

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

A PROTEÍNA S100B COMO MARCADOR  
PERIFÉRICO DE DANO AO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL, E ATIVIDADES DE NUCLEOTIDASES EM  
LCR DE RATOS

LUIS VALMOR CRUZ PORTELA

Orientador: Prof. Diogo O. Souza  
Co-Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica,  
como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

PORTO ALEGRE  
2002

Dedico este trabalho à Isabella, Juliana e Elsa

## AGRADECIMENTOS

Ao amigo e Prof. Diogo O Souza pela sua orientação e pelo seu carinho, dedicação e incrível capacidade de transformar a vida dos seus alunos. A minha inclusive!

Ao amigo e Prof. Carlos Alberto S Gonçalves pela sua orientação e por ter aberto as portas da bioquímica para que eu pudesse ter a oportunidade de conviver com o ambiente da pesquisa e com pessoas maravilhosas.

Ao Prof Diogo R Lara que considero um excelente amigo e um brilhante cientista.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS, especialmente a Cléia, pelo seu profissionalismo e amizade.

À Prof Deusa Vendite, pela sua capacidade de motivar e pela sua incansável boa vontade de ensinar.

Ao querido Prof. JJF Sarkis, por me dado a oportunidade de desenvolver trabalhos no seu grupo e pelo seu carinho.

Aos amigos André P. Schmidt, Débora V Schaf, Marcelo Dietrich, Vítor H Cereser, Anselmo Hofmann, Marcos Frizzo e Jean P Oses, pela convivência, amizade e pelo aprendizado que me proporcionaram.

As colegas de doutorado Carina Boeck e Lisiane Porciuncula

Ao Prof. Carlos A Neto do projeto isquemia-S100B-imagens e aos colaboradores: Guilherme Napp, Leonardo Paim, José M Fogaça, Everaldo Moczulski, Guilherme Mazzini pelo seu incansável trabalho.

Aos meus pais pelos ensinamentos de vida.

Ao meu irmão Luiz Osório C Portela

Ao meu amigo Adriano BL Tort pela convivência e pelo prazer de estarmos juntos quando escrevemos um artigo científico.

À Isabela, Juliana e Elsa pela motivação e carinho.

## RESUMO

(Luis Valmor Cruz Portela, A PROTEÍNA S100B COMO MARCADOR PERIFÉRICO DE DANO AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, E ATIVIDADES DE NUCLEOTIDASES EM LCR DE RATOS). A S100B é uma proteína ligante de cálcio, de massa molecular de 21kDa, expressa principalmente por astrócitos. Esta proteína tem sido implicada em atividades funcionais tanto intra quanto extracelulares. Muitos estudos têm sugerido que intracelularmente ela está envolvida na modulação de proteínas do citoesqueleto e na regulação do ciclo celular. A proteína S100B pode ser secretada pelos astrócitos e desenvolver atividades extracelulares, que parecem depender de sua concentração. Em concentração nanomolar ela atua como fator trófico às células neurais, enquanto que em concentrações micromolar ela pode ser neurotóxica. A quantificação da proteína S100B no sangue e líquido se correlaciona com a extensão e intensidade do dano ao sistema nervoso central (SNC) o que permite sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano ou disfunção cerebral. Esta tese está dividida em três partes. A primeira parte propõe a utilização clínica da proteína S100B em patologias com envolvimento do SNC como a síndrome de Down, mielopatia associada ao vírus HTLV-I, lupus eritematoso sistêmico, epilepsia secundária a neurocisticercose e, além disso demonstramos a curva de ontogenia da S100B no sangue. Na segunda parte descrevemos uma atividade de nucleotidases presente em líquido de ratos, e finalmente, na terceira parte abordamos as perspectivas para futuros trabalhos. Os resultados obtidos pelo nosso grupo e por outros grupos internacionais relatam que a proteína S100B é um marcador inespecífico para evidenciar dano ou disfunção em doenças agudas e crônicas com envolvimento do SNC. Apesar de ser um marcador inespecífico, medidas dos níveis da proteína S100B tem grande sensibilidade para detectar uma resposta celular cerebral inespecífica. Além disso, demonstramos que estudos clínicos com esta proteína necessitam controles pareados por idade e sexo. A atividade nucleotidásica descrita no líquido de ratos hidrolisa preferencialmente o GDP e UDP comparado aos outros nucleotídeos. Nas perspectivas, os resultados mostrados são referentes a experimentos preliminares o que torna prematuro qualquer tipo de conclusão.

## ABSTRACT

(Luis Valmor Cruz Portela, THE S100B PROTEIN AS A MARKER OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM DAMAGE, AND NUCLEOTIDASES ACTIVITIES IN THE RAT CSF) The S100B is a calcium binding protein, with low molecular weight, which is expressed predominantly by astrocytes. This protein has been implicated in functional activities in both intra and extracellular space. Many studies have suggested that intracellularly this protein is involved in the regulation of cytoskeleton and cell cycle. Moreover, S100B can be secreted by astrocytes and its effects on the extracellular space appear to be dependent of its concentration. The S100B protein, in nanomolar concentration act as trophic factor to neural cells stimulating glial proliferation and survival of neurons, whereas in micromolar concentration induce apoptosis of astrocytes and neurons. Measurement of S100B protein in cerebrospinal fluid (CSF) and blood is related with the extension and intensity of central nervous system (CNS) damage, this issue influenced its study as a biochemical marker of brain dysfunction or injury. This thesis is organized in three sections. The first is regarding the clinical use of S100B in some diseases with clear involvement of CNS as Down's syndrome, HTLV-I associated myelopathy, systemic lupus erythematosus, epilepsy secondary to neurocysticercosis, as well as we described the **ontogenic??** curve of S100B in serum. In the second section we described nucleotidase activities present in CSF of rats, and finally, in the third section we report some perspectives to **future** works. The results obtained by our group and others international groups report that S100b protein is a inespecific marker of damage or dysfunction in acute and chronic diseases involving CNS. Despite of an inespecific marker, measurement of S100B protein have high sensitivity to detect an inespecific cerebral response. On the other hand, we show that clinical studies using S100B needs controls matched by age and sex. The nucleotidase activities in the CSF, hydrolyzed preferentially GDP and UDP compared with the others nucleotides. In the perspectives, we shown preliminary results that needs additional experiments, therefore, is premature to take some conclusion.



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **A PROTEÍNA ASTROCITÁRIA S100B**

## **1.1 Os astrócitos**

No sistema nervoso central (SNC) há dois grupos de células gliais: a macroglia, constituída dos astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais, e a microglia. Dentre as células gliais, os astrócitos são os que estão presente em maior número. Eles desempenham um importante papel que está relacionado à homeostasia e à integração dos processos neuroquímicos, e não unicamente de suporte estrutural, como se acreditava anteriormente (Dong e Benveniste, 2001).

Os astrócitos, ao que se sabe, não estão diretamente envolvidos no processamento de informações no SNC, mas, entre outras funções, eles liberam fatores neurotróficos e citocinas, orientam o desenvolvimento neuronal, direcionam o crescimento dos axônios, regulam o metabolismo dos neurotransmissores e os níveis dos íons extracelulares (Benveniste, 1998; Dong e Benveniste, 2001). Outro importante papel atribuído aos astrócitos está a sua participação tanto na formação quanto na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (Ghazanfari e Stewart, 2001; Dong e Benveniste, 2001).

Portanto, alterações funcionais ou estruturais nos astrócitos podem afetar a atividade neuronal e das próprias células gliais, resultando em comprometimento do SNC.

