



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

ESTUDO DA PROTEÍNA S100B EM RESPOSTA AO LPS EM RATOS WISTAR

Leticia DapontToniolli

Orientador
Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ÊNFASE MOLECULAR, CELULAR E FUNCIONAL

Porto Alegre
2012

Apresentação

Este projeto faz parte do meu Trabalho de Conclusão de Curso em ciências biológicas, UFRGS. E segue o modelo da revista *Journal of Neuroinflammation*, porém redigido em português e contendo apenas os primeiros dados preliminares do projeto. Constando que esses experimentos serão repetidos.

Agradecimentos
Aos professores, amigos, colegas de laboratório e principalmente a minha família, que
sempre me apoiou muito.
Ao órgão financiador CNPq.

ESTUDO DA PROTEÍNA S100B EM RESPOSTA AO LPS EM RATOS WISTAR**Leticia Dapont Toniolli, Lucas Silva Tortorelli, Adriana Fernanda Kuckartz****Vizuete, Tadeu Mello e Souza, Carlos Alberto Gonçalves[§]**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, Brasil

[§] Autor correspondente: Carlos Alberto S. Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brasil

E-mail: leticiatoniolli@yahoo.com.br

Fax: 55-51-3308 5566

E-mail dos autores:

Lucas Tortorelli: lucastorto@yahoo.com.br

Adriana Fernanda KuckartzVizuete: adrivizu@yahoo.com.br

Tadeu Mello e Souza: tmelloesouza@yahoo.com.br

Carlos-Alberto Gonçalves: casg@ufrgs.br

Resumo

Introdução: A S100B, proteína ligante de cálcio está altamente expressa em astrócitos. Essa proteína pode ter caráter trófico ou apoptótico, dependendo de sua concentração, portanto é estudada como marcador de injúria cerebral, estando relacionada a doenças neurológicas e psiquiátricas. Como se sabe, essas doenças possuem um perfil inflamatório relacionado à ativação da microglia e dos astrócitos, dito neuroinflamação. Há uma molécula presente na parede celular de bactérias gram-negativas capaz de induzir neuroinflamação, o lipopolissacarídeo LPS que já demonstrou ser capaz de aumentar expressão de citocinas pró-inflamatórias, gerando um processo denominado “sickness behavior” e podendo ser prejudicial para a os processos de aprendizagem e memória. **Material e Métodos:** Frente a esses estudos e no intuito de avaliar a resposta da proteína S100B ao estímulo inflamatório utilizamos 45 ratos Wistar machos (60 dias). Esses animais foram divididos em grupo Controle (PBS), administração aguda de LPS 250 µg/K e LPS 2500 µg/Kg. O tratamento foi administrado agudamente através de injeção intraperitoneal (i.p.) e os parâmetros neuroinflamatórios coletados conforme os tempos estabelecidos para a curva (1 hora, 24 horas e 7 dias). Alguns grupos também foram treinados e testados na tarefa de esQUIVA inibitória, a fim de avaliar sua capacidade de aprendizado e a relação da S100B em processos cognitivos. **Conclusão:** Nossos resultados demonstraram que houve perda de peso nos animais tratados com LPS 24 horas. Os níveis de S100B no soro e no LCR não apresentaram alterações significativas, mas observou-se uma tendência ao aumento dos níveis de S100B do LCR no tempo 24 horas em animais tratados com LPS. Na esQUIVA inibitória o LPS 2500 /Kg (em 7 dias) apresentou-se como facilitatório no processo de aprendizagem. Estes achados são resultados preliminares desde projeto, sendo necessário que se repitam os experimentos e dosagens, afim de melhor elucidar o efeito das diferentes concentrações de LPS em diferentes períodos de tempo.

Palavras-chave: Neuroinflamação, S100B, LPS.

Introdução

A S100B é uma proteína ligante de cálcio da família das S100, sendo altamente expressa e secretada por astrócitos do sistema nervoso central, mas que também está presente em outros tipos celulares como oligodendrócitos, adipócitos e certas populações neuronais, entre outras [1]. Esta proteína desempenha um papel regulatório do citoesqueleto e do ciclo celular, intracelularmente. Extracelularmente, pode apresentar função trófica em astrócitos, neurônios e microglia, quando em concentrações nanomolares. Já em concentrações micromolares pode apresentar caráter apoptótico [4]. Em situações de injúria cerebral, a S100B tem sido utilizada como marcador de ativação astrogliar, bem como alterações do líquido cefalorraquidiano dessa proteína tem sido relacionados a várias desordens neurológicas e psiquiátricas. Além disso, a S100B pode estar envolvida em processos neuropatológicos através da ativação da microglia [10]. Visto que desordens neurológicas e psiquiátricas apresentam um perfil inflamatório, acredita-se que a S100B desempenhe papel de citocina [5].

