MIKE YOSHIO HAMASAKI

AVALIAÇÃO TEMPORAL DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE S100 β NO
ENCÉFALO DE RATOS NEONATOS SUBMETIDOS À ANÓXIA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

MIKE YOSHIO HAMASAKI

Avaliação temporal da expressão gênica e proteica de S100 β no encéfalo de ratos neonatos submetidos à anóxia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Hamasaki, Mike Yoshio.

Avaliação temporal da expressão gênica e proteica de S100 β no
encéfalo de ratos neonatos submetidos à anóxia / Mike Yoshio
Hamasaki. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de
concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa:
Neurociências.

Versão do título para o inglês: Assessment of S100 β gene and
protein expression over time in the brain of newborn rats subjected to
anoxia.

1. Biomarcador 2. Cerebelo 3. Córtex cerebral 4. Encefalopatia
hipóxico-isquêmica 5. Hipocampo I. Nogueira, Profa. Dra. Maria Inês
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0200/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mike Yoshio Hamasaki

Título da Dissertação: Avaliação temporal da expressão gênica e proteica de S100 β no encéfalo de ratos neonatos submetidos à anóxia.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria Inês Nogueira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **190** nas fls. **139** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Inês Nogueira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo da organização e dinâmica neural: no encéfalo de ratos após anóxia neonatal*" do qual participam o(s) aluno(s), **Silvia Honda Takada, Mike Yoshio Hamasaki, Vitor Yonamine Lee**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **12.12.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 14 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esse trabalho a minha mãe, Izabel Aparecida de Camargo, que mesmo na situação em que esta mais fragilizada ainda consegue me ensinar o verdadeiro significado de ser forte.

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Maria Inês Nogueira, por ter me aceito e proporcionado a oportunidade de realização deste estudo; pela doação de seu tempo e conhecimento, e principalmente, por entender e respeitar os obstáculos vividos por mim em todo período em que estamos juntos. Obrigado.

Aos Professores Doutores Mario Hiroyuki Hirata, Rosario Dominguez Crespo Hirata e Luiz Roberto Giorgetti de Britto, pela colaboração, atenção, respeito e ensinamentos fornecidos desde os primeiros experimentos em seus laboratórios.

Aos Professores Doutores Jackson Cioni Bittencourt, Patricia Castelucci, Luciana Pinato e, especialmente, Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves, pelas sugestões que contribuíram para aprimorar este estudo.

À Daniella Sabino Batagello, por ser amiga, colega, colaboradora nos mais diversos aspectos profissionais e pessoais.

À Natalia Marchesan Bexiga, por me auxiliar incondicionalmente. Obrigado.

Aos amigos e colaboradores do laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Leila Maria Guissoni Campos, Silvia Honda Takada e Vitor Yonamine Lee. Obrigado pela presença e apoio constantes.

Aos amigos membros do Laboratório de Neurobiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Priscila Crespo Garcia, Adilson da S. Alves, Livia Dati e Caroline Real Gregório. Meus sinceros agradecimentos pela amizade e apoio.

Aos amigos membros e ex-membros do laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Cristina Moreno Fajard, Andre Ducati Luchessi, Gabriela Guimarães Sousa Leite, Silvia Tchernin Himelfarb, Joas da Silva, Álvaro Cerda e Juliana Germano. Meus mais sinceros agradecimentos.

Ao amigo Ricardo Bandeira, por dispor de alguns períodos da semana e dos finais de semana para auxiliar na coleta do material biológico utilizado neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neuroanatomia Química do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Helder C. Costa e Joelcimar Martins da Silva. Meus mais sinceros agradecimentos.

À Rosana Duarte Prisco pela atenção, paciência e, principalmente, pela fundamental ajuda nas avaliações estatísticas deste trabalho.

À Priscila Harumi Hamasaki pelo auxílio nas correções ortográficas e gramaticais deste trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Pró Reitoria Auxílio à Pesquisa (PROAP) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro do desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Ciências Morfofuncionais, pela oportunidade e facilidades oferecidas.

Ao Departamento de Anatomia e ao Instituto de Ciências Biomédicas, pela utilização de seus espaços e recursos.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

Hamasaki MY. Avaliação temporal da expressão gênica e proteica de S100 β no encéfalo de ratos neonatos submetidos à anóxia. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Mais do que qualquer outro órgão do corpo humano, a integridade do encéfalo é dependente do contínuo fornecimento de oxigênio e glicose para manutenção de suas funções. A anóxia neonatal, considerada problema clínico mundial, é uma das mais importantes e frequentes causas de lesão encefálica neonatal que pode apresentar consequências graves e permanentes na vida adulta. O termo anóxia, aplicado a fisiopatogenia do processo que ocorre em nível tissular, é originada quando há baixo teor de oxigênio sanguíneo, de forma insuficiente para suprir as funções fisiológicas do organismo acometido de maneira sistêmica. Clinicamente em indivíduos de diferentes faixas etárias, o diagnóstico atribuído aos distúrbios hipóxicos/anóxicos que causam agressões ao sistema nervoso central (SNC) é denominado encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI). Durante a última década, os marcadores bioquímicos do sistema nervoso central têm chamado a atenção do meio científico, com destaque para a proteína S100 β . Apesar da crescente investigação científica sobre aspectos distintos envolvendo a relação da proteína S100 β com a EHI, atualmente são escassos os estudos que abrangem a análise da expressão de S100 β diretamente no tecido nervoso. De forma similar, poucos estudos avaliaram diferentes áreas do encéfalo acometido por este tipo de encefalopatia. Dados desta natureza tornam-se essenciais uma vez que o acometimento encefálico na grande maioria dos casos é extenso, ocasionando lesões em múltiplas regiões encefálicas. Ademais, a investigação dos teores de mRNA e da proteína S100 β de forma temporal, em regiões encefálicas distintas, constitui um alicerce extremamente útil no que se refere ao papel desta proteína na fisiopatologia da EHI neonatal. O presente trabalho objetivou explorar a eventual variação da expressão do mRNA do gene e da proteína S100 β no hipocampo, cerebelo e córtex cerebral de ratos neonatos pós-natais de quatro dias (P4) em condições de anóxia, comparativamente às condições controle por meio da técnica de RT-PCR e Western Blotting. Este estudo foi desenvolvido em ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), divididos em dois grupos: o grupo Experimental Anóxia (EA) e o grupo Experimental Controle (EC), que por sua vez foram subdivididos em tempos de 2, 4, 6, 12 e 24 horas no que se refere à coleta de amostras após a aplicação dos estímulos pré-estabelecidos para cada grupo. A fim de efetuar a estimulação dos grupos EA e EC foi utilizado um sistema de anóxia adaptado e validado em nosso laboratório. Dos períodos avaliados, nossos resultados indicaram que a anóxia proporcionou um pico na expressão gênica de S100 β após duas horas e um pico de expressão proteica às 4 horas nas áreas do hipocampo e cerebelo. O córtex cerebral do grupo EA quando comparado ao grupo EC, não apresentou nenhum aumento significativo de S100 β nos períodos avaliados. Os resultados obtidos contribuem de forma crucial para elucidação do papel da proteína S100 β como biomarcadora na EHI.

Palavras-chave: Biomarcador. Cerebelo. Córtex cerebral. Encefalopatia hipóxico-isquêmica. Hipocampo.

ABSTRACT

Hamasaki MY. Assessment of S100 β gene and protein expression over time in the brain of newborn rats subjected to anoxia. [Masters thesis (Sciences Morphofunctional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

More than any other organ, the integrity of the brain depends on the continuous supply of glucose and oxygen to maintain its functions. Neonatal anoxia, considered a clinical world-wide problem, is one of the most important and frequent causes of encephalic injury in neonates that can have serious and permanent consequences in adulthood. The term anoxia is applied to the pathophysiology of the process that occurs in a tissue level, is characterized by low oxygen concentrations so inadequate to meet the body's physiological functions in a systemic way. The clinical diagnosis corresponding to hypoxic/anoxic disorders damaging the central nervous system (CNS) is known as hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). The biochemical markers of the central nervous system and protein S100 β in particular have recently gained the attention of the scientific community. Despite the increasing number of studies on the relationship between protein S100 β and HIE, few studies have analyzed the expression of S100 β directly in the nervous tissue. Similarly, few studies have assessed the brain areas affected by this type of encephalopathy. This type of data is of paramount importance because the extent of the brain involvement is large in most cases of HIE, causing damage in multiple brain areas. In addition, investigation of the mRNA and protein levels of the S100 β in various brain areas over time might provide useful data for the elucidation of the role that this protein plays in the physiopathology of neonatal HIE. The aim of the present study was to investigate the temporal variation in the expression of S100 β gene and protein in the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex of newborn rats following anoxia. Reverse transcription polymerase chain reaction and Western Blotting was performed in brain regions of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) distributed in subgroups relative to the time elapsed since the application of the stimuli: two, four, six, 12, and 24 hours and their controls. To elicit anoxia in P4 pups, a system adapted and validated at our laboratory was used. Anoxia induced a peak in S100 β gene expression after two hours and a peak in protein expression after four hours in the hippocampus and cerebellum and never exhibited a significant increase in the cerebral cortex. These results represent crucial contribution to elucidates the role protein S100 β plays as a biomarker in HIE.

Keywords: Biomarker. Cerebellum. Cerebral cortex. Hypoxic-ischemic encephalopathy. Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura secundária das proteínas S100.....	17
Figura 2 - Funções intracelulares da proteína S100β.....	19
Figura 3 - Efeitos extracelulares da proteína S100β em neurônios.....	21
Figura 4 - Fases 1 e 2 da fisiopatologia da EHI.....	25
Figura 5 - Percentual de nascidos vivos pré-termos no Brasil e regiões.....	27
Figura 6 - Distribuição dos grupos pertencentes ao estudo.....	32
Figura 7 - Hipocampo: Expressão gênica de S100β.....	38
Figura 8 - Hipocampo: Expressão proteica de S100β.....	39
Figura 9 - Cerebelo: Expressão gênica de S100β.....	41
Figura 10 - Cerebelo: Expressão proteica de S100β.....	43
Figura 11 - Córtex Cerebral: Expressão gênica de S100β.....	44
Figura 12 - Córtex Cerebral: Expressão proteica de S100β.....	45
Figura 13 - Representação dos níveis da expressão gênica e proteica de S100β.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantificação da transcrição hipocampal do gene S100 β	37
Tabela 2 - Quantificação da tradução da proteína S100 β no hipocampo.....	39
Tabela 3 - Quantificação da transcrição cerebelar do gene S100 β	40
Tabela 4 - Quantificação da tradução da proteína S100 β no cerebelo.....	42
Tabela 1 - Quantificação da transcrição do gene S100 β no córtex cerebral.....	43
Tabela 2 - Quantificação da tradução da proteína S100 β no córtex cerebral.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ M – Micromolar	MPTP – neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
AGEs - Produtos finais da glicação avançada	mRNA - RNA mensageiro
AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico	NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleotido-fosfato
ATP – adenosina trifosfato	NF κ B - Fator Nuclear Kappa B
BDNF - fatores neurotróficos derivados do cérebro	NMDA - N-metil-D-aspartato
cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar	NSE - Enolase específica do neurônio
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético	PBS - Tampão fosfato salino
EGF - fator de crescimento epidérmico	PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase
EHI - Encefalopatia Hipóxico-isquêmica	PI3-K – fosfatidilinositol-3-quinase
ERK - Quinase Regulada por Sinais Extracelulares	RAGEs - Receptores para AGEs
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida	RNA - Ácido ribonucleico
GSK3 β - glicogênio sintase quinase 3 beta	ROS – espécies reativas de oxigênio
IL-1 β - interleucina-1 beta	RT-PCR - Transcrição reversa seguida de PCR
JAK – janus quinase	S100 β - S100 beta
JNK - quinase c-Jun n-terminal	SNC - Sistema nervoso central
iNOS - Sintase do óxido nítrico	STAT – transdutor de sinal e ativador da transcrição
MBP - Proteína básica da mielina	TNF α - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Família S100.....	16
1.2 Proteína S100β.....	18
1.3 Funções intracelulares da proteína S100β.....	19
1.4 Secreção e liberação da proteína S100β.....	20
1.5 Funções extracelulares da proteína S100β.....	21
1.6 Proteína S100β Vs. Biomarcador de dano neural.....	22
1.7 Hipóxia, anóxia e encefalopatia hipóxico-isquêmica.....	23
1.8 Encefalopatia hipóxico-isquêmica e proteína S100β.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Condições experimentais.....	31
4.3 Processamento do material biológico.....	33
4.4 Extração e análise de RNA total.....	33
4.5 Expressão do mRNA.....	33
4.6 Extração e análise das proteínas totais.....	34
4.7 Expressão da proteína.....	35
4.8 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Peso dos animais.....	37
5.2 Expressão gênica de S100β no hipocampo.....	37
5.3 Expressão proteica de S100β no hipocampo.....	38
5.4 Expressão gênica de S100β no cerebelo.....	40
5.5 Expressão proteica de S100β no cerebelo.....	41
5.6 Expressão gênica de S100β no córtex cerebral.....	43
5.7 Expressão proteica de S100β no córtex cerebral.....	44
5.8 Expressão gênica e proteica de S100β.....	46

6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE A - Artigo publicado.....	61
APÊNDICE B - Artigos submetidos.....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família S100

Os primeiros membros da família S100 relatados na literatura foram as proteínas S100A1 e S100 β . Inicialmente, foram descritas em 1965, quando Moore isolou uma fração subcelular do encéfalo de Boi (*Bos taurus*), em que verificou a presença de pequenas proteínas ácidas, específicas e altamente enriquecidas no tecido encefálico. Por apresentarem constituintes 100% solúveis em solução de sulfato de amônia, essas proteínas foram denominadas S100 (Moore, 1965).

