de machos aos 10 dias de idade.

A manipulação neonatal induz um aumento na expressão da proteína GFAP no *locus coeruleus* em machos e fêmeas aos 10 dias de idade.

Os machos não-manipulados têm um maior nível de S100B comparados com fêmeas não-manipuladas no *locus coeruleus* aos 10 dias de idade, sugerindo a atuação do estradiol sobre os níveis de S100B.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANISMAN, H., ZAHARIA, M.D., MEANEY, M.J. & MERALI, Z. Do early life permanently alter behavioral and behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci*, 16: 149-164, 1998.

AZMITIA, E.C., GRIFFIN, S.T., MARSHAK, D.R., VAN ELDIK, L.J., WHITAKER- AZMITIA, P.M. S100B and serotonin: a possible astrocytic-neuronal links to neuropathology of Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res*, 94: 459-453, 1992.

BARGER, S.W., WOLCHOK, S.R., VAN ELDIK, L.J. Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1160(1): 105-12, 1992.

BARROS VG, DUHALDE-VEGA M, CALTANA L, BRUSCO A, ANTONELLI MC. Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *J Neurosci. Res, Ap*; 83 (5): 787-800, 2006.

BENTON L, SHAN LX, HARDY MP. Differentiation of adult Leydig cells. *J. Steroid Biochem Mol. Biol*, Jun; 53(1-6):61-8. Review, 1995.

BIANCHI R., GARBUGLIA M, VERZINI M, GIAMBANCO I, IVANENKOV VV, DIMLICH RV, JAMIESON GA JR, DONATO R. S-100 (alpha and beta) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim Biophys Acta*, Oct 11;1313(3):258-67,1996.

CALDJI, C. SHARMA S., PLOTSKY P.M, MEANEY M.J. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. J. Neuroendocrinol, Janeiro; 12(1): 5-12, 2000.

CHROUSOS, G.P.,GOLD P.W. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA 267: 1244-1252, 1992.

CICCARELLI, R., CASABONA, G., D'ALIMONTE, I., DI IORIO, B., CACIAGLI, F. AND NICOLETTI, F.,. Stimulation of nerve growth factor and S100 protein production from rat cultured astrocytes by adenosine A1 and group II metabotropic glutamate receptors. Drug Dev Res, 43, p. 51,1998.

DENENBERG, V. H. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity. A theory of infantile stimulation. Psychol Rev. v. 71, n. 5, p. 335-51, 1964.

DENT, G. W, SMITH M. A, LEVINE S. Stress-induced alterations in *locus coeruleus* gene expression during ontogeny. Brain Res Dev. Mar 29;127(1):23-30, 2001.

DENT, G. W., SMITH, M. A, LEVINE, S. Rapid induction of corticotropin-releasing hormone gene transcription in the paraventricular nucleus of the developing rat. Endocrinology. v 141. p. 1593-98, 2000.

DONATO, R., GUGLIELMO S., AGNELETTI, L. A., BIANCHI, R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. Biochim. Biophys. Acta. V 1448, pp 277-289, 1998.

DONATO, R, Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type, *Biochim. Biophys. Acta* 1450, pp. 191–231, 1999.

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

DONATO,R. Intracellular and extracelular roles of S100 proteins. *Microsc. Res Technic* 60:540-551, 2003.

DONG Y, BENVENISTE E.N. Immune Function of Astrocytes. *Glia* 36. 280-190, 2001.

ENGI .F, GHIRNIKAAR RS, LEE YL. Glial Fibrillaary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). 2000. *Neurochem Res* ; 25:1439-51.

FRANCIS, D.D.D.; CALDJI, C.; CHAMPAGNE, F.; PLOSTSKY, P.M.; MEANEY, M. J. The role of corticotrophin-releasing factor-norepinephrine system in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biol. Psyc.*, 46:1153-1166, 1999.

