



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÊNFASE MOLECULAR, CELULAR E FUNCIONAL

UFRGS - BIBLIOTECA  
INST. BIOCÊNCIAS

**ESTUDO DA PROTEÍNA S100B EM RESPOSTA A ESTÍMULO  
INFLAMATÓRIO CENTRAL OU PERIFÉRICO**

**Lucas Silva Tortorelli**

**Orientador  
Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves**

Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas  
Ênfase Molecular, Celular e Funcional da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel

**Porto Alegre  
2009**

UFRGS - BIBLIOTECA  
INST. BIOCÊNCIAS

*Dedico este trabalho inteiramente a  
minha avó, historiadora natural, que tanto  
pelo componente genético quanto  
ambiental, foi fundamental para a minha  
escolha do curso.*

*“Imagine: dentro, os nervos, na cabeça – isto é, esses nervos estão lá na cabeça... (malditos sejam!) há uma espécie de rabichos, os rabichos desses nervos, e assim que começam a tremular... quer dizer, sabe, eu olho para alguma coisa com meus olhos e quando começam a tremular, esses rabichos... e quando tremulam aparece uma imagem... não de imediato, passado um instante, um segundo... e então algo como um momento aparece; quer dizer, não um momento – ao diabo com o momento! -, mas uma imagem, isto é, um objeto, ou uma ação, droga! É por isso que vejo e então penso, por causa desses rabichos, e não por que eu tenha uma alma nem porque eu seja alguma espécie de imagem e semelhança. Tudo isso é bobagem! Rakitin me explicou tudo ontem, meu irmão, e fiquei de boca aberta. É magnífica, Alyosha, essa ciência! Um novo homem está surgindo – isso eu entendo [...] Mas lamento perder Deus!”*

*(Dostoiévski – Os irmãos Karamazov)*

*“O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas apenas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o luto, o desalento e a lamentação. E por isso, de uma maneira especial, nós adquirimos sabedoria e conhecimento e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão nos tornamos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas essas coisas nós temos de suportar do encéfalo quando não está sadio... Nesse sentido, opino que é o encéfalo quem exerce maior poder sobre o homem.”*

*Hipócrates, Sobre a Doença Sagrada (Séc IV a.C.).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que estimularam e sustentaram a minha convicção questionadora. Professores, orientadores, amigos, colegas, mestres e doutores do Laboratório S100B e Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação. Em especial a todos aqueles que contribuíram para a construção desse TCC e me auxiliaram nos momentos mais complicados. Meus sinceros agradecimentos.

Ao órgão financiador: CNPq pela bolsa cedida ao longo da iniciação científica e que com certeza faz com que todos os meses lembremos de quanto o nosso país é precário no investimento científico. Mas que ao mesmo tempo traz a tona o questionamento de nossa atual situação socioeconômica. Vivendo, questionando e aprendendo. Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Organização do Sistema Nervoso Central.....</b>	<b>6</b>
1.1.1	Neurônios.....	8
1.1.2	Astrócitos.....	9
1.1.3	Microglia.....	11
1.1.4	Oligodendrócitos.....	12
<b>1.2</b>	<b>Neuroinflamação.....</b>	<b>12</b>
1.2.1	S100B.....	14
<b>1.3</b>	<b>Memória.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>18</b>
3.1	Animais.....	18
3.2	Procedimento Cirúrgico.....	18
3.3	Avaliação Cognitiva.....	18
3.4	Lipopolissacarídeo.....	19
3.5	Coleta de Amostras.....	19
3.6	ELISA para S100B.....	19
3.7	Análises estatísticas.....	20
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>21</b>
4.1	Tratamento Agudo com LPS.....	21
4.2	Análise comportamental.....	23
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Há bastante tempo o encéfalo causa curiosidade, provavelmente a partir do momento em que passamos a criar os questionamentos sobre o que vemos ou sentimos. Existem registros de “intervenções cirúrgicas encefálicas” de mais de sete mil anos. E, com o passar do tempo, muitas hipóteses e teorias foram propostas a respeito do funcionamento deste órgão (Bear, 2008).

Atualmente, dentre o seu mais amplo aspecto de investigação, as neurociências vem buscando compreender e elucidar os mecanismos envolvidos em diversas patologias. Condições neuroinflamatórias têm atraído a comunidade científica pelo seu destacado envolvimento em doenças neurodegenerativas. Neste trabalho vou falar sobre o envolvimento da proteína S100B, uma citocina prevalentemente astrocítica, envolvida em situações de neurodegeneração.

### 1.1 Organização do Sistema Nervoso Central

A compreensão da estrutura encefálica é fundamental para entender o funcionamento deste órgão, sua interação com outros tecidos e como responde a estímulos externos. Sua organização celular peculiar e diferenciada revela um órgão formado por redes específicas capazes de interagir entre si, e com outros tecidos, através de diferentes componentes celulares (Przedborski, 2008).

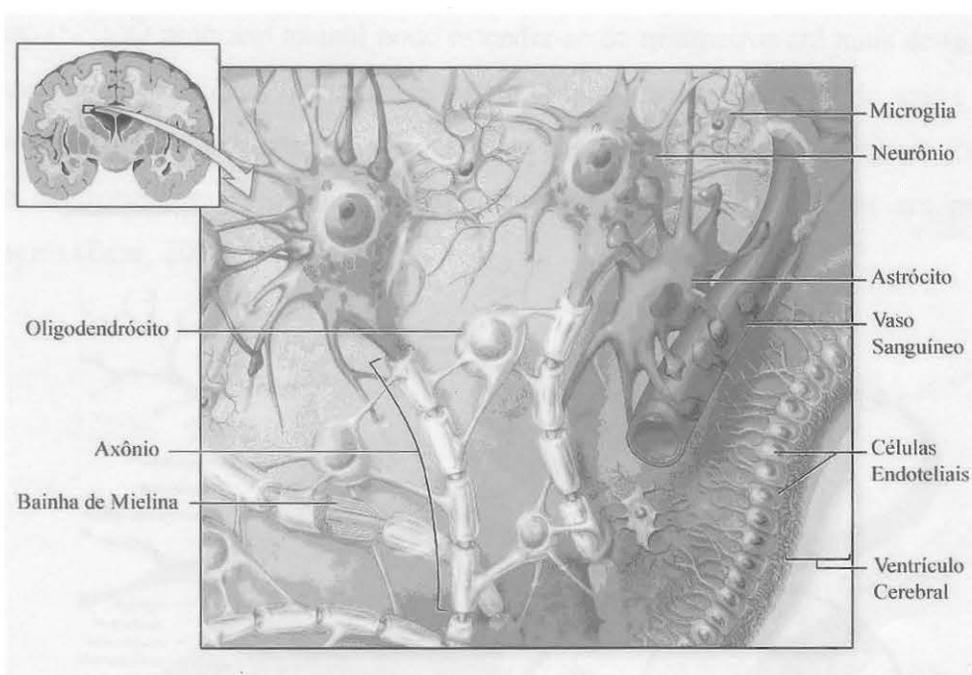
Significante importância se dá na interação entre o sistema nervoso central (SNC) e os sistemas imune e endócrino. Tradicionalmente considerado como imunologicamente privilegiado, o SNC deveria ser abordado como uma região imunologicamente especializada. Uma característica anatômica importante, que determina a natureza única das reações neuro-imune é a presença de barreiras com permeabilidades seletivas, a barreira hemato-encefálica (BHE) (Przedborski, 2008).