## **1.2 A Gliose reativa**

Os astrócitos proliferam intensamente durante o desenvolvimento embrionário do cérebro e mantêm sua capacidade de proliferar por toda a vida adulta, embora nesta fase da vida, e sob condições fisiológicas, a maioria das células gliais mantêm uma proliferação apenas modesta, que tem por objetivo substituir a perda astrocitária que ocorre durante o envelhecimento (Ciccarelli et al, 2001). Entretanto, nos eventos neuropatológicos agudos (isquemia cerebral, trauma, convulsões), bem como em doenças neurodegenerativas crônicas (doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington), ocorre uma ativação astrocitária vigorosa que é denominada de "gliose reativa" (Ciccarelli et al, 2001; Vila et al, 2001; Stone, 2001). A gliose reativa é uma resposta dos astrócitos caracterizada pelo aumento da sua proliferação e/ou por alterações da sua morfologia, como hipertrofia e emissão de ramificações. Em decorrência disso, há um aumento da expressão e síntese de filamentos intermediários como proteína glial fibrilar ácida, e, também, aumento da síntese e secreção de outras proteínas astrocitárias como, por exemplo, interleucina-1, interleucina-6, fator de

necrose tumoral-alfa, interferon-gama e proteína S100B (Cerutti e Chadi, 2000; Dong e Benveniste, 2001; Nolte et al, 2001; Adami et al, 2001). Dentro do contexto que envolve aspectos estruturais e funcionais dos astrócitos, a proteína S100B tem recebido muita atenção da comunidade científica, tanto em relação ao seu envolvimento em estados patológicos quanto à sua função fisiológica.

### **1.3 A proteína S100B**

Moore, em 1965, descreveu uma proteína que estava presente em extratos solúveis de cérebro bovino, mas ausente em extratos de fígado. Devido à solubilidade parcial desta proteína em solução de sulfato de amônio 100% saturado e pH neutro, ela foi denominada “S100”. Estudos posteriores demonstraram que esta fração de tecido cerebral continha uma mistura de polipeptídeos  $\alpha$  e  $\beta$  que formam, na verdade, as isoformas S100A1 (dímero  $\alpha$  -  $\alpha$ ) e S100B (dímero  $\beta$  -  $\beta$ ) da proteína S100 (Isobe e Okuyama, 1981; Isobe et al, 1981).

No SNC, a proteína S100A1 tem localização predominantemente neuronal, enquanto que a proteína S100B está presente em altas concentrações nos astrócitos, e, em menor concentração, nas células de Schwann. Fora do SNC, a proteína S100A1 está expressa em cardiomiócitos, células do músculo esquelético, células renais e células epiteliais salivares, enquanto que outros grupos celulares como melanócitos, adipócitos, condrócitos e células epidermais de Langerhans também expressam a proteína S100B (Donato, 1991; Donato, 1999).

Atualmente, está descrito que S100 é uma família de proteínas ligantes de cálcio com 19 membros já descritos, que por sua vez estão implicados nas mais variadas funções, tanto intra quanto extra celularmente (Donato, 1999). A ligação do íon cálcio a estas proteínas provoca mudanças conformacionais e levam à exposição de resíduos hidrofóbicos, que parecem ser o sítio de ligação das proteínas efetoras. Esta interação resulta na alteração da atividade da proteína efetora e, posteriormente, numa resposta celular (Baudier e Gerard, 1986; Zimmer et al, 1995).

A proteína S100B, assim como outras da família S100 (S100A4, S100A8, S100A9), além de possuir propriedades funcionais intracelulares, pode fisiologicamente ser secretada para o meio extracelular e desenvolver atividades funcionais extracelularmente (Shashoua et al, 1984; Van Eldick e Zimmer, 1987; Zimmer et al, 1995).

De acordo com experimentos “in vitro”, a proteína S100B tem sido estudada tanto no que se refere às suas propriedades funcionais intracelulares quanto extracelulares. Intracelularmente, ela tem sido relacionada a funções biológicas tais como: (a) regular fosforilação de proteínas constituintes do citoesqueleto, como proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e proteínas associadas a microtúbulos (MAP); (b) modular a atividade de enzimas como ATPase, adenilato ciclase e aldolase; (c) modular o ciclo celular; (d) manutenção da homeostasia de cálcio intracelular (Donato, 1991; Zimmer et al, 1995; Schäfer e Heizmann, 1996; Donato, 1999; Gentil et al, 2001).

Kligmann & Marshak (1985) demonstraram que a proteína S100B tem ação neurotrófica, sugerindo pela primeira vez uma possível função extracelular. No desenvolvimento do sistema nervoso, ocorre uma série de eventos coordenados que inclui a regulação da proliferação e diferenciação celular, sendo que a proteína S100B tem sido implicada nestes processos (Selinfreund et al, 1991; Donato, 2001). Outra ação extracelular foi proposta por Azmitia et al (1992), que sugerem que a secreção da proteína S100B poderia ser estimulada pelo neurotransmissor serotonina através dos receptores 5HT<sub>1A</sub> presentes nos astrócitos. Em contrapartida, a proteína liberada pelos astrócitos provocaria a liberação de mais serotonina pelos neurônios.

Além dos trabalhos citados acima, nosso grupo, sob coordenação do Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves, tem contribuído significativamente com publicações relevantes sobre aspectos como a modulação, secreção e mecanismos de ação envolvendo a proteína S100B. Dentre estes trabalhos, podemos destacar o efeito inibitório da S100B sobre a fosforilação da GFAP e vimentina como um possível mecanismo regulador do ciclo polimerização/despolimerização dos filamentos intermediários (Ziegler et al, 1998). Em outro trabalho, culturas de astrócitos do cerebelo apresentaram maior secreção e imunoconteúdo da proteína S100B quando comparados com culturas de astrócitos de hipocampo e córtex cerebral (Pinto et al, 2000). Além disso, em cultura de astrócitos, a atividade extracelular da S100B parece ser mediada pela ativação da cascata das ERK 1 e 2 (do inglês, “Extracellular Regulated Kinases”) (Gonçalves et al, 2000).

Entretanto, apesar de ter sido descrita há mais de 30 anos, as funções biológicas da proteína S100B ainda não foram totalmente identificadas e compreendidas (Zimmer et al, 1995; Donato, 2001).

#### **1.4 Implicações da proteína S100B em doenças neurodegenerativas**

Estudos com o objetivo de esclarecer o potencial envolvimento da S100B em processos neurodegenerativos e os mecanismos pelos quais ela exerce seus efeitos têm sido tratados com grande interesse nos últimos anos (Azmitia et al, 1992; Zimmer et al, 1995; Azmitia et al, 1997, Donato, 2001). O aumento dos níveis cerebrais desta proteína tem sido implicado na patofisiologia das alterações cerebrais presentes na doença de Alzheimer e síndrome de Down, sendo que camundongos transgênicos que super expressam a proteína S100B apresentam alterações morfológicas e comportamentais semelhantes àquelas que ocorrem na doença de Alzheimer e síndrome de Down (Azmitia et al , 1992; Withaker-Azmitia et al, 1997, Donato 1999). Devido aos seus efeitos extracelulares, a proteína S100B é também considerada uma citocina, e, desta forma, ela pode estar envolvida não somente na patofisiologia das alterações presentes na doença de Alzheimer e síndrome de Down, como também na resposta inflamatória ao dano cerebral (Griffin et al, 1998 ).

Uma vez no meio extracelular, e dependendo da sua concentração, a proteína S100B pode ter um efeito trófico (concentrações nanomolares) ou tóxico (concentrações micromolares) às células neurais. Os mecanismos moleculares pelos quais a proteína S100B exerce seus efeitos tróficos ainda precisam ser melhor esclarecidos (Donato, 2001).

Um dos mecanismos propostos para o efeito neurotóxico da proteína S100B pode ser atribuído à estimulação de uma enzima óxido nítrico sintase induzível de astrócitos, resultando na morte celular por apoptose, tanto dos neurônios quanto de astrócitos (Hu e Van Eldik, 1996; Hu et al, 1997; Donato, 2001). O aumento do influxo de cálcio citosólico e a depleção das reservas intracelulares induzidas pela proteína S100B também pode levar a morte neuronal por apoptose (Mariggio et al, 1997; Donato, 1999).

