

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**IMUNOQUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA S100 β EM LÍQUOR,
SORO, E TECIDO CEREBRAL POR UM ENSAIO DE
QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

Luis Valmor Cruz Portela

**Orientador : Dr. Diogo Onofre de Souza
Co-orientador : Dr. Carlos Alberto Gonçalves**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas :
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul , para obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica .**

**PORTO ALEGRE
1999**

AGRADECIMENTOS

Acredito que não haja palavra capaz de expressar a gratidão que sinto pelos orientadores deste trabalho: Diogo Souza e Carlos Alberto Gonçalves (CA), mesmo assim vou tentar: “Toneladas de obrigado”.

Ao Adriano Bretanha Lopes Tort pela amizade, convivência científica e colaboração na execução deste trabalho.

Ao Dr Eurico Camargo Neto, do Laboratório Nobel-RIE, pela inestimável contribuição técnica e científica no desenvolvimento deste trabalho. Aos funcionários do Laboratório Nobel-RIE.

Ao meu amigo de fé, meu irmão camarada Diogo Lara obrigado pela colaboração e sugestões.

Um ultra obrigado ao Sarkis e a Deusa.

Ao Secretário e ao Diretor de Saúde da Prefeitura Municipal de Novo Hamburgo Sr. Mário César e Luis Carlos Petri.

Ao Sr. Prefeito Municipal de Novo Hamburgo.

Um super obrigado aos farmacêuticos bioquímicos Arno Neuhof, Vera Silveira, Cláudia Seibel e Matilde Falkenback e aos demais colegas e funcionários do laboratório Municipal de Novo Hamburgo.

A minha mãe Adir Cruz Portela e aos irmãos Osório, Nei, Barbel e alemão e ao meu pai Setembrino Portela.

Um agradecimento muito especial ao Sr. Adelino Cruz, Bernadete, Rafael e Luciano, também a tia Zu, Ana e Maria Luiza.

A Lúcia do Canto Vinadé pela sua amizade.

Aos colegas do laboratório 26 Carla Tasca, Carina Boeck, Lúcia Martini, André Schmidt e Marcos Frizzo.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pela sua dedicação ao ensino e pesquisa.

Às entidades financiadoras, PRONEX e PIBIC-CNPq.

Dedico este trabalho para a Juliana e Elsa

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
LISTA DE	
ABREVIATURAS.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1. Histórico da Família S100.....	1
1.2. Propriedades Estruturais.....	4
1.3. Propriedades Funcionais.....	7
1.3.1. Propriedades Funcionais Intracelulares.....	8
1.3.1.1. Ciclo Celular.....	8
1.3.1.2. Citoesqueleto.....	9
1.3.1.3. Enzimas.....	10
1.3.2. Propriedades Funcionais Extracelulares.....	11
1.4. Aplicações Clínicas.....	12
1.5. Metodologias para Quantificação da S100 β	16
1.5.1. Ensaio Imunoluminométrico.....	17
1.6. Objetivos.....	19
2. Material e Métodos.....	19
2.1. Animais.....	19
2.2. Material.....	19
2.3. Métodos.....	20

2.3.1. Obtenção das Amostras.....	20
2.3.1.1. Líquido Céfalo Raquidiano (LCR).....	20
2.3.1.2. Soro Sanguíneo.....	20
2.3.1.3. Tecido Cerebral.....	21
2.3.2. Imunoquantificação da Proteína S100 β	21
2.3.2.1. Princípio da reação.....	21
2.3.2.2. Efeito do Cálcio, EGTA e Citrato na imunorreatividade dos anticorpos.....	23
2.3.3. Dosagem de Proteínas Totais.....	24
2.3.4. Análise dos Resultados.....	24
3. Resultados.....	24
3.1. Padronização da Técnica de Quimioluminescência.....	24
3.1.1. Curva Padrão.....	24
3.1.2. Efeito do Cálcio, Citrato e EGTA no Imunoensaio.....	28
3.2. Imunoquantificação da Proteína S100 β em LCR.....	29
3.3. Imunoquantificação da Proteína S100 β em Soro Sanguíneo.....	31
3.4. Imunoquantificação da Proteína S100 β em Tecido Cerebral.....	33
4. Discussão.....	36
4.1. O Método Imunoluminométrico da Sangtec Medical.....	36
4.2. A proteína S100 β em LCR de Ratos.....	38
4.3. A proteína S100 β em Soro de Ratos.....	39
4.4. A proteína S100 β em Tecido Cerebral de Ratos.....	40
4.5. A Influência do Cálcio, EGTA e Citrato na Reação de Imunoquantificação da Proteína S100 β	41
5. Aplicação Clínica em Humanos.....	43
5.1. Aumento da Proteína S100 β no Soro de Pacientes com Mielopatia Associada ao Vírus HTLV-I.....	43
5.2. A Proteína S100 β como Marcadora Bioquímica de Síndrome de Down em triagem neonatal.....	46

6. Conclusões.....	49
7. Referências.....	51

RESUMO

A proteína S100 β pertence a uma família de proteínas ligantes de cálcio ácidas e de baixo peso molecular, e tem sido implicada no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Esta proteína tem atividade neurotrófica e gliotrófica e está localizada principalmente no Sistema Nervoso Central em astrócitos e células de Schwann, mas pode ser detectada em menores concentrações em outras células, como melanócitos e adipócitos. Relatos sugerem que a S100 β está envolvida nos mecanismos da neuropatologia principalmente na doença de Alzheimer e Síndrome de Down, onde astrócitos reativos expressam altos níveis desta proteína.

Neste trabalho foi padronizado uma técnica imunoluminométrica muito sensível (0,02 μ g/L) que utiliza um anticorpo marcado com o isoluminol como molécula “tracer”. A emissão de luz na fase final da reação é diretamente proporcional a concentração de proteína S100 β das amostras. Na fase inicial do trabalho utilizamos amostras biológicas (soro, LCR e tecido cerebral) de ratos e também realizamos alguns ensaios metodológicos para se avaliar a sensibilidade, especificidade e a reprodutibilidade do imunoensaio. Demonstramos que o método empregado para se coletar sangue e LCR de ratos influencia na quantificação da proteína S100 β .

Finalmente, utilizamos este imunoensaio em investigações clínicas. Observamos que níveis desta proteína em pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I estava aumentada no soro, mas não em LCR. Também quantificamos a proteína em fluido amniótico, sendo que nas gestantes com fetos diagnosticados com Síndrome de Down os níveis foram mais elevados.

ABSTRACT

S100 β protein belongs to a family of acidic low molecular calcium binding proteins and it has been implicated in the development and maintenance of the nervous system. This protein has neurotrophic and gliotrophic activity and is found mainly in the CNS in astrocytes and Schwann cells, but it can be detected at lower levels in other cells, such as melanocytes and adipocytes. S100 β has been postulated to play a role in neuropathology of Alzheimer's disease and Down's syndrome, where reactive astrocytes express higher levels of this protein.

In this work we standardized a highly sensitive (0,02 μ g/L) immunoluminometric assay which uses a isoluminol-labelled antibody as a tracer. The light emission at the end of the final reaction is directly proportional to the concentration of S100 β i the samples. Firstly, we worked with biological samples (serum, CSF and brain tissue) of rats and also studied the sensitivity, specificity and reproducibility of the immunassay. We observed that the method of blood and CSF collection influenced the levels of S100 β protein in the samples.

Finally, we used this assay in clinical investigation. We found higher levels of this protein in serum, but not in the CSF, of patients with HTLV-1 associated myelopathy. We also detected S100 β in amniotic fluid, which was increased where Down's syndrome had been diagnosed.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. Modelo estrutural das mudanças conformacionais e modo de reconhecimento da proteína efetora (alvo) pela proteína S100B ligação a íons cálcio.....	6
FIGURA 2. Perfil típico de uma reação a , vida curta e b , vida longa de quimioluminescência.....	18
FIGURA 3. Representação esquemática da reação.....	22
FIGURA 4. Representação gráfica de uma curva padrão da proteína S100 β	26
FIGURA 5. Imunoquantificação da proteína S100 β em LCR de ratos.....	30
FIGURA 6. A concentração de S100 β em soro sanguíneo depende do método de coleta das amostras.....	32
FIGURA 7. Concentração de S100 β em três áreas cerebrais.....	34
FIGURA 8a. Níveis de S100 β em LCR em pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I.....	45
FIGURA 8b. Níveis de S100 β no soro de pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I.....	45
FIGURA 9. Níveis de S100 β no fluido amniótico de gestantes em cujos fetos foi diagnosticada Síndrome de Down.....	48

TABELA 1. Resumo das propriedades descritas dos membros da família de proteínas S100.....	3
TABELA 2. Valores obtidos das leituras dos padrões e controles.....	25
TABELA 3. Limite mínimo de detecção do ensaio imunoluminométrico.....	27
TABELA 4. Efeito do cálcio, EGTA e citrato na imunoquantificação da proteína S100 β por quimioluminescência.....	28
TABELA 5. Imunoquantificação de S100 β e níveis de fosforilação de GFAP em fatias de cérebro de ratos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barreira hemato encefálica
Ca ²⁺	Íon cálcio
EGTA	Ácido etileno glicol-tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FI	Filamentos intermediários
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
K ⁺	Íon potássio
LIA	Luminescence immunoassay
LCR	Líquido céfalo raquidiano
NaCl	Cloreto de sódio
NOSi	Enzima óxido nítrico sintase induzível
NEF	Fator de extensão de neuritos
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio e fosfolípidios
PKCaM II	Proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PBS	Tampão fosfato em solução salina
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
RIE	Radioimunoensaio
RLU	Relative light unit
SNC	Sistema Nervoso Central
SPC	Sintomas pós concussionais
S100β	Monômero de proteína S100β
S100B	Dímero da proteína S100β
T 21	Trissomia do cromossomo 21
Zn ²⁺	Íon zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
LISTA DE	
ABREVIATURAS.....	viii
2. Introdução.....	1
2.1. Histórico da Família S100.....	1
2.2. Propriedades Estruturais.....	4
2.3. Propriedades Funcionais.....	7
2.3.1. Propriedades Funcionais Intracelulares.....	8
2.3.1.1. Ciclo Celular.....	8
2.3.1.2. Citoesqueleto.....	9
2.3.1.3. Enzimas.....	10
2.3.2. Propriedades Funcionais Extracelulares.....	11
2.4. Aplicações Clínicas.....	12
2.5. Metodologias para Quantificação da S100 β	16
2.5.1. Ensaio Imunoluminométrico.....	17
2.6. Objetivos.....	19
5. Material e Métodos.....	19
5.1. Animais.....	19
5.2. Material.....	19
5.3. Métodos.....	20

5.3.1. Obtenção das Amostras.....	20
2.3.1.1. Líquido Céfalo Raquidiano (LCR).....	20
2.3.1.2. Soro Sanguíneo.....	20
2.3.1.3. Tecido Cerebral.....	21
5.3.2. Imunoquantificação da Proteína S100 β	21
2.3.2.1. Princípio da reação.....	21
2.3.2.2. Efeito do Cálcio, EGTA e Citrato na imunorreatividade dos anticorpos.....	23
5.3.3. Dosagem de Proteínas Totais.....	24
5.3.4. Análise dos Resultados.....	24
6. Resultados.....	24
6.1. Padronização da Técnica de Quimioluminescência.....	24
6.1.1. Curva Padrão.....	24
6.1.2. Efeito do Cálcio, Citrato e EGTA no Imunoensaio.....	28
6.2. Imunoquantificação da Proteína S100 β em LCR.....	29
6.3. Imunoquantificação da Proteína S100 β em Soro Sanguíneo.....	31
6.4. Imunoquantificação da Proteína S100 β em Tecido Cerebral.....	33
7. Discussão.....	36
7.1. O Método Imunoluminométrico da Sangtec Medical.....	36
7.2. A proteína S100 β em LCR de Ratos.....	38
7.3. A proteína S100 β em Soro de Ratos.....	39
7.4. A proteína S100 β em Tecido Cerebral de Ratos.....	40
7.5. A Influência do Cálcio, EGTA e Citrato na Reação de Imunoquantificação da Proteína S100 β	41
5. Aplicação Clínica em Humanos.....	43
5.1. Aumento da Proteína S100 β no Soro de Pacientes com Mielopatia Associada ao Vírus HTLV-I.....	43
5.2. A Proteína S100 β como Marcadora Bioquímica de Síndrome de Down em triagem neonatal.....	46

7. Conclusões..... 49

7. Referências..... 51

RESUMO

A proteína S100 β pertence a uma família de proteínas ligantes de cálcio ácidas e de baixo peso molecular, e tem sido implicada no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Esta proteína tem atividade neurotrófica e gliotrófica e está localizada principalmente no Sistema Nervoso Central em astrócitos e células de Schwann, mas pode ser detectada em menores concentrações em outras células, como melanócitos e adipócitos. Relatos sugerem que a S100 β está envolvida nos mecanismos da neuropatologia principalmente na doença de Alzheimer e Síndrome de Down, onde astrócitos reativos expressam altos níveis desta proteína.

Neste trabalho foi padronizado uma técnica imunoluminométrica muito sensível (0,02 μ g/L) que utiliza um anticorpo marcado com o isoluminol como molécula “tracer”. A emissão de luz na fase final da reação é diretamente proporcional a concentração de proteína S100 β das amostras. Na fase inicial do trabalho utilizamos amostras biológicas (soro, LCR e tecido cerebral) de ratos e também realizamos alguns ensaios metodológicos para se avaliar a sensibilidade, especificidade e a reprodutibilidade do imunoensaio. Demonstramos que o método empregado para se coletar sangue e LCR de ratos influencia na quantificação da proteína S100 β .

Finalmente, utilizamos este imunoensaio em investigações clínicas. Observamos que níveis desta proteína em pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I estava aumentada no soro, mas não em LCR. Também quantificamos a proteína em fluido amniótico, sendo que nas gestantes com fetos diagnosticados com Síndrome de Down os níveis foram mais elevados.

ABSTRACT

S100 β protein belongs to a family of acidic low molecular calcium binding proteins and it has been implicated in the development and maintenance of the nervous system. This protein has neurotrophic and gliotrophic activity and is found mainly in the CNS in astrocytes and Schwann cells, but it can be detected at lower levels in other cells, such as melanocytes and adipocytes. S100 β has been postulated to play a role in neuropathology of Alzheimer's disease and Down's syndrome, where reactive astrocytes express higher levels of this protein.

In this work we standardized a highly sensitive (0,02 μ g/L) immunoluminometric assay which uses a isoluminol-labelled antibody as a tracer. The light emission at the end of the final reaction is directly proportional to the concentration of S100 β i the samples. Firstly, we worked with biological samples (serum, CSF and brain tissue) of rats and also studied the sensitivity, specificity and reproducibility of the immunassay. We observed that the method of blood and CSF collection influenced the levels of S100 β protein in the samples.

Finally, we used this assay in clinical investigation. We found higher levels of this protein in serum, but not in the CSF, of patients with HTLV-1 associated myelopathy. We also detected S100 β in amniotic fluid, which was increased where Down's syndrome had been diagnosed.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1. Modelo estrutural das mudanças conformacionais e modo de reconhecimento da proteína efetora (alvo) pela proteína S100B ligação a íons cálcio.....	6
FIGURA 2. Perfil típico de uma reação a , vida curta e b , vida longa de quimioluminescência.....	18
FIGURA 3. Representação esquemática da reação.....	22
FIGURA 4. Representação gráfica de uma curva padrão da proteína S100 β	26
FIGURA 5. Imunoquantificação da proteína S100 β em LCR de ratos.....	30
FIGURA 6. A concentração de S100 β em soro sanguíneo depende do método de coleta das amostras.....	32
FIGURA 7. Concentração de S100 β em três áreas cerebrais.....	34
FIGURA 8a. Níveis de S100 β em LCR em pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I.....	45
FIGURA 8b. Níveis de S100 β no soro de pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I.....	45
FIGURA 9. Níveis de S100 β no fluido amniótico de gestantes em cujos fetos foi diagnosticada Síndrome de Down.....	48

TABELA 1. Resumo das propriedades descritas dos membros da família de proteínas S100.....	3
TABELA 2. Valores obtidos das leituras dos padrões e controles.....	25
TABELA 3. Limite mínimo de detecção do ensaio imunoluminométrico.....	27
TABELA 4. Efeito do cálcio, EGTA e citrato na imunoquantificação da proteína S100 β por quimioluminescência.....	28
TABELA 5. Imunoquantificação de S100 β e níveis de fosforilação de GFAP em fatias de cérebro de ratos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barreira hemato encefálica
Ca ²⁺	Íon cálcio
EGTA	Ácido etileno glicol-tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FI	Filamentos intermediários
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
K ⁺	Íon potássio
LIA	Luminescence immunoassay
LCR	Líquido céfalo raquidiano
NaCl	Cloreto de sódio
NOSi	Enzima óxido nítrico sintase induzível
NEF	Fator de extensão de neuritos
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio e fosfolípidios
PKCaM II	Proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PBS	Tampão fosfato em solução salina
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
RIE	Radioimunoensaio
RLU	Relative light unit
SNC	Sistema Nervoso Central
SPC	Sintomas pós concussionais
S100β	Monômero de proteína S100β
S100B	Dímero da proteína S100β
T 21	Trissomia do cromossomo 21
Zn ²⁺	Íon zinco

1.INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DA FAMÍLIA S100

A proteína S100 foi descrita primeiramente por Moore (1965), durante um experimento de mapeamento protéico de extratos solúveis de cérebro e fígado na tentativa de encontrar proteínas exclusivas ou únicas do sistema nervoso. O mapeamento foi feito por cromatografia em colunas de troca iônica seguido de eletroforese em gel de amido. Uma banda de proteína em especial chamou a atenção por mover-se mais rapidamente na eletroforese em gel de amido, sem sobreposição de outras proteínas, por estar presente nos extratos de cérebro, mas ausente nos de fígado. Devido à solubilidade parcial da proteína em solução de sulfato de amônio 100% saturado e pH neutro foi denominada “S100”. Moore sugeriu ser uma proteína neuronal e que não fazia parte da bainha de mielina.