O SNC apresenta uma organização circulatória baseada no fluxo do líquido cefalorraquidiano, na microvasculatura, na BHE e no controle do fluxo sanguíneo exercido por atividade neural que regula a interação entre o SNC e o fluxo celular da periferia (Przedborski, 2008).

O SNC é constituído por dois grupos de células, os neurônios e as células gliais. Inicialmente, os neurônios, por serem células eletricamente excitáveis, foram reconhecidos como elementos celulares responsáveis pela transmissão do impulso

elétrico e pelo processamento da informação, enquanto que as células gliais foram consideradas apenas um suporte inerte para os neurônios. Contudo, de um século e meio pra cá, graças ao trabalho do patologista alemão Rudolf Virchow (1846), as células gliais passaram a ser elementos morfológicamente distintos dos neurônios, tendo, nos últimos quarenta anos, suas funções elucidadas e sua importância reconhecida (Raine, 2006).

Evidências de que as células gliais desempenham importante papel no funcionamento neuronal suportam a idéia de que a interação neurônio-glia é um elemento fundamental no entendimento do funcionamento das dinâmicas do SNC (Holz, 2004).



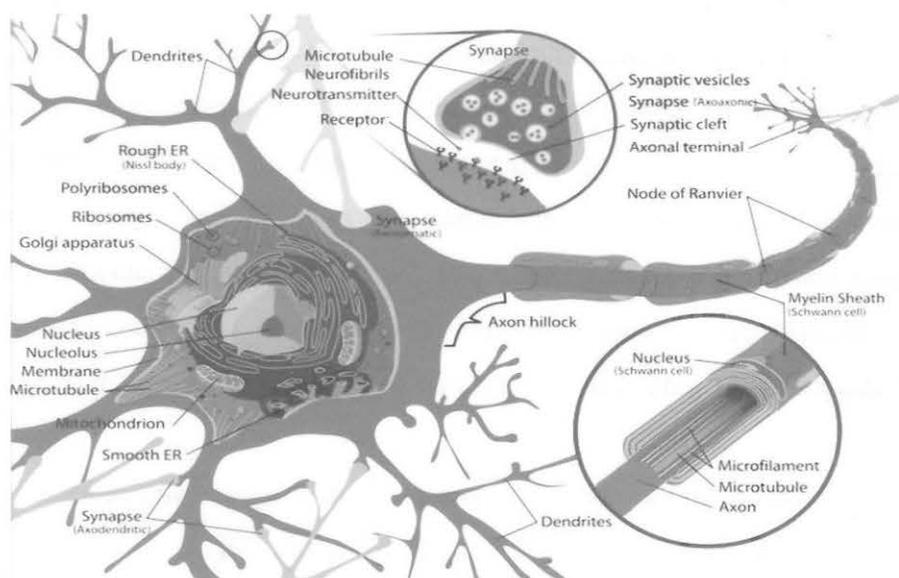
**Figura 1.1** Principais componentes celulares do SNC. Neurônios, astrócitos, microglia, oligodendrócitos e células ependimárias em suas representações morfológicas e intercomunicantes.

As células gliais são classificadas em dois grupos: a macroglia e a microglia. A microglia compreende células fagocíticas envolvidas nas respostas inflamatórias. A macroglia é constituída pelos oligodendrócitos, que formam a mielina, pelas células ependimárias, que revestem os ventrículos cerebrais, e pelos astrócitos cujas funções estão altamente relacionadas com a manutenção da homeostase do sistema (Perea & Araque, 2005).

### 1.1.1 Neurônios

Neurônios são células de origem ectotérmica capazes de gerar e transmitir potenciais de ação. Tal propriedade só é possível devido à ocorrência de passagem de correntes iônicas através de canais que perpassam a membrana plasmática (Bear, 2008)

Os neurônios são células altamente polarizadas e em função disso apresentam uma morfologia altamente distinta. O soma abriga diversas organelas num citosol rico em potássio; o núcleo, os retículos endoplasmáticos liso e rugoso, o aparelho de Golgi e as mitocôndrias. O axônio, uma estrutura exclusiva de neurônios, é altamente especializado para o processo de transferência de informação ao longo do sistema nervoso (SN). O processo axonal pode estender-se de milímetros até mais de um metro e a constituição protéica é fundamental para a propagação do potencial de ação e tráfego de vesículas até o botão terminal. Os dendritos partem do soma e em conjunto formam a árvore dendrítica; suas membranas altamente especializadas são ricas em proteínas receptoras (Bear, 2008).



**Figura 1.2 Morfologia neuronal.** Representação da distribuição de organelas, morfologia e polaridade bem como seus contatos sinápticos.

Neurônios são capazes de estabelecer junções especializadas denominadas sinapses. Essas podem ser; elétricas ou químicas. As sinapses elétricas permitem uma passagem direta de íons, via canais de junções comunicantes. As sinapses químicas são mais abundantes no SN humano maduro. Nessas, as membranas são separadas pela fenda sináptica, onde ocorre a liberação dos neurotransmissores. A maioria dos neurônios

recebe milhares de sinais de entrada nas sinapses, que ativam diferentes combinações de canais iônicos e receptores metabotrópicos, resultando em uma única saída dos potenciais de ação (Bear, 2008).

### 1.1.2 Astrócitos

Os astrócitos compreendem aproximadamente 50% de toda massa cerebral e são as células gliais mais abundantes no SNC. Compreendem uma família de células que partilham propriedades e funções, no entanto, exibem heterogeneidade como resultado de seus diferentes micro-domínios. Já está bem elucidado que essas células mantêm um ambiente viável para os neurônios, tamponando o excesso de potássio e neurotransmissores do meio extracelular, provendo nutrientes, dando suporte estrutural em sinapses e contribuindo para a integridade da BHE. Os astrócitos também são conhecidos por liberar moléculas importantes para a sobrevivência neuronal e formação de neuritos (Wang, 2008).