Portanto, é possível considerar que a saída da proteína S100B do compartimento intracelular (onde a concentração média estimada é de 10  $\mu$ M) resulta em níveis extracelulares que podem refletir uma situação benéfica (neuroprotetora) ou tóxica para as células vizinhas (Nishikawa et al, 1997, Ahlemeyer et al, 2000).

#### **1.5 Marcadores bioquímicos de dano cerebral**

Marcadores periféricos de dano ou disfunção de órgãos como rim, próstata, fígado e coração têm sido ao longo dos anos amplamente utilizados com muito sucesso na prática

médica. Entretanto, no que diz respeito ao cérebro, fatores como a sua complexidade de funções, compartimentalização e distribuição celulares, bem como a influência da barreira hematoencefálica, impõem consideráveis dificuldades na interpretação dos níveis de marcadores de dano cerebral no líquido céfalo-raquidiano (LCR) e sangue. Neste sentido, a busca de marcadores periféricos capazes de auxiliar a detectar e quantificar precocemente alterações neurológicas e psiquiátricas secundárias a doenças de diferentes etiologias tem merecido atenção de diversos grupos de pesquisa nos últimos anos.

Medidas das atividades de adenilato kinase, creatina fosfoquinase e dos níveis de lactato têm sido propostas, e os resultados indicam que os níveis destes marcadores quando quantificados no LCR podem ser correlacionados a alterações cerebrais; entretanto, as medidas no sangue apresentam fraca correlação. Um outro marcador, a proteína básica de mielina, encontrada nos oligodendrócitos, também pode ser liberada no LCR após dano cerebral ou doenças desmielinizantes. Entretanto, a punção medular para a obtenção do LCR é um fator clínico e ético limitante do uso destes marcadores bioquímicos (Johnsson, 1996).

A NSE (neuron specific enolase) isoforma  $\gamma\gamma$  é uma enzima glicolítica que está localizada no citoplasma dos neurônios, e tem sido proposta como marcadora de morte neuronal (Wunderlich et al, 1999). Sua maior restrição como marcador de dano cerebral está no fato de estar presente em altas concentrações nos eritrócitos e plaquetas, e portanto, a hemólise e lise plaquetária podem prejudicar a análise e interpretação dos resultados (Johnsson, 1996). Outros marcadores como interleucina-1, interleucina-6, neopterin,  $\beta$ 2microglobulina, GFAP e a proteína S100B também têm sido estudados.

### **1.5.1 A proteína S100B como marcadora de dano cerebral**

Embora o papel fisiológico da proteína S100B ainda não seja precisamente conhecido, está bem descrito que seus níveis no sangue e no LCR estão aumentados em vários distúrbios agudos e crônicos envolvendo o SNC. Tem sido demonstrado que a quantificação dos níveis da proteína S100B em LCR e sangue se correlaciona com a intensidade e a extensão das injúrias ao SNC, o que permite sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano ou disfunção cerebral (Wimmer-Greinecker et al, 1998; Ashraf et al, 1999; Ingebritsen et al, 1999; Herrmann et al, 2000; Lara et al, 2000; Lara et al, 2001; Peskind et al, 2001; Lara et al, 2001). Os níveis periféricos no LCR e no

sangue podem refletir a reatividade glial à injúria cerebral, bem como alterações na barreira hematoencefálica (Ingebritsen et al, 1999). Entretanto, além de dano cerebral, dosagens da proteína S100B no sangue têm sido estudadas como marcador de melanomas, e os resultados sugerem que a proteína S100B é um potencial marcador sangüíneo para o diagnóstico, prognóstico e para monitorar a resposta à terapia (Schoultz et al, 1996; Mohamed et al, 2001).

No nosso laboratório, para quantificar os níveis da proteína S100B, utilizamos um ensaio imunoluminométrico com alta sensibilidade e especificidade e também desenvolvemos um imunoensaio enzimático para quantificar a S100B em tecidos e LCR de ratos com alta especificidade e leitura colorimétrica (Missler et al, 2000, Tramontina et al, 2000).

Nos últimos 4 anos, nosso grupo vem desenvolvendo pesquisa básica sobre o papel intra e extracelular da proteína S100B (Ziegler et al, 1998; Gonçalves et al, 2000; Pinto et al, 2000), bem como pesquisa aplicada onde estudamos o envolvimento desta proteína em doenças neuropsiquiátricas (Lara et al, 2000; Lara et al, 2001; Vieira et al, 2002, Vieira et al, 2002). Neste sentido, a presente tese procura fornecer novas abordagens clínicas para a utilização da S100B como marcador de dano cerebral. As nossas publicações, em conjunto com os diversos trabalhos da literatura internacional, buscam ampliar os conhecimentos necessários para que se leve em consideração a potencialidade da proteína S100B como marcadora bioquímica na prática médica. Além disso, na busca por novos marcadores bioquímicos de dano cerebral, detectamos a presença, e caracterizamos preliminarmente, atividades enzimáticas no LCR de ratos, envolvidas na metabolização de purinas extracelulares.

## **1.6 Objetivos e organização dos trabalhos apresentados na tese**

Esta tese está dividida em três partes. Na primeira parte, procuramos abordar aspectos clínicos da utilização da proteína S100B. Para isso, estudamos: **a)** a potencialidade desta proteína como uma ferramenta no diagnóstico pré-natal de fetos portadores da síndrome de Down; **b)** a sua utilização em humanos como um possível marcador bioquímico periférico em doenças crônicas e que cursam com comprometimento do SNC; **c)** a ontogenia dos níveis sangüíneos da proteína S100B em indivíduos saudáveis.

Na segunda parte, no capítulo VII, fazemos uma breve introdução sobre hidrólise de nucleotídeos por nucleotidasas, enquanto que, no capítulo VIII, nos dedicamos a descrever atividades nucleotidásicas solúveis presentes em LCR de ratos. Estas atividades, embora longamente descritas em diversas fontes biológicas, é, pela primeira vez, detectada em LRC, o que estimula fortemente a sua utilização como mais um marcador de dano cerebral.

Na terceira parte, baseados em resultados preliminares do nosso grupo, mostramos de maneira concreta que, como perspectivas, pretendemos estudar: **a)** modulação pela proteína S100B de atividades nucleotidásicas presentes no LCR de ratos; **b)** o efeito de uma única sessão de exercício de natação na secreção astrocitária da proteína S100B e na hidrólise de nucleotídeos em LCR e soro de ratos; **c)** a caracterização da hidrólise de nucleotídeos em soro de humanos; **d)** a utilização da proteína S100B em cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea (em um projeto que envolve o Departamento de Bioquímica e Instituto de Cardiologia / RS, que se iniciou em janeiro de 2002); **e)** a proteína S100B como marcadora do envolvimento cardíaco na doença de Chagas; **f)** a proteína S100B em modelo experimental de isquemia em ratos: associação de um marcador neuroquímico e ressonância magnética nuclear (RMN).