Estudos posteriores demonstraram que esta fração S100 de tecido cerebral continha predominantemente uma mistura de dois polipeptídeos, α e β , constituindo as três isoformas da S100: Ao (dímero $\alpha - \alpha$), A1 (dímero $\alpha - \beta$) e B (dímero $\beta - \beta$). A semelhança estrutural e a homologia na sequência de aminoácidos sugere uma relação de proximidade no processo evolutivo destas subunidades (Isobe & Okuyama, 1981; Isobe et al, 1981).

A S100B é uma proteína ligante de cálcio presente em altas concentrações nos astrócitos. Foi também imunodetectada em células de Schwann, melanócitos, adipócitos, condrócitos e células epidermais de Langerhans. S100Ao é encontrada principalmente no músculo estriado, coração e rins mas também em menor quantidade nos neurônios. A S100A1 foi imunodetectada em células gliais. No cérebro de humanos a S100 β constitui 96% do total das proteínas S100 (Isobe et al, 1984; Jensen et al, 1985; Donato, 1991).

Em 1985, um fator neurotrófico presente em uma fração protéica ácida e termoestável de cérebro bovino, demonstrou intensa atividade promotora de extensão de neuritos (NEF), quando adicionado a um meio de cultura de neurônios corticais de pinto, na ausência de soro. A purificação e caracterização evidenciou que a composição de aminoácidos deste fator neurotrófico era idêntica à da proteína S100B de cérebro bovino (Kligman & Marshak, 1985).

Desde o isolamento e caracterização da S100A1 e S100 β , 17 proteínas já foram relatadas pertencerem a família S100, baseado na semelhança de suas propriedades estruturais e na homologia da sequência de aminoácidos (Schäfer & Heizmann, 1996). Alguns dos membros da família S100 são apresentados na **tabela 1**. Na atual nomenclatura a S100A1 corresponde à anteriormente denominada S100Ao.

TABELA I -Resumo das propriedades descritas dos membros da família de proteínas S100

Proteína	Localização celular nos tecidos de sintese	Proteínas alvo	Funções Sugeridas	Doença associada
S100A1(S100a) (pode formar homodímeros ou heterodímeros com S100B) ligante de Ca ⁺²	Citoplasma de neurônios, músculo estriados e cardíaco, rim.	Frutose-1,6-bifosfato aldolase, glicogênio fosforilase, adenilato ciclase, tubulina, GFAP.	Estimula a liberação de Ca ⁺² induzida por Ca ⁺² pelo retículo sarcoplasmático, inibição da polimerização de microtúbulos, inibição da fosforilação mediada por PKC.	Miocardopatias
S100A2 (S100L) ligante de Ca ⁺²	Citoplasma e núcleo de cels pulmonares e renais.			Câncer de mama
S100A3 (S100E) ligante de Ca ⁺² e Zn ⁺²				
S100A4 (CAPL) ligante de Ca ⁺²	Extracelularmente e no citoplasma de fibroblastos, cels mioepiteliais e tumorais	Tropomiosina não-muscular, p53, miosina não-muscular, cadeia pesada, MAP	Motilidade e invasão, polimerização de tubulina	Metástases
S100A5 (S100D)				
S100A6 (calciolina) (pode formar homodímeros) ligante de Ca ⁺² e Zn ⁺²	Citoplasma de fibroblasto e cels tumorais	Anexina II e anexina VI, anexina XI, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Estimulação da liberação de insulina dependente de Ca ⁺² , estimulação da secreção de prolactina, exocitose.	Melanoma
S100A7 (psoriasina) ligante de Ca ⁺²	Cels epiteliais			Psoríase
S100A8 (MRP8) (pode formar heterodímeros com S100A9) ligante de Ca ⁺²	Extracelularmente e citoplasma de granulócitos e monócitos	Filamentos intermediários (vimentina)	Inibição da caseína quinase, citoquina	Fibrose cística, inflamação
S100A9 (MRP14) ligante de Ca ⁺²	Extracelularmente e citoplasma de granulócito e monócito	Filamentos intermediários (vimentina)	Inibição da caseína quinase	Fibrose cística, inflamação
S100A10 (p11)	Citoplasma de fibroblasto	Anexina II	Exocitose e endocitose	
S100B (S100b) (pode formar homodímeros e heterodímeros com S100A1) ligante de Ca ⁺² e Zn ⁺²	Extracelularmente e citoplasma de cels gliais e de Schwann, melanócitos, condrócitos e adipócitos	Frutose-1,6-bifosfato aldolase, p53, calponina, tau, tubulina, caldesmon, neurocalcina, neuromodulina (GAP43), GFAP, capZ	Extensão neurítica, proliferação de cels do melanoma, estimula o fluxo de Ca ⁺² , inibição da fosforilação mediada por PKC, astrocitose, proliferação axonal, inibição da polimerização de microtúbulos	Doença de Alzheimer, síndrome de Down, marcador tumoral, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia
S100C (pode formar homodímeros) ligante de Ca ⁺²	Músculo liso e cardíaco	Anexina I		
S100P	Placenta			
Calgranulina C ligante de Ca ⁺² e Zn ⁺²	Citoplasma de granulócitos			
Calbindina 3 (calbindina D _{9k}) ligante de Ca ⁺²	Citoplasma de intestino		Função de transporte	
Profilaggrin ligante de Ca ⁺²	Células granulares da epiderme		Regulação da estrutura celular	
Trichohyalin	Células granulares da epiderme	Queratina	Regulação da estrutura celular	

Tabela de Schäfer & Heizmann, 1996

1.2. PROPRIEDADES ESTRUTURAIS

O íon cálcio atua como segundo mensageiro na transdução de sinais, e o aumento transitório de cálcio intracelular controla uma multiplicidade de processos celulares que incluem, por exemplo, contração, secreção, divisão e crescimento celular. O cálcio como segundo mensageiro, completa sua “missão” não transferindo carga ou ligando-se a lipídios, mas pela união a proteínas receptoras de cálcio. As proteínas ligantes de cálcio atuam como moléculas moduladoras (por exemplo CaM e S100 β) ou tamponantes de cálcio (por exemplo parvalbumina) (Kretsinger, 1980; Van Eldik & Zimmer, 1988; Zimmer et al, 1995).

Portanto, os níveis de cálcio intracelular, bem como sua sinalização, ou seus mecanismos de sinalização, são finamente controlados, pois algumas patologias como a doença de Alzheimer e neoplasias podem estar associadas à alteração dos níveis deste íon intracelularmente, bem como mudanças na expressão das proteínas ligantes de cálcio (Heizmann, 1992; Heizmann & Braun, 1992; Azmitia et al, 1992; Schäfer Heizmann, 1996).

Baseados nas suas propriedades estruturais as proteínas ligantes de cálcio podem ser divididas em três grupos: (a) aproximadamente 200 membros da superfamília Calmodulina-S100-Troponina C, que contêm domínios de alta afinidade do tipo EF-hand; (b) aquelas que possuem domínios ligantes de cálcio tipo Hemolisín-like; (c) família das Anexinas, que se ligam a fosfolipídios de membrana de maneira dependente de cálcio (Zimmer et al, 1995).

As proteínas S100 são estruturalmente relacionadas com a calmodulina, mas ao contrário desta que têm distribuição ubíqua, as S100 são imunodetectadas em grupos celulares específicos desenvolvendo funções específicas. Estas proteínas S100 no Sistema Nervoso Central (SNC) são um grupo de proteínas ligantes de cálcio de baixo peso molecular (10 - 20 kDa), de ponto isoelétrico entre 4 e 5, diferindo basicamente nas suas subunidades alfa e beta. (Isobe & Okuyama, 1978; Donato, 1986).

A subfamília S100 de proteínas possui uma característica comum aos outros membros da Superfamília Calmodulina-S100-Troponina C, que é a alça (“loop”) ligante

de cálcio altamente conservada e flanqueada por duas alfa hélices. Este “HELIX-LOOP-HELIX motif” é conhecido como “EF-hand” (Kretzinger & Nockolds, 1973).

Estudos das propriedades ligantes de cálcio da proteína S100 comprovaram que ela pode ligar 4 moles de Ca^+ /dímero de proteína em sítios específicos (Baudier & Gerard, 1986).

As proteínas S100 possuem dois distintos “EF-hand” por subunidade. O “EF-hand” no carbóxi terminal constituído por 12 aminoácidos possui 6 resíduos com capacidade para ligar cálcio e é descrito como sítio de ligação de alta afinidade, enquanto que o “EF-hand” no amino terminal é formado de 13-14 aminoácidos com 5 resíduos ligantes de cálcio, descrito como um sítio de baixa afinidade (Kretzinger et al, 1991).

A ligação do íon cálcio na proteína S100 induz mudanças conformacionais que levam à exposição de resíduos hidrofóbicos, que parecem ser os sítios de ligação das proteínas “alvo”, também denominadas proteínas efetoras. Esta interação resulta na alteração da atividade da proteína efetora e conseqüentemente uma resposta celular (Zimmer et al, 1995).

Portanto a ligação do cálcio na proteína S100 representa uma etapa muito importante na regulação da interação com a proteína efetora, e a afinidade desta ligação pode ser influenciada por fatores como pH e presença de cátions metálicos como Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ (Baudier & Gerard, 1986; Ogama et al, 1992). **Figura 1.**

A proteína S100B liga 8 íons Zn^{2+} por molécula com afinidade superior ao cálcio, e a presença de K^+ diminui a afinidade por estes dois íons. A alta afinidade pelo Zn^{2+} é explicada pelo alto conteúdo de resíduos de histidina presentes na subunidade β . Uma vez ligada às S100 o Zn^{2+} aumenta grandemente a afinidade destas proteínas pelo cálcio e diminui o antagonismo exercido pelo K^+ (Baudier et al, 1986; Ogama et al, 1992).

Na sequência de aminoácidos da S100 β um dos aspectos que chamam a atenção é: (a) duas cisteínas (posições 68 e 84) e (b) nenhum triptofânio. A implicação funcional da ausência de triptofânio não está bem determinada enquanto que as cisteínas são importantes na medida que formam ligações covalentes na proteína através de pontes dissulfeto que estabilizam sua conformação. A presença ou não das pontes dissulfeto é que indicaráo o estado de oxidação da proteína. (Mely & Gerard,1990).

Pontes dissulfeto em proteínas são encontradas principalmente no meio extracelular devido à presença de oxigênio e baixo conteúdo de glutathiona reduzida (GSH). Mesmo assim na proteína S100B ligações dissulfeto podem ser formadas intracelularmente. As formas oxidadas são geradas a partir de suas formas reduzidas quando a conformação da proteína é favorável; portanto, as formas oxidada e reduzida da proteína S100B podem coexistir (Mely & Gerard, 1988; Mely & Gerard, 1990).

Quando Kligman & Marshak (1985) demonstraram que S100B tinha atividade trófica promovendo a extensão de neuritos, notaram que na presença de agentes redutores a proteína migrava como uma única banda de 6500Da de peso, e que na ausência destes agentes a proteína apresentava bandas de diferentes pesos no gel de eletroforese. Observaram que a redução da proteína abolia a atividade trófica, o que indica que a atividade extensora de neuritos (NEF) está associada a forma dissulfeto da proteína S100B.

1.3. PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Apesar de ter sido descrita há mais de 30 anos, as funções biológicas das proteínas S100 ainda não foram totalmente identificadas e compreendidas; entretanto tem sido relatado que esta família apresenta atividades tanto intra como extracelulares. Embora detectada extracelularmente, a concentração intracelular é muito maior, o que sugere que neste compartimento elas funcionem como proteínas receptoras de cálcio. Dentro das células de acordo com experimentos “in vitro”, estas proteínas têm sido relacionadas a funções biológicas tais como: (a) regular fosforilação de proteínas constituintes do citoesqueleto como proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e proteínas associadas a microtúbulos; (b) modular a atividade de enzimas como ATPase, adenilato ciclase e aldolase; (c) modular o ciclo celular. Alguns destes efeitos são estritamente

cálcio dependentes, outros não. A S100B pode ser secretada e extracelularmente estimular a diferenciação neuronal e proliferação glial; entretanto os mecanismos que envolvem a secreção da S100B e ativação destes processos são totalmente desconhecidos (Donato, 1986; Zimmer & Van Eldik, 1987; Donato, 1991; Zimmer et al, 1995; Schäfer & Heizmann, 1996)

1.3.1. PROPRIEDADES FUNCIONAIS INTRACELULARES

1.3.1.1. CICLO CELULAR

O ciclo celular é composto por uma série de etapas que são reguladas positiva ou negativamente por vários fatores; entre os reguladores negativos está a proteína p53, cujo gen é considerado um inibidor oncogênico. A p53 é uma fosfoproteína citosólica que precisa ser translocada ao núcleo para ter atividade. Apresenta uma região C terminal que provavelmente seja responsável pela sua ligação ao DNA e formação de oligômeros estáveis. Estudos de fosforilação “in vitro” confirmaram a proteína p53 como substrato das isoformas de proteína quinase dependente de cálcio e fosfolipídio (PKC). A proteína S100B inibiu a fosforilação da p53 por PKC. Entretanto calmodulina não provocou nenhum efeito. É pouco provável que a inibição seja na própria PKC, mas sim consequência direta da interação com o sítio de fosforilação da p53. Outra ação importante dependente de cálcio da S100B sobre p53 é a inibição da oligomerização e a indução a desoligomerização, provavelmente pelo seqüestro de monômeros de p53. Portanto a S100B media de maneira dependente de cálcio a inibição da fosforilação e oligomerização pelos mesmos processos básicos, isto é, ligação ao C terminal da proteína p53 bloqueando o acesso ao sítio de fosforilação pela PKC e prevenindo as interações entre monômeros de p53 (Baudier et al, 1992). Wilder et al (1998), em outro estudo utilizando um peptídeo sintético da proteína p53, confirmaram a capacidade da proteína S100B inibir de maneira cálcio dependente a fosforilação desta proteína por proteína quinase C.

1.3.1.2. CITOESQUELETO

Por muito tempo os filamentos intermediários (FI) foram considerados constituintes estáveis do citoesqueleto devido à sua baixa solubilidade. Entretanto tem sido demonstrado que eles passam por notáveis mudanças estruturais durante processos celulares fisiológicos ou patológicos. Entre os fatores implicados nas mudanças estruturais está a fosforilação que resulta na despolimerização dos filamentos intermediários ou formação de subunidades incapazes de polimerizar (Bianchi et al, 1994).

Estudos “in vitro” indicam que a polimerização dos FI ocorre acima de uma concentração crítica e que as subunidades estão em equilíbrio dinâmico com um “pool” de subunidades solúveis. Durante a divisão e o crescimento celular, quando ocorre intensa reorganização do citoesqueleto, este equilíbrio pode ser modulado por sinais externos que atuam sobre a fosforilação protéica tais como cálcio e glutamato. Estas observações sugerem que o estado de polimerização é um evento que pode ser regulado por fatores tais como proteínas quinases e fosfatases, que tanto podem promover quanto inibir a formação de FI. A fosforilação da GFAP, a principal proteína formadora dos FI em astrócitos maduros, parece regular o ciclo polimerização/despolimerização destes filamentos. (Bianchi et al, 1994; Wofchuk & Rodnigt, 1994; Rodnigt, et al, 1997).

A proteína S100B se liga as moléculas de GFAP não polimerizadas de maneira dependente de cálcio, diminuindo grandemente as interações entre as moléculas e consequentemente inibindo sua polimerização. Como a S100B é uma proteína de característica ácida foi sugerido que a inibição da polimerização ocorre pela interação entre resíduos carregados negativamente da S100 com resíduos básicos N terminal de GFAP (Bianchi et al, 1993).