De acordo a homologia das sequências de aminoácidos e outras propriedades moleculares, até o presente momento, são consideradas 24 proteínas como membros desta família, sendo todas com baixa massa molecular (variando entre nove e 13 kDa) e encontradas exclusivamente em vertebrados (Donato et al., 2012). Dos genes expressos em humanos, 19 deles estão localizados no cromossomo 1q21. Outras localizações dos genes da família *S100* incluem *S100A11P* que se encontram no cromossomo 7q22-q3, *S100 β* no cromossomo 21q22, *S100G* no cromossomo Xp22, *S100P* no cromossomo 4p16 e o gene *S100Z* no cromossomo 5q13 (Marenholz et al., 2004).

Todos os membros dessa família possuem um arranjo estrutural comum, com duas regiões que apresentam diferentes afinidades pelo cálcio, conhecidas por *EF-hand*, em que uma é próxima à região amino-terminal e a outra, à região carboxi-terminal (Heizmann, 1999; Rothermund et al., 2003). Cada *EF-hand* é formada por duas alfa-hélices e uma alça de ligação ao cálcio. As duas *EF-hand* são unidas por uma região intermediária denominada de “*hinge region*” (região dobradiça), em que a Hélice 2 (HII) é unida à Hélice 3 (HIII). Na hélice 4 (HIV), todas as proteínas dessa família são acompanhadas por uma extensão na região carboxi-terminal. As diferentes sequências de aminoácidos da região dobradiça e da extensão da região carboxi-terminal são as que sugerem a especificidade da atividade biológica de cada membro (figura 1.) (Donato, 2003).

Figura 1 - Esquema da estrutura secundária das proteínas S100.

As alças de ligação com cálcio são representadas pelas siglas L1 e L2, as regiões carboxi-terminal e amino-terminal pelas letras “C” e “N”, respectivamente, e a região dobrada corresponde a letra “H” (Donato, 2003).

Não há mecanismo específico para que ocorra a ativação das proteínas da família S100, uma vez que foi observada que ampla variedade de sinais ativam o processo de sua expressão gênica, entre eles estão o interferon gamma (Pawlinski et al., 1999), fator de crescimento do fibroblasto 2 (Goddard et al., 2002), interleucinas (Sheng et al., 2000), glutamato (Martinez-Contreras et al., 2002), corticoesterona (Nishi et al., 1996) e prednisona (Gonzalez-Perez et al., 2001).

Funcionalmente, as proteínas S100 dependem do meio onde se encontram, podendo ser divididas em três subgrupos: as que exercem efeitos regulatórios apenas no meio intracelular, as que exercem funções intra e extracelulares e as proteínas que exercem atividades apenas no meio extracelular (Donato et al., 2012). Assim, no meio intracelular, essas proteínas estão relacionadas com regulação de fosforilação de proteínas, dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, homeostase do cálcio, atividade enzimática, respostas inflamatórias, apoptose, metabolismo, interação com receptores de membrana e ácidos nucleicos (Donato et al., 1999, 2001, 2012; Schafer, Heizmann, 1996; Zimmer et al., 1995). Já em meios extracelulares, a literatura científica indica que essas proteínas agem de forma autócrina e parácrina via ativação de receptores de superfície, receptores acoplados à proteína G, receptores scavenger, proteoglicanas heparan de sulfato e N-glicanas. Por meio da sinalização extracelular, alguns membros da família S100 foram relatados exercendo a atividade de regulação da proliferação e da diferenciação celular, sobrevivência e migração celular em condições fisiológicas e patológicas, inflamação e reparo tecidual e atividades antimicrobianas (Donato et al., 2012).

Determinadas proteínas da família S100 também podem ser encontradas em níveis elevados no plasma sanguíneo e em outros fluidos biológicos durante o processo de algumas condições patológicas e são utilizadas como biomarcadores.

1.2 Proteína S100 β

A proteína S100 β apresenta as características comuns do seu grupo quanto a peso molecular, sendo ligante de cálcio, zinco e cobre, além de pertencer ao subgrupo funcional de proteínas que exerce efeitos regulatórios no meio intracelular e extracelular. Ela é encontrada principalmente na forma homodimérica dentro das células. Atualmente, essa proteína é identificada em grandes quantidades em astrócitos, células de Schwann, células ependimárias, oligodendrócitos maduros, melanócitos, células adiposas e condrócitos. E em menor proporção em algumas populações neuronais tais como células da microglia, células epiteliais renais, mioblastos, células do músculo esquelético, condrócitos, células progenitoras neuronais e células de Langerhans (Donato et al., 2001, 2003, 2012; Heizmann, 2002).

À semelhança dos demais membros de sua família, diversos fatores e condições regulam a expressão desta proteína. Em astrócitos já foram identificados alguns fatores que atuam no aumento da expressão de S100 β . São eles: a interleucina-1 beta (IL-1 β), a proteína beta-amiloide, fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) e a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) (Djalali et al., 2005; Iuvone et al., 2007; Manev et al. 2003; Peña et al., 1995; Sheng et al., 1996). Em contrapartida, o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o interferon gamma têm demonstrado exercer uma depressão na expressão de S100 β em astrócitos e microglias (Halonen et al., 2006; Raponi et al., 2007).

A proteína S100 β exerce a sua função biológica por meio da interação com outras proteínas. Intracelularmente, atua como um sensor de Ca²⁺. Quando a proteína S100 β se liga ao íon de Ca²⁺, a HIII de monômeros próprios se torna mais perpendicular que a HIV, fazendo com que a região dobradiça se torne distante. Em consequência dessas alterações morfológicas, uma mudança ocorre no número de resíduos hidrofóbicos da região dobradiça, HIII e HIV. Estas mudanças do número de resíduos promovem a formação de uma fenda hidrofóbica, no qual S100 β se liga a outras proteínas denominadas de proteínas alvo (*target proteins*). Entretanto, em alguns casos, a proteína S100 β pode se ligar a proteínas alvo sem necessariamente depender da ligação com íons de cálcio, porém o mecanismo pelo qual é possível esta interação ainda é desconhecido (Donato, 2001; Heizmann et al., 2002; Santamaria-Kisiel et al., 2006). Sua expressão abundante no citoplasma e em variados tipos celulares, sugere interação com ampla gama de proteínas alvo na célula.

1.3 Funções intracelulares da proteína S100β

Por meio da interação intracelular com outras proteínas alvo, a proteína S100β participa de diferentes eventos celulares tais como: promoção de sobrevivência e diferenciação celular, regulação da fosforilação de proteínas, homeostase de cálcio, modulação da atividade dos canais transmembranares, dinâmica do microtúbulo e dos filamentos intermediários do tipo III, fatores de transcrição, atividade enzimática e metabolismo, como indica a figura 2 (Alexanian et al., 1999; Castets et al., 1997; Donato et al., 2009, 2012; Rothermundt et al., 2003; Selinfreund et al., 1990).

Figura 2 - Funções intracelulares da proteína S100β

Esquema ilustra as funções em que a proteína S100β está envolvida. No meio intracelular, seu papel abrange vias muito variadas, algumas das quais estão associadas às proteínas alvo. Já foram descritas funções da proteína S100β no citoesqueleto, locomoção celular, degradação proteica, ligação com receptores, fosforilação de diversas proteínas, homeostase de cálcio, modulação de enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição (imagem adaptada do artigo científico de Donato et al., 2012).

Experimentos realizados por um grupo de pesquisadores chineses (Liu et al., 2011) demonstraram que o aumento crônico da expressão de S100β em camundongos transgênicos pode estar associado ao desenvolvimento da doença de Parkinson. Níveis elevados da expressão de S100β (em astrócito e neurônios) também foram relacionados com alterações de humor e esquizofrenia (Rothermundt et al., 2009; Schroeter et al., 2010).

1.4 Secreção e liberação da proteína S100 β

Diversos membros da família S100, já foram descritos em fluidos biológicos. Plasma sanguíneo, urina, líquido seminal, saliva, escarro, líquido, fezes e fluidos de abscessos são locais que usualmente são encontrados membros da família S100, principalmente em condições de enfermidades. Alguns deles, por exemplo, as proteínas S100A8, S100A9 e S100 β , são considerados biomarcadores de determinados processos patológicos. Entretanto o mecanismo de exocitose destas proteínas é bastante variado e depende de distintos estímulos e condições (Bloomfield et al., 2007; Dassan et al., 2009; Foell et al., 2007; Gazzolo, Michetti, 2010; Kleindienst, Ross Bullock, 2006; Mocellin et al., 2007; Sem, Belli, 2007). Estudos indicam que os astrócitos e os adipócitos são tipos celulares que estão em constante processo de liberação de S100 β (Shashoua et al., 1984; Suzuki et al., 1984; Van Eldik, Zimmer, 1987). Em astrócitos, é evidenciado que agonistas do receptor de serotonina (5-HT_{1A}), glutamato, antidepressivos, risperidona, antioxidantes naturais, adenosina, interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), MTPT, ácido lisofosfatídico, complexo da desidrogenase dos α - cetoácidos de cadeia ramificada, estresse metabólico, estresse oxidativo e alterações extracelulares dos níveis de cálcio e potássio são estímulos que induzem a liberação da proteína S100 β (Abib et al., 2007; de Almeida et al., 2007; de Souza et al., 2009; Donato et al., 2009; Edwards, Robinson, 2006; Funchal et al., 2007; Iuvone et al., 2007; Nardin et al., 2009; Quincozes-Santos et al., 2008; Sorci et al., 2011; Tramontina et al., 2008).

Segundo Sakani et al. (2008), a proteína S100 β é exocitada dos astrócitos por meio da interação com os receptores metabotrópicos do tipo 3. Além disso, S100 β pode extravasar para o meio extracelular em decorrência de danos que promovam ruptura da membrana lipídica da célula (Bloomfield et al., 2007; Kleindienst et al., 2007; Korfias et al., 2006; Rothermundt et al., 2003). Outra possibilidade descrita na literatura científica sobre a via de secreção da proteína S100 β foi demonstrada no modelo *in vitro* de células de Schwann utilizado por Perrone et al. (2008), em que S100 β se liga a receptores de produtos de glicação avançada (RAGE) e é exocitada via ativação da quinase Src, fosforilação da caveolina-1 e ativação da proteína Rab 11.

1.5 Funções extracelulares da proteína S100β

No meio extracelular a proteína S100β também desempenha função variada, entretanto, sua ação depende diretamente da quantidade em que é liberada e do tipo celular com o qual interage. No sistema nervoso central (SNC), em concentrações micromolares (μM) exerce efeitos neurotóxicos, porém em quantidades nanomolares (nM) apresenta efeito neurotrófico (Donato, 2001). Estudos indicam que os efeitos neurotróficos da proteína S100β em neurônios se devem à interação com receptores de produtos de glicação avançada (RAGEs), que posteriormente estimulam as quinases reguladoras de sinais extracelulares (ERK 1 e 2) e consequentemente o fator NFκB, mediados por regulação aumentada da proteína anti-apoptótica bcl-2. Entretanto, em quantidades μM , ocorre um excesso de ativação das ERK 1 e 2, que por conseguinte, induz o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), promovendo e/ou aumentando a neurotoxicidade, conforme ilustra a figura 3 (Donato et al., 2009; Huttunen et al., 2000; Sorci et al., 2010; Van Eldik, Wainwright, 2003).

Figura 3 - Efeitos extracelulares da proteína S100β em neurônios.

Esquema ilustra as principais vias descritas da ligação das proteínas S100β com os receptores RAGEs, produção de espécies reativas de oxigênio, e o desdobramento desses eventos em cascatas bioquímicas para ações tróficas, em concentrações nM, ou tóxicas em concentrações μM . Imagem adaptada de Donato et al., 2009.

Por estarem presentes em quantidades aumentadas nos tecidos que sofreram lesão, essas proteínas têm sido consideradas biomarcadores (Donato et al., 1999; Fano et al., 1995; Gatazz et al., 2000).

1.6 Proteína S100 β como biomarcadora de dano neural

Basicamente, as barreiras encefálicas podem ser conceituadas como sendo dispositivos que impedem ou dificultam a troca de substâncias entre o sangue e o tecido nervoso, entre o sangue e o líquido e entre o líquido e o tecido nervoso (Nau et al., 2010). Atualmente, existem indícios de que a quantidade de S100 β na circulação sanguínea é diretamente proporcional às alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Kanner et al., 2003; Kleindienst et al., 2010).

A detecção de níveis elevados da proteína S100 β no plasma sanguíneo, em condições de lesão neurológica, evidenciam seu potencial como biomarcadora de danos neurais. Já foi observado o aumento da concentração sérica dessa proteína em trauma crânioencefálico (Savola et al., 2004; Wiesmann et al., 2010), em insultos cérebro-vasculares (Brouns et al., 2010; Missler et al., 1997), em hemorragia intracerebral (James et al., 2009), dano cerebral perinatal (Tina et al., 2010), em encefalopatia séptica (Hamed et al., 2010), meningites bacterianas (Hamed et al., 2010), em doenças neurodegenerativas (Griffin et al., 1889) e em transtornos psiquiátricos (Rothermundt et al., 2004). Além disso, a quantidade circulante de S100 β também já foi utilizada em pesquisas para monitoramento da eficácia de determinadas abordagens terapêuticas (Baker et al., 2009). Seu potencial uso clínico no processo de tomada de decisão terapêutica é apoiado por um vasto corpo de literatura, em que a detecção das variações nos níveis séricos de S100 β são efetuadas, com abordagens e modalidades convencionais, para diagnosticar e prognosticar a extensão dos danos no SNC.