**PRIMEIRA PARTE**  
**ASPECTOS CLÍNICOS DA**  
**PROTEÍNA S100B**

**CAPÍTULO II**

**HIGH IMMUNOCONTENT OF S100 $\beta$  PROTEIN**  
**IN AMNIOTIC FLUID OF PREGNANCIES**  
**WITH DOWN SYNDROME**







# **CAPÍTULO III**

**SERUM S100B LEVELS IN PATIENTS  
WITH HTLV-I ASSOCIATED  
MYELOPATHY/TROPICAL  
SPASTIC PARAPARESIS**





# **CAPÍTULO IV**

## **SERUM S100B LEVELS IN PATIENTS WITH LUPUS ERYTHEMATOSUS: PRELIMINARY OBSERVATION**







# **CAPÍTULO V**

## **INTERICTAL SERUM OF S100B PROTEIN IN PATIENTS WITH EPILEPSY RELATED TO CHRONIC NEUROCYSTICERCOSIS: A CASE CONTROL STUDY**

**(SUBMETIDO AO EXPERIMENTAL NEUROLOGY)**

# **CAPÍTULO VI**

**SERUM S100B LEVEL IS AGE DEPENDENT**

**(SUBMETIDO AO CLINICAL CHEMISTRY)**





























# **SEGUNDA PARTE**

## **CAPÍTULO VII**

### **ECTO-NUCLEOTIDASES E HIDRÓLISE DE NUCLEOTÍDEOS (BREVE INTRODUÇÃO)**

## 2. Ecto-nucleotidasas

Os nucleotídeos podem ser encontrados no espaço extracelular onde atuam como moléculas sinalizadoras, mas, em determinado momento, estas moléculas necessitam ser removidas e isto ocorre pela ação de ecto-nucleotidasas. O produto final da degradação dos nucleotídeos pelas nucleotidasas é um nucleosídeo (Zimmermann, 2001). No caso do sistema purinérgico, os derivados da adenina e guanina têm sido implicados em funções extracelulares e são igualmente hidrolizados por ecto-nucleotidasas. O ATP, por exemplo, exerce um papel de neurotransmissor excitatório enquanto que a adenosina age como um neuromodulador, cada um deles atuando em receptores específicos do tipo P2 (ATP) e P1 (adenosina) (Brundege e Dunwiddie, 1997; Ralevick e Burnstock, 1998). Os derivados da guanina também são encontrados no meio extracelular e conseqüentemente estão sujeitos à ação de nucleotidasas. Com isto, podemos afirmar que as ecto-nucleotidasas exercem um papel fundamental nos mecanismos de terminação da sinalização via ATP e na produção da adenosina (Cunha, 2001). O papel das nucleotidasas na metabolização dos nucleotídeos da guanina extracelulares é um campo promissor que merece ser melhor esclarecido.

Os nucleosídeos tri e difosfatados podem ser hidrolizados por EctoATPases, por membros da família das Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e também pela Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP). Os nucleotídeos monofosfatados, por sua vez, podem ser hidrolizados por uma ecto-5'-nucleotidase e também por fosfatases alcalina (Cunha, 2001; Zimmermann, 2001). Nesta breve introdução vamos focar basicamente as E-NTPDases que na atual nomenclatura são classificadas numericamente como E-NTPDase1, E-NTPDase2, E-NTPDase3, E-NTPDase4, E-NTPDase5 e E-NTPDases6. Embora hidrolisem tanto os nucleosídeos trifosfatados quanto os difosfatados, estas enzimas apresentam diferenças na ordem de preferência para os vários nucleotídeos e na sua localização. As E-NTPDase1, E-NTPDase2 e E-NTPDase3 estão localizadas na face externa da membrana celular, a E-NTPDase4 está localizada intracelularmente, enquanto que a E-NTPDase5 e E-NTPDase6 estão localizadas intracelularmente mas podem ser liberadas para o espaço extracelular (Mullero et al, 1999; Braun et al, 2000; Zimmermann, 2001).

Os nucleotídeos da purina, sob a modulação das ecto-nucleotidasas, exercem importantes efeitos fisiológicos nas células nervosas, como a indução da diferenciação e

proliferação celular, e estimulação da síntese e liberação pelos astrócitos da proteína S100B que vai atuar como fator trófico e/ou citocina (Rathbone et al, 1999; Ciccarelli et al, 2001). Além dos seus efeitos fisiológicos, alterações na hidrólise dos nucleotídeos também têm sido descritas em algumas patologias como esquizofrenia, epilepsia e isquemia (Pasini et al, 2000, Lara e Souza, 2000; Bonan 2000; Bonan, 2001).

No próximo capítulo desta tese, descrevemos uma atividade nucleotidásica solúvel em LCR de ratos.

# **CAPÍTULO VIII**

## **GUANINE AND ADENINE NUCLEOTIDASE ACTIVITIES IN RAT CEREBROSPINAL FLUID**

**(SUBMETIDO AO BRAIN RESEARCH)**

# **TERCEIRA PARTE**

## **CAPÍTULO IX**

### **PERSPECTIVAS**

**a) A proteína S100B modula a atividade de nucleotidase presente em LCR de ratos**

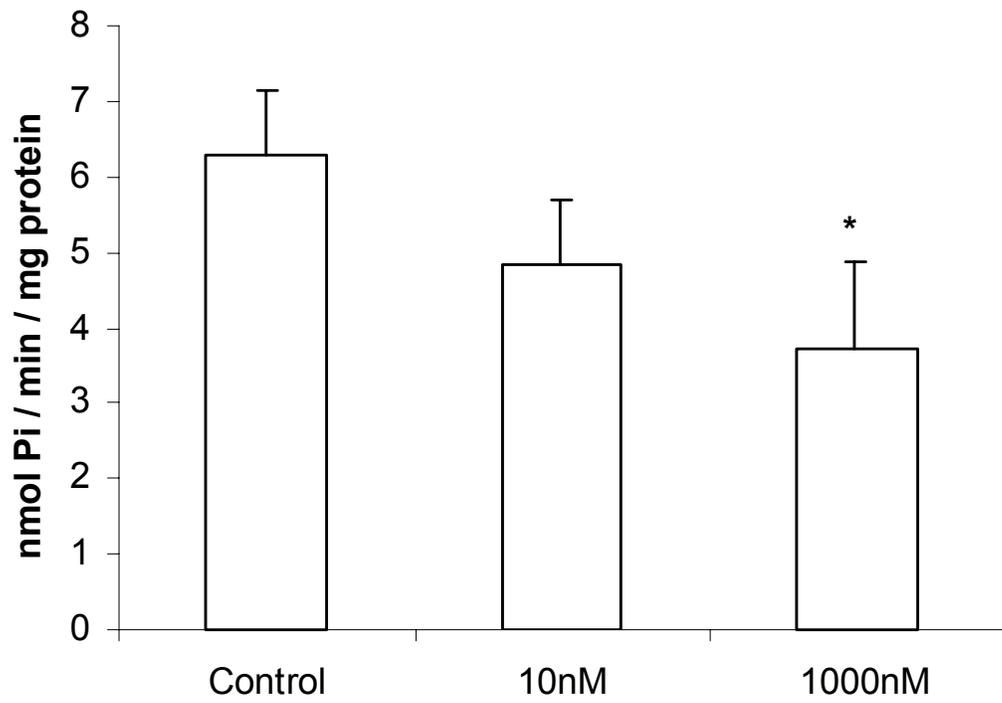
**Autores: Portela LV, Oses JP, Sarkis JJ, Gonçalves CA, Souza DO**

Alguns trabalhos relatam que a proteína S100B pode modular a atividade de algumas enzimas. As proteínas S100B e S100A1 estimularam a atividade de ATPases em frações subcelulares de mitocôndria e mielina no SNC. A adição de cálcio ou zinco provoca um efeito estimulatório adicional (Simonian et al, 1989). As proteínas S100B e S100A1 também foram capazes de estimular a atividade de uma frutose-1,6-bisfosfato aldolase, enquanto que a S100A1 inibiu a glicogênio fosforilase muscular e a S100B não teve efeito. Em relação à fosfoglicomutase, a S100A1 inibiu enquanto que a S100B estimulou sua atividade. Estes resultados indicam que as proteínas S100B e a S100A1 podem interagir com enzimas e modular o metabolismo energético intracelular (Zimmer et al, 1995; Donato, 1999). Nos trabalhos citados acima, a proteína S100B exerceu um efeito estimulatório intracelular, ou não apresentou nenhum efeito.