Um estudo da fosforilação de GFAP e vimentina, em fração citoesquelética de hipocampo de ratos jovens, mostrou que estas proteínas têm sua fosforilação reduzida na presença de S100B, de maneira dependente de cálcio. Este efeito deve-se provavelmente à ação da proteína S100B sobre o sítio de fosforilação da GFAP, mas também não se deve descartar um efeito sobre a própria quinase. Se a S100B diminui a fosforilação de GFAP, isto poderia paradoxalmente favorecer a polimerização. Entretanto muitos aspectos do controle intracelular do ciclo polimerização/ despolimerização dos FI

precisam ser melhor estabelecidos. As quinases envolvidas neste estudo foram a dependente de cálcio e calmodulina (PKCaM I I) e dependente de AMPc (PKA) (Ziegler et al, 1998).

Além de atuar nos FI, a proteína S100B afeta a fosforilação de proteínas associadas a microtúbulos, como a proteína tau. A S100 pode ter uma importante função regulatória cálcio dependente na reestruturação do citoesqueleto durante a mitose ou processos patológicos (Bianchi et al, 1994; Donato, 1998).

1.3.1.3. ENZIMAS

As proteínas S100 (A1 e B) demonstraram capacidade de modular atividades de ATPases em frações subcelulares no Sistema Nervoso Central. A S100A1, mesmo na ausência de cálcio, estimula atividades ATPases em frações subcelulares de mitocôndria e mielina em SNC. A adição de cálcio provoca um efeito estimulatório adicional; entretanto, a proteína sozinha ou combinada com cálcio não demonstrou efeito em sinaptossomas ou mitocôndria de fígado. A proteína S100B estimula as atividades de ATPases em mitocôndria e mielina no SNC; em presença de zinco há um efetivo aumento de atividade somente na fração de mielina (Simonian et al, 1989).

Alguns relatos sugerem outras atividades intracelulares das proteínas S100A1 e S100B, como regulação do metabolismo energético envolvendo a interação com enzimas como frutose-1,6-bisfosfato aldolase e glicogênio fosforilase (Zimmer et al, 1995).

O efeito estimulatório da S100B sobre a adenilato ciclase foi descrito em córtex cerebral de rato na presença do íon magnésio, que produziu um aumento de 2.0-2.5 vezes na atividade da enzima. Este efeito provavelmente não é exercido diretamente na enzima mas na subunidade inibitória G_i atuante sobre a adenilato ciclase. (Fanno et al, 1988; Fulle et al, 1991).

1.3.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS EXTRACELULARES

As proteínas S100 ocorrem essencialmente no meio intracelular, mas a S100B assim como outras da família (S100A4, S100A8, S100A9) podem ser secretadas para o meio extracelular. (Shashoua et al, 1984; Van Eldick & Zimmer, 1987; Zimmer et al, 1995).

Evidências sugerem que a S100B exerce um conjunto de funções extracelulares, uma vez que ela pode ser liberada para o espaço extracelular. A liberação pode ser modulada por hormônio adrenocorticotrofina (ACTH) e neurotransmissores como glutamato e serotonina, embora o mecanismo não seja bem compreendido. Consistente com este pensamento é que a S100B pode ser detectada no Líquido Céfalorraquidiano (LCR) e em meio de cultura de células astrogliais (Shashoua et al, 1984; Donato et al, 1986; Van Eldik & Zimmer, 1987; Suzuki et al, 1987; Donato, 1991; Azmitia et al, 1992; Barger et al, 1992).

Kligmann & Marshak (1985), demonstraram que a forma dissulfeto da S100B tem ação neurotrófica, sugerindo pela primeira vez uma possível função extracelular.

O desenvolvimento do Sistema Nervoso envolve uma série de eventos coordenados que inclui a regulação da proliferação e diferenciação celular por fatores extracelulares; a S100B tem sido implicada nestes processos. Durante o desenvolvimento, a S100B é secretada pelos astrócitos durante a fase de proliferação astrogliar e também durante o período de extensão neurítica dos neurônios corticais. Além disto, um estímulo na liberação da S100B tem sido demonstrado pela ação direta da serotonina em receptores $5HT_{1A}$ nos astrócitos; uma vez no espaço extracelular a proteína S100B atua tanto em neurônios quanto astrócitos. Concentração em nanomolar de S100B promoveu a proliferação de células C6 de glioma e astrócitos primários, enquanto que duas linhagens de neuroblastoma não proliferaram, indicando que a atividade mitogênica é seletiva para astrócitos (Marshak, 1990; Selinfreund et al, 1991; Azmitia et al, 1992).

Os mecanismos pelos quais a S100B interage com receptores específicos e de que maneira isto resulta na transdução de sinal intracelular, precisam ser definidos. O aumento da hidrólise de fosfatidil inositol e conseqüentemente do cálcio livre

intracelular observado em astrócitos e neurônios, possivelmente sejam componentes desta resposta. (Azmitia et al, 1992; Barger et al, 1992).

Outro componente do efeito extracelular foi apontado pela demonstração de que culturas de astrócitos de córtex cerebral de ratos tratados com S100B, ativaram uma enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSi), com subsequente geração de óxido nítrico intracelularmente que pode levar à morte dos astrócitos com características de apoptose (Hu & Van Eldik, 1996).

Para investigar se a liberação de óxido nítrico pelos astrócitos estimulada pela S100B pode ter alguma influência sobre neurônios, foram feitas co-culturas com células de neuroblastoma B104 ou neurônios hipocámpais primários e astrócitos de córtex cerebral de ratos. O tratamento da co-cultura astrócito-neurônio com S100B resultou na morte neuronal por necrose e apoptose, de maneira dependente da ativação de uma óxido nítrico sintase induzível (NOSi) e produção de óxido nítrico pelos astrócitos. Este estudo sugere que a proteína S100B não é capaz de induzir a morte neuronal via mecanismo do óxido nítrico sem a presença dos astrócitos (Hu et al, 1997).

Fulle et al (1997), mostraram que a S100B foi capaz de induzir a apoptose em células PC12, num processo dependente do aumento de cálcio intracelular. Tal apoptose foi inibida pelo fator de crescimento de nervo (NGF).

1.4. APLICAÇÕES CLÍNICAS

Em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Síndrome de Down, os níveis de S100 β estão muito aumentadas nas regiões cerebrais onde os astrócitos reativos circundam as placas neuríticas. Cabe salientar que o gen que codifica a proteína S100 β está localizado no cromossomo 21 na mesma região da Síndrome de Down, e que a proteína está excessivamente expressa no lobo temporal dos portadores desta síndrome e doença de Alzheimer. Na Síndrome de Down são observadas lesões cerebrais iniciais indistinguíveis da Doença de Alzheimer. Por este motivo tem sido sugerido que os elevados níveis da S100 β possa contribuir para neuropatologia na doença de Alzheimer e desenvolvimento anormal do Sistema Nervoso na Síndrome de Down. As alterações cerebrais desta proteína possivelmente podem se refletir em alterações dos níveis séricos e no LCR (Marshak, 1990; Marshak et al, 1992; Azmitia et al, 1992).

Nygaard et al (1997) quantificaram a proteína S100 β com um ensaio imunoradiométrico (RIE) em LCR e soro de indivíduos hígidos de ambos os sexos, com idades entre 20 a 89 anos sem história prévia ou atual de doença neurológica. Não foi possível detectar a proteína no soro, enquanto que a concentração no LCR demonstrou ser idade e sexo dependente, sendo significativamente ($P=0,0026$) maior para homens ($1,9 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$) do que para mulheres ($1,5 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$). A concentração de S100 β no LCR aumentou com a idade em ambos os sexos.

Wiessmann et al (1998) desenvolveram um método fluorimétrico sensível o suficiente para determinar concentrações de S100 β no plasma de sujeitos hígidos de ambos os sexos. A diferença entre a concentração encontrado no plasma de homens e mulheres não foi considerada estatisticamente significante ($p>0,05$); entretanto com o aumento da idade foi detectada uma discreta diminuição da concentração de S100 β . Portanto, a concentração de S100 β no plasma foi independente de sexo e idade para sujeitos adultos, enquanto que, para crianças, necessita ser melhor estabelecida.

Aumento dos valores de S100 β no LCR foram descritos em diferentes doenças neurológicas, bem como na fase ativa da injúria celular no Sistema Nervoso Central, enquanto que elevações no soro sugerem o comprometimento da integridade da barreira hemato encefálica (BHE). Por isto, medidas de S100 β no LCR e soro podem ser úteis clinicamente para avaliar danos ao Sistema Nervoso Central (Nygaard et al, 1997; Wiesmann et al, 1998; Ingebritsen et al, 1995)

Em um estudo realizado por Persson et al (1988), em 45 pacientes internados com hemorragia subaracnóide sendo 44 com ruptura de aneurisma, foi quantificado S100 β no LCR (2-15 amostras por paciente) por um método imunoradiométrico (RIE). A concentração de S100 β no LCR provou estar relacionada com o dano cerebral associado à hemorragia subaracnóide. Pacientes cujos níveis da S100 β não excedeu 20 ng/ml durante o curso da doença tiveram um prognóstico favorável, enquanto aqueles em que uma ou várias medidas foram maiores que 100 ng/ml tornaram-se inválidos, vegetativos ou morreram.

Com o objetivo de se utilizar S100 β como marcador bioquímico precoce e sensível de lesão cerebral, dosagens da proteína por RIE foram feitas no soro de pacientes após trauma crânio encefálico leve, sem alterações no exame radiológico, com

a finalidade de prognosticar ou evitar sintomas pós concussionais (SPC). Os resultados mostraram que 67% dos pacientes que tiveram níveis de S100 β \geq 0.5 μ g/L na admissão desenvolveram sintomas após concussão, enquanto que 36% dos pacientes sem aumento da proteína \leq 0.5 μ g/L relataram sintomas após concussão. Após trauma crânio encefálico leve, 15 a 50% dos pacientes desenvolvem SPC. Técnicas diagnósticas de alta precisão como tomografia computadorizada e ressonância magnética não têm revelado uma associação entre alterações de neuroimagem e desenvolvimento de SPC (dor de cabeça, perda de memória, fadiga, tonturas, irritabilidade, dificuldade de concentração, insônia, zumbido, defeito auditivo, depressão, ansiedade e visão dupla). Entretanto em nível microscópico, evidências têm demonstrado lesões cerebrais sutis que podem contribuir para SPC.(Ingebrigtsen et al, 1995; Waterloo et al, 1997).

Estudos sugerem que o trauma crânioencefálico leve está associado a déficit cognitivo e que tomografia computadorizada não é sensível para evidenciar lesão cerebral difusa (Ingebrigtsen et al, 1997). Para estes pacientes, um marcador cerebral precoce seria útil para prognosticar e prevenir seqüelas neuropsicológicas e o possível desenvolvimento de SPC. O déficit cognitivo destes pacientes é sensivelmente detectado com testes computadorizados de tempo de reação, atenção e velocidade de processamento de informação. Comparados a um grupo controle pareado, os pacientes que apresentaram aumento de S100 β após o traumatismo cranioencefálico leve tiveram performance cognitiva inferior nestes testes um ano após o trauma (Waterloo et al , 1997).

Sintomas neurológicos como disfunção cognitiva e comprometimento da BHE após cirurgias cardíacas e circulação extracorpórea em que os pacientes são submetidos à hipóxia transitória, são complicações pelas quais várias abordagens farmacológicas tem sido sugeridas, ao menos para reduzir os danos celulares após os eventos isquêmicos. Para avaliar técnicas cirúrgicas, bem como detectar e quantificar o dano cerebral após cirurgia cardíaca, a dosagem de marcadores cerebrais no LCR, soro e plasma parece ser indicado, embora muitas vezes não haja correspondência entre LCR e sangue (Johnsson et al, 1995).

Experiências usando marcadores cerebrais de trauma ou isquemia têm sido aplicadas à cirurgias cardíacas, embora circulação extra corpórea adiciona “per se”

dificuldades para coleta e interpretação. Vários marcadores têm sido propostos como adenilato quinase, creatina fosfoquinase isoenzima BB, lactato, enolase específica de neurônio (NSE), proteína S100 β , proteína básica de mielina. Os resultados usando a maioria destes marcadores não têm sido definitivos e em alguns casos contraditórios. Em poucos experimentos as concentrações de marcadores no LCR têm demonstrado boa correlação clínica, mas estudos mais abrangentes necessitam a disponibilidade de coleta e dosagens no sangue. Atualmente o interesse está focalizado principalmente na enolase específica de neurônio e proteína S100 β como marcador sanguíneo periférico de lesão cerebral. (Johnsson et al, 1995; Johnsson, 1996).

O aparecimento da proteína S100 β no soro pode indicar dano cerebral e alteração da integridade da barreira hemato encefálica (BHE) durante circulação extracorpórea em pacientes submetidos a cirurgias cardíacas. Um grupo de pacientes sem história prévia de doença neurológica, submetidos a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea variando entre 15 e 180 minutos, demonstrou uma significativa correlação entre os níveis de S100 β no soro dosados por RIE, e a duração da circulação extracorpórea, sugerindo uma possível lesão cerebral subclínica ou comprometimento da permeabilidade da barreira hemato encefálica. (Westaby et al, 1996).

Os níveis de S100 β foram medidos por RIE no soro de pacientes ressuscitados após parada cardio respiratória e coletados nos três primeiros dias após o episódio para avaliar os efeitos precoces da isquemia global sobre o cérebro. Como controles foram utilizados pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio sem sintomas neurológicos e doadores de sangue; nestes, os níveis permaneceram idênticos ($\leq 0,2$ $\mu\text{g/L}$). Os níveis médios da proteína aumentaram ($\geq 0,2$ $\mu\text{g/L}$) quando comparados aos controles. O tempo de hipóxia se correlacionou bem com os níveis de S100 β dosados no 1º e 2º dias. Usando o valor de 0,2 $\mu\text{g/L}$ como ponto de corte (“cutoff”) foi observado que 100% dos pacientes com níveis de S100 β acima disto no segundo dia de coleta morreram em 14 dias, enquanto 90% dos pacientes com valores abaixo do ponto de corte sobreviveram. Poucos marcadores foram capazes de estimar precocemente a mortalidade após a internação hospitalar de maneira tão eficiente quanto a proteína S100 β (Rosen et al, 1997).

Além de lesão cerebral a proteína tem sido usada como marcadora de melanomas. Através de técnicas de imunohistoquímica a detecção de S100 β foi amplamente usada no diagnóstico, diferenciação e determinação da invasividade de melanomas, . A dosagem da proteína S100 β no soro de 643 pacientes com melanoma, classificado pelo Sistema de Três Estágios (I, II, III) foi realizada por um ensaio de RIE. A proteína demonstrou ser um bom marcador diagnóstico e prognóstico da doença. As concentrações de S100 β no soro foram fortemente correlacionadas com a taxa de sobrevivência e aos estágios clínicos da doença sendo menores valores no estágio I e maiores no estágio III; além disso, as concentrações foram maiores em homens do que mulheres. Os dados sugerem que a proteína S100 β é um potencial marcador sanguíneo que pode ser útil para identificar casos de alto risco e monitorar a resposta à terapia em pacientes com melanoma (Schoultz et al, 1996).

1.5. METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA S100 β

As primeiras metodologias desenvolvidas para uso clínico foram baseadas em enzimaímunoensaio (ELISA) (Kato et al, 1982; Aurell et al, 1989) e radioímunoensaio (RIE) (Fagnart et al, 1988). Entretanto, a necessidade de se marcar anticorpos e purificar proteínas no próprio laboratório, eram fatores determinantes na demora para padronizar e aplicar a técnica. Outro fator importante que limitava o uso das técnicas era a especificidade, pois havia a possibilidade de reações cruzadas dos anticorpos anti-S100 β com outros membros da família S100, uma vez que compartilham uma certa homologia estrutural, principalmente S100A1. Além disso, a sensibilidade dos métodos não permitia a detecção da proteína no soro e plasma de sujeitos sem transtornos neurológicos.

Usando cromatografia de fase reversa, Isobe et al (1983) mostraram a possibilidade desta técnica ser utilizada não somente como alternativa na purificação da proteína S100 β , mas também na separação das subunidades da família S100 e identificação de seus componentes, entretanto esta metodologia ainda não foi aplicada clinicamente.

A maioria dos trabalhos clínicos publicados atualmente na literatura utilizam técnicas RIE para quantificar a proteína S100 β no LCR e soro (Persson et al, 1988; Ingebritsen et al, 1995; Westaby et al, 1996; Waterloo et al, 1997; Nygaard et al, 1997). Entretanto tem havido um esforço na tentativa de substituir estas técnicas na rotina clínico laboratorial, devido a inconvenientes como marcadores radioativos de vida curta, licenciamento oficial, treinamento técnico especializado, necessidade de descarte reservado ao declínio de radioatividade (Dudley, 1990).

Uma técnica de ELISA com alta sensibilidade (0,04 ng/ml) e especificidade foi desenvolvida para detectar a proteína S100 β no LCR, utilizando reagentes disponíveis comercialmente (Green et al, 1997). Apesar de sensível a técnica não foi usada para quantificar a proteína no soro.