GATTAZ, W.F., CAIRNS, N.J., LEVY, R., FORSTL, H., BRAUS, D.F. AND MARAS, A.,. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 246 3, pp. 129–131,1996.

GATTAZ, W.F., HÜBNER, NEVALAINEN, T.J., THUREN, T. KINNUNEN, P.K.J.,. Increased serum phospholipase A2 activity in schizophrenia: a replication study. *Biol. Psychiatry* 28, pp. 495–501,1990.

GARBUGLIA M, VERZINI M, SORCI G, BIANCHI R, GIAMBANCO I, AGNELETTI AL, DONATO R. The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res.* Oct;32(10):1177-85, 1999.

GARCIA-SEGURA L.M, MCCARTHY M.M. Minireview: role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145:1082-1086, 2004.

GOMES CM, RAINEKI C, RAMOS DE PAULA P, SEVERINO GS, HELENA CV, ANSELMO-FRANCI JA, FRANCI CR, SANVITTO GL, LUCION AB. Neonatal handling and reproductive function in female rats. *J Endocrinol.* Feb;184(2): 435-45, 2005.

GRIFFIN, W.T.S., STANLEY, E.C., LING, C., WHITE, J., MACLEOD, V., PERROT, L.J., WHITE, C.L. AND ARAOZ, C.,. Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, pp. 7611–7619,1989.

HAUSMANN R, RIEB R, FIEGUTH A, BETZ P. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *Int J Legal Med*, 113:70-5, 2000.

HERMANN M, VOS P, WUNDERLICH MT, BRUJIN CHMM, LAMERS KJB. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analyse of serum concentrations of protein S100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*, 31:2670-7, 2000 .

HU J. , FERREIRA ., VAN ELDIK, L. J. S100B induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69. 2294-301,1997.

HUTTUNEN HJ, KUJA-PANULA J, SORCI G, AGNELETTI AL, DONATO R, RAUVALA H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* Dec 22;275(51):40096-105, 2000.

INAGAKI M, NAKAMURA Y, TAKEDA M, NISHIMURA T, INAGAKI N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol.* Jul;4(3):239-43. Review,1994.

INGEBRIGTSEN, T., K. WARTERLOO, E. A. JACOBSEN, B. LANGBAKK, AND B. ROMNER.. Traumatic Brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioural outcome. *Neurosurgery* 45: 468-475,1999.

JACCOBSON L. , SAPOLSKY R. M. The roles hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinol Rev*12.118-134,1991.

JANKOVIC, B.D. AND DJORDJIJEVIC, D.,. Differential appearance of autoantibodies to human brain S100 protein — neuron specific enolase and

myelin basic protein in psychiatric patients. *Int. J. Neurosci.* 60, pp. 119–127, 1991.

KAUFMAN J, PLOTSKY PM, NEMEROFF CB, CHARNEY DS. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol Psychiatry.* Oct 15;48(8):778-90, 2000.

KLIGMAN, D. , MARSHAK, D. R. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 (20).7136-9, 1985.

KOENIG JI, KIRKPATRICK B, LEE P. Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Aug; 27(2):309-18.

LARA, D.R. AND SOUZA, D.O., Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med. Hypoth*, 1999.

LEITE MC, BROLESE G, DE ALMEIDA LM, PINERO CC, GOTTFRIED C, GONÇALVES CA. Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res Bull.* Jun 30;70(2):179-85, 2006.

LEON M. Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol.* Dec;23(10):1557-73. Review,1992.

LEVINE S. Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science.* Mar 9;135:795-6, 1962.

LIEDTKE W, EDELMANN W, BIERI PL, CHIU F, COWAN NJ, KUCHERLAPATI R. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*; 17:607-15,1996.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193: 265–275,1951.

LUCION, A.B., PADOIN, M.J., PEREIRA, FM., MANDARIN-LACERDA, C.A. & SCHNEIDER, F.L. Estimation of the number of neurons in the medial amygdala and frontal cortex of rats submitted to neonatal simulation. 29 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, p. 617. 1999.