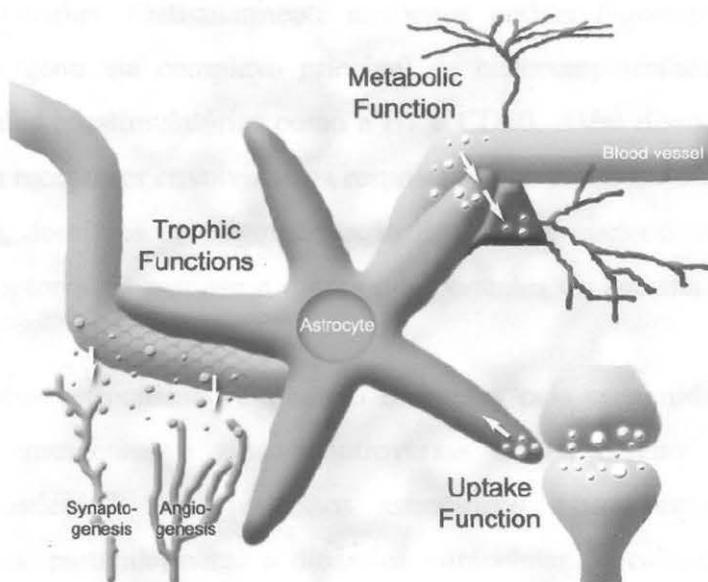
Numa classificação mais antiga, os astrócitos foram divididos em astrócitos protoplasmáticos (tipo 1 em cultura), que estão localizados na substância cinzenta, apresentam numerosos processos curtos, bastante ramificados e de espessura variável que se estendem à longas distâncias; e astrócitos fibrosos (tipo 2 em cultura) localizados na substância branca, de formato estrelar e processos longos, finos e pouco ramificados. Estes processos longos são emitidos em várias direções. No entanto, a morfologia astrocítica é altamente complexa e heterogênea, o que se evidencia quando falamos na glia de Bergmann (cerebelo), nas células de Muller (retina), pituócitos (hipófise), nos que formam a BIIE (microvasculaturas) e os astrócitos da zona subventricular (Wang, 2008).

A membrana plasmática astrocítica está projetada sob a forma de lamelas e fibras, que são capazes de infiltrar-se por dentro a rede neuronal, incluindo terminais sinápticos, dendritos e espinhos dendríticos. O grau de envolvimento dos processos astrocíticos demonstra uma variabilidade regional. No hipocampo, somente 57% das sinapses possuem processos astrocíticos, enquanto no cerebelo as células de Purkinje, que recebem dois tipos de aferências excitatórias, das fibras paralelas e trepadeiras, revelam diferentes graus de envolvimento astrocítico (67% versus 94%, respectivamente). Essas membranas constituem micro-compartimentos celulares independentes capazes de modular diversas sinapses: um astrócito hipocampal pode, por

exemplo, contatar aproximadamente 100.000 sinapses (Wang, 2008).

Assim a morfologia astrocítica tem estado em debate, pois seu aspecto esponjiforme quando micro injetado com corantes fluorescentes tem sido preponderante ao aspecto estrelar muitas vezes demonstrado. Astrócitos maduros são classicamente conhecidos por expressarem o filamento intermediário GFAP (proteína glial fibrilar ácida). No entanto outras células podem expressar GFAP, como as células ependimárias (Wang, 2008).

Dentre as funções astrocíticas melhor elucidadas, pode-se citar: o envolvimento na maturação e sobrevivência neuronal, formação de sinapses, regulação da angiogênese e a manutenção de micro-domínios viáveis para os neurônios. Mas ainda muito precisa ser elucidado sobre esses processos, como por exemplo, as moléculas e a sinalização envolvidas. (Wang, 2008).



**Figura 1.3** Representação esquemática das funções astrocíticas melhor elucidadas. Captação de íons e neurotransmissores, elemento-chave para trocas metabólicas entre os sistemas periférico e central, regulação da angiogênese e sinaptogênese.

O controle da maturação neuronal e da sinaptogênese são fortemente sustentados pela produção astrocítica de componentes que regulam o crescimento neuronal e remodelam a matriz extracelular (MEC). A maior fonte de produção de componentes da MEC e de moléculas de adesão são os astrócitos, e essas moléculas incluem; laminina, N-caderina, moléculas de adesão neuronal (NCAM), fibronectina e metaloproteínas 2 e 9. Dentre os fatores de crescimento pode-se citar a produção de; fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3),

fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e ainda outras moléculas como a proteína S100B (Wang, 2008).

Os astrócitos também são conhecidos por possuírem pés perivasculares que regulam o fluxo sanguíneo da microvasculatura e ainda por induzirem a formação dessa microvasculatura (angiogênese). Também são capazes de seqüestrar o potássio que se concentra no meio extracelular durante a atividade neuronal de forma passiva ou ativa. Destacadamente, os astrócitos também são famosos por possuírem mecanismos para captar neurotransmissores como o glutamato e o GABA (ácido gama-amino-butírico). Astrócitos suportam o metabolismo neuronal via captação de glicose que pode ser tanto convertida a lactato quanto a glicogênio. Podem ainda agir na detoxificação da amônia, via ação da enzima glutamina sintetase, e metais pesados, via proteínas ligantes de metais como as metalotioneínas. (Wang, 2008).

Realizando a comunicação entre sistema imune e SNC, os astrócitos representam a ligação desses sistemas. Particularmente astrócitos podem fagocitar e realizar a apresentação de antígeno via complexo principal de histocompatibilidade do tipo 2 (MHC II) e moléculas coestimulatórias como a B7 e CD40. Além disso, essas células também apresentam receptores envolvidos na resposta imune inata; incluindo receptores do tipo Toll (TLR), domínios de oligomerização ligantes de nucleotídeos, receptores seqüestradores, receptores de manose e outros componentes do sistema complemento (Wang, 2008).

Outras funções astrocíticas vêm sendo debatidas pela comunidade científica, como as funções emergentes e ainda controversas dessas células. Estudos têm demonstrado a plasticidade dos processos astrocíticos e seu envolvimento na transmissão sináptica, particularmente a dinâmica intracelular do cálcio, produção de gliotransmissores, modulação rápida da transmissão sináptica e auxílio na formação de novos espinhos dendríticos. Sabemos muito pouco ainda sobre a pluralidade dessas células e estamos apenas começando a compreender a verdadeira natureza dos astrócitos (Wang, 2008).