Mais recentemente, Wiessmann et al (1998), desenvolveram uma metodologia fluorimétrica com capacidade para quantificar os níveis da proteína S100 β no plasma (limite de detecção $\geq 0,015 \mu\text{g/L}$), relatando que no plasma as concentrações aparentemente não são sexo e idade dependentes.

Para a imunoquantificação da proteína S100 β a técnica fluorimétrica é teoricamente mais sensível quando comparada com a de ELISA, todavia muitos componentes normais de proteínas no soro são capazes de fluorescer o que pode superestimar as leituras por esta técnica. Por sua vez a sensibilidade descrita para a técnica de ELISA (0,04 ng/ml) não foi reproduzida em nosso laboratório, alcançando um limite de detecção de 0,1 ng/ml.

1.5.1. ENSAIO IMUNOLUMINOMÉTRICO

Uma alternativa ao uso do RIE em imunoenaios clínicos tem sido a quimioluminescência, que em termos simples, é a emissão de luz que ocorre como resultado de uma reação química. Tais reações envolvem a produção de uma grande quantidade de energia que é perdida na forma de fótons pelas moléculas excitadas. Se os elétrons presentes no orbital mais externo de um composto forem estimulados, eles serão promovidos a um estado mais energético e ao retornarem ao estado fundamental liberam energia na forma de luz. Este processo difere da fluorescência e fosforescência porque não requer absorção prévia de luz. A emissão de fótons de uma reação de

quimioluminescência pode ter um perfil característico de “vida curta” ou “vida longa”, basicamente relacionado com o tempo de emissão e a intensidade da luz. (Dudley, 1990; Price & Newman, 1997). O perfil da emissão de fótons está representada na **figura 2**.

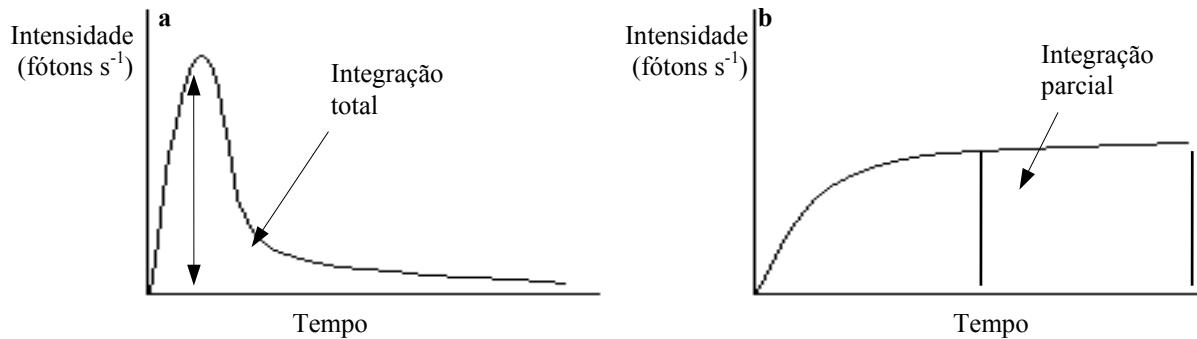


Figura2. Perfil típico de uma reação **a**, vida curta e **b**, vida longa de quimioluminescência (Price & Newman, 1997).

Como a quimioluminescência não envolve a absorção prévia de luz, medidas de emissão de quimioluminescência são feitas contra um baixo “background” o que potencialmente permite uma grande sensibilidade de detecção. Há muitas reações químicas que exibem quimioluminescência, embora relativamente poucas estão associadas com intensa emissão de luz. O composto quimioluminescente mais amplamente conhecido é o luminol (5 amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona), que foi primeiramente descrito por Albretch (1928); logo após, Gleu e Petsch (1935) descreveram o sal de acridina ou lucigenina (Price & Newman, 1997).

Na produção de um marcador para imunoensaio o luminol apresenta a desvantagem de ao ser conjugado com um anticorpo perder parte de sua atividade quimioluminescente. Esta perda de atividade pode ser compensada pelo uso de isoluminol (Dudley, 1990; Price & Newman, 1997; Messeri et al, 1989).

A emissão de fótons nestes imunoensaios pode ser detectada e quantificada com grande sensibilidade; para isto usamos equipamentos com fotomultiplicadores detectores denominados luminômetros. Para as reações que não requerem detecção com grande sensibilidade há luminômetros com detectores de fotodiiodo (Price & Newman, 1997).

1.6. OBJETIVOS

- I- Padronizar uma técnica de luminescência para imunoquantificação da proteína S100 β .
- II- Determinar o imunoconteúdo da proteína S100 β em soro, LCR e tecido cerebral de ratos.
- III- Avaliar a possível utilização clínica da proteína S100 β como marcador bioquímico de dano cerebral em soro e líquido e marcador para triagem pré-natal da trissomia do cromossomo 21 em fluido amniótico de humanos.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com idade de cinco (05) meses, pesando entre 290 a 350g provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS e do Departamento de Bioquímica. Os animais receberam água e ração “ad libitum” e foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas com a temperatura das salas mantidas a 23°C aproximadamente.

2.2. MATERIAL

Pentobarbital sódico, , reagentes para imunoquantificação da S100 β foram adquiridos da Sangtec Medical. EGTA, albumina bovina, NaCl, e PMSF foram obtidos da SIGMA, tampão fosfato em solução salina (PBS). Outros reagentes são p.a.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

2.3.1.1 . Líquido Céfal Raquidiano (LCR)

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico administrado i.p., e depois, fixados no estereotáxico e puncionados na cisterna magna. A punção foi realizada com seringa do tipo insulina com agulha de 30-1/2 cc, e o volume coletado por animal foi 80-100 μ L. O LCR foi centrifugado por 5 minutos a 1,000 \times g em microcentrífuga refrigerada, aliquotado e imediatamente congelado a -70° C. No momento do uso, as amostras de LCR foram diluídas 1/5 com tampão fosfato 0,1 M em solução salina (pH 7,4) e o resultado da dosagem multiplicado pelo fator de diluição.

2.3.1.2. Soro sangüíneo

Para obtenção de soro sangüíneo foram utilizados três procedimentos diferentes de coleta rotineiramente utilizados em nosso laboratório:

I- O rato anestesiado com pentobarbital sódico foi decapitado, e o sangue total recolhido em um tubo de ensaio. Após coagulado o sangue foi centrifugado por 10 minutos à 2,000 \times g, para separação do soro dos constituintes celulares.

II- O rato anestesiado com pentobarbital sódico foi submetido a um pequeno corte na ponta da cauda e o sangue total foi recolhido em tubos de microcentrífuga. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2,000 \times g em microcentrífuga refrigerada.

III- O rato anestesiado com pentobarbital sódico, foi submetido a punção cardíaca transcutânea com seringa de insulina e agulha 26G 1/2, retirando-se um volume sangüíneo de aproximadamente 450-500 μ L. Uma vez coagulado o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2,000 \times g em microcentrífuga refrigerada.

O tempo de coagulação foi \pm 6 minutos e após centrifugação do sangue para obtenção do soro, por quaisquer dos procedimentos de coleta, as amostras foram congeladas a -70° C. A quantificação da proteína S100 β no soro sangüíneo foi feita sem diluição da amostra.

2.3.1.3. Tecido cerebral

Os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi rapidamente dissecado em uma placa de Petri, mantida sobre gelo. Foram dissecados hipocampo, córtex

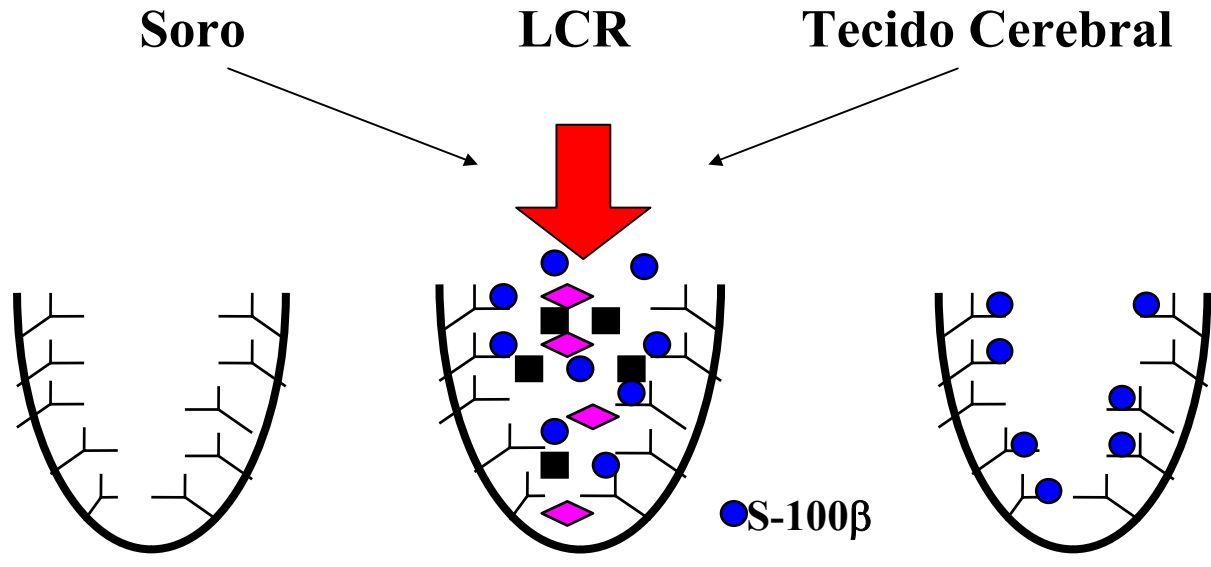
cerebral e cerebelo, de onde foram obtidas fatias de 0,4 mm de espessura em McIlwain “chopper”. A partir das fatias foram feitas micro-fatias de 1 mm de diâmetro, usando um vazador inoxidável. As fatias e microfatias foram mantidas em solução de NaCl 145 mM. Duas microfatias foram homogeneizadas em 1ml de uma solução contendo Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, EGTA 1 mM e PMSF 1 mM, com auxílio de uma seringa de insulina aspirando e dispensando a amostra até completa dissolução. Estas amostras foram diluídas 1/10 , 1/50 e 1/100 em solução similar sem PMSF e armazenadas no freezer -70°C para o ensaio de imunoquantificação da proteína S100β. Os resultados obtidos foram expressos em µg S100β/mg de proteína total.

2.3.2. IMUNOQUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA S100β

2.3.2.1. Princípio da reação

O ensaio imunoluminométrico (LIA) para S100β da Sangtec Medical, é uma reação que consiste de um “duplo sanduíche” de anticorpos. O imunoensaio é constituído de três anticorpos monoclonais anti-S100β, sendo que um deles conjugado com isoluminol (tracer) e os outros dois revestindo o tubo de poliestireno, a chamada fase sólida. Durante a fase de incubação, os anticorpos da fase sólida imobilizam a proteína S100β presente na amostra biológica (soro, plasma, tecido ou LCR) ou nas soluções padrões. Após se adiciona o anticorpo conjugado com isoluminol que liga à proteína imobilizada nas paredes do tubo. A reação imunológica é detectada e quantificada através da emissão de fótons que ocorre pela forte oxidação do anel aromático do isoluminol resultando na liberação de N₂ , H₂O e luz quando da adição do “iniciador”, que é constituído de dois reagentes: Reagente 1: peróxido de hidrogênio em solução de hidróxido de sódio 4%; Reagente 2: uma solução catalítica com peroxidase. Os anticorpos discriminam a subunidade β da proteína tanto na forma do dímero de S100B ou dissociada como S100β. A representação esquemática da reação está na **figura 3**.

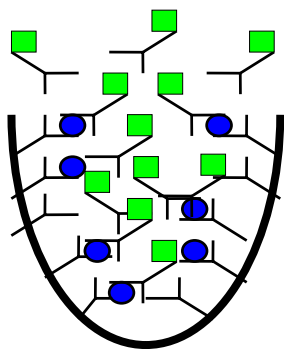
Amostras Biológicas :



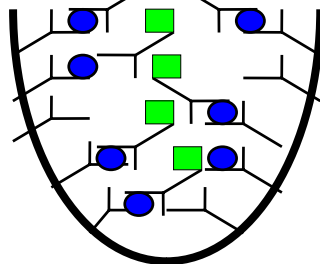
Tubo revestidos por Ac anti-S100β

Incubação 1 h /TA

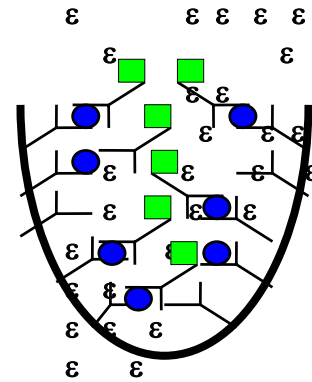
Lavagem



Incubação com Ac marcado com Isoluminol - 2hs/TA



Lavagem



Adição de H₂O₂ + Peroxidase

EMISSÃO DE LUZ (RLU) ~ [] de S-100β

Y Ac anti-S100β

■ Ac anti-S100β marcado com isoluminol

● S-100β

ε peroxidase + H₂O₂

◇ Substâncias inespecíficas

Figura 3: Representação esquemática da reação

Desde que há uma rápida emissão de fótons que ocorre em ± 2 segundos após ser acrescentado o “iniciador”, os tubos de reação devem estar conectados ao detector do luminômetro, o qual expressa a medida de luz em RLUs (Relative Light Units), que por sua vez é diretamente proporcional à concentração de S100 β nas amostras, soluções padrões e controles. Utilizamos um luminômetro da Ciba-Corning modelo Magic Lite Analyzer II..

Em cada ensaio é necessário que seja feito uma curva padrão sobre a qual será realizada a leitura das amostras. Uma curva de 05 pontos em duplicata foi feita a partir de soluções de proteína purificada de concentração conhecida (0,1 $\mu\text{g/L}$ - 0,4 $\mu\text{g/L}$ - 2,0 $\mu\text{g/L}$ - 8,0 $\mu\text{g/L}$ - 20,0 $\mu\text{g/L}$). As amostras em que a concentração final de proteína S100 β foi maior que 20,0 $\mu\text{g/L}$ eram diluídas em tampão fosfato (pH 7,4) com albumina de soro bovino, e o valor obtido em uma nova dosagem foi multiplicado pelo fator de diluição. Além disto, soluções de concentração conhecida denominadas controles alto (10,20 $\mu\text{g/L}$) e baixo (1,12 $\mu\text{g/L}$) eram acrescentadas ao ensaio, sendo então quantificados como amostra. Na curva, a concentração de proteína foi plotada no eixo da abscissa e a emissão de luz (RLUs) no eixo da ordenada.

2.3.2.2. Efeito do Cálcio, EGTA e Citrato na imunorreatividade dos anticorpos

Ao se ligar a íons cálcio as proteínas S100 passam por mudanças conformacionais que facilitam a interação com as proteínas efetoras, portanto a ligação com este íon é uma das etapas da regulação da atividade destas proteínas (Zimmer et al, 1995).

Gonçalves et al (1997) relataram que a imunorreatividade dos anticorpos anti-S100 β pode variar dependendo do estado ligante da proteína S100 β . O kit LIA da Sangtec Medical contém três anticorpos monoclonais anti-S100 β denominados SMST 12, SMSK 25 e SMSK 28, capazes de discriminar a subunidade beta, mas nenhuma informação técnica é descrita sobre a influência do estado ligante de cálcio da proteína S100 β sobre a imunorreatividade destes anticorpos.

Para testarmos a imunorreatividade dos anticorpos do kit Sangtec Medical comparamos uma solução de proteína S100 β de concentração 0,2 $\mu\text{g/L}$ utilizada: (a) isoladamente (b) adicionada de cálcio (1mM) e (c) um quelante de cálcio (EGTA 1mM

ou Citrato de sódio 0,8%). A imunorreação foi realizada em dois experimentos distintos em condições idênticas.

2.3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração total de proteínas na amostra foi determinada pelo método de Lowry et al (1951) utilizando-se albumina como padrão.

2.3.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na análise estatística foi utilizado o teste t pareado de Student de uma via e os resultados expressos como média e desvio padrão.

3.RESULTADOS

3.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA

3.1.1. CURVA PADRÃO

Uma curva padrão com 05 pontos em duplicata da proteína S100 β purificada em que a concentração varia de 0,1 a 20,0 μ g/L foi feita em cada experimento. As leituras dos padrões e controles e a representação de uma das curvas estão na **tabela 2, figura 4**. A possibilidade de reação cruzada dos anticorpos anti-S100 β foi testada com uma solução de 20 μ g/L de S100A1, um membro da família S100 de localização neuronal, porém nesta concentração não houve reatividade cruzada (resultados não apresentados).

Os coeficientes de variação intraensaio são de 6.4%, e interensaio 4,0% avaliados por intermédio de 02 soluções padrão de concentração 1,12 μ g/L e 10,20 μ g/L de proteína S100 β dosadas em duplicata em 04 experimentos diferentes.