LUCION AB, PEREIRA FM, WINKELMAN EC, SANVITTO GL, ANSELMO-FRANCI JA. Neonatal handling reduces the number of cells in the *locus coeruleus* of rats. *Behav Neurosci*, Oct;117(5):894-903, 2003.

MARIGGIO M.A., FULLE S., CALISSANO P., NICOLETTI I. The brain protein S100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neuroscience*, 60, pp. 29–35,1994.

MARGIS R., ZANATTO V. C., TRAMONTINA F., ELSA V., LHULLIER F., PORTELA L. V., SOUZA D. O., DALMAZ C., KAPCZINSKI F, GONÇALVES C.A Changes in S100B cerebrospinal fluid levels of rats subjected to predator stress. *Brain Res.* v. 1028, 3. December, Pages 213-218, 2004.

MARSHAK, D.R.,. S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog. Brain Res.* 86, pp. 169–181,1990.

MEANEY, M. J. AIKEN, D.H., BHATNAGAR, S., SAPOLSKY, R.M. Postnatal Handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiol. Aging*. V. 12, p. 31-8, 1991.

MEERLO, P. HORVATH, K.M. , NAGY, G..M. BOHUS, B, KOOLHAAS, J..M. The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *J. Neuroendocrinol.* V11, p. 925-33,1999.

MELLO E SOUZA T, ROHDEN A, MEINHARDT M, GONCALVES CA, QUILLFELDT JA. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav.* Oct 1-15;71(1-2):29-33,2000.

NETTO CB, PORTELA LV, FERREIRA CT, KIELING C, MATTE U, FELIX T, DA SILVEIRA TR, SOUZA DO, GONCALVES CA, GIUGLIANI R. Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem.* May;38(5):433-5, 2005.

NETTO CB, PORTELA LV, FELIX TM, SOUZA DO, GONCALVES CA, GIUGLIANI R. Serum S100B levels in patients with neural tube defects. *Clin Chim Acta.* 2006 Feb;364(1-2):275-8. Epub Sep 6, 2005.

PADOIN, M.J; CADORE, L.P.;GOMES, C.M.; BARROS, H.M.& LUCION A.B. Long-lasting effects of stimulation on the behavior of rats. *Behavioral Neuroscience* 115:1332-1340, 2001.

PALKOVITS M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res*, 50: 449-450, 1973.

PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press, 1997.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. J. Neurosci. Methods, 14: 149-167, 1985.

PETERSON GL. A simplification of the protein assay method of lowry *et al.* Which is more generally applicable. Anal Biochem 83:346-356. 1977

PLOTSKY , P..M, MEANEY, M.J Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) RNAm, median eminence CRF content and stress induce release in adult rats. Brain Res. Mol. Brain Res.. V. 18. P. 195-200, 1993a.

RAINEKI, C. Manipulação Neonatal, Aprendizado Olfatório e Reprodução em Ratos. Tese de Doutorado (Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.65, 2006.

RODNIGHT R., GONÇALVES C.A., WOFCHUK S.T., LEAL R. 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 in astrocytic plasticity. Braz J Med Biol res 30:1-14,1997.

SANCHO-TELLO M, VALLES S, MONTOLIU C, RENAU-PIQUERAS J, GUERRI C. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. Glia. Oct;15(2):157-66,1995.

SCACCIANOCE, P. DEL BIANCO, G. PANNITTERI, PASSARELLI, F. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein, *Brain Res.* 1004, pp. 208–211, 2004.

SCOTTO C, DELPHIN C, DELOULME JC, BAUDIER J. Concerted regulation of wild-type p53 nuclear accumulation and activation by S100B and calcium-dependent protein kinase C. *Mol Cell Biol.* Oct;19(10):7168-80, 1999.

SELINFREUND RH, BARGER SW, WELSH MJ, VAN ELDIK LJ. Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. *J Cell Biol.* Nov;111(5 Pt 1):2021-8, 1990.