A microglia é a principal mediadora de processos de neuroinflamação, mas também se acredita que haja participação astrocitária, uma vez que essas células possuem receptores do tipo toll 4 (TLR4). Esses receptores estão relacionados ao sistema imune reconhecendo especificamente o lipopolissacarídeo presente na parede celular de bactérias gram-negativas, o LPS, conhecido por induzir respostas inflamatórias [3]. O LPS é capaz de provocar a secreção de citocinas pró-inflamatórias e macrófagos e microglias [6], podendo também modular respostas astrocitárias através de alterações na expressão proteica. Havendo estudos que demonstram que a neuroinflamação induzida por LPS pode prejudicar o aprendizado e a memória [6, 9]. Entretanto, a progressão do processo neuroinflamatório em doenças neurodegenerativas permanece obscura em diversos aspectos, como a própria quantidade de S100B em diferentes compartimentos quando estimuladas pelo LPS.

Com base nesses apontamentos, o objetivo desse trabalho foi avaliar a concentração de S100B em diferentes compartimentos em animais estimulados com LPS, em uma curva de concentração e tempo.

Material e Métodos

Animais: Foram utilizados quarenta e cinco ratos Wistar (60 dias, pesando entre 250 e 300 gramas) provenientes do biotério central da UFRGS mantidos sob controle de luminosidade e temperatura (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro em constantes $22 \pm 1^\circ\text{C}$) e comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o manual do National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23).

Os animais foram divididos em grupos de cinco animais por tratamento: Controle (PBS) 1h, Controle (PBS) 24h, Controle (PBS) 7dias, LPS 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 1h, LPS 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 24h, LPS 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 7dias, LPS 2500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 1h, LPS 2500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 24h e LPS 2500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 7dias.

Injeção intraperitoneal (i.p.): Nos grupos do tempo 1 hora foi realizado o tratamento através de injeção intraperitoneal de PBS, LPS 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ou LPS 2500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, e após uma hora, os animais foram anestesiados com injeção i.p. de xilazina (75 mg/Kg) mais cetamina (10 mg/Kg) e posteriormente colocados no aparelho estereotáxico para a coleta do LCR, através de punção da cisterna magna. Também foi coletado sangue via punção cardíaca, após as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3000 rpm por 12 minutos para coletar-se o soro. As amostras foram armazenadas a -70°C para posterior análise.

Os animais dos grupos 24 horas e 7 dias receberam injeção i.p. através do mesmo procedimento acima e após vinte minutos foram submetidos ao treino de esquiva inibitória.

Esquiva Inibitória: A esquiva inibitória consiste em uma caixa iluminada (Albarsch; lâmpada 15 W) contendo uma plataforma de 2,5 cm de altura sobre uma grade de aço (42 x 25 cm; barras com espaçamento 1 cm e de calibre 0,1 cm). Os animais foram colocados na plataforma e a latência para que o animal descesse com as quatro patas foi cronometrada. No treino, quando o animal desce da plataforma com as quatro patas ele recebe um choque de 0,4 mA por dois segundos [7]. O tempo limite dado ao animal para descer da plataforma é de cento e oitenta segundos. O teste é feito vinte e quatro horas pós-treino ou 7 dias pós-treino e o tempo para que o animal desça é novamente mensurado, porém não é dado choque.

Análises bioquímicas: O conteúdo de S100B foi mensurado no soro e no LCR através do método de ELISA.

Protocolo de ELISA para S100B: O ensaio de ELISA para S100B foi realizado como descrito previamente em [2]. Brevemente, 50 uL de amostra de soro ou LCR diluídas na proporção 1:5 e 1:15, respectivamente mais 50 uL de Tampão Tris/Ca⁺² 50 mM/0,2 mM (pH 8,6) foram incubados por 2 h à 37°C sobre a placa previamente coberta com anticorpo monoclonal anti-S100B (1:1000). Anticorpo anti-S100 policlonal (1:5000) foi incubado por 30 minutos à 37°C seguido de um anticorpo anti-*rabbit* IgG conjugado à peroxidase (1:5000) incubado por mais 30 minutos à mesma temperatura. Finalmente, a reação de cor foi produzida com o-fenildiamina (OPD) por 30 minutos à temperatura ambiente e a leitura foi realizada a 492 nm. A curva padrão para S100B variou de 0,001 a 1 ng/mL.

Materiais – anticorpo monoclonal anti-S100B (SH-B1) e lipopolissacarídeo *Escherichia coli* (LPS) provindos da empresa Sigma. Anticorpo polyclonal anti-S100B e anti-*rabbit* peroxidase provindos da empresa DAKO and GE, respectivamente.