A curva padrão demonstra uma relação linear e proporcional entre as leituras expressas em RLUs e as concentrações da proteína S100 β em todos os experimentos quando se usa padrões em duplicata. Os resultados em que os coeficientes de variação das amostras dosadas em duplicata forem maiores que 10% foram descartados.

Tabela 2. Valores obtidos das leituras dos padrões e controles

Amostra	RLU	µg/L	%CV	Amostra	RLU	µg/L	%CV
Pd 1 1	1406	0,100	1,1	Pd 4 1	87106	8,000	
Pd 1 2	1311	0,100		Pd 4 2	88588	8,000	1,1
Média	1359	0,100		Média	87847	8,000	
Pd 2 1	4513	0,400		Pd 5 1	219080	20,000	
Pd 2 2	4598	0,400	0,6	Pd 5 2	222946	20,000	1,2
Média	4555	0,400		Média	221013	20,000	
Pd 3 1	21489	2,000					
Pd 3 2	22173	2,000	1,8				
Média	21831	2,000					
Ctrl 1 1	12559	1,148		Ctrl 2 1	111511	10,134	
Ctrl 1 2	13690	1,252	4,4	Ctrl 2 2	112290	10,207	0,5
Média	13124	1,200		Média	111901	10,170	

Nota: o “background” da reação foi 4883 RLU

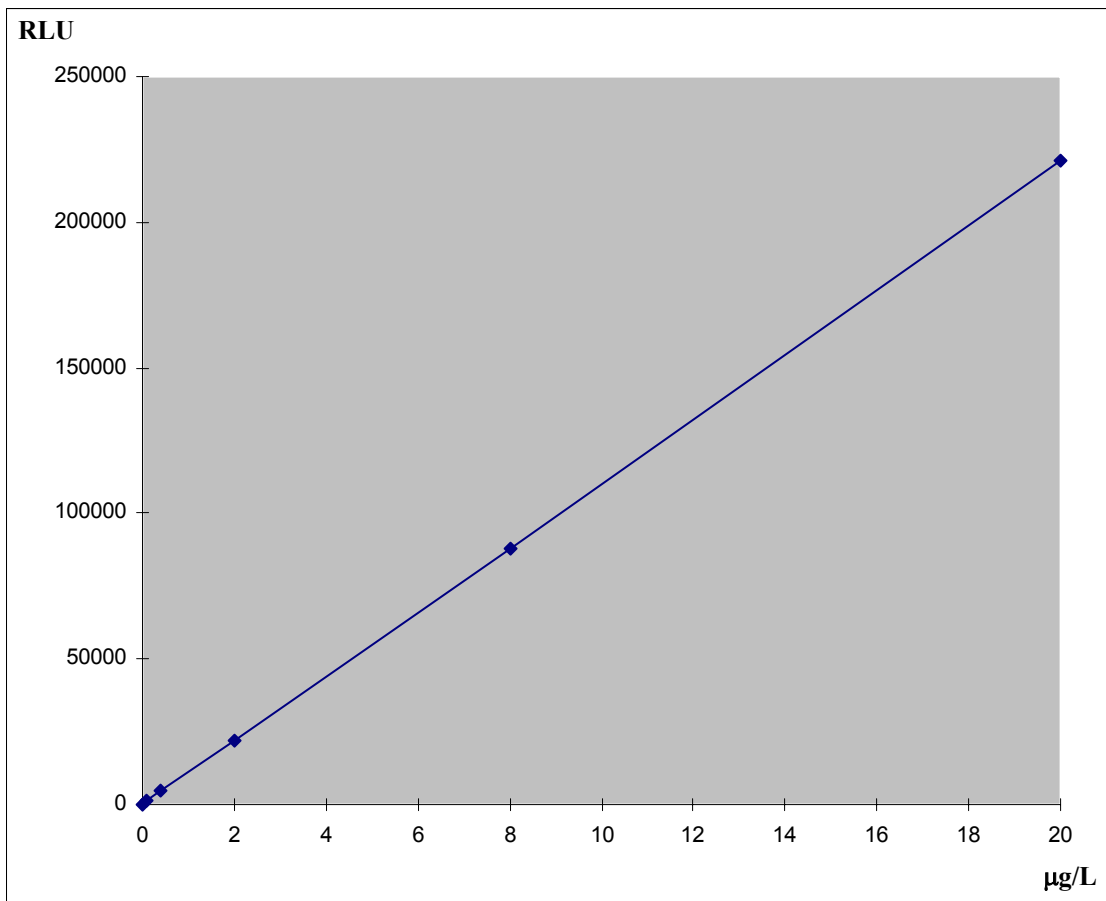


Figura 4. Representação gráfica de uma curva padrão da proteína S100β

Sobre esta curva, foram plotadas as médias das RLU das amostras e controles, que devem ser diretamente proporcionais a concentração de proteína S100β.

O limite mínimo de detecção da técnica foi testado usando 03 padrões (0,01 µg/L, 0,02 µg/L, 0,04 µg/L) cujas concentrações estão abaixo do primeiro ponto da curva padrão (0,1 µg/L) usada rotineiramente. O valor mínimo de detecção da proteína S100β por esta técnica de quimioluminescência foi considerado como sendo 0,02 µg/L. A **tabela 3** representa as concentrações testadas e os valores obtidos neste experimento. Amostras com concentrações de proteína S100β acima de 20,0 µg/L necessitam ser diluídas, pois as leituras a partir deste valor deixam de ser lineares.

Tabela 3. Limite mínimo de detecção do ensaio imunoluminométrico

Concentração Padrão	Valor Obtido
0,04 µg/L	0,042 µg/L
0,02 µg/L	0,018 µg/L
0,01 µg/L	0,019 µg/L

3.1.2. EFEITO DO CÁLCIO, CITRATO E EGTA NO IMUNOENSAIO

Considerando que a imunorreatividade dos anticorpos poderia variar em função do estado ligante de Ca^{2+} das proteínas ligantes de cálcio (Gonçalves et al, 1997), foram testados os efeitos do cálcio, ácido etilenoglicol-tetra-acético (EGTA 1 mM) e do citrato de sódio (0,8%). Inesperadamente na presença destes quelantes de Ca^{2+} a formação do complexo antígeno-anticorpo foi alterada de maneira que a quantificação da proteína aumenta aproximadamente 2,5 vezes na presença de EGTA e 3,7 vezes na de citrato de sódio quando comparadas à solução padrão de proteína utilizada sozinha. A adição de cálcio 1mM reduziu à metade a imunorreatividade da amostra. A comparação destes efeitos está na **Tabela 4**.

Tabela 4. Efeito do Cálcio, EGTA e Citrato na imunoquantificação da proteína S100 β por quimioluminescência

	Experimento I Concentração de S100 β ($\mu\text{g/L}$)	Experimento II Concentração de S100 β ($\mu\text{g/L}$)
Solução padrão de S100 β (0,2 $\mu\text{g/L}$)	0,203	0,198
Solução padrão de S100 β (0,2 $\mu\text{g/L}$) + Ca^{2+} 1 mM	0,115	0,120
Solução padrão de S100 β (0,2 $\mu\text{g/L}$) + EGTA 1 mM	0,429	0,470
Solução padrão de S100 β (0,2 $\mu\text{g/L}$) + Citrato 0,8%	0,628	0,506

3.2. IMUNOQUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA S100 β EM LCR

Amostras de LCR foram coletadas de ratos machos de 05 meses (n=28) através de punção da cisterna magna após fixação do animal em estereotáxico. O volume coletado foi de 80-100 μ l, e como critério para se considerar uma punção bem realizada foi adotado o aspecto visual do LCR; por este critério, as amostras sem contaminação com hemáceas, isto é, com aspecto límpido e incolor são consideradas ideais para quantificação da proteína S100 β em ratos, pois resultou em amostras com uma concentração homogênea de proteína e compatível com a literatura cujos níveis foram $1,58 \pm 0,60$ μ g/L. Além do aspecto visual, a concentração da proteína S100 β “per se” é um indicativo de dano tecidual no procedimento de coleta (Huang 1996) . Tentativas de se coletar um volume maior de LCR (120 - 140 μ l) levam na maioria das vezes à obtenção de amostras de aspecto hemorrágico e com concentrações de S100 β muito elevadas ou de aspecto límpido mas igualmente elevada a quantificação da proteína. A variação na concentração da proteína S100 β no LCR está representada na **Figura 5**.

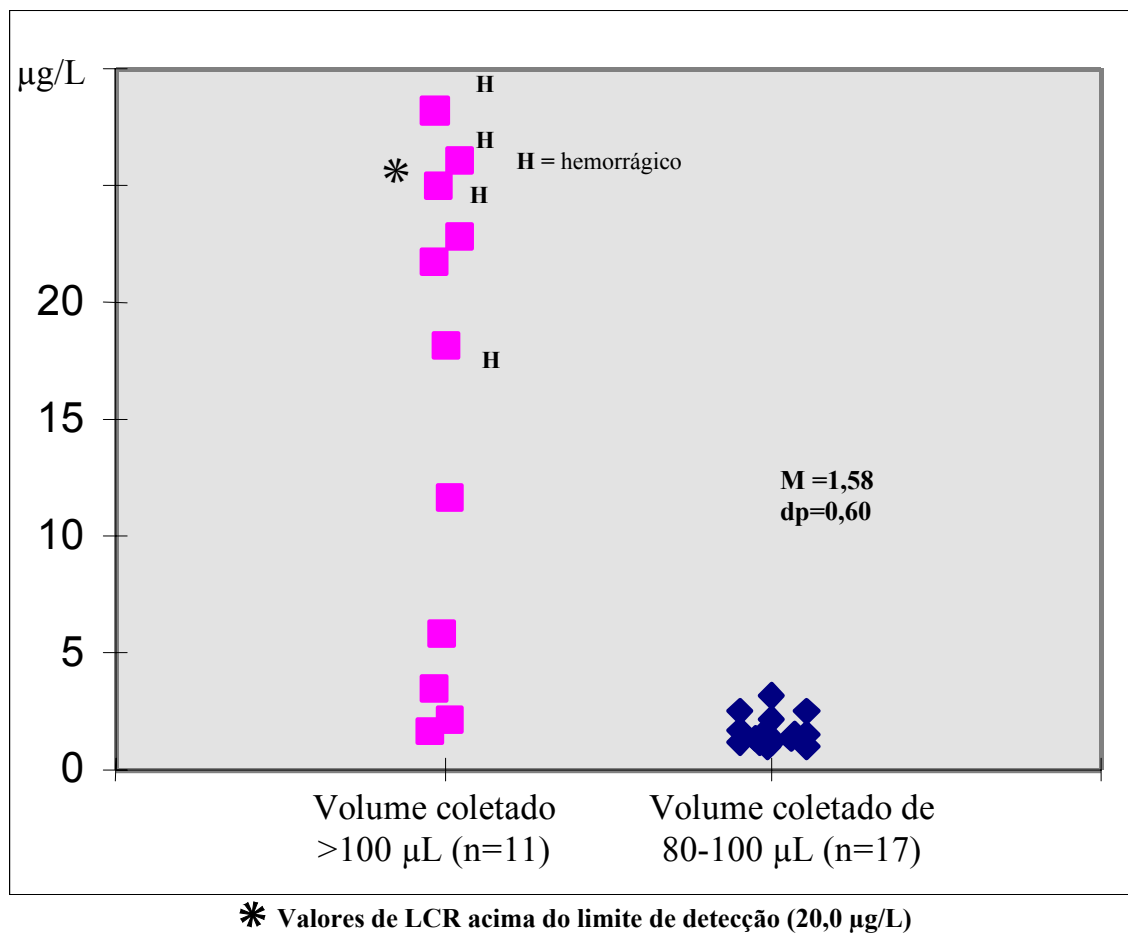


Figura 5. Imunoquantificação da proteína S100β em LCR de ratos

Representa as concentrações de S100β encontradas no LCR de ratos, levando em consideração o volume coletado e o aspecto da amostra. Os grupos de dispersão demonstram que o volume coletado e o aspecto de LCR podem influenciar na quantificação da proteína S100β. A obtenção de volumes acima de 100µl (representado em vermelho) pode originar amostras hemorrágicas (H) ou não, mas de quantificação igualmente elevadas.

3.3. IMUNOQUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA S100β EM SORO SANGÜÍNEO

Como LCR e sangue são as principais amostras biológicas utilizadas para imunquantificação da proteína S100 β e diferentes métodos de coleta de LCR podem estar associadas a variações na concentração da proteína (Huang et al, 1996), comparamos os níveis da proteína com três tipos de coleta de sangue para obtenção de soro rotineiramente utilizados em nosso laboratório, no que diz respeito à melhor maneira de se obter este material para quantificar a proteína S100 β .

Para a coleta de sangue e posterior obtenção de soro em ratos, as técnicas mais empregadas em nosso laboratório são: (a) punção intracardíaca (b) coleta após um pequeno corte na extremidade da cauda (c) decapitação. A concentração da proteína S100 β em soro sangüíneo de varia dependendo da técnica empregada para a obtenção da amostra de sangue, sendo que os níveis obtidos por decapitação ($8,346\pm 5,377\mu\text{g/L}$) foram maiores e de menor reprodutibilidade, quando comparado à coleta da extremidade da cauda ($1,232\pm 0,994\mu\text{g/L}$). A punção cardíaca apresentou melhor reprodutibilidade, menor média e desvio padrão ($0,458\pm 0,234\mu\text{g/L}$) (**Figura 6**). As concentrações no soro da proteína S100 β obtida através de decapitação e corte da extremidade da cauda estão acima dos valores médios encontrados em LCR ($1,577\mu\text{g/L}$) enquanto que a relação esperada seria inversa, devido a proteína ter localização principalmente cerebral (Shashoua et al,1984; Zimmer & Van Eldick, 1987).

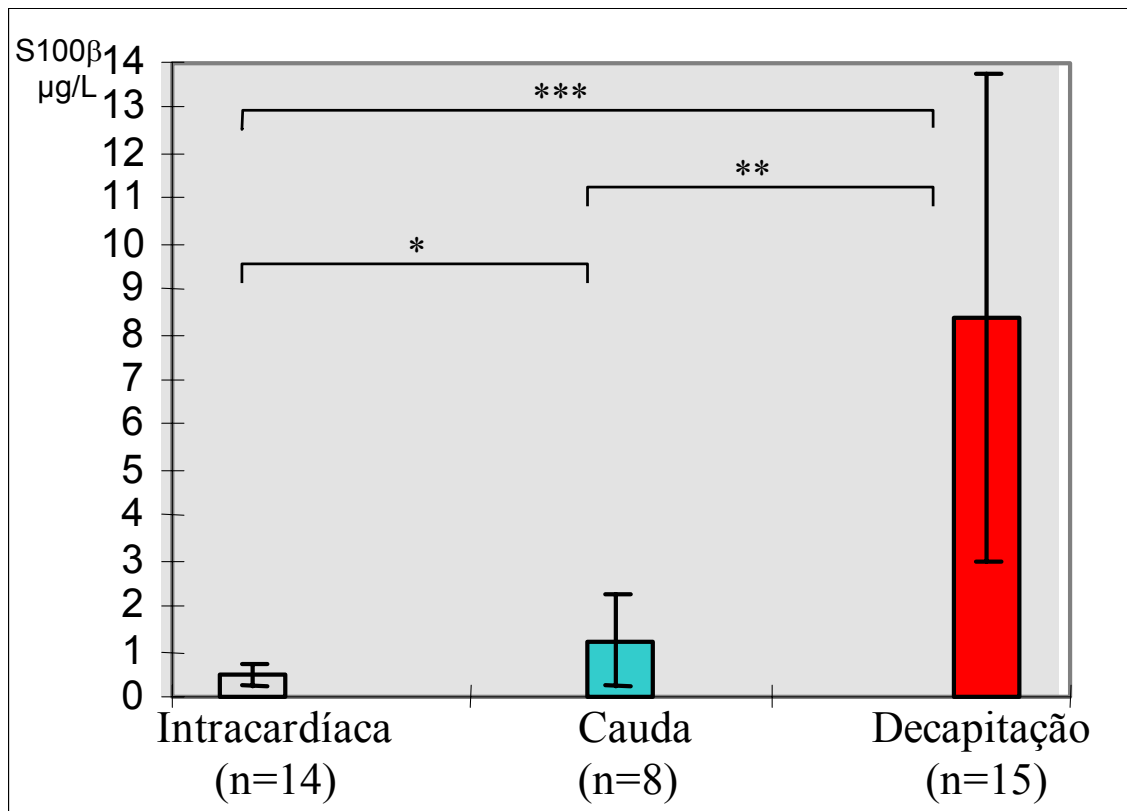


Figura 6.. A concentração de S100β em soro sanguíneo depende do método de coleta das amostras.

Comparando os níveis de S100β no soro utilizando três diferentes técnicas de coleta rotineiramente empregada em nosso laboratório, evidenciamos que o método de coleta influencia a quantificação da proteína. (* $P=0,01$; ** $P=0,001$; *** $P=0,0001$).