No caso da atividade enzimática presente em LCR de ratos, quando a proteína S100B (10 e 1000 nM) foi adicionada ao meio de incubação com GDP (0,1 mM), houve inibição da hidrólise (**Figura 1**).

**Figura 1**

**S100B & Atividade Nucleotídica em LCR**



**b) O efeito de uma única sessão de exercício de natação nos níveis da proteína S100B e na hidrólise de nucleotídeos em soro de ratos**

**Autores: Dietrich M, Schaf DV, Hoffmann A, Oses JP, Portela LV, Sarkis JJ, Gonçalves CA, Souza DO**

O exercício tem efeitos benéficos para o funcionamento cerebral, que incluem, por exemplo, a ativação da plasticidade neural e, conseqüentemente, melhoria no aprendizado e memória. O aumento na expressão e secreção cerebral de fatores tróficos (fator neurotrófico derivado de cérebro e fator de transformação e crescimento beta) no hipocampo durante exercício também tem sido frequentemente relatado, e isto poderia ter uma influência positiva na função cerebral, como proliferação celular e proteção do estresse oxidativo (Tong et al, 2001, Arai et al, 2002). Por outro lado, o exercício aumenta a liberação de serotonina no cérebro e este neurotransmissor, agindo no receptor 5HT<sub>1A</sub>, estaria envolvido na fadiga cerebral (Struder e Weicker, 2001; Dwyer e Flyn, 2002).

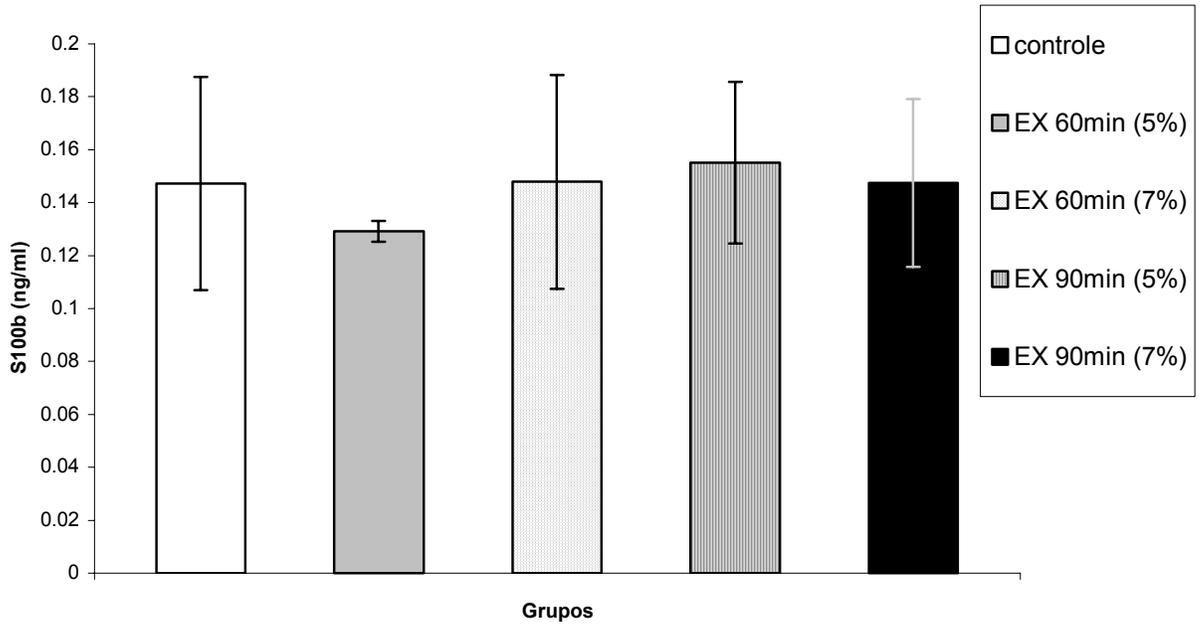
Como já foi descrito na introdução desta tese, a proteína S100B é um fator trófico envolvido na maturação, desenvolvimento e proliferação do SNC e que o seu aumento no cérebro, sangue e LCR pode estar relacionado a dano celular e/ou ativação de células gliais. A serotonina por sua vez pode modular positivamente a secreção da proteína S100B (Kligman e Marshak, 1985; Sellinfreund et al, 1991; Azmitia et al, 1992).

Oses et al (dados não publicados) determinaram o padrão de hidrólise dos nucleotídeos da adenina e guanina em soro de ratos sob condições basais. Está bem descrito que, sob condições de estresse, as ecto-nucleotidases são liberadas das células endoteliais de vasos junto com os nucleotídeos (Yegutkin et al, 2000).

Desenvolvemos um modelo experimental, onde os ratos foram colocados em contato prévio com a água (5 minutos sem peso extra). Depois de 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão única de natação de 1 hora ou 2 horas, com um artefato correspondente a 5% ou 7% do peso corporal preso à cauda. Imediatamente após o exercício os ratos foram anestesiados com halotano, quando foi então coletado o LCR e depois o sangue por decapitação. Os níveis liquóricos da proteína S100B foram medidos por um ensaio imunoenzimático (Tramontina et al, 2001) (**Figura 2**). A hidrólise dos nucleotídeos no sangue foi medida pelo método de Chan et al (1986) (**Figura 3**).

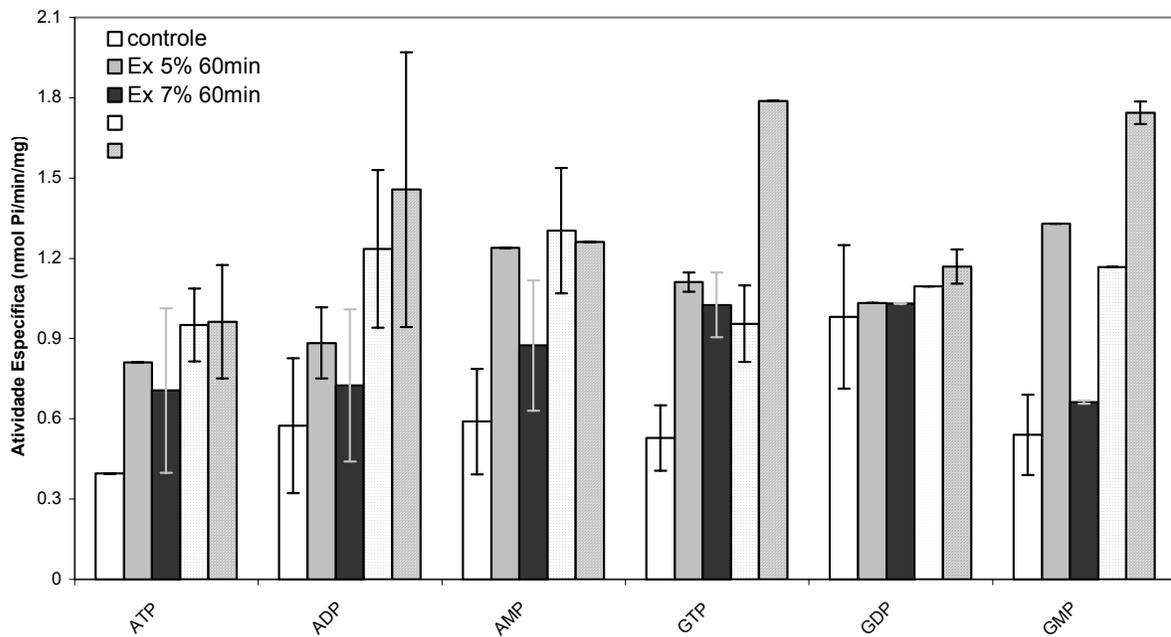
**Figura 2**

**S100b em líquor de ratos submetidos a natação em diferentes intensidades e durações**



**Figura 3**

**Hidrólise dos Nucleotídeos**



### c) A caracterização da hidrólise de nucleotídeos da purina em soro de humanos

**Autores: Cerezer VH, Oses JP, Portela LV, Sarkis JJ, Souza DO**

A importância dos nucleotídeos da adenina (ATP, ADP, AMP), e o seu nucleosídeo adenosina no sangue já está bem estabelecida. O ATP tem efeito vasoconstritor, e dependendo da sua concentração pode ser citotóxico. O ADP provoca agregação plaquetária e a adenosina produzida a partir da degradação do ATP, ADP e AMP atua como vasodilatador (De oliveira et al, 1997). Por sua vez, os efeitos dos nucleotídeos da guanina (GTP, GDP, GMP) e da guanosina no sangue ainda são pouco conhecidos (Cicarelli et al, 2001). Estamos caracterizando o padrão de hidrólise dos nucleotídeos da adenina e guanina no soro de humanos. A produção de fosfato inorgânico (Pi) foi linear na concentração de 1,00 até 1,25 mg de proteína por tubo. Escolhemos trabalhar na concentração fixa de 1,00 mg de proteína por tubo. A hidrólise dos nucleotídeos foi linear até 60 minutos. A atividade específica de hidrólise de nucleotídeos esta expressa na **tabela 1**.

