LEILA MARIA GUISSONI CAMPOS

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA S100 β
EM ENCÉFALO DE RATOS

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

São Paulo
2007

LEILA MARIA GUISSONI CAMPOS

ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA S100 β
EM ENCÉFALO DE RATOS

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

Área de concentração:
Anatomia

Orientador(a):
Maria Inês Nogueira

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Campos, Leila Maria Guissoni.

Estudo da distribuição da proteína S100 β no encéfalo de ratos / Leila Maria Guissoni Campos. -
- São Paulo, 2007.

Orientador: Maria Inês Nogueira.

Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento
de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Sistemas
neurais envolvidos em reflexos e ritmos biológicos.

Versão do título para o inglês: Distribution of the S100 β protein specific in brain of the rats.

Descritores: 1. Proteína S100 β 2. Neuroglia 3. Cérebro 4. Distribuição (análise funcional) 5.
Basal 6. Ratos I. Nogueira, Maria Inês II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB159/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leila Maria Guissoni Campos.

Título da Dissertação: Estudo da distribuição da proteína S100 β no encéfalo de
de ratos.

Orientador(a): Maria Inês Nogueira.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho
Aos meus pais João e Josefina, responsáveis pela minha formação pessoal e profissional,
pelo o amor e apoio durante toda minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A toda minha família: meu Pai, minha Mãe (sempre presentes na minha vida), minhas irmãs Josy e Jeane (irmãs de verdade), Pê, Mô e Manu (todos pestinhas). Pela presença constante de todos em minha vida, mesmo que em pensamento, por todo o amor, paciência e apoio. Nada terei sido possível sem eles em minha vida.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por todas as oportunidades que me foram concedidas para realização desta dissertação no Curso de Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. Newton Canteiras, em especial, por toda sua atenção e ensinamentos valiosos.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, por seu apoio, compreensão, e pela amizade durante todo esse tempo.

A todos os companheiros do laboratório de Neurociências, Wilminha, Luciano, Vasconcelos, Frazão, Vandéquio, Pinato, Silva, Carmem, Renne, Paula, e outros da Pós Graduação, Rovená, Gisele, Regina, Flávio, Priscila, Júnior, Amanda, Sandra, Simone, Fátima, Guilherme, Alexandre, e os mais distantes, Sandra e Luiz, por todo o apoio, carinho e incentivo.

Ao meu Tio Walter e a Helena, pela amizade conquistada, pelo amor em todos os momentos, e por todas as nossas conversas maravilhosas.

À Mãe e o PH por sempre estarem ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, por seus ensinamentos, amor e dedicação a Anatomia e a todos que o rodeiam.

Aos funcionários do Biotério, do Departamento de Anatomia, em especial Renivaldo, pela ajuda e atenção, dada sempre de bom gosto.

Aos funcionários da secretaria de Pós Graduação do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao serviço da biblioteca e Informação Biomédica, pela presteza e a orientação dispensada.

Ao Chefe do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt.

Aos demais professores do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela ajuda durante todo o mestrado.

À Coordenadoria de aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa deste curso de Pós Graduação.

RESUMO

A proteína S100 β no cérebro é produzida e secretada pela célula da glia astrócito, e exerce de acordo com sua quantidade extracelular, ação trófica ou tóxica sobre os neurônios. Investigamos a distribuição da proteína S100 β , no animal em condição basal, realizando o mapeamento em diferentes áreas do encéfalo, com a técnica imuno-histoquímica, explorando a hipótese do aparecimento de S100 β em áreas encefálicas preferenciais. A distribuição da proteína foi analisada pela técnica do imuno-histoquímica, com utilização de anticorpo anti-S100 (β subunidade). Foram analisadas áreas do telencéfalo, diencéfalo, e tronco encefálico, e cerebelo. Nessas áreas as respectivas regiões como córtex cerebral, região septal, núcleos da base, corpo caloso, formação hipocampal, amígdala, tálamo, epitálamo, hipotálamo, células endodimárias, mesencéfalo, bulbo e cerebelo, apresentaram marcação de S100 β . O mapeamento da proteína S100 β ao longo do eixo AP, permitiu observar marcação de elementos gliais em sua maioria com formato pequeno, irregular, com preenchimento do corpo celular, em alguns casos, houve somente a borda citoplasmática marcada, e dependendo do local, células com poucas ramificações citoplasmáticas. Nossos resultados sugerem que a proteína possa estar relacionada ao fato dessa distribuição ser conservada como padrão dentro da espécie. Verificamos que S100 β imunopositiva em elementos gliais, apresentou distribuição irregular entre em regiões da porção cranial, e caudal. Nossa suspeita sobre essa distribuição, está associada à imunoexpressão de S100 β em subpopulações de glias específicas, e que essas provavelmente sejam encontradas somente em regiões limitadas do encéfalo.