### 1.1.3 Microglia

A microglia é composta pelas células que são consideradas os macrófagos do cérebro, que compõem de 5 a 20 % do volume cerebral. Essas células são extremamente móveis, podendo migrar até a lesão neuronal. No SNC adulto, a microglia pode assumir diferentes formas: (1) ramificada ou de repouso, presente no cérebro saudável; (2)

ativada ou reativa, que é vista em estados patológicos do cérebro, porém ainda não apresenta capacidade fagocitária, e (3) fagocitária cuja função é de eliminar resíduos de células mortas do cérebro. A microglia se mostra muito sensível ao dano neuronal, respondendo com a passagem do estado intermediário para a forma ativada (Streit, 1995).

Além da atividade fagocítica, a resposta imune microglial é evidente pela sua capacidade de recrutar células do sistema imune periférico e gerar a resposta para diferenciação e proliferação de células T (Jack, 2005).

#### **1.1.4 Oligodendrócitos**

Os oligodendrócitos são as células responsáveis pela mielinização dos neurônios no SNC assim como as células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP). Rio Hortega em 1928 constatou a presença abundante de oligodendrócitos na matéria branca cerebral e os classificou em três diferentes grupos: (1) aqueles que estão justapostos aos prolongamentos neuronais e promovem a sua mielinização, denominados interfasciculares; (2) os que estão colocados junto ao corpo celular, denominados de perineuronais, e (3) os que envolvem vasos sanguíneos, os perivasculares (Quarles, 2004).

### **1.2 Neuroinflamação**

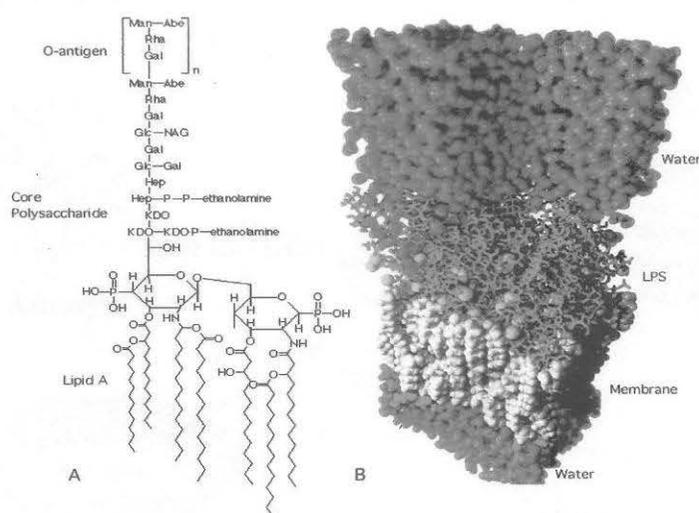
Condições neuroinflamatórias estão altamente envolvidas na progressão de desordens neurodegenerativas, principalmente na doença de Alzheimer. Regiões envolvidas com aprendizado e memória, como o hipocampo e córtex entorrinal, apresentam degeneração neuronal e ativação glial, sugerindo que a participação glial, através de modulação resposta imune, inata, contribua para patologia e demonstre um excelente alvo terapêutico (Griffin 2006, Rosi, 2004).

Diversos modelos animais de neuroinflamação crônica têm sido desenvolvidos para estudo de desordens neurodegenerativas. Os resultados, encorajadores, reproduzem muitas das características comportamentais, eletrofisiológicas, neuroquímicas e neuropatológicas dessas doenças. Incluindo a presença de microglia ativada no hipocampo e córtex entorrinal, prejuízo na LTP (long term potentiation) no giro dentado, prejuízo no aprendizado e memória, e significativa perda de neurônios piramidais de CA3 e córtex entorrinal (Rosi, 2004).

Uma das drogas comumente utilizadas tem sido o LPS. O LPS é um lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas, reconhecido como um imunógeno capaz de induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células gliais, principalmente microglia e astrócitos. Tanto a administração central quanto periférica de LPS são capazes de estimular a secreção de diversos fatores neurotóxicos e neuroativos como interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6), TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Tais citocinas provenientes de células gliais ou células periféricas, têm sido responsabilizadas pelos danos neuroquímicos de diversos sistemas de neurotransmissão, como o sistema colinérgico no prosencéfalo (Tyagi, 2007).

Um dos mecanismos de ação do LPS é através da interação com receptores do tipo Toll (TLR), ativação de cinases e consequente modulação da expressão gênica. A sinalização desencadeada pela ativação de TLR é específica para cada tipo de ligante, mas classicamente envolve a migração de NF- $\kappa$ B para o núcleo, um fator de transcrição associado com a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Astrócitos expressam principalmente TLR dos tipos 3 e 4 (Jack, 2005).

Alguns trabalhos têm demonstrado a correlação de sucessivas respostas inflamatórias periféricas com a progressão de situações neuroinflamatórias e neurodegenerativas, sugerindo o envolvimento de mediadores inflamatórios para a perda neuronal e declínio cognitivo (Perry, 2003).



**Figura 1.4** Molécula de LPS. Representações estruturais do LPS e sua posição na membrana celular de bactérias gram-negativas.

### 1.2.1 S100B

A proteína S100B possui 21 kDa e encontra-se ativa sobre a forma dois homodímeros cada um possuindo dois sítios ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  e um de  $\text{Zn}^{+}$ . Seu amplo espectro de ação é revelado pela sua interação com elementos do citoesqueleto (GFAP, vimentina e MAP) e outras proteínas, como a proteína supressora tumoral p53 e a calcineurina. É uma citocina expressa e secretada principalmente por astrócitos no encéfalo de vertebrados. *In vitro*, seus efeitos parácrinos sobre neurônios revelam uma dualidade: concentrações da ordem de nM promovem o crescimento de neuritos enquanto que concentrações da ordem de  $\mu\text{M}$  exercem um efeito tóxico. O mecanismo de ação proposto tanto na resposta neurotrófica quanto na neurotóxica tem sido os receptores de produtos avançados de glicação (RAGE) (Donato, 2003).

Embora seja mais expressa e secretada por astrócitos, os níveis séricos dessa proteína podem ser influenciados por outros tipos celulares como adipócitos, condrócitos, linfócitos, cardiomiócitos e tecido hematopoiético. No LCR, a S100B é considerada predominantemente astrocítica, porém é possível que outros tipos celulares que expressem a proteína possam contribuir. Astrócitos da substância cinzenta são as células predominantemente positivas para S100B, enquanto na branca são os oligodendrócitos. Estudos com camundongos revelaram a expressão de S100B em oligodendrócitos e microglia. Já na microglia de humanos não foi detectada a expressão, e outros estudos confirmaram prévios estudos em ratos demonstrando neurônios positivos para S100B (Gonçalves, 2008).