Análise Estatística: A análise individual dos grupos da esquia inibitória foi feita através do teste não-paramétrico pela ANOVA de Wilcoxon e de Friedman, e entre os grupos através pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise dos níveis de S100B foi realizada através de teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Resultados

Alterações do peso

Os animais dos grupos Controle, LPS 250 µg/Kg, LPS 2500 µg/Kg do tempo 24 horas foram pesados no dia do tratamento e 24 horas após. Houve uma diminuição no peso em ambas as doses de LPS em relação ao controle, confirmado pelo teste estatístico não-paramétrico ANOVA de Wilcoxon ($p=0,028$). Já os animais dos grupos Controle, LPS µg/Kg, LPS 2500 µg/Kg do tempo 7 dias foram pesados no dia do tratamento e após 7 dias e não foram observadas alterações significativas entre os grupos (ANOVA de Wilcoxon; $p=0,460$). Tabela 1.

Níveis de S100B séricos e do líquido cefalorraquidiano

A coleta das amostras de soro e LCR foram realizadas 1 hora, 24 horas ou 7 dias após administração i.p. de PBS, LPS 250 µg/Kg ou LPS 2500 µg/Kg. Os animais foram anestesiados e então coletou-se o soro através de punção cardíaca, assim como coletou-se LCR por punção da cisterna magna. Não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos (Figura 1) entre os grupos (Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis; $p=0,932$). Nos dados do tempo 1 hora (Figura 2A) não houve alterações significativas entre os grupos ($p=0,987$), no tempo 24 horas (Figura 2B) não teve diferença estatística mas observou-se uma tendência ao aumento nos níveis de S100B quando tratadas com LPS, sendo proporcional a dose ($p=0,062$) e no tempo 7 dias (Figura 2C) também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,987$). Para todos os dados dos níveis de S100B no LCR foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Efeito do tempo e dose sobre a tarefa comportamental da esQUIVA inibitória

Todos os grupos receberam PBS, LPS 250 µg/Kg ou LPS 2500 µg/Kg 20 minutos pré-treino na esQUIVA inibitória. Os animais foram testados 24 horas ou 7 dias após o treino. Não foram observadas diferenças estatísticas entre treino e teste nos grupos Controle, LPS 250 µg/Kg e LPS 2500 µg/Kg 24 horas (Figura 3A) e nem no Controle e LPS 250 µg/Kg 7 dias (Figura 3C; Teste não-paramétrico de Wilcoxon e Friedman). Já no grupo LPS 2500 µg/Kg 7 dias (Figura 3B) observou-se um aumento na latência do teste em relação ao treino (Teste não-paramétrico de Wilcoxon e Friedman; $p=0,043$ e $p=0,025$, respectivamente).

Discussão

O LPS é conhecido por desencadear um quadro de “sickness behavior”, o qual se caracteriza por febre, perda do apetite com consequente perda de peso, entre outros aspectos [11]. Nossos resultados com o LPS em ambas as doses 24 horas após a administração já demonstram uma redução na massa corporal dos animais, que está associada a esse quadro. Sete dias após essa redução não foi observada, caracterizando o efeito agudo do nosso tratamento.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado que, com uma dose i.p. de 250 µg/Kg, não há alteração nos níveis séricos de S100B. Os resultados desse presente trabalho corroboram com os dados pré-existentes [4]. Porém os valores absolutos observados estão subestimados em relação aos dados obtidos previamente em outros trabalhos. No LCR os níveis de S100B não foram estatisticamente significativos, porém 24 horas após o tratamento encontramos uma tendência ao aumento dose-dependente dos níveis de S100B. Como se sabe que a S100B é vista como marcador de injúria cerebral, sugerimos que essa alteração observada no LCR possa indicar ativação astrogliar [10], decorrente de inflamação induzida pelo LPS.

Na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória não se observou diferença entre as sessões de treino e teste entre os grupos, o que demonstra que os animais não consolidaram a memória aversiva, exceto no grupo LPS 2500 µg/Kg no tempo 7 dias, que apresentou diferença significativa indicando que esse grupo aprendeu a tarefa. Estudos já demonstraram que o LPS pode prejudicar a potenciação de longa duração (LTP), através de uma neurodegeneração relacionada a altos níveis de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS [12]. Já foi demonstrado um importante envolvimento do fator de transcrição NF-κB nos processos de consolidação e reconsolidação da memória. O envolvimento da proteína S100B já foi demonstrado em memórias espaciais e aversivas, bem como uma atividade modulatória nos processo de plasticidade sináptica no protocolo de indução da potenciação de longa duração [34, 27]. Outras observações do nosso grupo têm encontrado dados contraditórios a literatura. Outro grupo observou uma melhora no déficit induzido pela privação de sono quando os animais receberam o LPS concomitante [15]. Esse efeito poder ser através do estresse, uma vez que já se sabe que o LPS aumenta os níveis de corticosterona, hormônio relacionado a estresse [17] que por sua vez tem apresentado caráter facilitatório na consolidação da memória em tarefas comportamentais [16].