Palavras chaves : proteína S100 β , encéfalo, basal, distribuição

ABSTRACT

S100 protein is expressed primarily by astroglia in the brain, and practice functional implication of S100B secretion by astrocytes into the extracellular space is scant but there is substantial evidence that secreted glial S100B exerts trophic or toxic effects depending on its concentration. We provide here a detailed description of the distribution of the calcium-binding protein S100 β in and glial elements in the encefalo of rats. The distribution of S100-like immunoreactivity was analyzed by antisera: monoclonal, the b subunit (S100b) of this protein. All sera showed glial positive elements, which were more abundant in the brainstem than in the prosencephalon. S100-immunoreactive was detected in glial elements, in different regions of the telencephalon, diencephalon and mesencephalon. This distribution appears very similar to that, as well as to sparse observations on different vertebrates. Therefore, our results suggest that the distribution pattern of this protein in glial elements is highly conserved between the species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Figura. Representação do *software Image-Pro®Plus*, evidenciando capturas de imagens em campo claro de cortes coronais (40µm) do encéfalo de rato Wistar, com elementos gliais marcados na região do hipocampo. As fotomicrografias representam marcação alta (+++), moderada (++) e baixa (+).....41
- Figura 2.** Teste de adsorção com anticorpo monoclonal anti-S100b, com concentração de 1:5000 (B e C), e 1:10000 (D e E). Esquema A (paxinos) e fotografias B, C, D, E de cortes coronais de encéfalos ratos Wistar. As fotografias B e D (escala 100µm); fotografia C e E (50µm). Todas as fotografias demonstram marcação da proteína S100β, na fímbria da região hipocampal, sendo que a mais evidente, foi encontrada com a concentração de 1:10000.....45
- Figura 3.** Teste de absorção com anticorpo monoclonal anti-S100β, com concentração de 1:20000 (B e C), e 1:30000 (D e E). Esquema A (paxinos) e fotografias B, C, D, E de cortes coronais de encéfalos ratos Wistar. As fotografias B e D (escala 100µm); fotografias C e E (escala de 50µm). As fotografias B, C, D e E demonstram marcação moderada da proteína S100β, na fímbria da região hipocampal.....46
- Figura 4.** Fotomicrografia do hipocampo (Atlas *Paxinos e Watson*, Bregma – 2.80 mm) evidenciando os parâmetros utilizados neste trabalho. As setas vermelhas indicam células da glia utilizadas para análise semiquantitativa celular, com marcação evidente e no foco correto; as setas azuis indicam células descartadas, com marcação fraca e desfocada (100µm).....47
- Figura 5.** Fotomicrografias de campos claro da fímbria na região do hipocampo, evidenciando os parâmetros de densidade de marcação da análise qualitativa deste trabalho (20X). A- +++ marcação alta; B- ++ marcação moderada; C- + marcação baixa.....49

Figura 6. Esquema ilustrativo da distribuição espacial da proteína S100 β no encéfalo de ratos. Os pontos simulam regiões do encéfalo onde foram encontradas células S100 β imunopositivas. As regiões marcadas são representadas em cortes coronais, de acordo com a nomenclatura de *Paxinos e Watson, 1997*.....60

A- Córtex pré frontal, respectivamente córtex pré límbico, e córtex orbital.

B- Córtex do cíngulo área 1, córtex pré límbico, córtex infra límbico e córtex peduncular dorsal, núcleo claustrum.