A grande vantagem da utilização desta proteína é que, em situações em que há elevação da quantidade na circulação sanguínea, seu teor pode ser facilmente aferido, fornecendo uma medida sensível para auxiliar no descarte ou na quantificação de eventuais disfunções no SNC. Entretanto, como já foi descrito anteriormente, há relatos da expressão desta proteína em outros tipos celulares (Donato, 2003). Recentemente, surgiram controvérsias a respeito da especificidade de S100 β para sistema nervoso. Enquanto alguns autores relatam que o aumento de S100 β (no plasma sanguíneo) pode ser encontrado também em alguns tipos de câncer do cólon (Hwang et al., 2011), melanomas (Gogas et al., 2009) e

até mesmo em atletas (maratonistas, corredores, jogadores de basquete, jogadores de hóquei e boxeadores) (Hasselblatt et al., 2004; Otto et al., 2000; Stalnacke et al., 2003), outros ressaltam que a expressão nas células periféricas não altera a quantidade de S100 β na circulação sanguínea (Pham et al., 2010). Porém, estudos científicos que quantificam individualmente os diferentes níveis de expressão de S100 β (tanto mRNA, quanto proteína intracelular) nas diversas estruturas do SNC ainda se apresentam escassos, principalmente em condições de lesões.

Outro fator a ser considerado na análise do potencial uso desta proteína como biomarcadora de lesões do SNC é a idade do paciente, já que a literatura revela que a expressão de S100 β em diversos tipos celulares está diretamente influenciada pela faixa etária (Nogueira et al, 2009; Pham et al., 2010; Portela et al., 2002; Tiu et al., 2000).

1.7 Hipóxia, anóxia e encefalopatia hipóxico-isquêmica

A hipóxia é um termo utilizado para descrever o estado de baixo teor de oxigênio nos tecidos orgânicos, que pode ocorrer de por fatores como obstrução física do fluxo sanguíneo em qualquer ponto da circulação corpórea, obstrução das vias aéreas ou deslocamento para áreas com concentrações baixas de oxigênio no ar. A anóxia, condição de máxima hipóxia, acontece quando a concentração de oxigênio ambiente é praticamente nula (Nyakas et al., 1996; Vannucci, 1999).

Clinicamente, o diagnóstico atribuído aos distúrbios hipóxicos/anóxicos que ocasionam agressões ao sistema nervoso central (SNC) é denominado encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI). Em recém-nascidos, na maior parte das vezes, esse diagnóstico advém do comprometimento multissistêmico gerado por asfixia perinatal (Volpi, 2008). Os aspectos anatomopatológicos da EHI variam consideravelmente de acordo com a idade gestacional, natureza do dano e tipo de intervenção. Diversos estudos demonstram que injúrias hipóxico-isquêmicas se desenvolvem em duas fases: uma fase primária denominada de “fase isquêmica”, dominada por processos de necrose celular das áreas onde ocorreu a privação do oxigênio, e uma fase secundária chamada de “fase de reperfusão”, caracterizada principalmente por processos apoptóticos que se estendem além das áreas isquêmicas. Esta segunda fase acontece, em geral, no período de duas a seis horas após a EHI, sua latência constitui um período importante em que medidas terapêuticas podem ser capazes de parar ou diminuir a evolução do dano cerebral (Hammerman, Kaplan, 1998; Inder, Volpe, 2008). A

figurar 4 ilustra detalhadamente, por meio de fluxograma, a fisiopatologia das duas fases descritas.

Figura 4 - Fases 1 e 2 da fisiopatologia da EHI.

Fluxograma dos eventos moleculares e anatomofisiológicos envolvidos nas fases 1 e 2 da fisiopatologia da EHI no sistema nervoso desde o estímulo hipóxico/anóxico até 6 horas. Adaptada de Distefano; Praticò, 2010.

Quanto ao período em que ocorre o dano neuronal, existe variabilidade regional. Por exemplo, em culturas organotípicas de células em meio livre de glicose, o período para o dano de neurônios hipocâmpais foi mais precoce do que o dos neurônios corticais. Ocorrem também diferentes períodos para o dano neuronal ou glial, dependendo da interação, se neurônio-neurônio ou glia-neurônio, sendo, por exemplo, em 7 minutos a ativação microglial subjacente a áreas hipocâmpais isquemiadas (Bernaudin et al., 1998). Em astrócitos, a vulnerabilidade a agressões hipóxicoisquêmicas, em cultura de células gliais, Zhao e Flavin (2000) demonstraram que os astrócitos do hipocampo são mais vulneráveis, com morte em 2 horas após hipóxia e hipoglicemia, que os astrócitos corticais, que morrem em 8 horas.

Dentre os fatores de risco para a ocorrência da asfíxia perinatal, tem sido destacada a prematuridade, uma vez que os avanços tecnológicos e novos conhecimentos e estratégias terapêuticas permitem maiores taxas de sobrevivência de recém-nascidos pré-termos, quando comparadas com períodos anteriores (Suguihara et al., 2005). Recém-nascidos pré-termos são assim classificados quando o parto da criança ocorre antes de 37 semanas ou 259 dias de gestação, sendo um dos principais determinantes para morbidade e mortalidade neonatal (Wang et al., 2004). Estimativas indicam que, em 2005, os gastos dos Estados Unidos da América com despesas médicas, educacionais e perda de produtividade associada à prematuridade foram superiores a 26,2 bilhões de dólares (Beck et al., 2010).

Dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc) (Brasil, 2011) mostram que a prematuridade medida pelo percentual de nascidos vivos com duração da gestação inferior a 37 semanas no Brasil apresentou aumento considerável ao longo dos últimos anos (2009 a 2011). Esse aumento foi identificado nas regiões sudeste e sul, até 2010. No ano de 2011, houve forte crescimento em todas as regiões do país, passando de 7,1 para 9,8% na média nacional (Figura 5).

Figura 5 - Percentual de nascidos vivos pré-termos no Brasil e regiões.

O gráfico indica aumento considerável ao longo dos últimos anos (2009 a 2011), especialmente nas regiões sudeste e sul até 2010. Em 2011, houve um forte crescimento em todas as regiões, passando de 7,1 para 9,8% na média nacional (Brasil, 2011).

1.8 Encefalopatia hipóxico-isquêmica e proteína S100 β

A partir da última década, os marcadores bioquímicos do SNC têm atraído maior atenção, principalmente em condições de baixo teor de oxigênio encefálico (Brouns, Deyn, 2009; Foerch et al., 2009). Pois neste tipo de lesão ocorre ativação celular e desintegração, causando a liberação de proteínas celulares específicas, tais como proteína básica da mielina (MBP), proteína glial fibrilar ácida (GFAP), actina A, adrenomedulina, proteína S100 β e enolase específica do neurônio (NSE) (Missler et al., 1997; Risso et al., 2012). Entre estes biomarcadores de danos neuronais, a proteína S100 β tem destaque devido à sua interação na fisiopatologia da anóxia cerebral; hipótese pela qual em concentrações μ M, esta proteína exerce efeitos prejudiciais ao tecido nervoso (aumentando a apoptose celular), justificada pela sua interação com o aumento da expressão da sintase do óxido nítrico (iNOS), o que gera posterior liberação de óxido nítrico, pela ativação da microglia e de astrócitos no ciclo de citocinas e, por último, em decorrência da ativação do NF κ B, que é o fator chave nas respostas inflamatórias (Hu et al., 1996; Lam et al., 2001). Existem atualmente diversos estudos indicando que os efeitos neurotóxicos da proteína S100 β em várias doenças do SNC estão associados principalmente à interação com receptores de produtos de glicação avançada

(RAGE) (Leclerc et al., 2010; Xia et al., 2010) e à produção de peptídeos β -amiloide (Mori et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

A EHI, considerada problema clínico mundial, é uma das mais importantes e frequentes causas de lesão encefálica neonatal. A avaliação precoce da gravidade de uma lesão cerebral aguda, secundária a privação de oxigênio, proporciona uma base extremamente útil para a prevenção e terapêutica em pacientes pediátricos (Naithani, Simalti, 2010). Por esta razão, durante a última década, os marcadores bioquímicos do sistema nervoso central têm chamado a atenção do meio científico, com destaque para a proteína S100 β . Existem diversos relatos na literatura que correlacionam níveis elevados desta proteína no plasma sanguíneo a múltiplas condições de lesão neurológica (Brouns et al., 2010; Griffin et al., 1889; Hamed et al., 2009; James et al., 2009; Missler et al., 1997; Rothermundt et al., 2004; Savola et al., 2004; Tina et al., 2010; Wiesmann et al., 2010).

Entretanto, apesar da crescente investigação científica a respeito da correlação entre a proteína S100 β e a EHI, são ainda escassos os estudos que analisam a expressão de S100 β nessas condições, diretamente em regiões do tecido nervoso. A relevância desta abordagem se torna clara ao considerar que a EHI provoca lesões em múltiplas regiões encefálicas. Ademais, explorar os teores de mRNA e da proteína S100 β de forma temporal, em diferentes regiões encefálicas, constitui um alicerce extremamente útil no que se refere ao esclarecimento do papel dessa proteína na fisiopatologia da EHI neonatal e na adoção de medidas e procedimentos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, temporalmente, possível correlação entre os níveis de expressão gênica e proteica de S100 β após anóxia neonatal em diferentes regiões do encéfalo de ratos (hipocampo, cerebelo e córtex cerebral), a fim verificar seu potencial como biomarcadora de insulto neural.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar temporalmente se a anóxia neonatal promove diferenças na expressão gênica de S100 β nas regiões do hipocampo, cerebelo e córtex cerebral.
- Avaliar temporalmente se a anóxia neonatal promove diferenças na expressão proteica de S100 β nas regiões do hipocampo, cerebelo e córtex cerebral.
- Verificar eventual correlação temporal entre os níveis de expressão gênica e proteica de S100 β nas diferentes regiões encefálicas estudadas.
- Realizar um levantamento bibliográfico sobre S100 β e EHI a fim de buscar informações que embasem os resultados desta pesquisa com dados clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados filhotes de ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), fornecidos pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Esses animais foram mantidos no Biotério do departamento de anatomia da USP, em condições de temperatura constante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas (início do claro às 7:00 h) e com alimento (ração) e água *ad libitum*. Os experimentos obedeceram as normas e princípios do protocolo de ética em experimentação animal 190/2012, segundo recomendações do Internacional Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for Neuroscience, 1991) e do Cobeia (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991).

4.2 Condições experimentais

O estímulo anóxico foi efetuado no quarto dia após o nascimento (P4), pois segundo nosso interesse no estudo, o SNC de ratos da linhagem Wistar com idade inferior a nove dias apresenta características similares àsquelas de neonatos humanos prematuros (Rice, Barone, 2000). O peso dos animais foi verificado no momento do estímulo, com balança eletrônica digital EQQ 410 (Insight, Brasil), com intuito de manter homogeneidade na seleção dos animais por grupo.

Os ratos foram divididos em dois grupos, o grupo Experimental Anóxia (EA) e o grupo Experimental Controle (EC). Ambos foram subdivididos em 2, 4, 6, 12 e 24 horas após o estímulo anóxico (Figura 6).

Figura 6 - Distribuição dos grupos pertencentes ao estudo.

Os estímulos foram efetuados em ratos da linhagem Wistar, quatro dias após seu nascimento (P4). Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo Experimental Anóxia (EA) e o grupo Experimental Controle (EC). Estes grupos, por sua vez, foram subdivididos em tempos de 2, 4, 6, 12 e 24 horas, quanto à coleta de amostras após a aplicação dos respectivos estímulos.

Para os animais de ambos os grupos EA e EC, foi utilizado modelo de não invasivo e global de anóxia neonatal, adaptado e validado por nosso laboratório (Takada et al., 2011). O referido sistema é, basicamente, constituído por uma câmara semi-hermética de policarbonato (31,0 × 14,0 × 19,5 cm), com entrada e saída de gás, acoplada a manômetro, fluxômetro e a um cilindro de nitrogênio gasoso. A câmara semi-hermética previne aumento de pressão interior, proporcionando ambiente comparável à pressão atmosférica. Com o objetivo de evitar hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura da câmara foi mantida entre 35 e 37 °C, pela imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica. Para o grupo EA, inicialmente, a câmara foi saturada com gás nitrogênio 100% (3L/minuto) e a pressão foi mantida próxima à atmosférica (aproximadamente 101,7 kPa) (Coq et al., 2008; Rogalska et al., 2006; Tan, Nakazawa, 2005). O grupo EC foi exposto às mesmas condições experimentais, no entanto, sem haver troca de ar dentro da câmara, isto é, os animais permaneceram em condição ambiente. Todos os animais (grupos EA e EC) foram mantidos por período de 19 minutos no interior da câmara, determinado por experimentação preliminar como o adequado tempo para causar menor índice de morte nos neonatos. Após esse período, os animais foram retirados da câmara e mantidos com a mãe até o momento da coleta do material biológico.