Conclusão

Nossos resultados mostraram que administração i.p. de LPS provocou “sickness behavior” levando a uma perda de massa corporal dos animais.

Quanto aos resultados dos níveis de S100B no soro e no LCR, a tendência encontrada no LCR pode sugerir que esteja ocorrendo ativação astrocitária e microglial decorrente de uma neuroinflamação induzida pelo LPS.

Já no teste comportamental da esQUIVA inibitória, nossos achados contradizem o que já está descrito na literatura, pois sugerem o LPS 2500 µg/Kg como facilitatório. Esse perfil facilitatório pode ser devido ao quadro de estresse desenvolvido pelo próprio LPS e aparentemente não vemos relação entre S100B e o fenômeno comportamental.

É importante ressaltar que estes achados são resultados preliminares desde projeto, sendo necessário que se repitam os experimentos e dosagens, a fim de melhor elucidar o efeito das diferentes concentrações de LPS em diferentes períodos de tempo e a sua relação com a S100B e o aprendizado.

Contribuições

Desenho experimental: Leticia Dapont Toniolli, Lucas Silva Tortorelli, Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete e Carlos Alberto Gonçalves.

Coleta de dados: Leticia Dapont Toniolli, Lucas Silva Tortorelli e Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete.

Análise e interpretação dos dados: Leticia Dapont Toniolli, Lucas Silva Tortorelli, Tadeu Mello e Souza e Carlos Alberto Gonçalves

Reconhecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 e INCT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção

Referências

1. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I: **S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2009, 1793:1008-1022.
2. Leite, MC.; Galland, F.; Brolese, G.; Guerra, MC; Bortolotto, JW; Freitas, R.; Almeida, LMV.; Gonçalves, CA.: **A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein.** *Journal of Neuroscience Methods* 2008, 169:93-99.
3. Bianchi, R.; Giambanco, I.; Donato, R.: **S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α .** *Neurobiology of Aging* 2010, 31:665-677.
4. Guerra, MC.; Tortorelli, LS.; Galland, F.; Da Ré, C.; Negri, E.; Engelke, DS.; Rodrigues, L.; Leite, MC.; Gonçalves, CA.: **Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats.** *Journal of Neuroinflammation* 2011, 8:128.
5. Gonçalves, CA.; Leite, MC.; Nardin, P.: **Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury.** *Clinical Biochemistry* 2008, 41:755-763.
6. Kranjac, D.; McLinden, KA.; Deodati, LE.; Papini, MR.; Chumley, MJ; Boehm, GW.: **Peripheral bacterial endotoxin administration triggers both memory consolidation and reconsolidation deficits in mice.** *Brain, Behavior, and Immunity* 2012, 26:109-121.
7. Genro, BP.; Alvares, LO.; Quillfeldt, JA.: **Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the aversiveness of the conditioning procedure.** *Neurobiology of Learning and Memory* 2012, 97:355-360.
8. Adami, C.; Sorci, G.; Blasi, E.; Agneletti, AL.; Bistoni, F.; Donato, R.: **S100B expression in and effects on microglia.** *Glia* 2001, 33:131-142.
9. Chen, J.; Buchanan, JB.; Sparkman, NL.; Godbout, JP.; Freund, GG.; Johnson, RW.: **Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system.** *Brain, Behavior, and Immunity* 2008, 22:301-311.
10. Rothermundt, M.; Peters, M.; Prehn, JHM.; Arolt, V.: **S100B in brain damage and neurodegeneration.** *Microscopy Research and Technique* 2003, 60:614-632.
11. Granger, JI.; Ratti, PL.; Datta, SC.; Raymond, RM.; Opp, MR.: **Sepsis-induced morbidity in mice: Effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain.** *Psychoneuroendocrinology* 2012, 2287:1-11
12. Henningan, A.; Trotter, C.; Kelly, AM.: **Lipopolysaccharide impairs long-term potentiation and recognition memory and increases p 75NTR expression in the rat dentate gyrus.** *Brain Research* 2007, 1130:158-166.
13. Boccia, M.; Freundenthal, R.; Blake, M.; Fuente, V.; Acosta, G.; Baratti, C.; Romano, A.: **Activation of hippocampal nuclear factor- κ B by retrieval is required for memory reconsolidation.** *Journal of Neuroscience* 2007, 27:13436-13445.
14. Silva, SM.; Madeira, MD.: **Effects of chronic alcohol consumption and withdrawal on the response of the male and female hypothalamic-pituitary-adrenal-axis to acute immune stress.** *Brain Research* 2012, 1444:27-37.