C- Córtex do cíngulo área 1, córtex do cíngulo área 2, corpo caloso, núcleo septal lateral porção dorsal, núcleo septal lateral porção ventral, núcleos caudado e putâmen, núcleo claustrum

Figura 7. Esquema ilustrativo da distribuição espacial da proteína S100 β no encéfalo de ratos. Os pontos simulam regiões do encéfalo onde foram encontradas células S100 β imunopositivas. As regiões marcadas são representadas em cortes coronais, de acordo com a nomenclatura de *Paxinos e Watson, 1997*.....61

D- Córtex do cíngulo área 1, córtex do cíngulo área 2, corpo caloso, núcleos caudado e putâmen, núcleo periventricular do hipotálamo porção rostral.

E- Corpo caloso, fímbria do hipocampo, giro denteado, núcleo paraventricular do tálamo, núcleos caudado putâmen, núcleo periventricular do hipotálamo, núcleos caudado e putâmen, núcleo globo pálido lateral.

F- Hipocampo propriamente dito (CA₁, CA₂, CA₃), giro denteado (CA₄), fímbria do hipocampo, núcleo paraventricular do tálamo, núcleos caudado putâmen, núcleo periventricular do hipotálamo, núcleos caudado e putâmen, núcleo globo pálido lateral, e núcleo arqueado.

Figura 8. Esquema ilustrativo da distribuição espacial da proteína S100 β no encéfalo de ratos. Os pontos simulam regiões do encéfalo onde foram encontradas células S100 β imunopositivas. As regiões marcadas são representadas em cortes coronais, de acordo com a nomenclatura de *Paxinos e Watson, 1997*.....62

G- Hipocampo propriamente dito (CA₁, CA₂, CA₃), giro denteado (CA₄), núcleo habenular medial e lateral, área hipotalâmica posterior, núcleo arqueado hipotalâmico posterior.

H- Substância cinzenta periaquedutal dorso medial e lateral.

I- Córtex do cerebelo, e núcleo trato solitário porção lateral, medial, pirâmide, núcleo pálido da Rafe.

Figura 9. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região do córtex do cíngulo área 1, córtex pré límbico, infra límbico.....64

Figura 10. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região do corpo caloso e cíngulo.....65

Figura 11. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β na região septal, núcleo septal lateral (porção dorsal), núcleo septal lateral (porção intermédia).....66

Figura 12. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região dos núcleos da Base, núcleo caudado e putâmen.....67

Figura 13. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região da formação hipocampal, giro denteado (GD), hipocampo propriamente dito (CA₁, CA₂, CA₃).....68

Figura 14. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β região da formação hipocampal, giro denteado (GD).....69

Figura 15. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β região da formação hipocampal, fímbria do hipocampo.....70

Figura 16. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região anterior do tálamo, núcleo paraventricular.....71

Figura 17. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região epitálamo, núcleo habenular.....72

Figura 18. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em núcleos da amígdala.....	73
Figura 19. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região do hipotálamo, núcleo periventricular.....	74
Figura 20. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região mesencefálica, substância cinzenta periaquedutal.....	75
Figura 21. Fotomicrografia de cortes coronais de rato evidenciando S100 β em região do cerebelo, córtex cerebelar.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Diferentes concentrações testadas do anticorpo primário monoclonal anti-S100 β , para as análises imuno-histoquímicas em tecido nervoso de ratos.....36

TABELA 2. Anticorpos utilizados na aplicação da técnica de imuno-histoquímica.....36

TABELA 3. Análise semiquantitativa da distribuição da proteína S100 β no encéfalo de ratos Wistar, em condição basal.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5HT1A** - receptores serotoninérgicos
- ABC** - complexo avidina biotina
- Aq** - aqueduto cerebral
- BDNF** - fator neurotrófico derivado do encéfalo
- Ca²⁺** - íon cálcio
- DAB** - 3,3 diamino benzina tetrahydroclorato
- DG** - giro dentado
- GFAP** - proteína glial fibrilar ácida
- GHIH** - hormônio inibidor da secreção do hormônio de crescimento
- IL-1** - interleucina-1
- LSD** – núcleo septal lateral, porção dorsal
- MEC** - matriz extracelular
- McPV** - núcleo amigdalóide medial pósterio ventral
- Mμ** - micromolares
- NFκB** - fator nuclear κB
- NGF** - fator de crescimento neuronal
- nM** - nanomolares
- NT-3** - neurotrofina-3
- NT4/5** - neurotrofina-4/5
- PAG** - substância cinzenta periaquedutal
- PBS** - tampão sódio fosfato
- PK** - proteína quinase
- PMCo** - núcleo cortical amigdalóide pósterio medial
- PP** - proteína fosfatase
- PV** – núcleo paraventricular do tálamo
- RNA** - ácido ribonucleico
- RPa** – núcleo pálido da Rafe
- S100β** - proteína astrogliar neurotrófica 100% solúvel em solução saturada de amônio
- S100A1** - proteína alfa 1
- S100A6** - proteína alfa 6