4.3 Processamento do material biológico

Todos os animais foram levados para sala específica e acusticamente isolada, onde foram decapitados com guilhotina. Em seguida, foi retirada cautelosamente a calota craniana dos animais para exposição do encéfalo.

Os encéfalos foram então removidos, dissecando-se rapidamente as áreas de interesse (hipocampo, cerebelo e córtex cerebral) sob microscópio cirúrgico. Após coleta, os materiais do hemisfério direito foram imersos em reagente estabilizante RNAlater® (Qiagen, Venlo, Holanda) para análise via técnica de RT-PCR em tempo real, enquanto que as estruturas do hemisfério esquerdo foram congeladas em nitrogênio líquido para análise via técnica de Western Blotting.

4.4 Extração e análise de RNA total

A extração do RNA total foi feita por meio de kit RNeasy Lipid Tissue® (Qiagen) com auxílio do equipamento Qiacube® (Qiagen), segundo as instruções estabelecidas pelo fabricante. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260nm/A280nm (Fleige, Pfaffl, 2006).

Foi avaliada a integridade do RNA total extraído por meio do Kit RNA 6000 Nano series II (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA). Foram utilizadas apenas amostras com RIN > 7 (do inglês Number of Integrated of RNA).

4.5 Expressão do mRNA

O RNA extraído foi utilizado para a síntese de uma cadeia complementar de DNA (cDNA) através do sistema de pré-amplificação Superscript para RT-PCR (Life Technologies Carlsbad, CA, EUA) com “primers” randômicos. A ordem e as etapas de incubação foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O protocolo foi realizado de acordo com as recomendações de tempo e temperatura determinadas pelo fabricante.

As amplificações por PCR foram realizadas em duplicata, utilizando-se 200 ng de cDNA para cada reação. Foram empregados reagentes padronizados para PCR em tempo real (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), adicionados aos conjuntos de primers e sonda específicos para cada gene. Os iniciadores e sondas (marcadas com fluoróforos) para o gene alvo S100 β , bem como o gene endógeno controle beta-actina, foram selecionados e adquiridos da empresa *Applied Biosystems* (Applied Biosystems).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystems) e os dados analisados pelo programa *System 7500 software* (Applied Biosystems).

Os valores do *cycle threshold* (Ct) obtidos nos experimentos foram utilizados para realizar o cálculo da expressão relativa de mRNA de S100 β em relação à beta-actina. Essa relação determinada pela variação de Ct (Δ Ct) é calculada através da fórmula de Livak, Schmittgen, 2001.

Os dados de Δ Ct foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta C_t}$) para comparação dos valores de expressão nos diversos tempos após o estímulo. Os resultados obtidos foram divididos por área estudada para facilitar a compreensão e análise.

4.6 Extração e análise das proteínas totais

A extração das proteínas totais foi feita por intermédio do kit Qproteome Mammalian Protein Prep® (Qiagen), seguindo as informações do fabricante. O tecido nervoso foi homogeneizado por 30 segundos em recipiente contendo 1 ml do tampão de lise para células mamíferas, incluindo Benzonase®(Qiagen) e solução inibidora de proteases. A proteína total foi colhida do sobrenadante, depois de centrifugar a amostra por 10 minutos em velocidade de 16.000 rpm, temperatura de 4 °C.

As proteínas totais foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976), que adota o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, no pH de reações. A interação entre as proteínas e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton, 1985).

4.7 Expressão da proteína

A quantificação da expressão proteica de S100 β foi realizada pela técnica de Western Blotting, em que quantidades equivalentes a 75 microgramas de proteínas das amostras tratadas e armazenadas com Laemmli (contendo DTT 100 mM) foram submetidas à separação por eletroforese com corrente constante de 60 mA em gel de poliacrilamida de 15% contendo SDS (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A proteína de interesse foi verificada após corrida de eletroforese, segundo o seu peso molecular, tomando como base um padrão de peso molecular corrido ao lado das amostras (Precision® plus, Bio-Rad).

As proteínas totais fracionadas em gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore, de 0,2 μ m de diâmetro) em cuba de eletroforese (15 V por 60 minutos), utilizando o Trans-Blot cell system (Bio-Rad). A eficiência de transferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose em 0,2% Ponceau S (Towbin et al., 1979).

Após serem bloqueadas por 24 horas, em temperatura 4 °C, com leite desnatado (Molico, Nestlé) em tampão Tris-Salina (Tris, a 5% e lavadas em tampão TBST (TBS com 0.1% de Tween 20), as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário para S100 β (monoclonal de coelho, Abcam, Cambridge, MA, USA) na concentração 1:500, assim como posteriormente para o anticorpo primário para proteína β -actina (monoclonal de camundongo, Sigma, St. Louis, MO, USA) na concentração 1:10000. Em seguida, as membranas foram lavadas em tampão Tris-Salina e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário marcado com peroxidase (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) diluído em 1:10000.

As membranas foram reveladas utilizando o kit de quimiluminescência “ECL western blot detection reagents” (Amersham Biosciences) e analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade das bandas marcadas, utilizando o programa Image J (National Institutes of Health, USA). Com os dados obtidos foi calculada a razão entre a densidade óptica da proteína S100 β com a da proteína β -actina, estes dados foram então submetidos às análises estatísticas.

4.8 Análise estatística

A homogeneidade de variâncias da expressão gênica foi verificada empregando-se transformação logarítmica. Para análise estatística da expressão gênica e proteica, assim como para análise do peso dos animais, foi empregado o teste de ANOVA de dois fatores (tempo/estímulo), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Os resultados obtidos evidenciam homogeneidade das amostras quanto à idade e o peso sendo esses dados confirmados pela avaliação estatística utilizada que não indicou diferenças entre os grupos, tampouco dentro de um mesmo grupo ($p>0.05$).

5.2 Expressão gênica de S100 β no hipocampo

Do total de amostras de hipocampo estabelecido para o estudo ($n=60$), foi possível analisar os dados de 51 amostras biológicas, 22 hipocampos do grupo EA e 29 hipocampos do grupo EC. A tabela 1 representa os valores obtidos da média de $2^{-\Delta Ct}$ dos grupos estudados, assim como os valores de desvio padrão e número de amostras por tempo após o estímulo.

Tabela 1 - Quantificação da transcrição hipocampal do gene S100 β .

Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio Padrão
2 horas	6	0,39331	0,08594
4 horas	4	0,00026	0,00007
6 horas	4	0,00023	0,00006
12 horas	4	0,00175	0,00016
24 horas	4	0,00250	0,00087
Grupo EC Após o estímulo	Número de amostras	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio Padrão
2 horas	7	0,00574	0,00165
4 horas	5	0,00919	0,00818
6 horas	7	0,00583	0,00158
12 horas	6	0,00841	0,00235
24 horas	4	0,00906	0,00153

A expressão relativa do gene S100 β nos grupos EA e EC, após os estímulos, mostrou diferenças significantes ($p<0,001$). No grupo EA, 2 horas após a anóxia a expressão de S100 β aumentou cerca de 1490 vezes em relação ao período de 4 horas, 1750 vezes em relação ao período de 6 horas, 223 vezes em relação ao período de 12 horas e 157 vezes em relação ao período 24 horas ($p<0,05$). No grupo EC não houve diferença estatística entre os períodos estudados após estímulo ($p>0,05$).

Na comparação entre grupos, o método estatístico indicou que a expressão relativa do gene S100 β no grupo EA difere do grupo EC, em todos os períodos estudados (2, 4, 6, 12 e 24 horas) ($p < 0,05$). No hipocampo, 2 horas após a anóxia ocorreu aumento da transcrição de S100 β que foi aproximadamente 51 vezes maior do que a média de todos os períodos do grupo EC ($p < 0,05$). Todavia, após o período de 2 horas, os teores de transcrição de S100 β se mantiveram sempre abaixo de todos os valores do grupo EC. A figura 7 ilustra todos os resultados obtidos no hipocampo.

Figura 7 – Hipocampo: Expressão gênica de S100 β .

O gráfico representa os valores obtidos a partir da expressão média de S100 β no hipocampo, que por sua vez foram obtidos por meio dos valores de $2^{-\Delta C_t}$ dos grupos estudados, bem como o respectivo desvio padrão. A expressão relativa do gene S100 β nos grupos EA e EC após os estímulos apresentou variações significativas ($p < 0,001$).

5.3 Expressão proteica de S100 β no hipocampo

A análise das amostras hipocâmpais para cada grupo, foram efetuadas apenas nos períodos de 2 e 4 horas após o estímulo, por problemas com as amostras coletas e a falta de tempo hábil para reprocessá-las. Tendo sido consideradas 20 amostras biológicas; 10 hipocâmpos do grupo EA e 10 hipocâmpos do grupo EC. A tabela 2 ilustra os valores obtidos da média da razão entre S100 β e a β -actina desses grupos, assim como os valores de desvio padrão e número de amostras por tempo após o estímulo.

Tabela 2 - Quantificação da tradução da proteína S100 β no hipocampo.

Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média S100β/β-actina	Desvio Padrão
2 horas	5	0,99	0,08
4 horas	5	1,65	0,13
Grupo EC Após o estímulo	Número de amostras	Média S100β/β-actina	Desvio Padrão
2 horas	5	0,59	0,04
4 horas	5	0,61	0,07

O teste estatístico utilizado indicou diferenças significantes ($p < 0,001$) da expressão proteica de S100 β nos grupos EA e EC. No grupo EA, todos os tempos estudados diferiram estatisticamente entre si. No grupo EC, o teste estatístico não apresentou diferença entre os distintos tempos avaliados.

Na comparação entre grupos, o método estatístico indicou que houve um aumento da expressão proteica de S100 β do grupo EA quando comparados a todos os tempos (2 e 4 horas) do grupo EC ($p < 0,05$), sendo mais significativo no período de 4 horas após anóxia. Enquanto no hipocampo, 2 horas após a anóxia ocorreu aumento da tradução de S100 β que é aproximadamente 0,4 vezes ou 41% maior do que a média de todos os períodos do grupo EC. No período de 4 horas após anóxia este aumento foi de 1,35 vezes ou 135%. A figura 8 ilustra as bandas marcadas de S100 β e β -actina, de um caso típico de cada grupo, assim como apresenta em forma de gráfico os valores das razões entre a densidade óptica dos mesmos.

Figura 8 - Hipocampo: Expressão proteica de S100 β .

Densidade óptica da imunorreatividade das bandas marcadas de S100 β e β -actina dos grupos EA (n=10) e EC (n=10) nos períodos de 2 e 4 horas, após os estímulos pré-estabelecidos (A). Em B, gráfico representa a média e desvio padrão da razão entre a densidade óptica da proteína S100 β com a da proteína β -actina.

5.4 Expressão gênica de S100 β no cerebelo

Do total de amostras de cerebelo estabelecidas para o estudo (n=60), foi possível analisar os dados relativos a 57 amostras biológicas, 29 cerebelos do grupo EA e 28 cerebelos do grupo EC. A tabela 3 representa os valores obtidos da média de $2^{-\Delta Ct}$ dos grupos estudados, assim como os valores de desvio padrão e número de amostras por tempo após o estímulo.

Tabela 3 - Quantificação da transcrição cerebelar do gene S100 β .

Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio Padrão
2 horas	8	0,0411	0,0149
4 horas	5	0,0008	0,0003
6 horas	5	0,0011	0,0012
12 horas	5	0,0108	0,0064
24 horas	6	0,0050	0,0026
Grupo EC Após o estímulo	Número de amostras	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio Padrão
2 horas	7	0,0181	0,0120
4 horas	6	0,0254	0,0094
6 horas	5	0,0252	0,0130
12 horas	6	0,0195	0,0050
24 horas	4	0,0331	0,0109

A expressão relativa do gene S100 β nos grupos EA e EC, após os estímulos, evidencia diferenças significantes ($p < 0,001$). No grupo EA, 2 horas após a anóxia a expressão de S100 β difere estatisticamente ($p < 0,05$) de todos os outros tempos estudados (4, 6, 12 e 24 horas), os períodos de 4 e 6 horas também diferem estatisticamente dos tempos de 12 e 24 horas, porém entre os tempos de 4 e 6 horas e 12 e 24 horas, após o estímulo de privação de oxigênio, não há diferença estatística. No grupo EC, o teste estatístico não apresentou diferença entre os distintos tempos avaliados ($p > 0,05$).

No grupo EA, 2 horas após o estímulo, os teores do mRNA de S100 β estão aumentados aproximadamente 47 vezes em relação ao período de 4 horas, 34 vezes em relação ao período de 6 horas, 4 vezes em relação ao período de 12 horas e 8 vezes em relação ao período 24 horas ($p < 0,05$).

Na comparação entre grupos, o método estatístico indicou que expressão relativa do gene S100 β no grupo EA difere do grupo EC, nos períodos de 2, 4, 6 e 24 horas após o estímulo de anóxia ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatística entre os tempos de 12 horas após a privação de oxigênio. No cerebelo, 2 horas após a anóxia, ocorreu aumento da

transcrição de S100 β que foi aproximadamente 2 vezes maior do que a média de todos os períodos do grupo EC ($p < 0,05$). Todavia, após o período de 2 horas, os teores de transcrição de S100 β se mantiveram sempre abaixo de todos os valores do grupo EC. A figura 9 representa todos os resultados obtidos no cerebelo.