15. Esumi, LA.; Palma, BD.; Gomes, VL.; Tufik, S.; Hipólido, DC.: **Inflammatory markers are associated with inhibitory avoidance memory deficit induced sleep deprivation in rats.** *Behavioural Brain Research* 2011, 221:7-12.
16. Alvares, LO.; Engelke, DS.; Diehl, F.; Teixeira, RS.; Heubrich, J.; Cassini, LF.; Molina, VA.; Quillfeldt, JÁ.: **Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory.** *Learning and Memory* 2010, 17:202-209.
17. Cunningham, C.; Sanderson, DJ.: **Malaise in the water maze: Untangling the effects of LPS and IL-1 β on learning and memory.** *Brain, Behavior and Immunity* 2008, 22:1117-1127.]
18. Alvares, LO.; Einarsson, EO.; Santana, F.; Crestani, AP.; Haubrich, J.; Cassini, LF.; Nader, K.; Quillfeldt, JA.: **Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus.** *Hippocampus* 2012, 22:1091-1095.
19. Scnydrig, S.; Korner, L.; Landweer, S.; Ernst, B.; Walker, G.; Otten, U.; Kunz, D.: **Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotrophin and proopiomelanocortin in mouse brain.** *Neuroscience letter* 2007, 429:69-73.
20. Vinit, S.; Wilderborn, JA.; Mitchel, GS.: **Lipopolysaccharide attenuates phrenic long-term facilitation following acute intermittent hypoxia.** *Respiratory, physiology and neurobiology* 2011, 176:130-135.
21. Murray, CL.; Skelly, DT.; Cunningham, C.: **Exacerbation os CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent os circulating IL-1 β e IL-6.** *Journal of Neuroinflammation* 2011,8:50.
22. Griffin, WST.: **Inflammation and neurodegenerative diseases.** *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006, 83:470S-4S.
23. Wegrzyniak, BH, Lukovic, L.; Bigaud, M.; Stoeckel, ME.: **Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipolysaccharide: an immunohistochemical study.** *Brain Research* 1998, 794:211-224.
24. Sen, J.; Belli, A.: **S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain?** *Journal of Neuroscience Research* 2007, 85:1373-1380.
25. Mani, V.; Weber, TE.; Baumgard, LH.; Gabler, NK.: **Growth and development symposium: endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock.** *Journal of Animal Science* 2012, 90:1452:1465.
26. Matsamura, N.; Kamei, M.; Tsujikawa, M.; Suzuki, M.; Xie, P.; Nishida, K.: **Low-dose lipopolysaccharide pretreatment suppresses choroidal neovascularization via IL-10 induction.** *PLoS One* 2012, 7:1-7.
27. Mello e Souza, T.; Rohden, A.; Meinhardt, M.; Gonçalves, CA.; Quillfeldt, JÁ.: **S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation.** *Physiology and Behavior* 2000, 71:29-33.
28. Minogue, A.; Barret, JP.; Lynch, MA.: **LPS-induced release of IL-6 from glia modulates production of IL-1 β in a JAK2-dependent manner.** *Journal of Neuroinflammation* 2012, 9:126.
29. Pugh, CR.; Kumagawa, K.; Fleshner, M.; Watkins, LR.; Maier, SF.; Rudy, JW.: **Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning.** *Brain, Behavior, and Immunity* 1998, 12:212-229.

30. Rosi, S.; Amaya, Ramirez-Amaya, V.; Hauss-Wegrzyniak, B.; Wenk, GL.: **Chronic brain inflammation leads to decline in hippocampal NMDA-RI receptors.** *Journal of Neuroinflammation* 2004, 1:1-9.
31. Sorci, G.; Giovannini, G.; Riuzzi, P.; Zelante, T.; Zagarella, S.; Bistoni, F.; Donato, R.; Romani, L.: **The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation.** *PLoSPathogens* 2011, 7:1-15.
32. Tyagi, E.; Agrawal, R.; Nath, C.; Shukla, R.: **Effects of anti-dementia drugs on LPS induced neuroinflammation in mice.** *Life science* 2007, 80:1977-1983.
33. Wilcock, D.: **A changing perspective on the role of neuroinflammation in Alzheimer's disease.** *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, 495243:1-7.
34. Nishiyama, H.; Köpfel, T.; Endo, S.; Itohara, S.: **Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity.** *PNAS Neurobiology* 2002, 99:4037-4042.