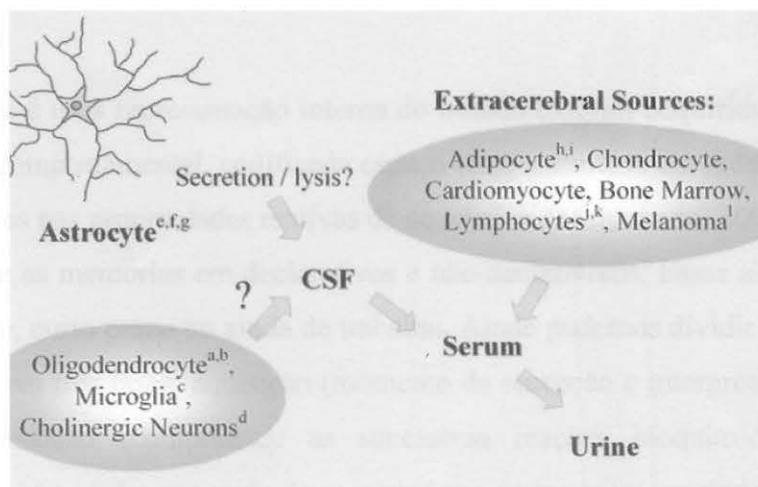


Figura 1.5 Elementos que contribuem para os níveis séricos e no LCR da S100B.

A S100B tem sido utilizada comumente como marcadora de dano cerebral e níveis elevados dessa proteína são encontrados em paciente com Alzheimer,

principalmente no lobo temporal, juntamente com a formação das placas neuríticas. Em quadros de lesão traumática e outras desordens acompanhadas de neuroinflamação, também são encontrados níveis elevados dessa citocina no soro (Griffin, 2006).

O Alzheimer tem sido a patologia neurodegenerativa mais investigada com relatos de alteração na S100B e, de acordo com a hipótese de Griffin, a sua secreção, quando induzida por estímulos inflamatórios, aumenta a expressão da proteína precursora amilóide (APP). No entanto diversos aspectos permanecem obscuros, necessitando ser melhor investigados, como a própria secreção de S100B influenciada por citocinas e outros estímulos (Gonçalves, 2008 e Griffin, 2006).

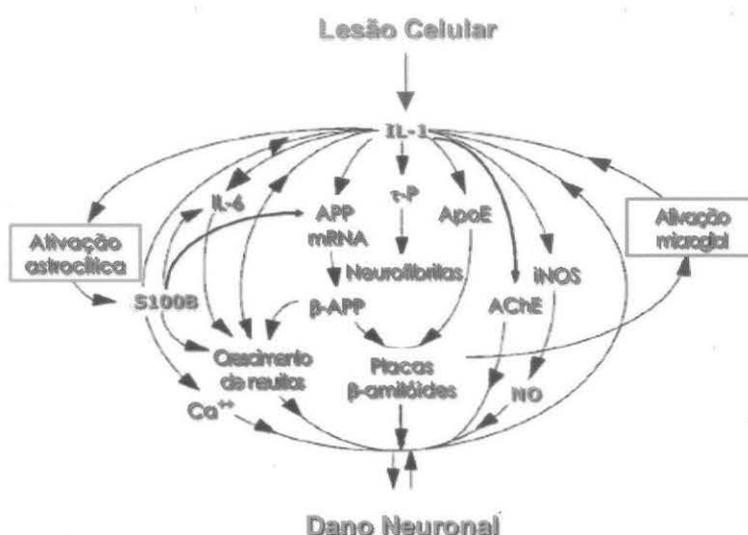


Figura 1.6 Ciclo das citocinas®. Hipótese de Griffin para a progressão da doença de Alzheimer

### 1.3 Memória

A memória é uma representação interna do mundo exterior adquirida através de uma experiência comportamental, codificada espaço-temporalmente em redes neuronais mediante alterações nas propriedades reativas de neurônios. (Maldonado, 2008).

Classificam-se as memórias em declarativas e não-declarativas. Essas ainda podem ser de longo prazo, curto prazo ou ainda de trabalho. Ainda podemos dividir a formação de uma memória em três fases: aquisição (momento da recepção e interpretação de um estímulo), consolidação (compreende as sucessivas reações bioquímicas para o fortalecimento de uma via) e evocação (o recordar que pode ser interpretado através de alterações comportamentais) (Bear, 2008).

Os mecanismos moleculares envolvidos na formação de uma memória passam pela liberação de neurotransmissores que se ligam em receptores pós-sinápticos,

conseqüentemente, ativando cinases que a curto e longo prazo, por diferentes mecanismos de sinalização, levam a um aumento de receptores na membrana pós-sináptica. Esse conceito de plasticidade sináptica tem sido fortemente relacionado com a formação de memórias e outras vias, sugerindo que a memória é o processo-chave para compreensão do fortalecimento das vias neuronais (Bear, 2008).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar possíveis alterações da S100B, em diferentes fluidos (soro e LCR), em resposta a estímulos inflamatórios periféricos, intra-peritoniais (i.p.), ou centrais, intra-cerebroventriculares (i.c.v.).

Como objetivo específico, avaliamos a persistência de um forte traço de memória após sete dias de um único estímulo inflamatório central.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados sessenta ratos Wistar (90 dias de idade, pesando entre 200 e 300 g) provenientes do biotério central da UFRGS mantidos sob controle de luminosidade e temperatura (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro em constantes  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e comida e águas *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o manual do National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23).

Os ratos foram divididos em 10 grupos: Controle ip 0,5 h (N = 5), LPS ip 0,5 h (N = 5), Controle ip 24 h (N = 5), LPS ip 24 h (N = 5), Controle icv 0,5 h (N = 5), LPS icv 0,5 h (N = 5), Controle icv 24 h (N = 5), LPS icv 24 h (N = 5), Controle icv 7 dias (N = 10) e LPS icv 7 dias (N = 10). Nos grupos de 0,5 e 24 horas, foi realizado o tratamento e posterior coleta de LCR e sangue, para obtenção de soro. No grupo de sete dias, anterior ao tratamento os animais foram condicionados aversivamente ao contexto para posterior avaliação de parâmetros cognitivos e coleta de LCR e sangue.