Figura 9 – Cerebelo: Expressão gênica de S100 β .

O gráfico representa os valores obtidos a partir da expressão média de S100 β no cerebelo, que por sua vez foram obtidos por meio dos valores de 2^{-ΔCt} dos grupos estudados, bem como o respectivo desvio padrão. A expressão relativa do gene S100 β nos grupos EA e EC após os estímulos apresentou variações significativas ($p < 0,001$).

5.5 Expressão proteica de S100 β no cerebelo

No que se refere à coleta de amostras após a aplicação dos estímulos pré-estabelecidos para cada grupo, foi possível realizar a análise dos períodos de 2, 4, 6 e 12 horas. Quanto ao total de amostras de cerebelo, foi possível analisar os dados referentes a 36 amostras biológicas, 18 cerebelos do grupo EA e 18 cerebelos do grupo EC. A tabela 4 representa os valores obtidos da média da razão entre S100 β e a β -actina dos grupos estudados, assim como os valores de desvio padrão e número de amostras por tempo após o estímulo.

Tabela 4 - Quantificação da tradução da proteína S100 β no cerebello.

Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média S100β/β-actina	Desvio Padrão
2 horas	5	0,85	0,09
4 horas	5	1,99	0,11
6 horas	4	1,33	0,09
12 horas	4	1,12	0,13
Grupo EC Após o estímulo	Número de amostras	Média S100β/β-actina	Desvio Padrão
2 horas	5	1,05	0,07
4 horas	4	1,00	0,02
6 horas	4	0,99	0,08
12 horas	5	1,04	0,05

O teste estatístico utilizado revelou diferenças significantes ($p < 0,001$) da expressão proteica de S100 β entre os diferentes tempos após o estímulo do grupo EA mas não entre os tempos do grupo EC.

Na comparação entre grupos, o método estatístico indicou que houve um aumento da expressão proteica de S100 β do grupo EA quando comparado aos tempos de 4 e 6 horas do grupo EC ($p < 0,05$), sendo mais significativa no período de 4 horas após anóxia. Enquanto no cerebello, 6 horas após a anóxia ocorreu aumento da tradução de S100 β de aproximadamente 0,3 vezes ou 30% maior do que a média de todos os períodos do grupo EC. No período de 4 horas após anóxia este aumento foi de 0,95 vezes ou 95%. Ainda na comparação entre grupos, o tempo 2 horas após a anóxia foi marcado por uma diminuição de 17% da tradução de S100 β . A figura 10 representa as bandas marcadas de S100 β e β -actina, assim como também apresenta em forma de gráfico os valores das razões entre a densidade óptica dos mesmos nos vários tempos estudados após o estímulo.

Figura 10 - Cerebelo: Expressão proteica de S100 β .

Densidade óptica da imunorreatividade das bandas marcadas de S100 β e β -actina no cerebelo dos grupos EA (n=18) e EC (n=18) nos períodos de 2, 4, 6 e 12 horas após os estímulos pré-estabelecidos (A). Em B, gráfico representa a média e desvio padrão da razão entre a densidade óptica da proteína S100 β com a da proteína β -actina.

5.6 Expressão gênica de S100 β no córtex cerebral

Do total de amostras de córtex cerebral estabelecidas para o estudo (n=60), foi possível analisar os dados referentes a 53 amostras biológicas, 26 córtex cerebrais do grupo EA e 27 córtex cerebrais do grupo EC. A tabela 5 representa os valores obtidos da média de $2^{-\Delta Ct}$ dos grupos estudados, assim como os valores de desvio padrão e número de amostras por tempo após o estímulo.

Tabela 5 - Quantificação da transcrição do gene S100 β no córtex cerebral.

Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio Padrão
2 horas	5	0,00095	0,00031
4 horas	5	0,00011	0,00008
6 horas	5	0,00012	0,00001
12 horas	5	0,00071	0,00039
24 horas	6	0,00300	0,00112
Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio Padrão
2 horas	6	0,00171	0,00040
4 horas	5	0,00227	0,00042
6 horas	6	0,00189	0,00042
12 horas	6	0,00243	0,00081
24 horas	4	0,00266	0,00143

A expressão relativa do gene S100 β no córtex cerebral dos grupos EA e EC, após os estímulos, mostrou diferenças significantes ($p < 0,001$). No grupo EA, todos os tempos estudados diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, exceto na comparação entre os

períodos de 4 e 6 horas, após o estímulo de privação de oxigênio ($p>0,05$). No grupo EC, o teste estatístico não apresentou diferença entre os distintos tempos avaliados ($p>0,05$).

Na comparação entre grupos, o método estatístico indicou que expressão relativa do gene S100 β no grupo EA difere do grupo EC, nos períodos de 4, 6 e 12 horas após o estímulo de anóxia ($p<0,05$), porém não houve diferença estatística entre os tempos de 2 e 24 horas após o estímulo. Diferente das outras regiões encefálicas examinadas (hipocampo e cerebelo), no córtex cerebral a anóxia parece diminuir a transcrição de S100 β . Os níveis de mRNA do grupo EA se mantiveram sempre abaixo dos valores do grupo EC ($p<0,05$), exceto no período de 24 horas após o estímulo em que os teores de S100 β do grupo EA estiveram próximos daqueles do grupo EC (Figura 11).

Figura 11 – Córtex Cerebral: Expressão gênica de S100 β .

O gráfico representa os valores obtidos a partir da expressão média de S100 β no córtex cerebral, que por sua vez foram obtidos por meio dos valores de $2^{-\Delta C_t}$ dos grupos estudados, bem como o respectivo desvio padrão. A expressão relativa do gene S100 β nos grupos EA e EC após os estímulos apresentou variações significativas ($p<0,001$).

5.7 Expressão proteica de S100 β no córtex cerebral

No que se refere à coleta de amostras após a aplicação dos estímulos pré-estabelecidos para cada grupo, foi possível realizar a análise dos períodos de 2, 4, 6 e 12 horas. Quanto ao total de amostras de córtex cerebrais, foi possível analisar os dados relativos a 37 amostras biológicas, 20 córtex cerebrais do grupo EA e 17 córtex cerebrais do grupo EC.

A tabela 6 representa os valores obtidos da média da razão entre S100 β e a β -actina dos grupos estudados, assim como os valores de desvio padrão e número de amostras por tempo após o estímulo.

Tabela 6 - Quantificação da tradução da proteína S100 β no córtex cerebral.

Grupo EA Após o estímulo	Número de amostras	Média S100β/β-actina	Desvio Padrão
2 horas	7	0,30	0,06
4 horas	4	0,33	0,03
6 horas	4	0,35	0,05
12 horas	5	0,31	0,08
Grupo EC Após o estímulo	Número de amostras	Média S100β/β-actina	Desvio Padrão
2 horas	4	0,30	0,05
4 horas	4	0,31	0,07
6 horas	4	0,33	0,02
12 horas	5	0,32	0,04

O teste estatístico utilizado não indicou diferenças entre os grupos, tampouco dentro de um mesmo grupo ($p > 0.05$). Os resultados sugerem que a anóxia não altera a dinâmica de tradução da proteína S100 β nos períodos estudados. A figura 12 representa as bandas marcadas de S100 β e β -actina assim como também apresenta em forma de gráfico os valores das razões entre a densidade óptica dos mesmos.

Figura 12 – Córtex Cerebral: Expressão proteica de S100 β .

Densidade óptica da imunorreatividade das bandas marcadas de S100 β e β -actina no córtex cerebral dos grupos EA ($n = 20$) e EC ($n = 17$) nos períodos de 2, 4, 6 e 12 horas após os estímulos pré-estabelecidos (A). Em B, gráfico representa a média e desvio padrão da razão entre a densidade óptica da proteína S100 β com a da proteína β -actina.

5.8 Expressão gênica e proteica de S100 β

Para efeito comparativo, e com o objetivo de facilitar a interpretação dos dados, os resultados temporais obtidos da expressão gênica e proteica de S100 β , nas diferentes áreas encefálicas estudadas, foram agrupados em forma de gráfico na figura 13.

Figura 13 - Representação dos níveis da expressão gênica e proteica de S100 β .

Valores de expressão gênica dos grupos EA e EC em todos os tempos e áreas estudadas. O hipocampo e o cerebelo apresentaram um pico de expressão gênica em duas horas após a anóxia (A) e um pico de expressão proteica em 4 horas após anóxia (B). No córtex cerebral a anóxia não promoveu aumento dos níveis gênicos e proteicos.

6 DISCUSSÃO

Os resultados da transcrição temporal de S100 β , após o insulto anóxico neonatal, demonstraram uma dinâmica de expressão gênica similar no cerebelo e no hipocampo, especialmente duas horas após a anóxia, em que os teores de S100 β estiveram extremamente elevados em relação aos valores dos respectivos grupos controle (EC). Todavia, comparando-se a transcrição de S100 β por meio da média de todos os outros tempos (2, 4, 6, 12 e 24 horas) dos grupos EC, hipocampo e cerebelo apresentaram algumas disparidades. No hipocampo, o aumento de S100 β foi de aproximadamente 51 vezes maior do que a média de todos os períodos do grupo EC, enquanto que no cerebelo este aumento esteve em torno de aproximadamente 2 vezes maior.

Ao analisar a dinâmica de expressão temporal proteica de S100 β , apesar da análise reduzida no hipocampo, observou-se que a anóxia promoveu aumento da expressão de S100 β iniciada após 2 horas no hipocampo e 4 horas no cerebelo. Em ambos, o pico de tradução ocorreu às 4 horas após a anóxia, sendo mais significativo no hipocampo, onde este aumento de S100 β foi de aproximadamente 135% vezes maior do que a média de todos os períodos do grupo EC.

Estudos indicam que toxinas liberadas no processo inflamatório como os fatores IL-1 β e TNF α estimulam o aumento da expressão e liberação de S100 β (de Souza et al., 2009; Edwards, Robinson, 2006). Adicionalmente, sabe-se que na patologia EHI, além do processo inflamatório, as células do SNC sofrem desintegração mediada por uma cascata iniciada pelo acúmulo e liberação de glutamato, fator adicional que induz a liberação da proteína S100 β (Abib et al., 2007; de Almeida et al., 2007; Distefano, Praticò, 2010). Sendo assim, sugere-se que o hipocampo, devido a sua transcrição e tradução aumentada de S100 β em relação à média de seu grupo EC, apresentou mais vulnerabilidade à privação do oxigênio do que cerebelo, bem como um provável aumento da liberação de S100 β .

Segundo Greenamyre et al. (1987), estruturas que apresentam maior vulnerabilidade à privação de oxigênio são conhecidas pela alta expressão de receptores de glutamato, entre as quais se destaca o hipocampo (Monaghan, Cotman, 1985). Outra característica essencial para que os danos hipóxicos/anóxicos promovam lesão neural em mamíferos é o aumento do influxo de íons de cálcio intracelular (Bickler, 2004). Possivelmente, o aumento da expressão de S100 β (hipocampal e cerebelar) se trate de um mecanismo protetor ineficaz de manter os níveis intracelulares de cálcio adequados, uma vez que em condições fisiológicas, esta

proteína desempenha um papel importante na homeostase de cálcio intracelular (Donato, 2003).

Os resultados apontaram que o córtex cerebral apresentou a maior diferença no que se refere à transcrição e tradução de S100 β quando comparado com as demais áreas (figura 13). Analisando-se o comportamento temporal do córtex, a primeira e mais evidente distinção observada (em nível de transcrição e tradução) está relacionada à quantidade de S100 β após a anóxia, que não ultrapassou em nenhum momento os valores do grupo EC. Possivelmente, a região cortical apresentou a menor sensibilidade à privação de oxigênio dentre as áreas estudadas.

Em culturas organotípicas de células em meio livre de glicose, Bernaudin et al. (1998), observaram que o período necessário para que ocorresse dano em neurônios hipocâmpais foi menor do que aquele necessário para ocasionar dano aos neurônios corticais. Zhao e Flavin, 2000, demonstraram *in vitro* que astrócitos hipocâmpais são mais vulneráveis (com morte 2 horas após a hipóxia e hipoglicemia) que astrócitos corticais (com morte 8 horas após hipóxia e hipoglicemia). Estes dados corroboram com os resultados obtidos, tanto em relação ao grau de vulnerabilidade entre as regiões quanto em relação ao tempo para que ocorresse morte celular e o pico de S100 β , reforçando a hipótese supracitada.

Se um período de lesão ocasionada por anóxia/hipóxia global é mantido, algumas regiões cerebrais tornam-se mais suscetíveis a danos neuronais em relação a outras. Esse fenômeno denominado “vulnerabilidade seletiva” é bem conhecido desde os primórdios da neuropatologia (Schmidt-Kastner, Freund, 1991). Entretanto, a partir do momento que são sugeridos diferentes graus de vulnerabilidade das regiões encefálicas, traduzidos pelo aumento da expressão de S100 β , faz-se necessária a elucidação do motivo pelo qual ocorrem estas variações. Segundo Volpe (2008), o padrão de distribuição de lesão no SNC depende essencialmente da etapa do desenvolvimento, idade gestacional, metabolismo e características anatômicas peculiares a cada região.