Os experimentos relacionados a este trabalho continuam e o próximo passo será a elaboração de uma curva de substrato. Uma vez concluída esta padronização, medidas desta atividade serão feitas em soro de pacientes psiquiátricos submetidos a eletroterapia convulsiva, numa colaboração entre o laboratórios do Prof. José J Sarkis e o do Prof. Wagner Gattaz da USP.

**Tabela 1.**

Nucleotídeo (N = 3)	Média ( $\pm$ DP) (nmol Pi. min <sup>-1</sup> . mg <sup>-1</sup> )
ATP	0,065 $\pm$ 0,001
ADP	0,047 $\pm$ 0,003
AMP	0,082 $\pm$ 0,022
GTP	0,105 $\pm$ 0,005
GDP	<b>0,520 <math>\pm</math> 0,100</b>
GMP	0,130 $\pm$ 0,03

**d) Avaliação perioperatória de injúria cerebral em transplantes cardíacos através da quantificação dos níveis sanguíneos da proteína S100B**

**Projeto coordenado pelo Prof. Carlos Alberto Gonçalves**

**Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS**

Diogo Souza, MD, PhD

Luis Valmor Cruz Portela, MSc

Juliana Karl, MSc

Débora Vigevani Schaf

Adriano Bretanha Lopes Tort

André Prato Schmidt

Guilherme Napp

Guilherme Mazzini

**Fundação Universitária de Cardiologia do RS/FUC-RS**

Ivo A. Nesralla, MD, Livre Docente

Estela Suzana K.Horowitz, MD, MSc

Solange Bordignon, MD

Edemar Pereira, MD

José Geraldo Taborda, MD

Complicações cerebrais decorrentes de cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea (CEC) têm sido descritas freqüentemente. A incidência de disfunções neurológicas e neuropsicológicas após cirurgias cardíacas varia significativamente, dependendo da idade e patologia do paciente, do tipo de cirurgia, do tempo de CEC e da parada circulatória. Dentre as complicações neurológicas, têm sido relatado casos de injúria cerebral fatal, convulsões, acidente vascular cerebral, déficit de consciência, entre outros achados neurológicos. As complicações neuropsicológicas incluem problemas como alteração de concentração, memória, aprendizado e déficit visual-motor.

A etiologia dessas disfunções pode estar relacionada a eventos tromboembólicos como macro e microembolia, tempo prolongado de CEC e clampeamento aórtico e hipotermia profunda (Aberg, 1995; Mills, 1995; Roach et al, 1996; Wimmer-Greinecker et al, 1998). Além disso, a indução de uma resposta inflamatória envolvendo a cascata do complemento,

ativação leucocitária, geração de espécies reativas de oxigênio e disfunções de coagulação, também podem estar relacionadas à fisiopatologia dessas disfunções (Aberg, 1995; Mills, 1995; Roach et al, 1996; Wimmer-Greinecker et al, 1998). Os transplantes cardíacos são hoje uma modalidade terapêutica para cardiopatias que não se beneficiam de outra modalidade cirúrgica e cujo tratamento farmacológico foi esgotado. A técnica cirúrgica inclui CEC com parada circulatória e hipotermia e as complicações neurológicas de transplantes cardíacos são semelhantes àquelas descritas para outras cirurgias com CEC. Dentro deste contexto, alguns grupos têm proposto a utilização da proteína S100B como marcador bioquímico de injúria cerebral decorrente de cirurgias cardíacas com CEC, e os resultados parecem demonstrar uma correlação significativa entre o aumento dos níveis sanguíneos desta proteína e comprometimento neuropsiquiátrico (Wimmer-Greinecker et al, 1998; Ashraf et al, 1999; Hermann et al, 2000). Neste projeto pretendemos quantificar os níveis sanguíneos perioperatórios da proteína S100B e avaliar seu possível valor prognóstico como marcador de comprometimento do SNC, em pacientes submetidos a transplantes cardíacos. As coletas de sangue iniciaram em março de 2002 e dependem, evidentemente, do número de doadores.

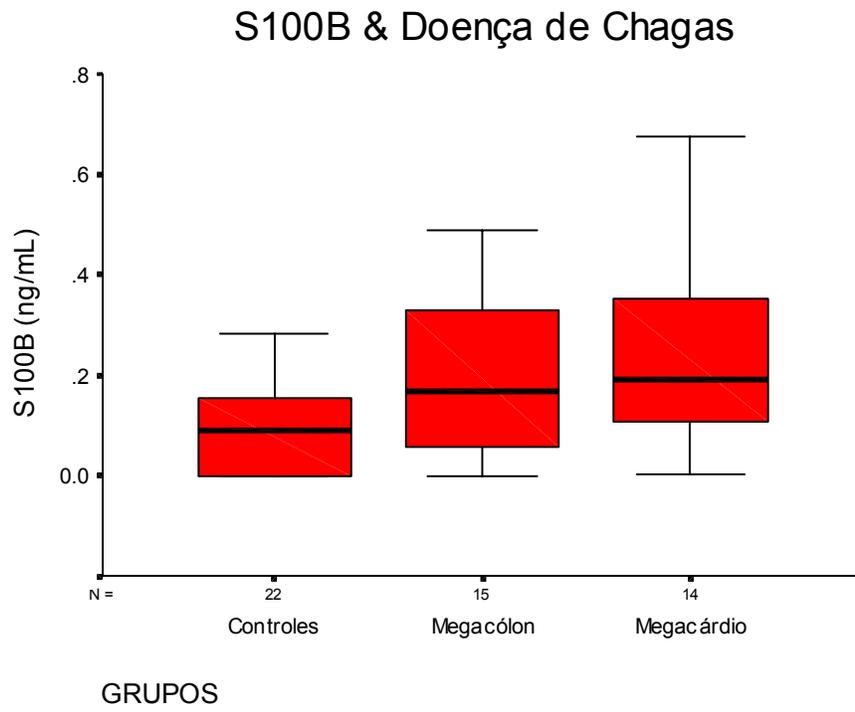
### **e) Doença de Chagas.**

**Autores: Portela LV, Tort ABL, Schaf DV, Walz R, Horowitz E, Gonçalves CA, Souza DO**

Relatos da literatura apontam para a possibilidade de cardiomiócitos também expressarem a proteína S100B quando submetidos a injúrias (Kahn et al, 1991; Tsoporis et al, 1997). Isto nos levou a estudar a possibilidade desta proteína ser um marcador periférico de utilidade clínica para algumas doenças cardíacas, como a doença de Chagas. Resultados preliminares do nosso grupo demonstram claramente que os níveis séricos de S100B estão aumentados em pacientes chagásicos com miocardiopatia (cardiomegalia) quando comparados com sujeitos controles ( $P < 0.004$ , **Figura 4**). Pacientes chagásicos com megacólon sem lesão cardíaca evidente apresentaram uma tendência ( $P = 0,07$ ) à significância em relação aos mesmos controles.