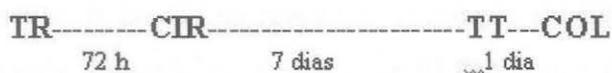
#### 3.2 Procedimento cirúrgico

Os ratos foram anestesiados com cetamina/xilazina (75 e 10 mg/Kg i.p. respectivamente) e a cirurgia realizada em aparelho estereotáxico. Foi realizada uma incisão sagital no escalpo e o furo bilateral na região antero-posterior e latero-lateral ventricular até a dura mater. Os ventrículos laterais foram alcançados utilizando as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior do bregma; 1,5 mm lateral a sutura sagital e 3,6 mm dorso-ventral a partir da dura mater. Foi realizada uma única infusão em cada ventrículo, de 5  $\mu\text{L}$  de PBS (controle) ou LPS (2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos a  $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Aqueles utilizados para análise comportamental foram testados uma semana após o procedimento cirúrgico, enquanto os outros foram anestesiados e submetidos à coleta de amostras nos tempos 0,5 e 24 h, sendo imediatamente sacrificados após as coletas.

#### 3.3 Avaliação cognitiva

O condicionamento aversivo ao contexto, foi a tarefa comportamental escolhida pelo seu alto grau de aversividade. O seguinte protocolo foi utilizado: no dia do treino os animais foram colocados em uma caixa por 4 minutos, após 3 minutos foram

aplicados dois choques de 0,7 mA e mais outros dois após 30 segundos, sendo retirados da caixa quando totalizados 4 minutos. Setenta e duas horas após o treino, foram realizadas o procedimento cirúrgico e infusão do LPS. No dia do teste, sete dias após a cirurgia, os animais foram recolocados na caixa e realizou-se a quantificação do comportamento de congelamento do animal.



**Figura 3** Esquema de procedimentos com o grupo de sete dias. TR = dia do treino, CIR = dia da cirurgia, TT = Dia do teste e COL = dia de coleta das amostras

### 3.4 Lipopolissacarídeo

O LPS utilizado foi o lipopolissacarídeo obtido de *Escherichia coli* sorotipo 055:B5 (L2880) comprado da Sigma e diluído em PBS. Quando injetado i.c.v., 25 µg foram aplicados no animal numa concentração de 2,5µg/µL; quando injetado i.p., o tratamento foi de 250 µg/Kg.

### 3.5 Coleta de amostras

O LCR foi obtido por punção da cisterna magna utilizando uma seringa de insulina e congelado para posterior análise a -20°C. A coleta sanguínea foi realizada por punção cardíaca e o sangue mantido em temperatura ambiente para posterior ( de 5 a 10 min) centrifugação (5000 g X 10 minutos). O soro foi coletado do sobrenadante e congelado para posterior análise a -20 °C.

### 3.6 ELISA para S100B

As placas de ELISA foram preparadas previamente com 100 µL do primeiro anticorpo (monoclonal anti-S100B SH-B1, S2532) na diluição de 1/1000 (em 50 mM de Tampão carbonato-bicarbonato) e mantidas a 4°C *overnight*. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL com tampão de lavagem (0,1% ovoalbumina em PBS contendo 0,05% Tween-20). A solução de bloqueio (2% ovoalbumina, 150 µL) foi incubada por 1 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µL de Tampão Tris 50 mM (pH 8,6) contendo 0,2 mM CaCl<sub>2</sub> mais 50 µl de amostra (diluída em PBS contendo 0,2% ovoalbumina) ou curva padrão (de 0,0019 to 1 ng/mL) foram incubados por 2 h a 37 °C em placas de aquecimento. As placas foram novamente lavadas e então aplicou-

se 100  $\mu$ L do segundo anticorpo (policlonal anti-S100B, diluído 1/5000 em 0,5% ovoalbumina e 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), para incubação por 30 min a 37 °C. As placas foram lavadas novamente e, então, 100  $\mu$ L do terceiro anticorpo (anti-rabbit conjugado a peroxidase diluído 1/5000 em 0,5% ovoalbumina) foi aplicado para incubação por 30 min a 37 °C. Novamente as placas foram lavadas com solução de lavagem e uma última com PBS. Então, 200  $\mu$ L de uma solução de OPD foi incubado no escuro por 30 min à temperatura ambiente. A parada da reação de revelação foi feita com 50  $\mu$ L de HCl 3 M e a leitura realizada em um leitor de placas de ELISA com o filtro de 492 nm.

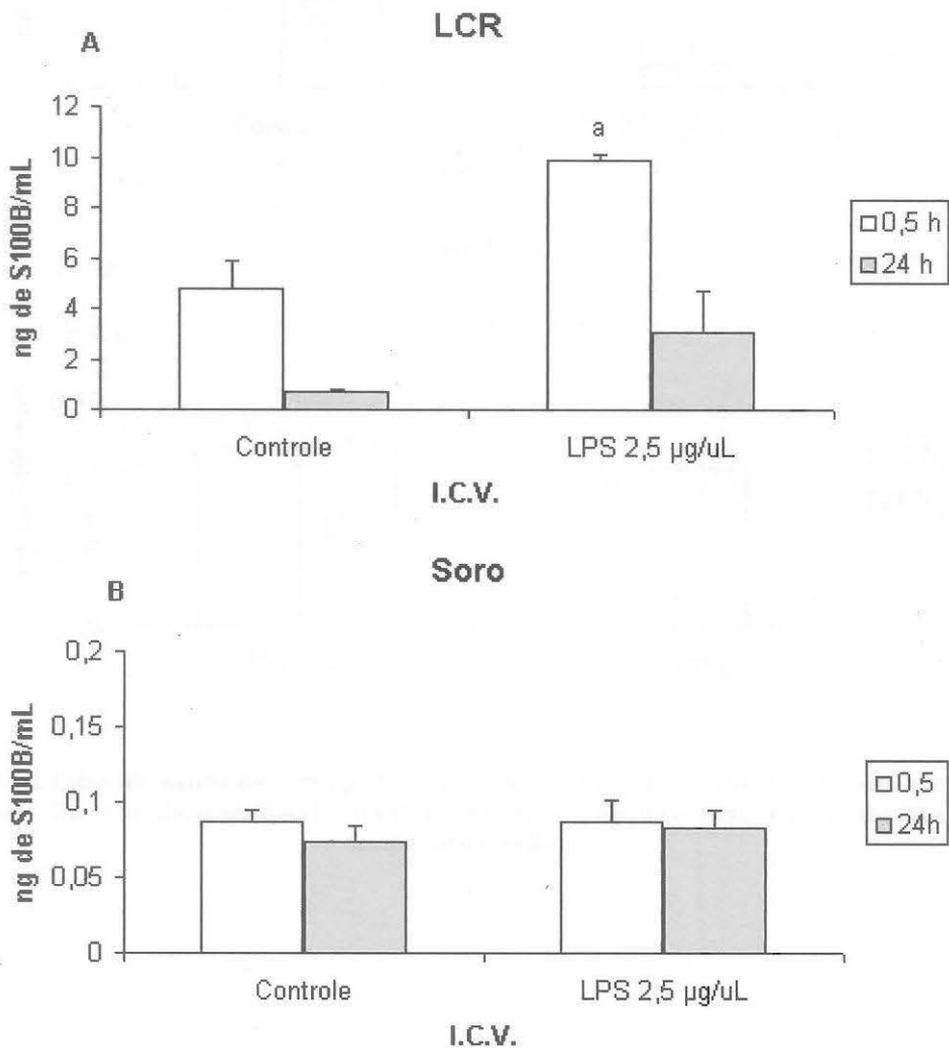
### **3.7 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SPSS 8,0 for Windows e os testes realizados foram; teste t independente e ANOVA de uma via com *pos hoc* de Tukey.