Em 40 semanas de vida fetal, próximo ao nascimento, apenas algumas estruturas, como aquelas necessárias à sobrevivência imediata (por exemplo, núcleos da base e via piramidal), encontram-se completamente desenvolvidas. Todavia, grande parte do encéfalo encontra-se em pleno processo de desenvolvimento (proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose celulares). Por esta razão, essas regiões metabolicamente mais exigentes tornam-se mais vulneráveis aos insultos de natureza hipóxica/anóxica (Bracci et al., 2006; Rice, Barone, 2000). Sendo assim, as regiões

encefálicas selecionadas para este trabalho (hipocampo, cerebelo e córtex cerebral) estariam relacionadas à vulnerabilidade individual ao insulto gerado.

Segundo Distefano, Praticò, 2010, em indivíduos prematuros as lesões relacionadas à privação de oxigênio iniciam-se predominantemente em regiões subcorticais profundas. Em contrapartida, em recém-nascidos a termo, as lesões acometem principalmente regiões córtico-subcorticais, o que poderia justificar um aumento expressão tardia de S100 β na região do córtex cerebral, uma vez que o SNC dos animais utilizados neste estudo apresentavam características similares às de neonatos humanos prematuros (Rice, Barone, 2000).

Estudo clínico realizado por Nagdyman et al. (2003) avaliou a presença de biomarcadores no sangue do cordão umbilical de 29 neonatos asfixiados e 20 neonatos controles em 2, 6, 12 e 24 horas após o nascimento. Observou-se um aumento de S100 β nos tempos de 2 e 6 horas para indivíduos asfixiados em relação aos controles. Adicionalmente, resultados apresentados por Pham et al. (2010) indicam que fontes extracranianas de S100 β não influenciam no aumento das concentrações sanguíneas. Sendo assim, nossos resultados corroboram e complementam os dados apresentados por Nagdyman et al. (2003), sugerindo que o aumento dos teores sanguíneos da proteína S100 β (em 2 e principalmente em 6 horas após asfixia) é diretamente proporcional ao aumento de sua expressão e liberação (via exocitose e/ou peroxidação lipídica) de áreas encefálicas mais sensíveis à privação de oxigênio, como por exemplo o hipocampo e cerebelo.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho evidenciam uma dinâmica temporal da expressão gênica e proteica de S100 β inédita no tecido nervoso, com especial repercussão na validação do modelo de anóxia utilizado. Estes resultados abrem perspectivas para que as pesquisas futuras sejam realizadas com intuito de esclarecer o papel desta proteína na fisiopatologia da EHI. Além do mais, os resultados obtidos podem servir como base no que se refere à avaliação da eficácia de determinadas abordagens terapêuticas sobre os níveis de expressão encefálica de S100 β .

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos é possível concluir que:

- No período de 2 horas após a anóxia houve aumento da expressão gênica de S100 β no hipocampo e cerebelo, sendo mais acentuada no hipocampo do que no cerebelo.
- No período de 2, e principalmente, 4 horas após a anóxia houve aumento da expressão proteica de S100 β no hipocampo. No cerebelo, a anóxia promoveu aumento dos níveis proteicos de S100 β nos períodos de 4 e 6 horas.
- No córtex cerebral, a anóxia não influenciou no aumento dos níveis gênicos e proteicos de S100 β em nenhum dos tempos avaliados.
- No grupo EC, houve similaridade na dinâmica de expressão gênica e proteica de S100 β entre as áreas estudadas.

REFERÊNCIAS*

- Abib RT, Quincozes-Santos A, Nardin P, Wofchuk ST, Perry ML, Goncalves CA, Gottfried C. Epicatechin gallate increases glutamate uptake and S100B secretion in C6 cell lineage. *Mol Cell Biochem.* 2008;310(1-2):153-8.
- Alexanian AR, Bamburg JR. Neuronal survival activity of s100betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-kappaB. *FASEB J.* 1999;13(12):1611-20.
- Baker AJ, Rhind SG, Morrison LJ, Black S, Crnko NT, Shek PN, Rizoli SB. Resuscitation with hypertonic saline-dextran reduces serum biomarker levels and correlates with outcome in severe traumatic brain injury patients. *J Neurotrauma.* 2009;26(8):1227-40.
- Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PFA. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull. World Health Organization.* 2009;88:31-8.
- Bernaudin M, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. *Exp Neurol.* 1998;150(1):30-9.
- Bickler PE. Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms. *J Exp Biol.* 2004;207(Pt 18):3243-9.
- Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care.* 2007;6(2):121-38.
- Bracci R, Perrone S, Buonocore G. The timing of neonatal brain damage. *Biol Neonate.* 2006;90:145-55.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Brasil. Ministério da Saúde. Consolidação do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos. Brasil; 2011. 24 p.
- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009;111(6):483-95.
- Brouns R, De Vil B, Cras P, De Surgeloose D, Marien P, De Deyn PP. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clin Chem.* 2010;56(3):451-8.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Businaro R, Leone S, Fabrizi C, Sorci G, Donato R, Lauro GM, Fumagalli L. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res.* 2006;83(5):897-906.

Castets F, Griffin WS, Marks A, Van Eldik LJ. Transcriptional regulation of the human S100 beta gene. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;46(1-2):208-16.

Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985;151(2):369-74.

Coq JO, Strata F, Russier M, Safadi FF, Merzenich MM, Byl NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp Neurol.* 2008;210(1):95-108.

Dassan P, Keir G, Brown MM. Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(3):295-302.

de Almeida LM, Pineiro CC, Leite MC, Brolese G, Tramontina F, Feoli AM, Gottfried C, Goncalves CA. Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol.* 2007;27(5):661-8.

de Souza DF, Leite MC, Quincozes-Santos A, Nardin P, Tortorelli LS, Rigo MM, Gottfried C, Leal RB, Goncalves CA. S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J Neuroimmunol.* 2009;206(1-2):52-7.

Distefano G, Pratico AD. Actualities on molecular pathogenesis and repairing processes of cerebral damage in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ital J Pediatr.* 2010;36:63.

Djalali S, Holtje M, Grosse G, Rothe T, Stroh T, Grosse J, Deng DR, Hellweg R, Grantyn R, Hortnagl H, Ahnert-Hilger G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem.* 2005;92(3):616-27.

Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1450(3):191-231.

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.* 2001;33(7):637-68.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 2003;60(6):540-51.

Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* 2013;13(1):24-57.

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. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(6):1008-22.

Edwards MM, Robinson SR. TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006;113(11):1709-15.

Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Bruck W, Ruther E, Cerami A, Becker W, Siren AL. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2004;9(1):42-54.

Fano G, Biocca S, Fulle S, Mariggio MA, Belia S, Calissano P. The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol.* 1995;46(1):71-82.

Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007;3(7):382-90.

Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):28-37.

Foerch C, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH. Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology.* 2009;73(5):393-9.

Funchal C, Tramontina F, Quincozes dos Santos A, Fraga de Souza D, Goncalves CA, Pessoa-Pureur R, Wajner M. Effect of the branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease on S100B release from glial cells. *J Neurol Sci.* 2007;260(1-2):87-94.

Gattaz WF, Lara DR, Elkis H, Portela LV, Goncalves CA, Tort AB, Henna J, Souza DO. Decreased S100-beta protein in schizophrenia: preliminary evidence. *Schizophr Res.* 2000;43(2-3):91-5.

Gazzolo D, Michetti F. Perinatal S100B Protein Assessment in Human Unconventional Biological Fluids: A Minireview and New Perspectives. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:703563.

Goddard DR, Berry M, Kirvell SL, Butt AM. Fibroblast growth factor-2 induces astroglial and microglial reactivity in vivo. *J Anat.* 2002;200(Pt 1):57-67.

Gogas H, Eggermont AM, Hauschild A, Hersey P, Mohr P, Schadendorf D, Spatz A, Dummer R. Biomarkers in melanoma. *Ann Oncol.* 2009;20Suppl 6:vi8-13.

Gonzalez-Perez O, Ramos-Remus C, Garcia-Estrada J, Luquin S. Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol.* 2001;28(11):2529-34.

Greenamyre T, Penney JB, Young AB, Hudson C, Silverstein FS, Johnston MV. Evidence for transient perinatal glutamatergic innervation of globus pallidus. *J Neurosci.* 1987;7(4):1022-30.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, 3rd, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7611-5.

Halonen SK, Woods T, McInnerney K, Weiss LM. Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes. *J Neuroimmunol.* 2006;175(1-2):19-30.

Hamed SA, Hamed EA, Abdella MM. Septic encephalopathy: relationship to serum and cerebrospinal fluid levels of adhesion molecules, lipid peroxides and S-100B protein. *Neuropediatrics.* 2009;40(2):66-72.

Hammerman C, Kaplan M. Ischemia and reperfusion injury. The ultimate pathophysiologic paradox. *Clin Perinatol.* 1998;25(3):757-77.

Hasselblatt M, Mooren FC, von Ahsen N, Keyvani K, Fromme A, Schwarze-Eicker K, Senner V, Paulus W. Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology.* 2004;62(9):1634-6.

Heizmann CW. Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res.* 1999;24(9):1097-100.

Heizmann CW, Cox JA. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals.* 1998;11(4):383-97.

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002;7:d1356-68.

Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem.* 1996;271(5):2543-7.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000;275(51):40096-105.

Hwang CC, Chai HT, Chen HW, Tsai HL, Lu CY, Yu FJ, Huang MY, Wang JY. S100B protein expressions as an independent predictor of early relapse in UICC stages II and III colon cancer patients after curative resection. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(1):139-45.

Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol.* 2000;5(1):3-16.

Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Bisogno T, Petrosino S, Scuderi C, Di Marzo V, Steardo L. Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro. *J Mol Med (Berl).* 2007;85(12):1379-92.

James ML, Blessing R, Phillips-Bute BG, Bennett E, Laskowitz DT. S100B and brain natriuretic peptide predict functional neurological outcome after intracerebral haemorrhage. *Biomarkers.* 2009;14(6):388-94.

Kanner AA, Marchi N, Fazio V, Mayberg MR, Koltz MT, Siomin V, Stevens GH, Masaryk T, Aumayr B, Vogelbaum MA, Barnett GH, Janigro D. Serum S100beta: a noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. *Cancer.* 2003;97(11):2806-13.

Kleindienst A, Hesse F, Bullock MR, Buchfelder M. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog Brain Res.* 2007;161:317-25.

Kleindienst A, Ross Bullock M. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma.* 2006;23(8):1185-200.

Kleindienst A, Schmidt C, Parsch H, Emtmann I, Xu Y, Buchfelder M. The Passage of S100B from Brain to Blood Is Not Specifically Related to the Blood-Brain Barrier Integrity. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:801295.

Korfias S, Stranjalis G, Papadimitriou A, Psachoulia C, Daskalakis G, Antsaklis A, Sakas DE. Serum S-100B protein as a biochemical marker of brain injury: a review of current concepts. *Curr Med Chem.* 2006;13(30):3719-31.

Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging.* 2001;22(5):765-72.

Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW. The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:539581.

Liu J, Wang H, Zhang L, Xu Y, Deng W, Zhu H, Qin C. S100B transgenic mice develop features of Parkinson's disease. *Arch Med Res.* 2011;42(1):1-7.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Manev H, Uz T, Manev R. Glia as a putative target for antidepressant treatments. *J Affect Disord.* 2003;75(1):59-64.

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322(4):1111-22.

Massirer KB, Hirata MH, Silva AE, Ferraz ML, Nguyen NY, Hirata RD. Interferon-alpha receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-alpha therapy of patients with chronic hepatitis C. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(5):643-7.

Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28(10):1956-60.

Mocellin S, Zavagno G, Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;123(10):2370-6.

Monaghan D, Cotman C. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci.* 1985;5(11):2909-19.

- Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(6):739-44.
- Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. *Stroke.* 2008;39(7):2114-21.
- Nagdyman N, Grimmer I, Scholz T, Muller C, Obladen M. Predictive value of brain-specific proteins in serum for neurodevelopmental outcome after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2003;54:270-5.
- Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, Gottfried C, Wofchuk ST, Donato R, Goncalves CA. S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochem Res.* 2009;34(9):1603-11.
- Naithani M, Simalti AK. Biochemical Markers in Perinatal Asphyxia. *J Nep Paedtr Soc* 2010;31(2):151-6.
- Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):858-83.
- Nishi M, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT 1A agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. *Synapse.* 1996;23(1):1-9.
- Nogueira MI, Abbas SY, Campos LG, Allemandi W, Lawson P, Takada SH, Azmitia EC. S100beta protein expression: gender- and age-related daily changes. *Neurochem Res.* 2009;34(8):1355-62.
- Nogueira MI, Barbieri C, Vieira R, Marques ER, Moreno JE. A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. *J Neurosci Methods.* 1997;72(1):65-70.
- Nyakas C, Buwalda B, Luiten PG. Hypoxia and brain development. *Prog Neurobiol.* 1996;49(1):1-51.
- Otto M, Holthusen S, Bahn E, Sohnchen N, Wiltfang J, Geese R, Fischer A, Reimers CD. Boxing and running lead to a rise in serum levels of S-100B protein. *Int J Sports Med.* 2000;21(8):551-5.
- Pawlinski R, Setkowicz Z, Ziaja M, Soltys Z, Janeczko K. Intralesional injection of interferon gamma affects reactive proliferation of astrocytes in the neonatal rat brain. A preliminary study of the age-dependent effect. *Folia Histochem Cytobiol.* 1999;37(4):237-42.
- Pena LA, Brecher CW, Marshak DR. beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;34(1):118-26.

Perrone L, Peluso G, Melone MA. RAGE recycles at the plasma membrane in S100B secretory vesicles and promotes Schwann cells morphological changes. *J Cell Physiol.* 2008;217(1):60-71.