A partir destes promissores resultados preliminares, pretendemos medir os níveis séricos de S100B em pacientes com cardiomegalia secundária à cardiopatia hipertensiva, com o objetivo de determinar se as alterações observadas nos níveis de S100B refletem uma resposta específica na doença de Chagas ou a alterações no miocárdio.

**Figura 4.**



## f) Isquemia experimental em ratos

**Portela LV, Napp G, Paim L, Moczulski E, Mazzini G, Schaf D, Gonçalves CA, Netto CA, Souza DO.**

Baseado em evidências da literatura, que indicam que os níveis séricos da proteína S100B aumentam em episódios isquêmicos cerebrais (Wunderlich et al, 1999; Jonsson et al, 2001), em colaboração com o grupo do Dr. Carlos Alexandre Netto, começamos a determinar os níveis séricos e líquóricos de S100B e a realizar exames de imagem cerebral por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em ratos submetidos a isquemia global transitória.

Resultados preliminares demonstram que logo após o insulto isquêmico os níveis líquóricos de S100B estão aumentados (ao redor de 10 vezes) (**Tabela 2**). Com o objetivo de tentar correlacionar este aumento precoce com posteriores alterações cerebrais detectadas por análise com imagens, realizamos RMN em cérebro de ratos 24 hs após o insulto isquêmico. A **Figura 5** mostra que o insulto isquêmico produz alterações detectáveis por RMN cerebral.

A partir disso, iniciaremos protocolos de pesquisas com abordagens farmacológicas de neuroproteção no modelo de isquemia induzida, utilizando para monitorar a terapêutica tanto a medida da S100B, como os parâmetros de neuroimagem.

**Tabela 2.**

<b>Grupo (N = 3)</b>	<b>S100B (ng/mL)</b>
Controle	0,38 ± 0,07
Isquemia	3,50 ± 0,03

Figura 5.



# **CAPÍTULO X**

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A proteína S100B é uma proteína astrocitária ligante de cálcio de peso molecular de 21 KDa e que tem localização predominantemente no SNC. Outras células fora do SNC como melanócitos, adipócitos e células epidermais de Langerhans também podem expressar esta proteína, mas a concentração cerebral é muito maior, sendo aproximadamente 90% do total de S100B presente no corpo. Nos últimos anos, a proteína S100B tem sido estudada com muito interesse no que se refere aos seus aspectos funcionais e como marcador bioquímico periférico de dano cerebral em eventos agudos e crônicos. Nosso grupo tem atuado tanto em ciência básica quanto aplicada. Esta tese tenta abordar sob o ponto de vista de trabalhos já realizados, e sob o ponto de vista de perspectivas, estes dois campos da ciência. Na primeira parte da tese, relatamos alguns estudos clínicos feitos com a proteína S100B.

No que se refere ao uso da proteína S100B como ferramenta diagnóstica, podemos dizer que medidas da proteína S100B no líquido amniótico foram capazes de detectar fetos com síndrome de Down, e que os níveis da proteína não apresentaram variações com a idade gestacional (Portela et al, 2000). Entretanto, a análise do líquido amniótico para fins diagnósticos tem ainda a limitação dos riscos que impõem a coleta.

Em relação as doenças com claras manifestações do SNC, como a paraparesia espástica tropical pelo vírus HTLV-I, lupus eritematoso sistêmico e epilepsia secundária a neurocisticercose (capítulos III, IV e V da tese) temos algumas considerações a fazer:

Na infecção pelo vírus HTLV-1, cerca de 1% dos indivíduos manifestam a paraparesia espástica tropical e a utilização de um marcador capaz de detectar precocemente estas alterações seria de grande relevância. Nossos resultados mostraram que medidas da proteína S100B no sangue poderia ser um bom marcador da atividade desta doença no SNC, entretanto estudos adicionais são necessários para validar esta proposta.

Os níveis da proteína S100B estão aumentados no lupus eritematoso sistêmico, mesmo naqueles pacientes sem manifestações neuropsiquiátricas. Este resultado sugere que a proteína S100B poderia estar detectando sutis alterações no SNC dos pacientes com lupus e que ainda não se manifestaram clinicamente.

No caso da epilepsia secundária a neurocisticercose, encontramos variações significativas apenas naqueles pacientes com alterações eletroencefalográficas bilaterais,

entretanto, a utilização de modelos animais poderia ser de grande relevância para se determinar o envolvimento da proteína S100B nas fases iniciais da doença.

No capítulo VI, demonstramos pela primeira vez na literatura internacional um curva ontogenética com a proteína S100B desde o nascimento até a vida adulta e os resultados reforçam o envolvimento desta proteína no processo de maturação do SNC e a necessidade de se utilizar controles pareados por sexo e idade em estudos clínicos.

Pela experiência do nosso grupo, bem como de outros já citados nesta tese, a proteína S100B tem demonstrado ser um marcador inespecífico para se evidenciar dano ou disfunção em doenças agudas e crônicas com envolvimento do SNC. Apesar de ser um marcador inespecífico, medidas dos níveis da proteína S100B tem grande sensibilidade para detectar uma resposta cerebral inespecífica.

As atividades nucleotidásicas no LCR de ratos, descritas no capítulo VIII desta tese, apresentam duas características importantes. Estão solúveis no meio extracelular e são detectáveis no LCR. Além disso, esta atividade também pode ser estudada como marcadora de dano cerebral em modelos experimentais. A caracterização desta atividade em LCR de humanos será o próximo passo desta linha de trabalho.

Em relação ao capítulo das perspectivas, nenhuma discussão foi apresentada, pois, em se tratando de resultados preliminares, evidentemente necessitam de experimentos adicionais afim de que seja possível obter algumas conclusões.

## Referências

1. Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100B Expression in and effects on Microglia. *Glia* 33:131-142 (2001).
2. Alhemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein. S-100 $\beta$  protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced dmge and is involved in the antiapoptotic action of the 5HT<sub>1A</sub> -receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res* 858:121-128(2000).
3. Arai M Yamazaki H, Inoue K, Fushiki T. Effects of intracranial injection of transforming growth factor-beta relevant to central fatigue on the waking eletroencephalogram of rats comparison with effects of exercise. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 307-312(2002).
4. Ashraf S, Bhattacharya K, Tian Y, Watterson K. Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest. *Eur J Cardio-Thorac Surg*.16:32-37(1999).
5. Azmitia EC, Griffin ST, Marshak DR, Van Eldik LJ, Whitaker-Azmitia PM. S100 $\beta$  and serotonin: a possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 94:459-473 (1992).
6. Baudier J, Gerard D. Conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 $\alpha$  protein: the effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a ( $\alpha\beta$ ) protein. *J Biol Chem* 261:8204-8212 (1986).
7. Benveniste EN. Cytokines actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:259-275 (1998).
8. Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AM, Cavalheiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJ.Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 39:229-238(2000).
9. Braun N, Fengler S, Ebeling C, Servos J, Zimmermann H. Sequencing, functional expression and characterization of rat NTPDase6, a nucleoside diphosphatase and novel member of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family. *Biochem J* 351:639-647 (2000).

10. Brundege JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 39:353-391(1997).
11. Cerutti SM, Chadi G. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. *Cell Biol Int* 24:35-39 (2000).
12. Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-380(1986).
13. Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'Onofrio M, Caciagli F, Di Iorio P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosc* 19:395-414 (2001).
14. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38:107-125(2001).
15. De Oliveira ME, Battastini AMO, Meirelles MNL, Moreira CM, Dias RD, Sarkis JF. Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Molecular and Cell Biochem* 170:115-123(1997).
16. Donato R. Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium* 12:713-26 (1991).
17. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450:191-231(1999).
18. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668 (2001).
19. Dong Y, Benveniste EN. Immune Function of Astrocytes. *Glia* 36:280-190 (2001).
20. Dwyer D, Flynn J. Short term aerobic exercise training in young males does not alter sensitivity to a central serotonin agonist. *Exp Physiol* 87:83-89(2002).
21. Gentil BJ, Delphin C, Mbele GO, Deloulme JC, Ferro M, Garin J, Baudier J. The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis regulation by S100B. *J Biol Chem* 276:23253-23261(2001).