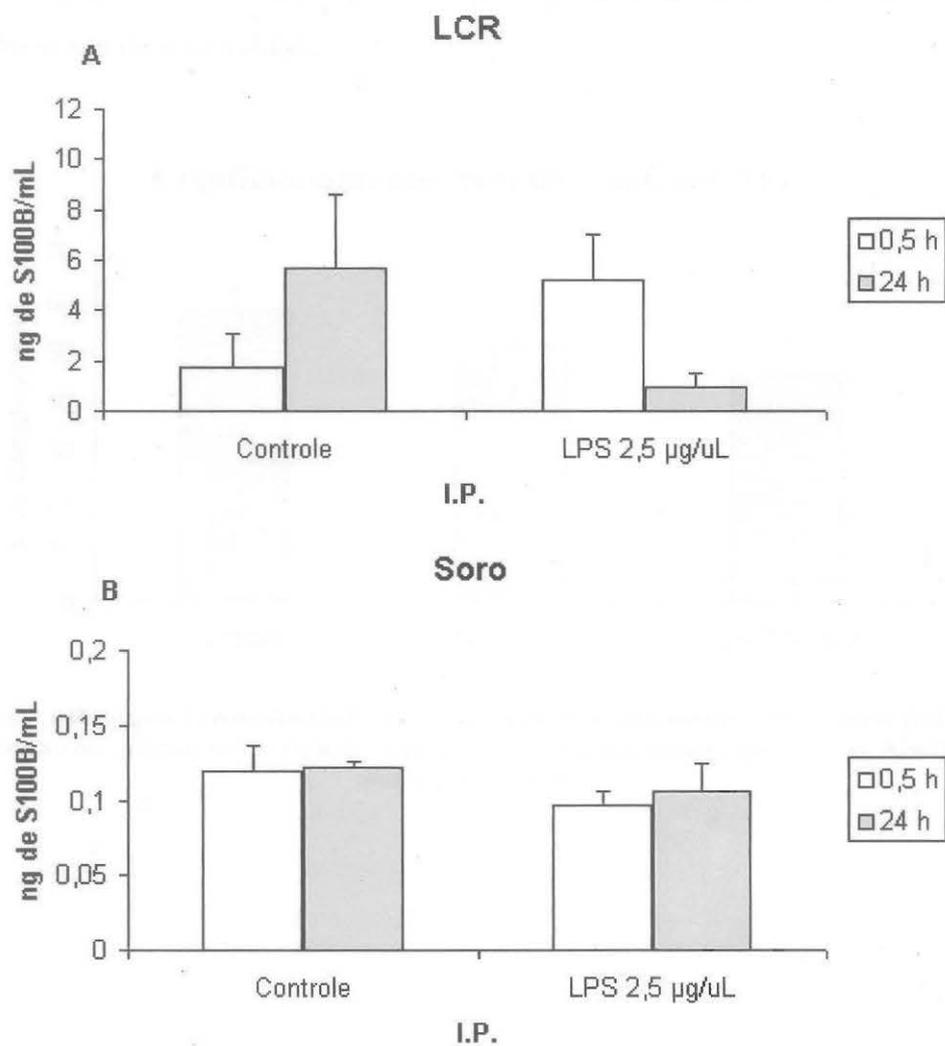
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Tratamento Agudo com LPS

O tratamento agudo com LPS em 0,5 e 24 h tanto quando administrado i.p. quanto i.c.v. na demonstrou alterações nos níveis séricos da S100B. Porém, em 0,5 h quando administrado i.c.v., o LPS foi capaz elevar os níveis da proteína no LCR ( $p = 0,009$ ). Quando comparado às vias de administração o LPS i.c.v. em 0,5 h demonstrou uma tendência ao aumento em relação à administração i.p. ( $p = 0,062$ ). Em via i.p. o LPS não causou alterações nos níveis séricos e no LCR da S100B.



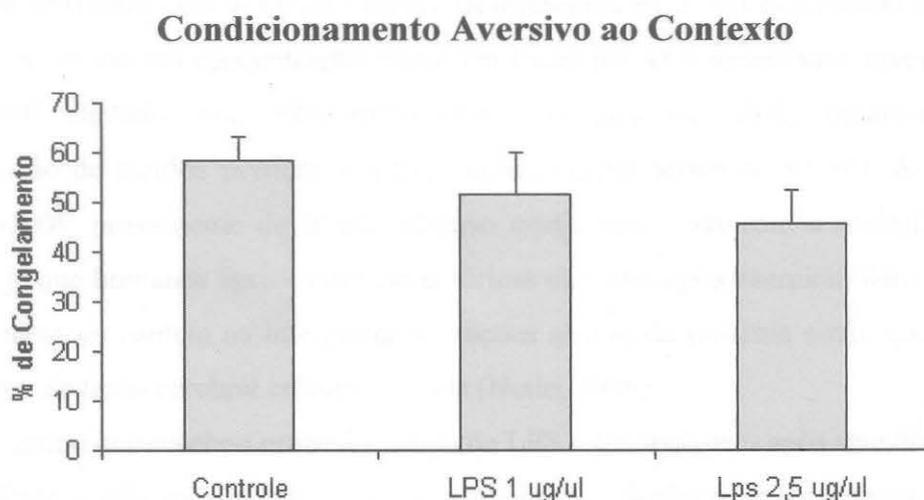
**Figura 4.1.1 Estímulo agudo de LPS i.c.v.** Em A os níveis de S100B no LCR em 0,5 e 24 h. a= diferença entre controle e LPS 2,5 µg/µL ( $p = 0,009$ ), análise por teste T independente. Em B os níveis séricos de S100B sem alterações estatisticamente significativas nos dois tempos mensurados.



**Figura 4.1.2 Estímulo agudo de LPS i.p.** A os níveis de S100B no LCR em 0,5 e 24 h sem alterações estatísticas. Em B os níveis séricos de S100B sem alterações estatisticamente significativas nos dois tempos mensurados.