3.4. IMUNOQUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA S100β EM TECIDO CEREBRAL

Há uma importante variação dos níveis da proteína S100 β entre diferentes áreas cerebrais, como córtex frontal, cerebelo e hipocampo de um mesmo rato. Os resultados da quantificação da proteína nestas áreas cerebrais pelo ensaio imunoluminométrico foram convertidos em μg de S100 β /mg de proteína total. Os maiores níveis de proteína S100 β , tanto relativo, quanto expresso em mg de proteína total, foram encontrados no cerebelo ($1,33\pm 0,41\mu\text{g/L}$) seguido do córtex frontal ($0,72\pm 0,15\mu\text{g/L}$) e hipocampo ($0,49\pm 0,13\mu\text{g/L}$). À análise estatística, houve uma significância entre os níveis de hipocampo e cerebelo ($P=0,03$); enquanto que entre cerebelo e córtex tendem a ser diferente ($P=0,07$). As concentrações de S100 β e suas respectivas distribuições cerebrais estão representadas na **figura 7**.

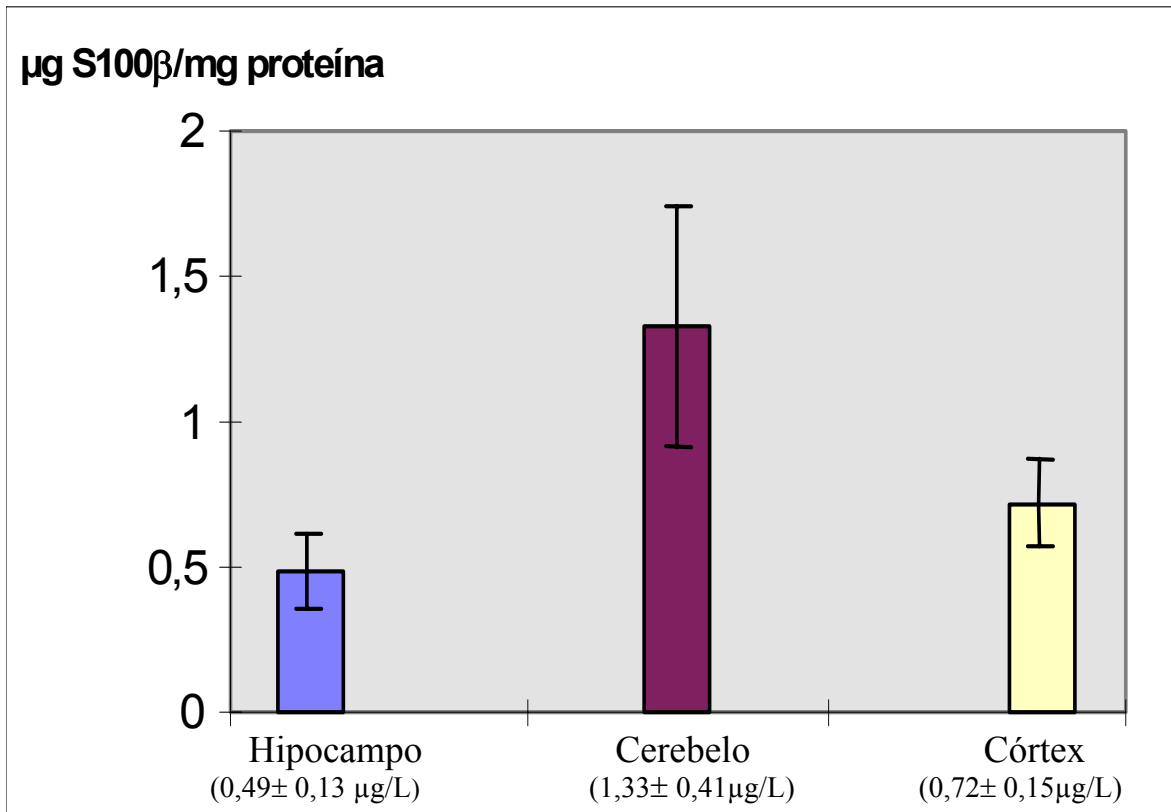


Figura 7. Concentração de S100β em três áreas cerebrais.

Distribuição da proteína S100β em três áreas cerebrais. Os níveis da proteína são:

> cerebelo > córtex > hipocampo (n=3).

Baseado no efeito inibitório (62%) da proteína S100B na fosforilação de GFAP (Ziegler et al, 1998) e na sua colocalização nos astrócitos nós avaliamos uma possível correlação entre a concentração da proteína e a fosforilação de GFAP em cerebelo, córtex e hipocampo (Portela et al, 1998). Os níveis da proteína S100 β em hipocampo, cerebelo e córtex comparados com a percentagem de fosforilação de GFAP nestas áreas estão representados na **Tabela 5**..

Tabela 5. Imunoquantificação de S100 β e níveis de fosforilação de GFAP em fatias de cérebro de ratos.

	S100 β ^a	Fosforilação de GFAP ^b
Hipocampo	0,49	100
Cerebelo	1,33	42
Córtex	0,72	7

a - Imunoquantificação de S100 β expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína total (n=3).

b - Percentagem de fosforilação de GFAP em fatias de cérebro marcado com ³²P-fosfato (Rodnight et al, 1991)

4.DISSCUSSÃO

4.1. O MÉTODO IMUNOLUMINOMÉTRICO DA Sangtec Medical

O crescente interesse clínico pela proteína S100 β como marcador de lesão celular cerebral propiciou o desenvolvimento de imunoenaios que nos permitem quantificar esta proteína rotineiramente no LCR, plasma ou soro (Fagnart et al, 1988; Kato et al, 1982; Aurell et al, 1989). Os estudos em LCR foram facilitados pela maior concentração da proteína tanto nos indivíduos hígidos como nos portadores de algum tipo de dano cerebral de origem diversa (Fagnart et al, 1988; Nygaard et al, 1997). Por outro lado, a quantificação da proteína S100 β em soro e plasma foi prejudicada pela falta de sensibilidade das técnicas utilizadas, o que levou Fagnart (1988) a afirmar que esta proteína normalmente não é detectável no soro de indivíduos hígidos. O aumento dos níveis de S100 β no soro indica dano às células gliais e alteração da permeabilidade da BHE, sendo proporcional à extensão da lesão (Westaby et al, 1996; Rosen et al, 1998).

A utilização de técnicas sensíveis e capazes de quantificar a proteína S100 β em soro e plasma são necessárias para o uso clínico em larga escala, pois a obtenção de LCR impõe dificuldades metodológicas e restrições clínicas para seu uso rotineiramente, mas de grande valor em estudos experimentais (Johnson, 1996).

Atualmente alguns grupos de pesquisa desenvolveram imunoenaios próprios com a finalidade de quantificar sensivelmente a proteína S100 β e estabelecer alguma correlação entre os níveis da proteína e danos ao Sistema Nervoso; estes ensaios se baseiam nas metodologias de ELISA e fluorimetria. (Green et al, 1997; Wiessmann et al, 1998). Estes dois imunoenaios utilizam anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente, o que possibilita eliminar etapas como a purificação e marcação de anticorpos, importantes variáveis que muitas vezes descartam o uso rotineiro de uma técnica. Nosso grupo adaptou o princípio da técnica ELISA descrita por Green (1998) e utilizamos a mesma metodologia tanto para leitura colorimétrica como por emissão de luz, porém estamos na fase experimental de padronização da técnica.

Uma metodologia alternativa baseada em um ensaio imunoradiométrico (RIE) desenvolvida pela Sangtec Medical e também disponível comercialmente demonstrou que,

além dos inconvenientes provenientes da utilização de materiais radioativos (Dudley, 1990) não consegue reproduzir a mesma sensibilidade dos imunoenaios de quimioluminescência (Ingebritsen et al, 1997).

O kit comercial LIA-mat Sangtec 100 utilizado neste estudo é baseado no princípio da quimioluminescência e tem como uma de suas principais características a alta sensibilidade caracterizada pelo baixo background da reação e utilização do isoluminol como molécula luminescente. A reação é capaz de detectar concentrações de 0,02 $\mu\text{g/L}$, portanto a sensibilidade é 15 vezes menor que a concentração média no soro da população de indivíduos hígidos (Hansson et al, 1998).

Mesmo sujeito a condições de temperatura ambiente e procedimentos não automatizados como pipetagem, centrifugação das amostras, lavagem dos tubos de reação e aspiração, cujas variações intrínsecas podem afetar diretamente a reação, as curvas de calibração feitas com o kit LIA da Sangtec Medical 100 demonstraram ser lineares, o que assegurou a exatidão em todos os experimentos, isto é, a emissão de luz foi proporcional à concentração da proteína na amostra. Para garantir a alta sensibilidade (0,02 $\mu\text{g/L}$) desta reação de quimioluminescência é necessário que ela seja lida contra um baixo “background”, isso faz que as leituras inferiores a 0,1 $\mu\text{g/L}$ da curva de calibração, permaneçam bem definidas com relação à média e desvio padrão. Considerando que os componentes do kit estejam em condições adequadas, a pipetagem e os tempos de incubação devem ser seguidos rigorosamente, sendo estas etapas de fundamental importância na manutenção da performance da reação e obtenção de um baixo “background”. Os coeficientes de variação intraensaio (6,4%) foram maiores que o interensaio (4,0%), enquanto na maioria dos trabalhos metodológicos para quantificação da proteína S100 β a relação tem se mostrado inversa (Green et al, 1997, Fagnart et al, 1988; Wiesmann et al, 1998). Entretanto, estes trabalhos não utilizaram técnicas de quimioluminescência e estas variações encontradas em nossos experimentos não afetaram a capacidade de detecção da proteína S100 β e nunca foram superiores a 10% garantindo a reprodutibilidade do imunoenasão. É importante levar em consideração o limite máximo de detecção (20 $\mu\text{g/L}$) deste método para as amostras como tecido cerebral, sangue ou LCR, em que se espera níveis elevados de S100 β , sendo então necessário que se faça diluições de forma que a leitura das amostras ocorra dentro da

faixa linear da curva de calibração; todavia a principal característica desta reação de quimioluminescência é a sua sensibilidade.

A estabilidade dos reagentes que compõem o iniciador (“starter”) de reação é importante para o desenvolvimento da forte oxidação do isoluminol que resulta na emissão de luz. A preparação destes reagentes deve ser feita 30 minutos antes de sua utilização e cuidados devem ser tomados na preparação para que se evite a contaminação e mantenha sua atividade catalítica. A necessidade de um catalisador para as reações de quimioluminescência que envolvem a oxidação do luminol e seus derivados como o isoluminol aumenta a complexidade da reação e a possibilidade de interferentes, por isso alguns imunossaios clínicos utilizam os ésteres de acridina como molécula luminescente, pois são facilmente oxidáveis e não exigem nenhum catalisador (Dudley, 1990). Apesar da recomendação do fabricante de que se conservado em refrigerador (8° C) e ao abrigo da luz, o iniciador de reação uma vez preparado tem validade por uma semana, verificamos a perda de mais da metade da atividade em 4 dias após sua preparação.

4.2. A PROTEÍNA S100 β NO LCR DE RATOS

A coleta de LCR possibilita uma avaliação de eventos bioquímicos e farmacológicos que ocorrem no espaço extra e intracelular do Sistema Nervoso Central. Estes eventos podem ser resultado de uma atividade fisiológica ou resposta a algum tipo de dano das mais diversas origens ao SNC (Michetti et al, 1979; Persson et al, 1988; Usui et al, 1994; Nygaard et al, 1997; Green et al, 1997).

Para estudos em LCR de ratos o recurso mais disponível é a implantação cirúrgica de um tubo na cisterna magna, que nos permite coletas sucessivas de um mesmo rato e obtenção de um volume de aproximadamente 190 μ l contra 10 μ l do ventrículo lateral (Huang et al, 1996).

A quantidade de LCR obtido em nossas coletas pela punção direta com agulha 30 1/2 na cisterna magna dos ratos foi variável, sendo que na maioria das vezes coletas de um volume acima de 100 μ l inevitavelmente produziram lesão; além disso esta técnica dificulta as coletas sucessivas de LCR de um mesmo rato. Como o volume mínimo recomendado de amostra para quantificar a proteína S100 β por esta técnica de luminescência é 100 μ l, a diluição das amostras (1/5) se fez necessário para obtenção do

volume mínimo para reação, mesmo quando não se esperava níveis acima do limite máximo de detecção da técnica .

A imunoquantificação da proteína S100 β no LCR e o seu aspecto visual, isto é, presença de hemáceas nos permitiu avaliar a reprodutibilidade das coletas e a extensão do inevitável dano causado às meninges e tecido nervoso adjacentes pela punção da cisterna magna. O dano celular ao tecido nervoso foi menor sempre que um volume de $\leq 100\mu\text{l}$ foi obtido e o aspecto visual do LCR era límpido, sugerindo que se possa provocar uma lesão por aspiração sempre que volumes maiores de LCR forem coletados. Portanto, a interpretação de dados pode ser comprometida pelas variações obtidas na composição do LCR decorrentes dos procedimentos de coleta (Huang et al, 1996).

4.3. A PROTEÍNA S100 β EM SORO DE RATOS

Recentemente Huang et al (1996) demonstraram que diferentes métodos cirúrgicos de coleta de LCR em ratos podem estar associados a variações na concentração de proteína S100 β e outros parâmetros para avaliar dano tecidual.

As três técnicas de coleta de soro utilizadas em nosso laboratório (decapitação, punção intracardiaca e corte na extremidade distal da cauda) também demonstraram níveis variáveis de proteína S100 β , o que de certa forma sugere que se o procedimento de coleta não for bem padronizado também pode levar a erros de interpretação de resultados, como por exemplo, superestimar o conteúdo da proteína.

Os resultados da imunoquantificação da proteína S100 β no soro de ratos indicam que o melhor método de coleta de sangue entre os testados para se avaliar esta proteína é a punção intracardiaca, pois demonstrou melhor reprodutibilidade e concentração inferior ao do LCR (Huang et al, 1996) quando comparado à decapitação e corte na extremidade distal da cauda.

Sugerimos algumas explicações para as diferenças na concentração de proteína S100 β decorrentes das coletas de sangue por decapitação e corte na extremidade distal da cauda e quantificada por quimioluminescência. Na coleta por decapitação provavelmente as amostras de sangue são contaminadas com proteína proveniente do LCR, frações de tecido cerebral e medula espinhal além do conteúdo procedente de linfócitos T. Quando a amostra é obtida da cauda outras fontes de S100 β como melanócitos, adipócitos,

condrócitos e linfócitos poderiam contribuir para contaminação (Haimoto et al; 1987; Kojima et al, 1997).

Outra possibilidade para estas diferenças seria a reação cruzada dos anticorpos anti-S100 β com outros membros da família S100 distribuídos em várias células e tecidos que poderiam ser liberados no espaço extracelular e extravascular no momento da coleta (Zimmer et al, 1995; Schäfer & Heizmann, 1996).

4.4. A PROTEÍNA S100 β EM TECIDO CEREBRAL DE RATOS

As amostras como tecido cerebral de ratos, em que se espera encontrar níveis elevados de proteína S100 β devido à sua localização preferencial no Sistema Nervoso Central, devem ser diluídas de forma que o resultado seja a nova leitura multiplicada pelo fator de diluição. As três diluições testadas 1/10, 1/50, 1/100 foram capazes de trazer as leituras das amostras de tecido cerebral para dentro do limite de detecção da curva de calibração, mas os experimentos de imunoquantificação da proteína S100 β foram realizados na diluição de 1/50.

O conteúdo cerebral de S100 β variou entre as regiões investigadas (cerebelo, córtex e hipocampo), refletindo possivelmente a atividade diferenciada da proteína nas diversas regiões cerebrais. Considerando a co-localização celular da S100 β com GFAP, outra proteína exclusivamente astrocítica, observamos que a fosforilação da GFAP é maior em hipocampo (Rodnight et al, 1991) justamente onde encontramos os menores níveis de S100 β uma proteína que inibe a fosforilação da GFAP nesta região cerebral (Ziegler et al, 1998). Desta forma no hipocampo a GFAP estaria mais fosforilada devido a menor concentração de S100 β . Entretanto não é possível estabelecer uma relação inversa entre a concentração de GFAP e S100 β porque indubitavelmente a proteína S100 β tem muitos alvos e muitas outras funções além de modular os filamentos intermediários em astrócitos. Além disso, o efeito inibitório da fosforilação de GFAP por S100 β em outras áreas cerebrais precisa ser melhor estudado (Portela et al, 1998).