Pham N, Fazio V, Cucullo L, Teng Q, Biberthaler P, Bazarian JJ, Janigro D. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PLoS One.* 2010;5(9).

Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Goncalves CA, Souza DO. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem.* 2002;48(6 Pt 1):950-2.

Quincozes-Santos A, Abib RT, Leite MC, Bobermin D, Bambini-Junior V, Goncalves CA, Riesgo R, Gottfried C. Effect of the atypical neuroleptic risperidone on morphology and S100B secretion in C6 astroglial lineage cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;314(1-2):59-63.

Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, Deloulme JC. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia.* 2007;55(2):165-77.

Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 2000;108Suppl3:511-33.

Risso FM, Sannia A, Gavilanes DA, Vles HJ, Colivicchi M, Ricotti A, Li Volti G, Gazzolo D. Biomarkers of brain damage in preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25Suppl4:101-4.

Rogalska J, Caputa M, Wentowska K, Nowakowska A. Stress-induced behaviour in adult and old rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57Suppl 8:17-34.

Rothermundt M, Ahn JN, Jorgens S. S100B in schizophrenia: an update. *Gen Physiol Biophys.* 2009; 28 Spec No Focus: F76-81.

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60(6):614-32.

Rothermundt M, Ponath G, Arolt V. S100B in schizophrenic psychosis. *Int Rev Neurobiol.* 2004;59:445-70.

Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S, Hirase H. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J Neurosci.* 2008;28(43):10928-36.

Salazar LA, Hirata MH, Quintao EC, Hirata RD. Lipid-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. *J Clin Lab Anal.* 2000;14(3):125-31.

Fleige S, Pfaffl MW: RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):126-39.

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J.* 2006;396(2):201-14.

Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemela O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma.* 2004;56(6):1229-34.

Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci.* 1996;21(4):134-40.

Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 1991;40(3):599-636.

Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Sacher J, Steiner J, Blasig IE, Mueller K. Mood disorders are glial disorders: evidence from in vivo studies. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010:780645.

Sen J, Belli A. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J Neurosci Res.* 2007;85(7):1373-80.

Shashoua VE, Hesse GW, Moore BW. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem.* 1984;42(6):1536-41.

Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS. In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging.* 1996;17(5):761-6.

Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, Cordell B, Paul SM, Jones RA, Woodward S, Zhou XQ, McGinness JM, Griffin WS. Overexpression of the neuritotropic cytokine S100beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in APPV717F mice. *J Neurochem.* 2000;74(1):295-301.

Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010;2010.

Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, Bistoni F, Donato R, Romani L. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog.* 2011;7(3):e1001315.

Stalnacke BM, Tegner Y, Sojka P. Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study. *Clin J Sport Med.* 2003;13(5):292-302.

Suguihara C, Lessa AC. [Strategies to minimize lung injury in extremely low birth weight infants]. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81(1 Suppl):S69-78.

Suzuki F, Kato K, Nakajima T. Hormonal regulation of adipose S-100 protein release. *J Neurochem*. 1984;43(5):1336-41.

Takada SH, Sampaio CA, Allemandi W, Ito PH, Takase LF, Nogueira MI. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods*. 2011;198(1):62-9.

Tang AC, Nakazawa M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. *Behav Brain Res*. 2005;163(1):1-9.

Tina LG, Frigiola A, Abella R, Tagliabue P, Ventura L, Paterlini G, Li Volti G, Pinzauti S, Florio P, Bellissima V, Minetti C, Gazzolo D. S100B protein and near infrared spectroscopy in preterm and term newborns. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:159-64.

Tiu SC, Chan WY, Heizmann CW, Schafer BW, Shu SY, Yew DT. Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal and aged cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000;119(2):159-68.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.

Tramontina AC, Tramontina F, Bobermin LD, Zanotto C, Souza DF, Leite MC, Nardin P, Gottfried C, Goncalves CA. Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(6):1580-3.

Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci*. 2003;21(3-4):97-108.

Van Eldik LJ, Zimmer DB. Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells. *Brain Res*. 1987;436(2):367-70.

Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999;55(2):158-63.

Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: biochemical and physiological aspects; in Volpe JJ (ed): *Neurology of the Newborn*. Saunders Elsevier, 2008, ed. 5, p. 247–325.

Wang ML, Dorer DJ, Fleming MP, Catlin EA. Clinical outcomes of near-term infants. *Pediatrics*. 2004;114(2):372-6.

Wiesmann M, Steinmeier E, Magerkurth O, Linn J, Gottmann D, Missler U. Outcome prediction in traumatic brain injury: comparison of neurological status, CT findings, and blood levels of S100B and GFAP. *Acta Neurol Scand*. 2010;121(3):178-85.

Worthmann H, Tryc AB, Goldbecker A, Ma YT, Tountopoulou A, Hahn A, Dengler R, Lichtinghagen R, Weissenborn K. The temporal profile of inflammatory markers and

mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc Dis.* 2010;30(1):85-92.

Xia W, Han J, Huang G, Ying W. Inflammation in ischaemic brain injury: current advances and future perspectives. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(2):253-8.

Zhao G, Flavin MP. Differential sensitivity of rat hippocampal and cortical astrocytes to oxygen-glucose deprivation injury. *Neurosci Lett.* 2000;285(3):177-80.

Zimmer DB, Landar A. Analysis of S100A1 expression during skeletal muscle and neuronal cell differentiation. *J Neurochem.* 1995;64(6):2727-36.

Análise da expressão do mRNA da proteína S100 β em adipócitos de pacientes com diabetes melito tipo 2

Analysis of the mRNA expression of the S100 β protein in adipocytes of patients with diabetes mellitus, type 2

Mike Yoshio Hamasaki¹, Mario Hiroyuki Hirata², Rosario Dominguez Crespo Hirata², Silvia Tchernin Himelfarb², Leila Maria Guissoni Campos¹, Maria Inês Nogueira¹

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho objetiva compreender a possível relação do nível de expressão gênica do mRNA da proteína S100 β em adipócitos com o diabetes melito do tipo 2, pela comparação de dados de portadores dessa doença com os de indivíduos normoglicêmicos. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas amostras de tecido adiposo de oito pacientes da Seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), sendo quatro do grupo diabetes e quatro do grupo de normoglicêmicos. Essas amostras foram submetidas à técnica de RT-PCR em tempo real. **Resultados:** Por meio do *Test-t de Student* para os valores de diferença entre os ciclos threshold (Δ Ct), observou-se que houve aumento de aproximadamente 15 vezes ($p = 0,015$) da expressão do mRNA da proteína S100 β nos adipócitos dos indivíduos do grupo diabetes quando comparado aos do grupo controle. **Conclusão:** Nossos resultados evidenciam, de forma inédita, coexistência entre o aumento da expressão do gene S100 β e a patologia do diabetes melito do tipo 2. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56(7):435-40

Descritores

Diabetes; S100beta; RT-PCR; adipócitos; biomarcador

ABSTRACT

Objective: This study aims to explore the possible relationship between the expression level of S100 β protein mRNA with *diabetes mellitus* type 2 in adipocytes from patients with this disease in comparison with normoglycemic individuals. **Materials and methods:** Samples of adipose tissue of eight patients from the coronary section of the Institute Dante Pazzanese of Cardiology (IDPC), four in Group Diabetes and four of Normoglycemic group, were evaluated by RT-PCR real time. **Results:** An increase around 15 times values, between the threshold cycle (Δ Ct), of mRNA expression of S100 β protein in adipocytes of the diabetes group was observed in comparison to the control group ($p = 0.015$). **Conclusion:** Our results indicate, for the first time, that there is coexistence of increased expression of the S100 β and the type 2 *diabetes mellitus* gene. Arq Bras Endocrinol Metab. 2012;56(7):435-40

Keywords

Diabetes; S100beta; RT-PCR; adipocytes; biomarker

¹ Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências Biomédicas III (ICBIII), Departamento de Anatomia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil
² Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP, Brasil

Correspondência para:
Maria Inês Nogueira
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415
05508-900 – Cidade Universitária
São Paulo, SP, Brasil
minog@usp.br

Recebido em 7/Jun/2011
Aceito em 30/Ago/2012

INTRODUÇÃO

O termo diabetes melito (DM) engloba um grupo de doenças metabólicas de etiologia múltipla, caracterizado por hiperglicemia crônica com alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, em função da deficiente ação da insulina nos tecidos

alvos, em consequência de alterações na secreção e/ou ação da insulina (1).

De acordo com dados referidos no “Dossiê de Diabetes – Programa de Controle da Diabetes Mellitos – 1998”, da Direção Geral de Saúde e Sociedade Portuguesa de Diabetologia, “a DM constitui grave

problema de saúde pública em nível mundial não só pela crescente incidência, mas também por sua elevada morbidade e mortalidade”. Estimativas da Organização Mundial da Saúde indicam que cerca de 366 milhões de indivíduos serão afetados pela doença em 2030 (2).

O diabetes melito do tipo 2 (DM2) é o mais comum entre todos os outros tipos, perfazendo cerca de 90% dos casos de diabetes (3). Entre os mecanismos fisiopatológicos da DM2, as alterações teciduais estão relacionadas a um processo de gênese de produtos de glicação avançada (AGEs). Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (4).

Desde as primeiras pesquisas sobre AGEs *in vivo*, especulou-se sobre a possível existência de sistema de receptores ou proteínas ligantes para AGEs. Atualmente já se conhece um grande número deles, sendo o receptor para produtos finais da glicação avançada (RAGE) o mais descrito, por demonstrar desempenho importante no mecanismo patogênico de diversas doenças (5,6). Consequentemente há crescente relato da interação dos RAGEs com a proteína S100 β na ação de muitas patologias, principalmente do sistema nervoso (7-10).

A proteína S100 β pertence à família de proteínas ligantes de cálcio. Em espaços intracelulares, essa proteína regula a fosforilação de proteínas, atua na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, homeostase do cálcio, atividade enzimática e respostas inflamatórias (11-13).

A literatura não identifica mecanismo específico para a ativação e o aumento da expressão dessa proteína uma vez que foi encontrada uma variedade de sinais que podem ativar seu processo de expressão gênica, entre eles estão o interferon gama (14), o fator de crescimento do fibroblasto 2 (15), as interleucinas (16), o glutamato (17), a corticoesterona (18) e a pregnisona (19).

Contudo, atualmente em condições normais, essa proteína já foi detectada em astrócitos, melanócitos, adipócitos e condrócitos (20). Portanto, considerando o crescente relato da interação de RAGE com o aumento da expressão da proteína S100 β , assim como sua ocorrência em adipócitos, julgamos importante pesquisar a relação de S100 β com a fisiopatologia da DM2 no tecido adiposo de pacientes diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Foram selecionados oito pacientes (Tabela 1) na Seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Divididos em dois grupos, quatro pacientes para grupo controle (normoglicêmicos) e quatro pacientes para o grupo de DM2. Todos os pacientes foram informados quanto ao protocolo de estudos previamente aprovado pelo Comitê de Ética do IDPC e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Segundo os critérios de inclusão, foram requeridos indivíduos de ambos os sexos com idade entre 30 e 70 anos, sendo que, para o grupo DM2, estes deveriam apresentar duas glicemias em jejum com valores entre 126 mg/dL e 270 mg/dL em medida casual (com sintomas clínicos) ou duas horas após ingestão de 75 g de glicose; e por meio do teste da hemoglobina glicada (HbA1C) com valores superiores a 6,5%. Os dados dos pacientes foram obtidos por meio de um questionário padronizado.

Foram excluídos pacientes que estivessem em uso de bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, corticosteroides, fibratos e agentes hipoglicemiantes orais como: metformina, repaglinida, acarbose; pacientes com glicemia demasiadamente alta, que necessitassem de terapia insulínica, logo após o diagnóstico ou durante o tratamento; pacientes que necessitam de terapia combinada como hipoglicemiantes orais e mulheres grávidas. Os pacientes com DM2 selecionados para o estudo foram orientados a seguir uma dieta hipocalórica, sem uso de hipoglicemiante oral, por 30 dias, conforme indicação médica.

Tabela 1. Sigla representativa dos pacientes pertencentes ao estudo

Grupo controle	Grupo DM2
MAC	ASC
NFC	SSS
AIA	JCM
NMB	DP

Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo (50 mg), por meio de biópsia por agulha, denominada de *Punch* dermatológico (Koplast, Brasil). Agulha descartável e estéril com cinco mm de diâmetro. Após anes-

tesia local com lidocaína 2% (Xylestesin Cristália, Brasil), o tecido adiposo foi coletado da região lombar direita, por médico cirurgião do IDPC. Após a coleta, o tecido adiposo foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) e imerso em 1 ml de reagente estabilizante RNAlater® (Qiagen, Alemanha), mantido em temperatura ambiente por 24 horas e, posteriormente, o reagente foi removido e o tecido armazenado no freezer a -80°C até sua análise.

Extração do RNA total de tecido adiposo

O tecido adiposo foi homogeneizado com 1 mL de TRIZOL® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), por 10 segundos, à velocidade de 20.000 rpm, utilizando o homogeneizador de tecido Homomix D-130 (Biosystems, PR, Brasil), com probe de 5 mm. A amostra foi mantida em gelo durante esse processo.

Após a lise e homogeneização, foi realizada a extração, conforme procedimento previamente padronizado no laboratório (21,22). Resumidamente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram centrifugados 12.000 x g por 15 min, a 4 °C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 x g, por 10 min, 4 °C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água esterilizada tratada com (DEPC) (Sigma Aldrich, MO, USA).