## 4.2 Análise comportamental

Não foi observado prejuízo na permanência da memória em ambos os grupos tratados com LPS (1ug/ul e 2,5 ug/ml) em relação ao seu controle com PBS (ANOVA de uma via  $p = 0,463$ ). Esses resultados sugerem que o estímulo inflamatório induzido por LPS, nessas doses, não seja suficiente para apagar o traço de uma memória com esse componente de aversividade.



**Figura 4.2.1 Resposta de congelamento na tarefa de medo condicionado.** Porcentagem do tempo congelamento dos animais no dia do teste. Sem alterações estatisticamente significativas. ANOVA de uma via ( $p = 0,463$ )

## 5 DISCUSSÃO

O estímulo inflamatório central causou um aumento da S100B no LCR em 0,5 h, não observado no soro. O que sugere que esse aumento se deve principalmente pela secreção do astrócitos. Quando a endotoxina foi administrada perifericamente, 0,5 e 24 h após, não foram encontradas alterações tanto nos níveis séricos quanto no LCR da S100B, demonstrando que o estímulo foi incapaz de induzir a secreção periférica da citocina. Esses dados acordam com outras observações da compartimentalização da produção de S100B central ou periférica e os diferentes estímulos que podem contribuir para variações em sua concentração. Ratos em jejum por 48 h apresentam níveis séricos de S100B elevado, mas não apresentam alterações no LCR, demonstrando a contribuição de tecidos periféricos para a concentração sérica de S100B. Acredita-se que a S100B proveniente de tecido adiposo esteja envolvida com a mobilização de lipídios já que humanos apresentam taxas séricas elevadas após exercício físico. Assim, é importante ter cautela ao interpretar alterações séricas da proteína ainda que ela seja marcadora de lesão cerebral crônica e aguda (Netto, 2006).

O grupo que recebeu estímulo agudo de LPS e foi analisado após sete dias (dados incompletos e não mostrados) sugerem um possível declínio na concentração dessa proteína no LCR ao longo do tempo. No soro destes animais também não foi encontrado alterações estatisticamente significativas, porém ainda não foi realizado o grupo com administração i.p. Outros estudos do nosso grupo demonstram que a secreção de S100B, tanto em cultura primária de astrócitos quanto em linhagem de glioma C6 quando estimuladas com IL-1 $\beta$ , tende a diminuir ao longo do tempo (Fraga, 2009). Isso sugere que a secreção de S100B é um processo inicial e transitório da resposta imune inata.

Diante disso, mais estudos são necessários para elucidar uma possível diferença nos mecanismos de secreção da S100B, quando estimulados de forma aguda por LPS, entre astrócitos e células periféricas que secretem S100B (principalmente adipócitos).

Na tarefa comportamental não encontramos o resultado esperado de acordo com outros resultados da literatura. O LPS foi infundido 72 h após o treino de forma que o LPS não atuou dentro da janela temporal dos mecanismos moleculares da consolidação da memória. Assim o que encontramos foi a ausência de efeito do LPS sobre a evocação de um forte traço de memória ainda que a droga tenha alto potencial neurodegenerativo. A S100B em baixas concentrações quando injetada no hipocampo pós-treino exerce um efeito facilitatório sobre a consolidação da memória (Melo e Souza, 2000) e outros

estudos demonstram seu envolvimento na modulação da plasticidade sináptica (Nishiyama, 2001) e fortalecimento das oscilações gama induzidas por ácido kaínico (Sakataki, 2008). Um dia após o teste comportamental os níveis encontrados no LCR são menores (não mostrados). Embora não se possa inferir que o efeito encontrado seja devido ação da S100B, pois outras diversas citocinas participam da sinalização induzida pelo LPS, é importante lembrar que moléculas como estas exercem ações ambíguas e variações em suas concentrações são chave para compreendermos melhor essa dualidade entre trófico/tóxico.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bear, MF, Connors, BW, Paradiso, MA. (2008) Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso – 3ª Edição. Capítulos: 1, 2 e 24

Donato, R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy research and technique*. 60:540-551

Gonçalves, CA, Leite, MC, Nardin, P. (2008) Biological and methodological of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. 41:755-763

Griffin, WST (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 83 470S-4S

Holz, RW. (2004) Intercellular signaling em: *Basic neurochemistry* - Siegel

Jack, CS, Arbour, N, Manusow, J, Montgrain, V, Blain, M, McCrea, E, Shapiro, A, Antel, JP (2005) *The journal of immunology*. 175:4320-4330

Maldonado, H, Variaciones sobre la memoria: desde el cangrejo al hombre. SAN – conference Ranwell Caputto – I Neurolatam. Búzios, RJ, Brasil 2008

Melo e Souza, T, Rohden, A, Meinhardt, M, Gonçalves, CA, Quillfeldt, JA (2000) S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for inhibitory avoidance task but not for the open field habituation. *Physiol. Behavior*. 71:29-33

Netto, C, Conte, S, Leite MC, Pires C, Martins, TL, Vidal, P, Benfato, M, Giugliani, R, Gonçalves, CA (2006) Serum S100B Protein Is Increased in Fasting Rats – *Archives of medical research*

Perry, VH, Newman, TA, Cunningham, C, The impact of systemic infection on progression of neurodegenerative disease. *Nature reviews neuroscience*. 4:103-113

Przedborski, S (2008) *Neuroimmune pharmacology*.

Raine, C (2004) *Cellular neurochemistry and neural membranes*. Em: *Basic neurochemistry - Siegel*

Rosi, S, Ramirez-amaya, V, Hauss-wegrzyniak, B, Wenk, GL (2004) Chronic brain inflammation leads to a decline in hippocampal NMDA-R1 receptors. *Journal of neuroinflammation*

Sakatani, S, Seto-Ohshima, A, Yamamoto, Y, Yamamoto, H, Itohara, S, Hirase, H (2008) Neural-Activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations *In vivo*. *The journal of neuroscience* 28(43):10928-10936

Souza, DF, Leite, MC, Quincozes-Santos, A, Nardin, P, Tortorelli, LS, Rigo, MM, Gottfried, C, Leal, RB, Gonçalves, CA (2009)

Tyagi, E, Agrawal, R, Nath, C, Shukla, R. (2007) Effect of anti-dementia drugs on LPS induced neuroinflammation in mice. *Life sciences*. 80:1977-1983

Quarles, RH, Macklin, WB, Morell, P. (2004) *Myelin formation, structure and biochemistry*. Em: *Basic neurochemistry - Siegel*

Wang, DD, Bordey, A. (2008) The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology* 86:342-367.