Anexos

Tabela 1. Efeito de diferentes doses de LPS sobre a variação de peso (em gramas) de ratos Wistar.

	Controle		LPS 250 µg/Kg		LPS 2500 µg/Kg	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Pré-tratamento	Pós-tratamento
24 horas	331,8 ± 19,31	334,2 ± 20,05	314,6 ± 10,09	292 ± 5,48	313 ± 23,40	297 ± 19,65
7 dias	291,8 ± 17,20	300,6 ± 22,68	285 ± 15,13	295,2 ± 10,13	302,6 ± 16,64	291 ± 23,32

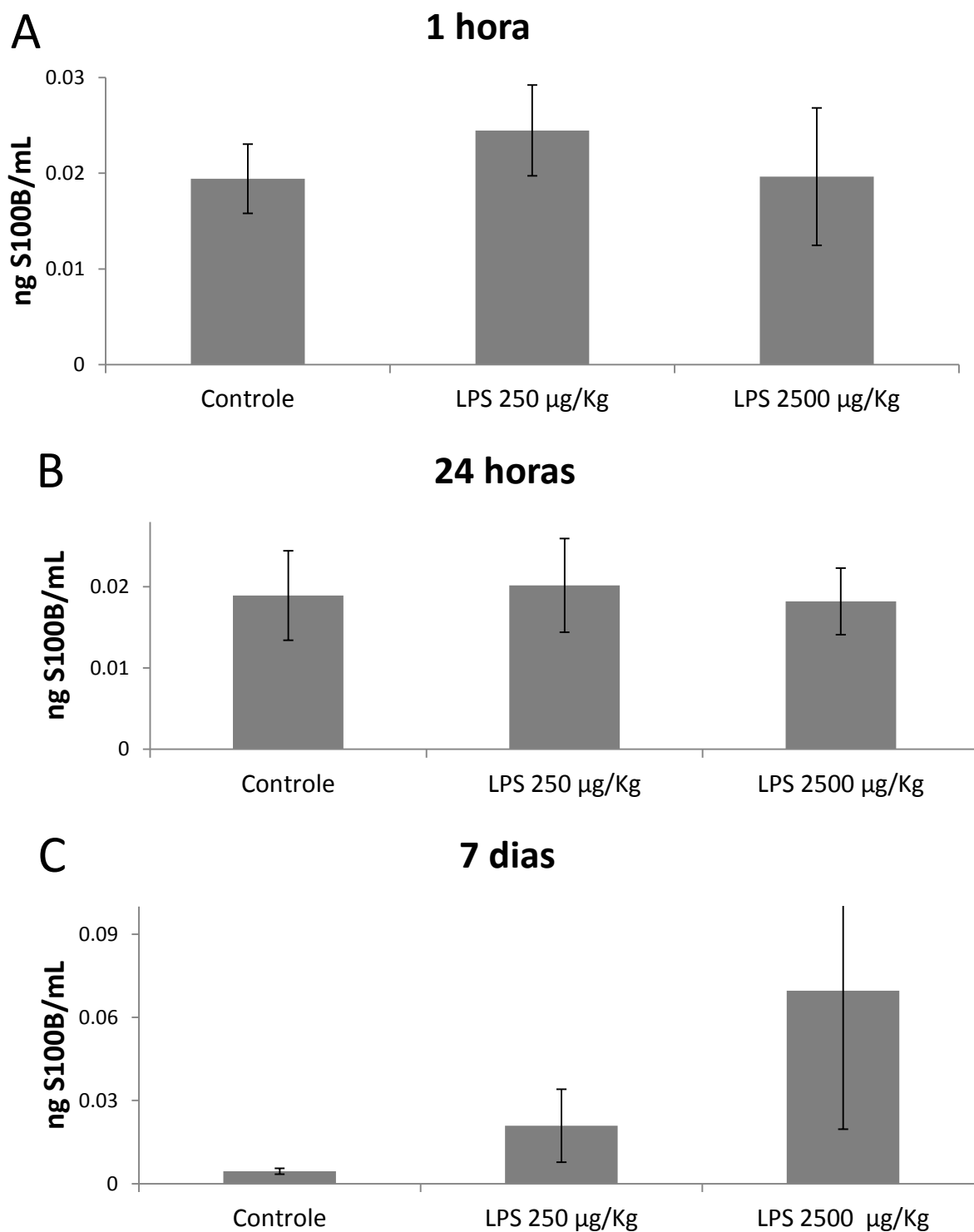


Figura 1. Efeito de diferentes doses de LPS e tempos nos níveis séricos de S100B. Em (A) efeito após 1 hora, em (B) após 24 horas e em (C) 7 dias após a administração de LPS ou PBS. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão, com N=5 exceto nos grupos Controle 1 hora (N=4), Controle 7 dias (N=3) e LPS 2500 µg/Kg 7 dias (N=2). Não foram observadas diferenças significativas para $p=0,932$ no teste Kruskal-Wallis.