22. Ghazanfari FA, Stewart RR. Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture. *Brain Res* 890:49-65(2001).
23. Gonçalves DS, Lenz G, Karl J, Gonçalves CA, Rodnight R. *Neuroreport* 11:807-809 (2000).
24. Griffin SWT, Sheng JG, Mrak RE. Inflammatory pathways. Implications in Alzheimer's disease. W Wasco. R.E. Tanzi (Edts), *Molecular Mechanism of Dementia*, Human Press, Totowa, NJ, pp. 169-176 (1996).
25. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, Chris HMM, Lamers KJB. Release of Glial Tissue-Specific Proteins After Acute Stroke: A Comparative Analysis of Serum Concentrations of Protein S-100B and Glial Fibrillary Acidic Protein. *Stroke* 31:2670-2677(2000).
26. Hu J, Van Eldik LJ. S100 $\beta$  induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1313:239-245 (1996).
27. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100B induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69:2294-2301(1997).
28. Ingebrigtsen T, Waterloo K, Jacobsen EA, Langbakk B, Romner B. Traumatic brain damage in minor head injury: relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioural outcome. *Neurosurgery* 45:468-475 (1999).
29. 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*, 115:469-74 (1981).
30. Isobe T, Okuyama, T. The amino-acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S100a protein. *Eur J Biochem*, 116:79-86 (1981).
31. Johnsson P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 10: 120-126 (1996).
32. Jonsson H, Johsson P, Birch-Iensen M, Alling C, Westaby S, Blonquist S. S100B as a predictor of size and outcome of stroke after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 71:1433-1437(2001).
33. Kahn HJ, Baumal R, Van Eldik LJ, Duhn RJ, Marks A. Immunoreactivity of S100 beta in heart, skeletal muscle, and kidney in chronic lung disease: possible induction by cAMP. *Mod Pathol* 4:698-701(1991).

34. Kligman D, Marshak DR. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7136-7139 (1985).
35. Lara DR, Souza DO. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* 54:157-166(2000).
36. Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LVC, Gonçalves CA, Fonseca M, Hauck S & Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiat. Res* 35:11-14 (2001).
37. Lara DR, Portela LVC, Gonçalves CA, Souza DO. Glial cells and S100B in psychiatry (replay to Drs. Hari and Radmila Manev). *J Psych Res* 35:349-350 (2001).
38. Machado-Vieira R, Knijnik DZ, Margis R, Chachamovic E, Lara DR, Portela LV, Tort ABL, Gonçalves CA, Souza DO, Kapzinski F. Decreased serum S100B protein in drug-free social phobic patients. No Prelo. *Eur Psych* (2002).
39. Machado-Vieira, Portela LV, Lara DR, Gonçalves CA, Soatres JC, Kapzinski F, Souza DO. Increased serum S100B protein in drug-free bipolar patients during the first manic episode. No Prelo. *Eur Neuropsychofarmacol*(2002).
40. Mariglió MA, Fulle S, Calissano P, Nicoletti I, G Fano. The brain protein S100ab induces apoptosis in PC12 cells. *Neurosc* 60:29-35.
41. Missler U, Wiesmann M, Ehlermann P, Tronier M, Notzold A, Steinmeier E, Wood WG. Validation and comparison of two solid-phase immunoassay for the quantification of S-100B in Human blood. *Clinical Chem* 46:993-996(2000).
42. Mohamed MQ, Abraha HD, Sherwood RA, MacRae K, Retsas S. Serum S100beta as a marker of disease activity in patients with malignant melanoma. *Med Oncol* 18:109-120.
43. Moore B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 739-744 (1965).
44. Mulero JJ, Yeung G, Nelken ST, Ford JE. CD39-L4 is a secreted human apyrase, specific for the hydrolysis of nucleotide diphosphatades. *J Biol Chem* 16:20064-20067(1999).
45. Nishikawa T, Lee ISM, Shiraishi T, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem*. 272:23037-23041(1997).

46. Nolte C, Matyash M, Pivneva T, Schipke CG, Ohlemeyer C, Hanish U, Kirchhoff F, Kettenmann H. GFAP Promoter-Controlled EGFP-Expressing Transgenic Mice: A Tool to Visualize Astrocytes and Astrogliosis in Living Brain Tissue. *Glia* 33:72-86 (2001).
47. Pasini FL, Guideri F, Picano E, Parenti G, Petersen C, Varga A, Di Perri T. Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: A study during transient ischemic attacks, and stroke. *Brain Res Bull* 51:327-330 (2000).
48. Pereira GS, Walz R, Bonan CD, Battastini AM, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *Neurosc Lett* 301: 72-74 (2001)
49. Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldick LJ. Cerebrospinal S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39:409-413.
50. Pinto SS, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Karl J, Gonçalves CA, Wofchuck S, Rodnight R. Immunocontent and secretion of S100b in astrocyte cultures from different brain regions relation to morphology. *FEBS Lett* 486:203-207.
51. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492(1998).
52. Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol* 59:663-690(1999).
53. Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21: 134-140 (1996).
54. Schoultz E, Hansson LO, Djureen E, et al. Prognostic value of serum analyses of S100B protein in malignant melanoma. *Melanoma Res* 6:133-7 (1996)
55. Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci* 88:3554-3558(1991).
56. Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J. Neurochem*, 42:1536-1541 (1984).
57. Simonian A, Baudier J, Haglid KG. Modulation of ATPase activities in the central nervous system by the S-100 proteins. *Neurochem Res* 14:761-764 (1989).

58. Stone W. Endogenous neurotoxins from triptophan. *Toxicon* 39:61-73 (2001).
59. Struder HK, Weicker H. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part I. *Int J Sports Med* 22: 467-481(2001).
60. Tong L, Shen H, Perrau VM, Balazs R, Cotman CW. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 8: 1046-1056(2001).
61. Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Gonçalves D, Portela LV, Gonçalves CA. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by tripan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Prot* 6:86-90 (2000).
62. Tsoporis JN, Marks A, Khan HJ, Butany JW, Liu PP, O'Hanlon D, Parker TG. S100beta inhibits alpha-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272:31915-31921(1997).
63. Van Eldik L J., Zimmer DB. Secretion of S-100 from rat c6 glioma cells. *Brain Res* 436:367-370 (1987).
64. Vila M, Jackson-Lewis V, Guégan C, Wu DC, Teismann P, Choi D, Tieu K, Przerdborski S. The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14:483-489 (2001).
65. Whitaker-Azmitia PM, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia EC. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S100 $\beta$  show neuronal cytoskeletal and signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* 776:51-60(1997).
66. Wimmer-Greinecker G, Matheis G, Brieden M, Dietrich M, Oremek G, Westphal K, Winkelmann BR, Moritz A. Neuropsychological changes after cardiopulmonary bypass for coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 46:207-212(1998).
67. Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Gortler M, Jost S, Herrmann M. Early Neurobehavioral Outcome After Stroke Is related to Release of Neurobiochemical Markers of Brain Damage. *Stroke* 30:1190-1195 (1999).
68. Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Brit J Pharmacol* 129: 921-926(2000).

69. Ziegler DR, Innocente CE, Leal RB, Rodnight R, Gonçalves CA. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res* 23:1259-1263 (1998).
70. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37: 417-429 (1995).
71. Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Develop Res.* 52:44-45(2001).