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

Zn²⁺ - zinco

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1 Glia	21
1.2 Proteínas do citoesqueleto de astrócitos	22
1.3 Interação Neurônio Glia	23
1.4 Proteína S100 β	24
1.5 Descoberta de S100 β	25
1.6 S100 β intracelular	27
1.7 Mecanismos de liberação de S100 β	29
1.8 Efeitos tróficos ou tóxicos no meio extracelular	30
1.9 S100 β como marcadora	31
2. Objetivos	33
3. Material e Métodos	34
3.1 Padronização da diluição do anticorpo S100 β	35
3.2 Animais	36
3.3 Manipulação dos animais	37
3.4 Processamento material biológico	37
3.5 Imuno-histoquímica	39
3.6 Análise da citoarquitetura	40
3.7 Análise microscópica	40
3.8 Apresentação de esquemas de locais com marcação de S100 β e fotomicrografias em campo claro	41
4. Resultados	44
4.1 Resultado dos experimentos preliminares - padronização das diluições do anticorpo anti-S100 β	44
4.2 Resultado da análise microscópica	47
4.3 Resultado da análise semiquantitativa	48
4.4 Resultado imuno-histoquímico da distribuição de S100 β em áreas encefálicas	50
4.5 Distribuição da proteína S100 β em estruturas encefálicas	50
4.5.1 Telencéfalo	50

4.5.1.1	<i>Córtex lobo frontal.....</i>	50
4.5.1.2	<i>Corpo caloso - face medial do telencéfalo.....</i>	51
4.5.1.3	<i>Região septal - face medial do telencéfalo.....</i>	51
4.5.1.4	<i>Formação Hipocampal – face inferior do telencéfalo.....</i>	52
4.5.1.5	<i>Núcleos da Base – porco interna dos hemisférios.....</i>	52
4.5.1.6	<i>Complexo amigdalóide.....</i>	52
4.5.2	<i>Diencefalo.....</i>	53
4.5.2.1	<i>Hipotálamo.....</i>	53
4.5.2.2	<i>Tálamo.....</i>	54
4.5.2.3	<i>Epitálamo.....</i>	54
4.5.2.4	<i>Subtálamo.....</i>	54
4.5.3	<i>Tronco encefálico.....</i>	54
4.5.3.1	<i>Mesencéfalo.....</i>	55
4.5.3.2	<i>Ponte.....</i>	55
4.5.3.3	<i>Bulbo.....</i>	55
4.5.4	<i>Cerebelo.....</i>	56
4.6	<i>Análise semiquantitativa da distribuição da proteína S100β.....</i>	56
4.7	<i>Esquema de distribuição espacial de S100β-imunopositiva, em cortes coronais de encéfalo de rato.....</i>	59
4.8	<i>Fotomicrografias de cortes coronais de rato evidenciando S100β imunopositiva em regiões com marcação evidente.....</i>	63
5.	<i>Discussão.....</i>	78
5.1	<i>Citoarquitetura da proteína S100β em áreas encefálicas.....</i>	79
5.1.1	<i>Telencéfalo.....</i>	80
5.1.1.1	<i>Córtex.....</i>	80
5.1.1.2	<i>Hipocampo - Fímbria - Áreas septal.....</i>	80
5.1.1.3	<i>Corpo caloso.....</i>	81
5.1.1.4	<i>Gânglios da base.....</i>	82
5.1.1.5	<i>Amígdala.....</i>	83
5.1.2	<i>Diencefalo.....</i>	84
5.1.2.1	<i>Hipotálamo.....</i>	84
5.1.2.2	<i>Tálamo.....</i>	84
5.1.2.3	<i>Epitálamo.....</i>	84
5.1.3	<i>Tronco encefálico.....</i>	85