Análise do mRNA total

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260nm/A280nm (23).

Os resultados obtidos por meio da quantificação do RNA total são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Teores do mRNA total das amostras

Amostra de RNA	Concentração (ng/µL)	Relação A260nm/A280nm
MAC	414,7	2,01
NFC	347,2	1,96
DP	192,8	1,76
ASC	178,7	1,76
NMB	161,3	1,71
SSS	137,3	1,78
JCM	60,2	1,81
AIA	33,8	1,64

Escolha dos iniciadores e sondas

A sequência dos genes-alvo foi obtida no Banco de genes (Genbank) do *National Institute of Health* (NIH) e exportada para o programa Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os conjuntos de iniciadores e sonda foram selecionados seguindo os critérios e padrões definidos pelo *software* para sondas do tipo TaqMan. Os pares de iniciadores e as respectivas sondas fluorogênicas foram sintetizados pela Applied Biosystems de acordo com a listagem apresentada na tabela 3.

Tabela 3. Desenhos dos iniciadores e sondas utilizados

Gene-alvo	Primers Sense (1) Anti-sense (2) e Sonda (3)
S100β	(1) 5'AAGAGGATGTCTGAGCTGGAGAA 3' (2) 5'CCCTCCCTTCCAGAATATTGG 3' (3) 5'FAM TGGCCCTCATCGAC MGB 3'
GAPDH	(1) 5'GGAAGGTGAAGGTGCGAGTCA 3' (2) 5'CTGGAAGATGGTGTGGGATTTC 3' (3) 5'VIC TCAGCCTTGAGGGTGC MGB 3'

Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir 200 ng de RNA, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 dNTP 10 mM (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™II RT RNase H⁻) e tampão de RT (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen, MD, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA).

Análise da expressão pela PCR em tempo real

A PCR em tempo real com objetivo da quantificação da expressão do mRNA dos genes S100β e GAPDH foi realizada com o equipamento *ABI Prism 7500 fast* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O programa trabalha em três etapas: (1) um ciclo de 2 minutos a 50°C; (2) um ciclo de 10 minutos a 95°C; (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento e os dados analisados pelo programa ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que geram curvas semilogarítmicas dos sinais de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (*cicle threshold* ou ciclo limiar), sendo este

o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, o que permite a análise quantitativa da expressão do fator em avaliação.

Os valores de Ct obtidos nesses experimentos foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de S100β em relação à do GAPDH. Essa relação é denominada pelo Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ controle endógeno} - Ct \text{ gene-alvo})$$

Em função da característica logarítmica dessa variável, foi utilizado o parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ para a análise dos dados conforme recomendado na literatura (24). Assim, foi possível determinar a expressão gênica individual dos participantes, diabéticos e normoglicêmicos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de ΔCt e $2^{-\Delta Ct}$ para cada amostra

Grupo controle	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$
MAC	1,4435	0,3676683
NFC	0,3653	0,7762955
NMB	2,3118	0,2014156
AIA	1,3053	0,4046295
Grupo DM2	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$
SSS	4,7708	0,0366300
ASC	5,7174	0,0190065
JCM	5,2693	0,0259282
DP	4,8620	0,0343859

RESULTADOS

Os resultados foram analisados com o auxílio do *software* Sigma Stat versão 3.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os valores estatísticos apresentados neste artigo são em relação às características biodemográficas dos dois grupos (Tabela 5) e à comparação dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ (Tabela 6); em ambos foram realizados o Test-t de Student. Para os valores de $2^{-\Delta Ct}$, foi avaliado também o tamanho de efeito (*“Effect Size”*), por meio da medida de *“Cohen d”*.

Tabela 5. Teste-t de Student para os dados biodemográficos de ambos os grupos

Parâmetros	Controle	CV*	DM2	CV [†]	P
Idade (anos)	61,7 ± 5,4	0,087	63,7 ± 11,5	0,180	0,764
Peso (kg)	68,8 ± 4,8	0,069	79,8 ± 15,7	0,196	0,231
Altura (m)	1,59 ± 0,06	0,037	1,68 ± 0,05	0,029	0,097
IMC (kg/m ²)	27,1 ± 2,0	0,073	28,0 ± 4,9	0,175	0,757
Glicemia (mg/dL)	90,2 ± 6,0	0,066	146,5 ± 35,3	0,240	0,049

* Coeficiente de variabilidade dos parâmetros biodemográficos do grupo controle.

[†] Coeficiente de variabilidade dos parâmetros biodemográficos do grupo DM2.

Tabela 6. Teste-t de Student para os valores de $2^{-\Delta Ct}$

Grupo	Média de $2^{-\Delta Ct}$	Desvio- padrão	P
DM2	0,029	0,008	0,015
Controle	0,438	0,243	

Os resultados evidenciam baixa variabilidade nas amostras do grupo DM2 e diferença significativa entre o $2^{-\Delta Ct}$ do Grupo DM2 e o grupo controle ($p \leq 0,015$); esta é maior do que seria esperado por acaso.

A expressão do mRNA no grupo DM2 é aproximadamente 15 vezes maior que o grupo controle.

DISCUSSÃO

A contribuição positiva e inédita deste trabalho, além de evidenciar relação do gene S100β com DM2, é a análise da expressão de mRNA do gene S100β diretamente no tecido adiposo de humanos com DM2 por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Embora algumas limitações devam ser consideradas, quais sejam: número de participantes igual a quatro para cada grupo, o que decorreu da complexidade de apropriação das amostras biológicas, e a ação negativa da insulina na expressão do gene endógeno GAPDH, usado como controle em adipócitos (25), os resultados mostraram de forma consistente e significativa que há coexistência de níveis alterados de S100β e a DM2.

O aumento da expressão do mRNA de S100β dos indivíduos com DM2, cerca de 15 vezes maior, quando comparados aos indivíduos normoglicêmicos (controle), corrobora com resultado similar obtido em estudo com ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Sprague-Dawley) induzidos a diabetes melito do tipo I. Utilizando as técnicas de Northern blot e PCR convencional para diversos tecidos, entre eles o tecido adiposo, Zimmer e cols. (26) concluíram que houve o dobro da transcrição de S100β no grupo induzido a diabetes melito do tipo I em comparação ao grupo de ratos normoglicêmicos.

O aumento observado na transcrição do mRNA do gene S100β pode refletir aumento da quantidade traduzida dessa proteína, o que, contudo, requer comprovação com técnicas de quantificação direta dos teores da proteína S100β, por exemplo a técnica de Western Blotting, como também seria interessante a realização de pesquisas que relacionem a interação entre S100β e RAGEs na DM2.

No estudo comparativo entre os dois grupos com o Test-t de Student e os valores de coeficiente de variabilidade para os parâmetros de idade, peso, altura e IMC, a

amostra se manteve homogênea, ou seja, neste trabalho especificamente com o grupo utilizado, os dados biodemográficos considerados não influenciaram no resultado da expressão gênica de S100 β . Esta conclusão também é encontrada e confirmada por outro trabalho (27). Neste projeto, a média de idade de ambos os grupos é elevada, segundo Pham e cols. (27), Portela e cols. (28), Tiu e cols. (29) e Nogueira e cols. (30). A expressão de S100 β em diversos tipos celulares é diretamente influenciada pela faixa etária dos pacientes, porém nenhum desses estudos realizou a análise do mRNA da proteína por RT-PCR, contribuição desta pesquisa.

CONCLUSÃO

A expressão dos genes S100 β e GAPDH avaliada pela técnica do RT-PCR em tempo real em amostras de tecido adiposo humano comprovou, de forma inédita, que há expressão significativa entre indivíduos diabéticos e normoglicêmicos (15 vezes maior nos diabéticos, $p < 0,05$), o que evidencia coexistência entre os valores aumentados de transcrição de S100 β e a fisiopatologia da DM2. Dado o envolvimento de S100 β com processos inflamatórios, a avaliação de seus teores pode contribuir como biomarcador para o diagnóstico da patologia ou do seu grau de severidade.

Agradecimentos: A todos que direta ou indiretamente ajudaram a concretizar este trabalho. Em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), à professora Mariana Doce Passadore, ao professor Adilson Apolinário, a Natalia Cristine Jukemura, André D. Lucchesi e Sílvia Honda Takada.

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
2. OMS. Organização Mundial da Saúde. Diabetes Programme. www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en. Acessado em: 18 jan, 2010.
3. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, World Health Organization; 1999. p. 59.
4. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):1-15.
5. Lohwasser C, Neureiter D, Popov Y, Bauer M, Schuppan D. Role of the receptor for advanced glycation end products in hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(46):5789-98.
6. Lue L, Walker DG, Jacobson S, Sabbagh M. Receptor for advanced glycation end products its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Future Neurol*. 2009;4(2):167-77.
7. Shaw SS, Schmidt AM, Baner AK, Wang W, Stern DM, Marrero MB. S100B-RAGE-mediated augmentation of angiotensin II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. *Diabetes*. 2003;52:2381-8.
8. Valencia JV, Mone M, Zhang J, Weetall M, Buxton FP, Hughes TE. Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA. *Diabetes*. 2004;53(3):743-51.
9. Xia W, Han J, Huang G, Ying W. Inflammation in ischaemic brain injury: Current advances and future perspectives. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(2):253-8.
10. Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW. The S100B/RAGE axis in Alzheimer's disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010:539581.
11. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1450(3):191-231.
12. 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*. 2001;33(7):637-68.
13. Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(4):134-40.
14. Pawlinski R, Setkowicz Z, Ziada M, Soltys Z, Janeczko K. Intraleisional injection of interferon gamma affects reactive proliferation of astrocytes in the neonatal rat brain. A preliminary study of the age-dependent effect. *Folia Histochem Cytobiol*. 1999;37:237-42.
15. Goddard DR, Berry M, Kirvell SL, Butt AM. Fibroblast growth factor-2 induces astroglial and microglial reactivity in vivo. *J Anat*. 2002;200:57-67.
16. Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, Cordell B, Paul SM, Jones RA, et al. Overexpression of the neurotrophic cytokine S-100beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in AP-PV717F mice. *J Neurochem*. 2000;74:295-301.
17. Martinez-Contreras A, Huerta M, Lopez-Perez S, Garcia-Estrada J, Luquin S, Beas Zarate C. Astrocytic and microglia cells reactivity induced by neonatal administration of glutamate in cerebral cortex of the adult rats. *J Neurosci Res*. 2002;67:200-10.
18. Nishi M, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT 1A agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. *Synapse*. 1996;23(1):1-9.
19. Gonzalez-Perez O, Ramos-Remus C, Garcia-Estrada J, Luquin S. Prednisone induces anxiety and glial cerebral changes in rats. *J Rheumatol*. 2001;28:2529-34.
20. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003;60(6):540-51.
21. Salazar LA, Hirata MH, Quintão ECR, Hirata RD. Lipid lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. *J Clin Lab Anal*. 2000;14(3):125-31.
22. Massier KB, Hirata MH, Silva AE, Ferraz ML, Nguyen NY, Hirata RD. Interferon-alpha receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-alpha therapy of patients with chronic hepatitis. *C Braz J Med Biol Res*. 2004;37(5):643-7.
23. Sambrook J, Russell DM. Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 7; 2001. p. 743-5a.
24. Kenneth JL, Thomas DS. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Meth*. 2001;25:402-8.

25. Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(2):372-9.
26. Zimmer DB, Chessher J, Wilson GL, Zimmer WE. S100A1 and S100B Expression and Target Proteins in Type I Diabetes. *Endocrinology*. 1997;138(12):5176-83.
27. Pham N, Fazio V, Cucullo L, Teng Q, Biberthaler P, Bazarian JJ, et al. Extracranial sources of S100B do not affect serum levels. *PLoS One*. 2010;10;5(9):1-9.
28. Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem*. 2002;48(1):950-2.
29. Tiu SC, Chan WY, Heizmann CW, Schäfer BW, Shu SY, Yew DT. Differential expression of S100B and S100A6(1) in the human fetal and aged cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000;119(2):159-68.
30. Nogueira MI, Abbas SY, Campos LGM, Allemandi W, Lawson P, Takada SH, et al. S100b protein expression: gender- and age-related daily changes. *Neurochem Res*. 2009;34(8):1355-62.

Welcome Ms. Mike Y. Hamasaki

Ms. Mike Hamasaki

Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 Cidade Universitária
São Paulo 05508-000
Brazil

Tel 1: 30917401

Email 1: mike.yoha@usp.br

Editorial Office

Phone: +41 61
3061358

Editorial Office

Email:
neo@karger.com

If you have an ORCID identifier, please click the edit contact information button below and add your ORCID id to your profile. If you do not yet have an ORCID identifier and would like to register or claim yours, edit your contact information and follow the link to the ORCID registry where you can easily register or claim your identifier. You can then update your profile with your ORCID id.

What is ORCID?

ORCID provides a persistent digital identifier that distinguishes you from every other researcher and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between you and your professional activities ensuring that your work is recognized.

[Find out more about ORCID.](#)

Note: Providing an ORCID is not required.

edit contact information

Click on and to view and hide list(s) below:

MANUSCRIPTS AS CORRESPONDING AUTHOR

Manuscripts Currently Under Consideration (1 manuscript)

201310016 Revision 0 *ASSESSMENT OF S100 BETA GENE EXPRESSION ...*

Submitted: 15/10/2013 Current Status: Under Review

powered by XpressTrack