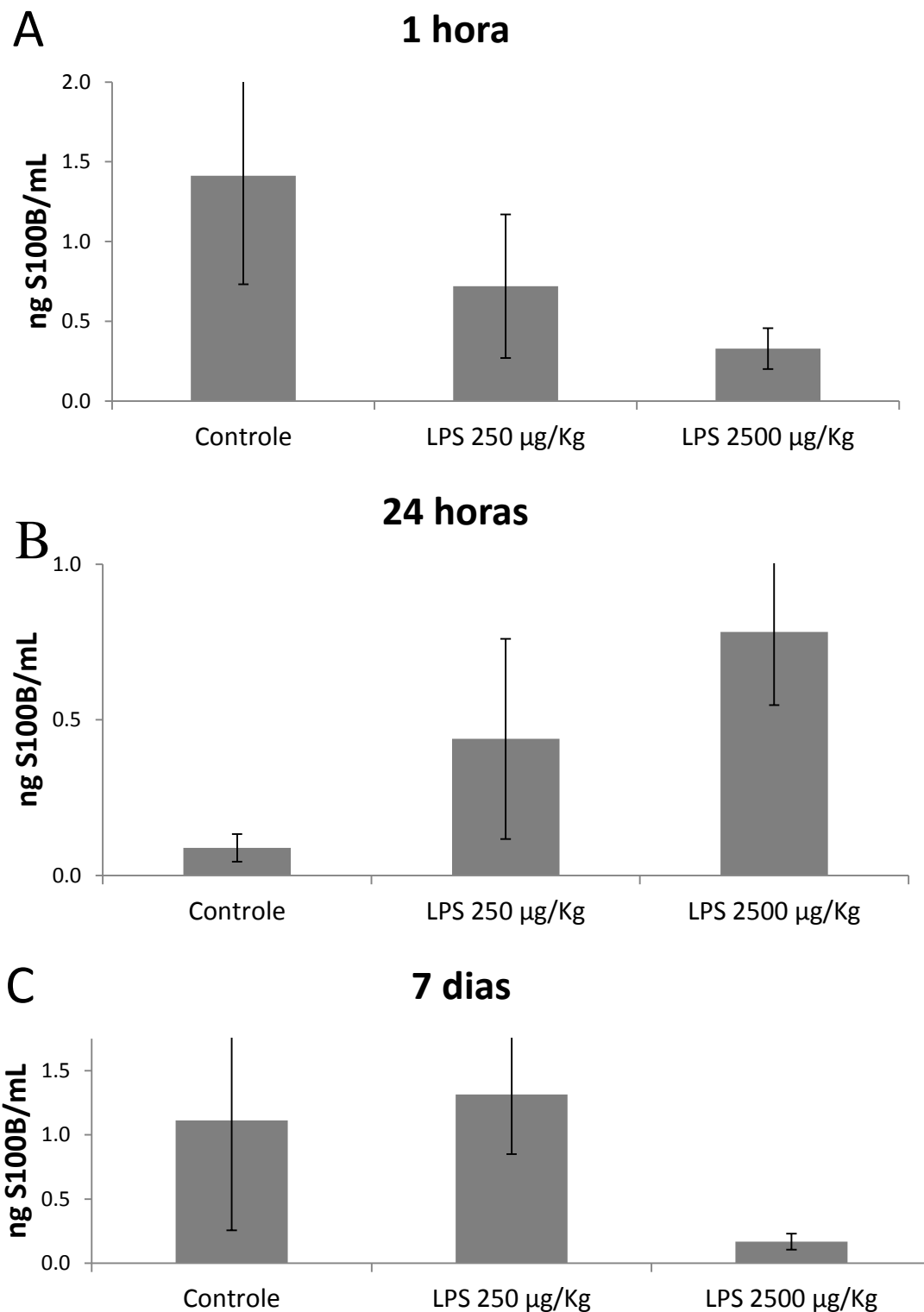


Figura 2. Efeito de diferentes doses de LPS e tempos nos níveis de S100B no líquidocefalorraquidiano. Em (A) efeito após 1 hora, em (B) após 24 horas e em (C) 7 dias após a administração de LPS ou PBS. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão, com N=5 exceto no grupo LPS 2500 µg/Kg 24 horas (N=4). Em (A) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,987$). Em (B) tem uma tendência ($p=0,062$). Em (C) não foi observada diferença estatística ($p=0,079$) no teste Kruskal-Wallis.