Kato et al (1990) demonstraram que a concentração de proteína S100 β em cerebelo é a maior entre as áreas cerebrais de ratos estudadas, o que podemos confirmar com nossos estudos. Segundo esses autores os níveis da proteína no córtex aumentam com a

idade mas nunca superam os níveis do cerebelo. Uma diferença entre as concentrações de córtex frontal e hipocampo foi encontrada em nossos experimentos quando comparado ao estudo de Linnemann & Skarsfelt (1994), que demonstraram que o hipocampo tem níveis maiores da proteína S100 β que no córtex frontal de ratos, ao contrário do que encontramos. Por sua vez Linneman & Skarsfelt (1994) relataram que a proteína S100 β diminui com o aumento da idade em córtex frontal o que contraria os resultados descritos por Kato et al (1990). A controvérsia nestes estudos torna evidente que uma melhor investigação será necessário, não somente para identificar as causas destas variações da concentração de proteína S100 β , mas também esclarecer seus aspectos funcionais nas diferentes regiões cerebrais (Van Eldik & Zimmer, 1988).

4.5. A INFLUÊNCIA DO CÁLCIO, EGTA E CITRATO NA REAÇÃO DE IMUNOQUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA S100 β

O reconhecimento da proteína S100 β pelos anticorpos anti-S100 β foi influenciado pelo Ca²⁺, e pelo o uso de citrato de sódio (0,8%) e EGTA (1mM). A mudança da imunorreatividade de proteínas ligantes de cálcio pode depender do seu estado ligante de cálcio. Esse fato foi descrito inicialmente para parvalbumina, calretinina, e calbindina (Winsky & Kuznicki, 1996) e mais recentemente para proteínas como calmodulina, calcineurina- β e S100 β (Gonçalves et al, 1997). Há anticorpos anti-proteínas ligantes de cálcio cuja imunorreação não é afetada pela presença de cálcio como, por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-S100 β SH-b1 da SIGMA, entretanto o clone SH-b4 é afetado. Até o momento havia se observado que na presença de cálcio alguns anticorpos têm sua imunorreação favorecida. Os anticorpos, ou pelo menos um deles, que compõem o kit da Sangtec Medical usado neste trabalho formam o complexo antígeno anticorpo mais eficientemente na ausência de cálcio. Este fato alerta, mais uma vez, a importância do estado ligante de cálcio no imunoreconhecimento destas proteínas, cujo desconhecimento pode alterar a interpretação dos resultados. Neste caso específico, fica a observação de que a coleta de material biológico na presença de quelantes de cálcio, como anticoagulantes, inibidores de proteases ou antioxidantes, podem afetar a quantificação da proteína S100 β com o kit da Sangtec Medical.

Entretanto, a influência da presença de interferentes químicos e do cálcio no meio de incubação desta reação de quimioluminescência precisa ser melhor investigada em amostras biológicas como soro, plasma e líquido, pois os experimentos realizados neste trabalho utilizaram solução padrão de S100 β de concentração 0,2 μ g/L diluída em tampão fosfato adicionado de albumina de soro bovino. Portanto, nas condições estudadas, o uso de uma única concentração de proteína S100 β em um meio não biológico não nos permite “*per se*” afirmar se a ausência ou diminuição do cálcio exclusivamente provoca um efeito favorecedor da reação antígeno anticorpo. Ainda, se a maior imunodeteção obtida na presença de quelantes de cálcio é resultado da maior afinidade dos anticorpos da Sangtec Medical, ou consequência de reações inespecíficas que de alguma maneira poderiam superestimar a concentração da proteína S100 β . Finalmente, levando em consideração estas observações, sugerimos que para imunoquantificação da proteína S100 β as amostras biológicas sejam coletadas sem aditivos, cujo grau de influência no imunoensaio precisa ser melhor estabelecida.

5. APLICAÇÃO CLÍNICA EM HUMANOS

5.1. Aumento da Proteína S100 β no Soro de Pacientes com Mielopatia Associada ao Vírus HTLV-I

Trabalho de investigação clínica envolvendo o Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Laboratório Nobel-RIE e Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

Participantes:

Departamento de Bioquímica: Luis V. Portela, Carlos A. Gonçalves, Adriano Tort, Roger Walz, Diogo O. Souza.

Serviço de Neurologia do HCPA: Luis Nelson Fernandes.

Laboratório Nobel-RIE: Eurico C. Neto

RESUMO:

Em cerca de 1% dos indivíduos infectados, o vírus HTLV-I (human T cell lymphotropic virus Type I), um vírus da família dos retrovirus, causa uma doença inflamatória crônica do Sistema Nervoso Central chamada mielopatia associada ao HTLV-I (do inglês HAM) ou paraparesia tropical espástica. Um importante pré-requisito para o surgimento da doença é a proliferação de linfócitos CD4+ infectados com HTLV-I, sua passagem através da BHE, a expressão das proteínas virais no SNC e um aumento da resposta imune dentro do SNC (Kitze & Brady, 1997; Izumo et al, 1997).

Inicialmente foi considerada uma doença endêmica em regiões tropicais, entretanto HAM tem sido diagnosticada em várias regiões do mundo. Os sintomas clínicos mais evidentes estão relacionados com a destruição de mielina e axônios ao longo da medula espinhal, fraqueza progressiva nos membros inferiores associada com sinais piramidais e distúrbios autonômicos. Lesões da substância branca no cérebro, lesão de nervos periféricos e doenças sistêmicas também estão associadas a esta doença (Gessain et al, 1985; Molgard et al, 1989; Osame et al, 1990).

Stanley et al (1994) relataram um aumento da liberação de citocinas incluindo S100 β decorrente da resposta imune no cérebro de pacientes infectados com o vírus HIV (também da família dos retrovírus), sendo que esta reação imune provoca progressiva

neurodegeneração e demência. Cartier et al (1997) descreveram um caso clínico de demência associada ao vírus HTLV-I referindo também alterações de neuroimagem.

Com o objetivo de se identificar um marcador neuroquímico que seja expresso no sangue e LCR antes do aparecimento de lesões cerebrais ou desenvolvimento de HAM e considerando que o vírus HTLV-I também provoca um aumento da liberação de citocinas no sangue e LCR, medimos em um grupo de oito (08) pacientes diagnosticados com o HAM, provenientes do Serviço de Neurologia do HCPA, os níveis da proteína S100 β no LCR e soro por um ensaio de quimioluminescência. Houve um significativo aumento nos níveis da proteína no soro de indivíduos com HAM, enquanto que a concentração no LCR não demonstrou variação, como está representado na **Figura 8a, b**.

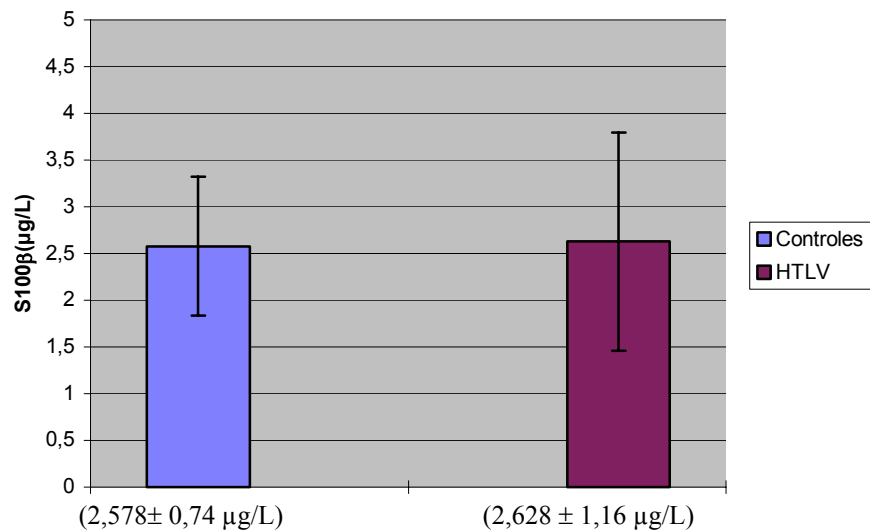


Figura 8a. Níveis de S100β em pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I

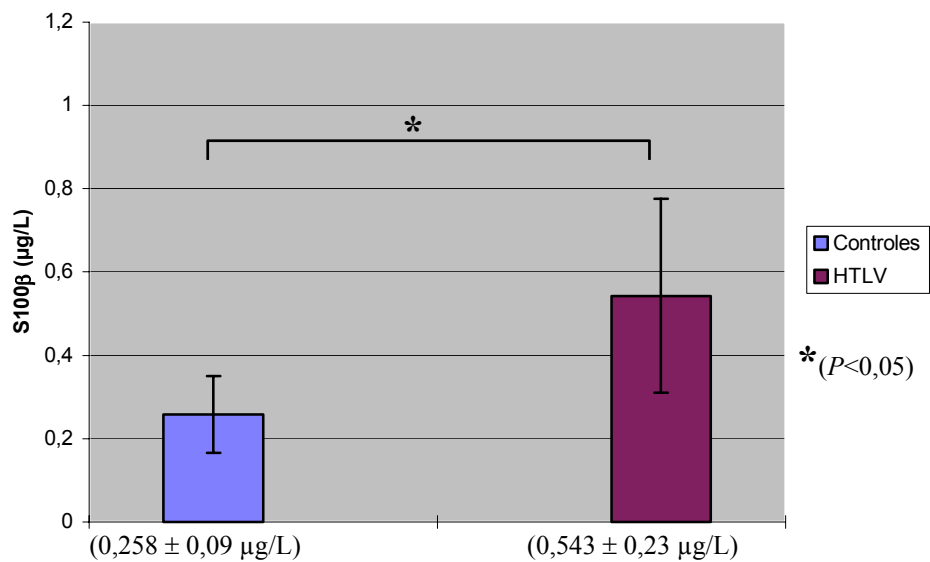


Figura 8b. Níveis de S100β no soro de pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I

5.2. A Proteína S100 β como Marcadora Bioquímica de Síndrome de Down em Triagem Neonatal.

Trabalho de investigação clínica envolvendo o Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

Participantes:

Departamento de Bioquímica: Luis V. Portela, Carlos A. Gonçalves, Adriano Tort, Diogo O. Souza.

Serviço de Genética Médica do HCPA: Roberto Giugliani

Laboratório Nobel-RIE: Eurico C. Neto

RESUMO:

As medidas de prevenção de defeitos congênitos têm despertado interesse nas últimas décadas, uma vez que as possibilidades de tratamento efetivo para a maioria das doenças genéticas e mal formações congênitas ainda são limitadas. Entre essas medidas destaca-se o diagnóstico pré-natal de anomalias cromossômicas, cuja incidência aumenta com a idade materna e são responsáveis por 50% dos abortos espontâneos. Uma das anomalias cromossômicas mais conhecidas é a Síndrome de Down ou trissomia do cromossomo 21 (T21) cuja incidência é 1 caso em cada 700 nascimentos (Becker et al, 1993; Milunski et al, 1997).

Programas de diagnóstico pré-natal de anomalias cromossômicas são utilizados rotineiramente nas gestações acima de 35 anos de idade, esses programas se baseiam em métodos invasivos como amniocentese e a coleta de vilosidades coriônicas. Embora eficientes estes métodos baseados na coleta de material fetal têm algumas limitações como perda fetal em 0.5 - 1 % dos casos e análise laboratorial demorada e custos elevados (Becker et al, 1993; Milunski et al, 1997).

A proteína S100 β é codificada por um gene localizado em 21q22.2-q22.3, exatamente a região crítica para a Síndrome de Down. De fato, altos níveis de S100 β têm sido encontrados em cérebro de indivíduos com esta doença e sua quantidade parece estar relacionada ao grau de retardo mental (Marks & Alore, 1990).

Imunoquantificamos a proteína S100 β em fluido amniótico de cinco (05) gestantes previamente submetidos ao exame do cariótipo cujos resultados foram positivos para Síndrome de Down, e cinco (05) amostras de fluido amniótico negativas ao exame do cariótipo a quaisquer alterações cromossômicas. Os resultados demonstraram um significativo aumento nos níveis da proteína S100 β em gestantes com fetos portadores de Síndrome de Down, como está demonstrado na **Figura 9**.

Estamos desenvolvendo um projeto em conjunto com os serviços citados neste trabalho para no futuro avaliar as variações dos níveis desta proteína também no sangue, além do fluido amniótico das gestantes que serão submetidas à amniocentese.

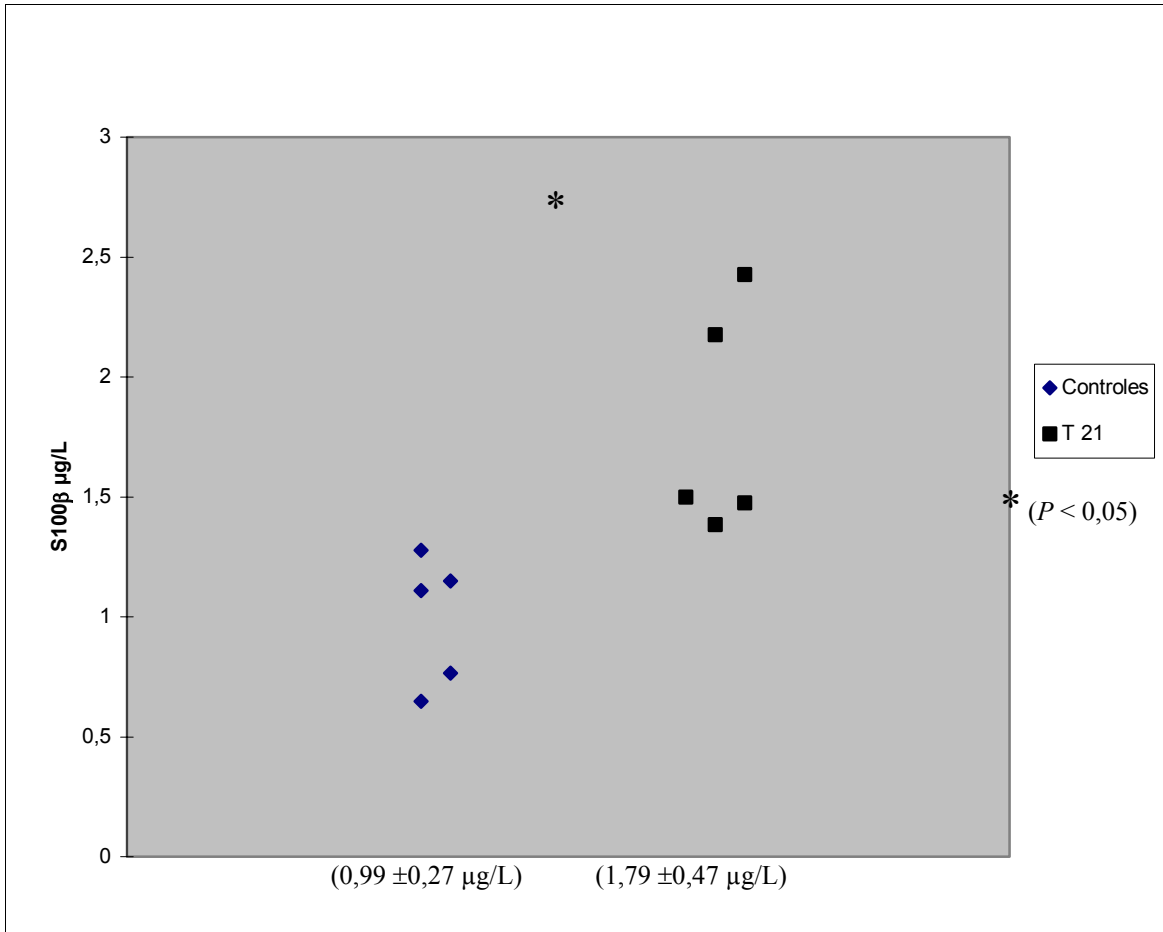


Figura 9. Níveis de S100β no fluido amniótico de gestantes em cujos fetos foi diagnosticada Síndrome de Down.

6. CONCLUSÕES

1. Foi possível estabelecer condições padrões para o uso do imunoenensaio por quimioluminescência da Sangtec Medical para amostras biológicas de ratos e de humanos.
2. O imunoenensaio apresentou:
 - 2.1. Uma curva padrão linear e com alta reprodutibilidade, com pouca variabilidade entre os ensaios;
 - 2.2. uma alta sensibilidade (0,02 $\mu\text{g/L}$) equivalente ou superior aos ensaios disponíveis.
 - 2.3. alta especificidade para a subunidade beta. Não apresentou reação cruzada com a subunidade alfa, uma proteína com alta homologia e também presente no tecido cerebral;
 - 2.4. instabilidade dos reagentes que compõem o iniciador (“starter”) o que exige o uso dentro de 24 horas após o preparo;
 - 2.5. uma interferência pela presença de citrato de sódio e EGTA nas amostras. A razão e a intensidade dessa interferência precisa ser melhor investigada. Por ora sugerimos o uso de amostras sem esses aditivos.
3. A alta sensibilidade do imunoenensaio por quimioluminescência permite avaliar o conteúdo de S100 β em soro ou plasma sangüíneo, onde comumente outros imunoenensaiois apresentam sensibilidade insuficiente.
4. Em ratos, a forma da coleta de sangue (punção intracardiaca, decapitação e corte na extremidade distal da cauda) afetou os valores finais do imunocónteuódo de S100 β . Somente com a punção intracardiaca foram obtidos valores inferiores ao LCR.
5. O imunocónteuódo de S100 β variou entre as regiões analisadas em ratos: cerebello > córtex > hipocampo.
6. A alta sensibilidade permitiu a quantificação em fluído amniótico de humanos abrindo a perspectiva de investigação do conteúdo da proteína S100 β como teste de triagem de anomalia cromossômica (Síndrome de Down) em gestantes de alto risco.