SEVERINO GS, FOSSATI IAM, PADOIN MJ, GOMES CM, TREVIZAN L, SANVITTO GL, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA, LUCION AB. Effects of neonatal handling on the behavior and prolactin stress response in male and female rats at various ages and estrous cycle phases of female. *Physiol. Behav.*, 81: 489-498, 2004.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA, A.K.; CLEMENTE,Z. & DALMAZ, C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not anxiety-like behavior. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23:93-99, 2005.

STRINGER GL. Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus. *Brain Res* 1996; 717:147-53.

SHENG J.G., R.E. MRAK, W.S. GRIFFIN,T. S100 protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *J. Neurosci. Res.* 39, pp. 398–404,1994.

SMYTHE JW, ROWE WB, MEANEY MJ. Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain Res Dev Brain Res.* Jul 15;80(1-2):183-9, 1994.

TAKUMA K, BABA A, MATSUDA T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* Feb;72(2):111-27. Review, 2004.

TIU SC, CHAN WY, HEIZMANN CW, SCHAFER BW, SHU SY, YEW DT. Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal and aged cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* Feb 7;119(2):159-68, 2000.

TRAMONTINA. F., CONTE, D . GONÇALVES, C. GOTTFRIED,. PORTELA L.V, VINADE L., SALBEGO C.,. GONÇALVES, C.A. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats, *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, pp. 373–378, 2002.

TRAMONTINA F, LEITE MC, GONCALVES D, TRAMONTINA AC, SOUZA DF, FRIZZO JK, NARDIN P, GOTTFRIED C, WOFCHUK ST, GONCALVES CA. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* Jun;31(6):815-20. Epub 2006 Jun 23, 2006.

VAN DEN HOVE DL., STEINBUSCH HW,. Prenatal stress S100B in the neonatal rat hippocampus. *Neuroreport.* Jul 11;17 (10): 1077-80, 2006.

VAN ELDIK L.J. AND GRIFFIN W.S.T., S100 expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim. Biophys. Acta* 1223, pp. 398–403, 1994.

VAN ELDIK L.J., STAECKER J.L. AND WINNINGHAM-MAJOR F., Synthesis and expression of a gene coding for the calcium-modulated protein S100 and designed for cassette-based, site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 263, pp. 7830–7837, 1988.

VICENTE E, BOER M, LEITE M, SILVA M, TRAMONTINA F, PORCIUNCULA L, DALMAZ C, GONCALVES CA Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology*. Sep;25(5):771-7, 2004.

VOLTERRA, A., MELDOLESI J., Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* August, volume 6, pp. 626-640, 2005.

WEINBERGER, D.R., From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 346, pp. 552–557, 1995.

WINKELMANN-DUARTE E.C. Alterações morfológicas do sistema nervoso central induzidas pela manipulação neonatal. Tese de Doutorado (Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

WHITAKER-AZMITIA, P.M., MURPHY, R. AND AZMITIA, E.C., Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor protein S100 and alters astroglial morphology. *Brain Res.* 528, pp. 155–158, 1990.

WIESMANN, W., WANDINGER, K.P., MISSLER, U., ECKHOFF, D., ROTHERMUNDT, M., AROLT, V. and KIRCHNER, H.,. Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenia patients. *Biol. Psychiatry* 45, pp. 1508–1511, 1999.

WOLFF J.,R MISSLER.,M. Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems. *Ann Anat.* Oct;174(5):393-403. Review, 1992.

WU, T., ANGUS, C.W., YAO, X.L., LOGUN, C. and SHALHAMER, J.H.,. P11, a unique member of the S100 family of calcium-binding proteins, interacts with and inhibits the activity of the 85-kDA cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 272 pp. 17145–17153, 1997.

ZIEGLER D.R., INNOCENTE C. E., LEAL R.B., RODNIGHT R., GONÇALVES C.A.. Tthe S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res* 23:1259-1263, 1998.