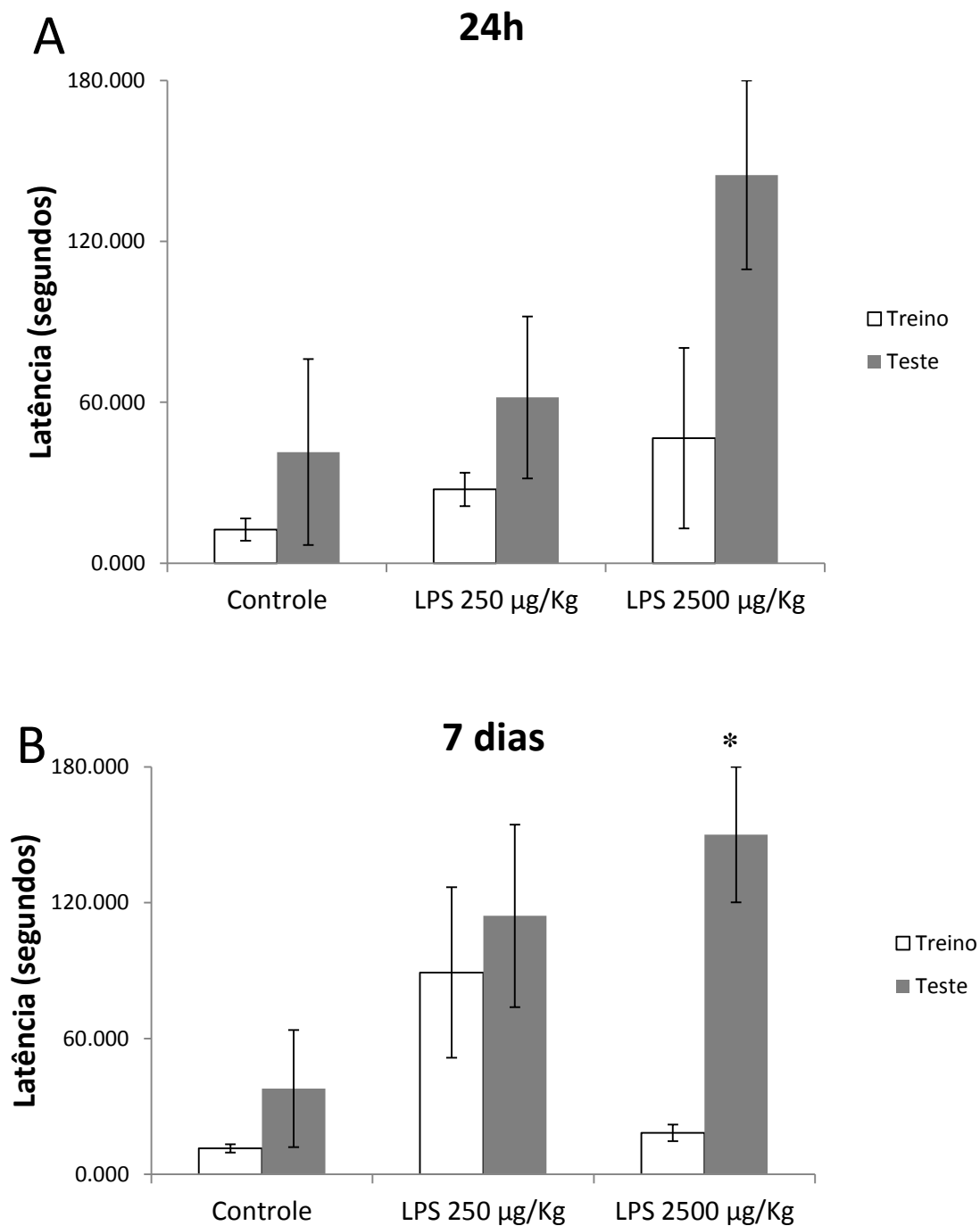


Figura 3. Efeito de diferentes doses e tempos sobre o aprendizado na tarefa da esquiwa inibitória. Em (A) o LPS ou PBS foi injetado 20 minutos pré-treino e testado 24 horas depois. Em (B) o LPS ou PBS foi injetado 20 minutos pré-treino e testado 7 dias depois. Dados estão expressos em média \pm erro padrão, com N=5. * diferença significativa entre treino e teste com $p = 0,025$ pelo teste de Friedman. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