7. A proteína S100 β está aumentada em fluido amniótico de mães grávidas de fetos portadores de Síndrome de Down.
8. Os níveis da proteína S100 β em LCR de pacientes diagnosticados com mielopatia associada ao vírus HTLV-I não foram diferentes dos controles, entretanto no soro a concentração aumentou duas vezes quando comparado aos controles.

CONCLUSÃO FINAL

O conteúdo de S100 β quantificado por LIA mostrou sensibilidade, especificidade, linearidade e reprodutibilidade, que permite a quantificação da proteína em LCR, soro ou fluido amniótico e portanto possibilita o uso clínico e experimental da S100 β como marcador bioquímico em muitas danos cerebrais.

7. REFERÊNCIAS:

1. Allore R., O'Hanlon D., Price R., Neilson K., et al. Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science*, 11:239(4845):1311-3, 1988.
2. Aurell, A., Rosengren, L.E., Wikkelso, C., Norberg, G., Haglid, K. G. The S-100 protein in cerebrospinal fluid:a simple ELISA method. *J. Neurol. Sci*, 89:157, 1989.
3. Azmitia, E.C., Griffin, S.T., Marshak, D.R., Van Eldik, L.J., Whitaker-Azmitia, P.M. S100 β and serotonin: a possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*, 94: 459-473, 1992.
4. 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.
5. Baudier, J., Glasser, N., Gerard D. Calcium and zinc-binding properties of bovine brain S100 $\alpha\alpha$, S100a ($\alpha\beta$), and S100b ($\beta\beta$) protein: Zn⁺² regulates Ca⁺² binding on S100b protein. *J Biol Chem*, 261(18):8192-8203, 1986.
6. Baudier, J., Gerard, D. Conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 $\alpha\alpha$ protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a ($\alpha\beta$) protein. *J Biol Chem*, 261(18):8204-12, 1986.
7. Baudier, J., Delphin, C., Grunwald, D., et al. Characterisation of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad*, 89:11627-11631, 1992.
8. Becker L.E. et al. Association of phenotypic abnormalities of Down syndrome with na imbalance of genes on chromosome 21. *APMIS Suppl*, 40:57-70, 1993.

9. Bianchi, R., Giambanco, H., Donato, R. S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca^{+2} -dependent manner. *J Biol Chem*, 268(17):12669-74, 1993.
10. Bianchi, R., Verzini, M., Garbuglia, M., Giambanco, I., Donato, R. Mechanism of S100 protein-dependeent inhibition of glial fibrillary acidic protein (GFAP) polymerization. *Biochim Biophys Acta*, 1223:354-60, 1994.
11. Cartier L., Gormaz A., Kleinstauber K., Ramirez E., Galeno H. New form of subcortical dementia: encephalopathy due to infection with human lynchotropic T virus (HTLV-1). Clinical case. *Rev Med Chil*, 125(2):209-13, 1997.
12. Donato, R. S-100 proteins. *Cell Calcium*, 7(3):123-45, 1986.
13. Donato, R. Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium*, 12(10):713-26, 1991.
14. Donato, R. S100 as potential regulators of the dynamics of cytoskeleton constituents. Fifth European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells, Muenster ; 1998, 88. Resumo.
15. Dudley, R.F. Chemiluminescence immunoassay an alternative to radioimmunoassay *American Journal of Clinical Pathology*, 93(4), 1990.
16. Fagnart, O.C., Sindic C.J., Laterre, C. Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system. *Clin Chem*, 34(7): 1387-1391, 1988.
17. Fanno, G., Fulle, S., Torre, G., Giambanco, I., Aisa, M.C., Donato, R., Calissano, P. S100b regulates the activity of skeletal muscle adenilate cyclase in vitro. *FEBS Letters*, 240:177-180, 1998;.

18. Fulle, S., Mariggio, M.A., Fano, G., et al. Activation of brain adenylate cyclase by S100 protein via a possible interaction with G-protein(s). *Neurosci Res Com*, 10(1):35-44, 1992.
19. Fulle, S., Mariggio, M.A., Belia, S., Nicoletti, I., Fanò, G. Nerve growth factor inhibits apoptosis induced by S-100 binding in neuronal PC12 cells. *Neuroscienc*, 76(1): 159-166, 1997.
20. Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al: antibodies to human T-lymphotropic virus type 1 in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 4-7-410.
21. Gonçalves, C.A., Goottfried, C., Kommers, T., Rodnight, R. Calcium-modulated proteins change their immunoreactivity in the presence of Ca^{+2} : a study of antibody recognition in a dot immunoassay for calmodulin, calcineurin (β -subunit), and S100B. *Analytical Biochemistry*, 253:1277-130, 1997.
22. Green, A.J., Harvey, R.J., Thompson, E.J., Rossor, M.N. Increased S100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett*, 10;235(1-2):5-8, 1997.
23. Green, A.J.E., Keir, G., Thompson, E.J. A specific and sensitive ELISA for measuring S100B in cerebrospinal fluid. *J Immunol Meth*, 205:35-41, 1997.
24. Haimoto, H., Hosoda, S., Kato, K. Differential distribution of immunoreactive S100 α and S100 β proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest*, 57(5): 489-498, 1987.
25. Hansson, L.O., Djuren, E., Dijlai-Merzog, R., Nilsson, B., Hansson, J. S100B: a prognostic marker in malignant melanoma. *Clin Chem*, 44(6)Suppl:A46, 1998.

26. Heizmann, C.W. Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *Gen Physiol Biophys*, 11(5):411-25, 1992.
27. Heizmann, C.W., Braun K. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 15(7):259-64, 1992.
28. Hidaka, H., Watanabe, M. Calcium protein signaling. *Nippon Rinsho*, 51(5):1151-5, 1993.
29. Hu, J., Van Eldik, L.J. S100 β induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1313:239-245, 1996.
30. Hu, J., Ferreira, A., Van Eldik, L.J. S100B induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, 69(6):2294-2301, 1997.
31. Huang, Y., Säljö, A., Suneson, A., Hansson, H. Comparison among different approaches for sampling cerebrospinal fluid in rats. *Brain Res Bull*, 41(5): 273-279, 1996.
32. Ingebrigtsen, T., Romner, B., Kongstad, P., Langbakk, B. Increased serum concentrations of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 45:1130-5, 1982.
33. Ingebrigtsen, T., Romner, B., Trumpy, J.H. Management of minor head injury: the value of early computed tomography and serum protein S-100 measurements. *J Clin Neurosci*, 4(1):29-33, 1997.
34. Isobe, T., Okuyama, T. The amino acid sequence of S-100 protein (PAP I-b) and its relationship to calcium-binding proteins. *Eur. J. Biochem*, 89:379-388, 1978.
35. Isobe, T., Okuyama, T. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S100a protein. *Eur J Biochem*, 116(1):79-86, 1981.

36. Isobe, T., Ishioka, N., Okuyama, T. Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. *Eur J Biochem*, 115(3):469-74, 1981.
37. Isobe, T., Ishioka, N., Masuda, T., Takahashi, Y., Ganno, S., Okuyama, T. A rapid separation of S100 subunits by high performance liquid chromatography: the subunit compositions of S100 proteins. *Biochem Int*, 6(3):419-26, 1983.
38. Isobe, T., Takahashi, K., Okuyama, T. S100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem*, 43(5):1494-6, 1984.
39. Izumo S., Umehara F., Kashio N., et al. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Leukemia*, 11(3):82-4, 1997.
40. Jensen, R., Marshak, D.R, Anderson, C., Lukas, T.J., Watterson, D.M. Characterization of human brain S100 protein fraction: amino acid sequence of S100 beta. *J Neurochem*, 45(3):700-5, 1985.
41. Johnsson, P., Lundqvist, C., Lindgren, A., Ferencz, I., et al. Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 9(6):694-699, 1995.
42. Johnsson, P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 10(1): 120-126, 1996;.
43. Kato, K., Nakajima, T., Ishiguro, Y., Matsutani, T. Sensitive enzyme immunoassay for S-100 protein in human cerebrospinal fluid. *Biomed. Res*, 3(1)24, 1982.
44. Kato, K., Kimura, S. S100a0 (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochim Biophys Acta*, 842(2-3):146-50, 1985.
45. Kato, K., Suzuki, F., Morishita, R., Asano, T., Sato, T. Selective Increase in S100B protein by aging in rat cerebral cortex. *J Neurochem*, 54(4): 1269-1274, 1990.

- 46.Kitze B., Brady J.N. Human T cell lymphotropic retroviruses: association with diseases of the nervous system. *Intervirology*, 40(2-3):132-142, 1997.
- 47.Kligman, D., Marshak, D.R. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(20):7136-9, 1985.
- 48.Kojima, K., Wekerle, H., Lassmann, H., Berger, T., Linington, C. Induction of experimental autoimmune eencephalomyelitis by CD4⁺ T cells specific for an astrocyte protein, S100B. *J Neural Transm Suppl*, 49:43-51, 1997.
- 49.Kretsinger, R.H., Nockolds, C.E. Carp muscle calcium-binding protein II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem*, 248:3313-3326, 1973.
- 50.Kretsinger, R.H. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev Biochem*, 8(2):119-74, 1980.
- 51.Kretsinger, R.H., Tolbert, D., Nakayama, S., Pearson, W. The EF-Hand, homologs and analogs. In: Heizmann, C.W., ed. Novel calcium-binding proteins. Berlin: Springer-Verlag, 17-38, 1991.
- 52.Linnemann, D., Skarsfelt, T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiol Aging*, 15(5): 651-655, 1994.
- 53.Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-75, 1951.
- 54.Marks, A., Allore R. S100 protein and Down syndrome. *Bioessays*, 12:381-3, 1990.
- 55.Marshak, D.R. S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res*, 86:169-81, 1990.
- 56.Marshak, D.R., Pesce, S.A., Stanley, L.C., Griffin, W.S. Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging*, 13(1):1-7, 1992.

57. Marshak, D.R., Pena, L.A. Potential role of S100 beta in Alzheimer's disease: an hypothesis involving mitotic protein kinases. *Prog Clin Biol Res*, 379:289-307, 1992.
58. Matsumura H., Shiba T., Inoue T., Harada S., Kay Y. A novel mode of target recognition suggested by the 2.0 Å structure of holo S100B from bovine brain. *Structure*, 15;6(2):233-41, 1998.
59. Mely, Y., Gerard, D. Large-scale, one-step purification of Oxidized and Reduced forms of bovine brain S100b protein by HPLC. *J Neurochem*, 50:739-744, 1988.
60. Mely, Y., Gerard, D. Intra- and interchain disulfide bond generation in S100b protein. *J Neurochem*, 55:1100-1106, 1990.
61. Messeri, G., Orlandini, A., Pazzagli, M. Luminescent immunoassay using isoluminol derivatives. *J Biolumin Chemilumin*, 4(1):154-8, 1989.
62. Michetti, F., Massaro, A., Maurazio, M. The nervous system-specific S100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett*, 11(2):171-5, 1979.
63. Milunsky A. The use of biochemical markers in maternal serum screening for Chromosome Defects. In: Milunsky A., ed.: Genetic Disorders and the Fetus. New York, Johns Hopkins University Press, 1997.
64. Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H., Goodman M. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J Mol Evol*, 30(6):522-62, 1990.
65. Molgaard CA, Eisenman PA, Ryden LA, Golbeck AL. Neuroepidemiology of human T-lymphotropic virus type-I-associated spastic paraparesis. *Neuroepidemiology* 1989; 8:109-123.
66. Moore, B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 19(6): 739-744, 1965.

67. Nygaard, O., Langbakk, B., Romner, B. Age- and sex-related changes of S100 protein concentration in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. *Clin Chem*, 43(3):541-3, 1997.
68. Ogama, Y., Kobayashi, H., Toshihiro, F., Kondo, Y. Binding study of metal ions to S100 protein: ^{43}Ca , ^{25}Mg , ^{67}Zn , and ^{39}K n.m.r. *Int J Biol Macromol*, 14:279-88, 1992.
69. Osame M, Janssen R, Kubota H, et al. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol* 1990; 28: 50-56.
70. Persson, L., Härdemark, H., Edner, G., Ronne, E., et al. S100 protein in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid haemorrhage: a potential marker of brain damage. *Acta Neurochir*, 93: 116-122, 1988.
71. Portela, L. C . S100B inhibits in vitro GFAP phosphorylation. Fifth European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells, Muenster; 1998,100. Resumo.
72. Price CP, Newman DJ. Principles and practice of immunoassay. Second edition, 1997.
73. Rodnight, R., Gonçalves, C.A., Leal, R., Rocha, E., Salbego, C., Wofchuk, S. Regional distribution and properties of an enzyme system that phosphorylates ppH47, an insoluble protein highly labelled in tissue slices from the hippocampus. *Progress in Brain Res.*, 89:157-161, 1991.
74. Rodnight R, Gonçalves C.A., Wofchuk S.T., Leal R. Control of the phosphorylation of astrocyte marker GFAP in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Brazilian Journal of Medicine Biological Research*, 30:325-38, 1997.

75. Rosén, H., Rosengren, L., Herlitz, J., Blomstrand, C. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke*, 29: 473-477, 1998.
76. Schäfer, B.W., Heizmann, C.W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*, 21: 134-140, 1996.
77. Schoultz, E., Hansson, L.O., Dijureen, E., et al. Prognostic value of serum analyses of S100B protein in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 6:133-7, 1996.
78. Selinfreund, R.H., Barger, S.W., Pledger, W.J., Van Eldik, L.J. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 88(9):3554-8, 1991.
79. Shashoua, V.E., Hesse, G.W., Moore, B.W. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J. Neurochem*, 42:1536-1541, 1984.
80. Simonian, A., Baudier, J., Haglid, K.G. Modulation of ATPase activities in the central nervous system by the S-100 proteins. *Neurochem Res*, 14(8):761-764, 1989.
81. Stanley, L.C., Mrak, R.E., Woody, R.C. et al. Glial cytokines as neuropathogenic factors in HIV infection: pathogenic similarities to Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53(3):231-8, 1994.
82. Suzuki, F., Kato, K., Kato, T, Ogasawara, N. S100 protein in clonal astrogloma cells is released by adrenocorticotrophic hormone and corticotropin-like intermediate-lobe peptide. *J Neurochem*, 49:1557-63, 1987.
83. Takashi, M., Haimoto, H., Murase, T., Mitsuya, H., Kato, K. An immunochemical and immunohistochemical study of S100 protein in renal cell carcinoma. *Cancer*, 61(5):889-95, 1988.

84. Usui, A., Kato, K., Murase, M., Hotta, T., Tanaka, M., et al. Neural tissue-related proteins (NSE, G₀α, 28 kDa calbindin-D, S100b and CK-BB) in serum and cerebrospinal fluid after cardiac arrest. *J Neurol Sci*, 123:134-9, 1994.
85. Van Eldik, L. J., Zimmer, D.B. Secretion of S-100 from rat c6 glioma cells. *Brain Res*, 436:367-370, 1987.
86. Van Eldik, L.J., Zimmer, D.B. Approaches to study the role of S100 proteins in calcium-dependent cellular responses. *J Dairy Sci*, 71:2028-34, 1988.
87. Waterloo, K., Ingebrigtsen, T., Romner, B. Neuropsychological function in patients with increased serum levels of protein S-100 after minor head injury. *Acta Neurochir*, 139:26-32, 1997.
88. Westaby, S., Johnsson, P., Parry, A.J., et al. Serum S100 protein: a potential marker for cerebral events during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 61:88-92, 1996.
89. Wiesmann, M., Missler, U., Gottmann, D., Gehring, S. Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age- and sex-independent. *Clin Chem*, 44(5):1056-7, 1998.
90. Wilder, P.T., Richard, R.R., Drohat, A.C., Weber, D.J. S100B (bb) inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a Ca⁺²-dependent manner. *Protein Sci*, 7:794-98, 1998.
91. Winsky, L., Kuznicki, J. Antibody recognition of calcium-binding proteins depends on their calcium-binding status. *J Neurochem*. Feb;66(2):764-71, 1996.
92. Wofchuk ST, Rodnight R. Age-dependent changes in the regulation by external calcium ions of the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in slice of rat hippocampus. *Dev Brain Res* 85:181-6, 1995.

93. Ziegler, D.R., Innocente, C.E., Leal R.B., Rodnight, R., Gonçalves, C.A. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res*, 23(10):1259-63, 1998.
94. Zimmer, D.B., Van Eldik, L.J. Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and S100-binding proteins. *Am J Physiol*, 252(3 Pt 1):C285-9, 1987.
95. Zimmer, D.B., Cornwall, E.H., Landar, A., Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*, 37(4): 417-429, 1995.