5.1.3.1 Substância periaquedutal.....	85
5.1.3.2 Células endodimárias.....	85
5.1.3.3 Bulbo.....	86
5.1.4 Cerebelo.....	86
5.2 Considerações finais.....	88
6. Conclusões.....	90
7. Referências Bibliográficas.....	92
8. Anexo.....	104

1.1 Glias

O termo neuroglia foi descrito pela primeira vez pelo patologista alemão Rudolf Virchow, em 1846. Virchow descreveu a neuroglia como um tecido que ocupa regiões entre os neurônios, sendo semelhante aos tecidos conectivos de outros organismos. Ainda no Século XIX, o citologista italiano Camilo Golgi, desenvolveu técnicas de coloração baseadas na impregnação metálica, que possibilitaram a descoberta de classes distintas de células não neuronais. Mas foram Santiago Ramón y Cajal e Pio del Río Hortega que desenvolveram, utilizando as técnicas de Golgi, um sistema de classificação das células gliais que persiste até hoje (Kimelberg *et al.*, 1989; Rakic *et al.*, 2003).

Neste sistema, a maior parte das células da neuroglia é classificada como macroglia e uma minoria é chamada de microglia. A macroglia é subdividida em astrócitos e oligodendrócitos, enquanto microglia se refere às microglias. Os oligodendrócitos são conhecidos por formar a bainha de mielina que envolve o axônio dos neurônios. Nessa população, os astrócitos chamam mais atenção devido ao fato de serem os tipos celulares mais abundantes no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos. (Kingsley, 2001)

Estas células apresentam o maior tamanho entre todas as glias, com núcleos esféricos e centrais. Em alguns ramos terminais, formam-se dilatações que envolvem os capilares, que são chamadas de pés vasculares da neuróglia, onde parecem desempenhar papel de transporte de substâncias entre o capilar e o neurônio, participando na formação da barreira hematoencefálica (Del Zoppo *et al.*, 2000; Abbott, 2002).

Essas células são conhecidas como “*glue cells*” (células conectivas), assim chamadas em razão de seu conhecido efeito de sustentação e compactação do sistema nervoso. São associados também à função de captação e liberação de neurotransmissores, controle do metabolismo iônico e produção de fatores neurotróficos. As pesquisas apontam papel ativo dos astrócitos com os neurônios, o que sugere que estas células estão envolvidas em quase

tudo o que o cérebro faz (Nedergaard *et al.*, 2003), possibilitando uma relação com a plasticidade sináptica e eventual processamento de informação neural, o que justifica a participação na homeostase do cérebro normal, fazendo interação com outras células do SNC (Norenberg 1994 e 1998; Ridet *et al.*, 1997), na qual provavelmente são expressos diferentes receptores, como os purinérgicos, adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos, entre outros, cuja função merece ainda muito estudo (Kimelberg, 1995).

Os astrócitos aparecem muito precocemente no SNC em desenvolvimento (Levitt *et al.*, 1980; Raff *et al.*, 1983), juntamente com os neurônios, desde os primeiros estágios. Como células da glia radial constituem o melhor substrato para a migração dos neurônios (Rakic, 1971). Após o desenvolvimento, suas principais funções são manter a homeostase neuronal, como equilíbrio iônico, através do tamponamento de potássio, e suprimento energético (Dringen *et al.*, 1992).

1.2 Proteínas do citoesqueleto de astrócitos:

Um importante passo para o entendimento das funções dos astrócitos ocorreu no início da década de 1970, com a descoberta da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). A GFAP é a maior proteína de filamentos intermediários encontrada no citoplasma de astrócitos e é um marcador de diferenciação astrocitária (Eng, 1985; Kimelberg *et al.*, 1989; Lefrançois *et al.*, 1997; Menet, *et al.*, 2001).

Além da GFAP, os astrócitos expressam outros dois tipos de filamentos intermediários: vimentina e nestina. Esses filamentos são as principais proteínas expressas em astrócitos imaturos, enquanto astrócitos em processo de diferenciação ou diferenciados expressam vimentina e GFAP, que formam polímeros entre si (Clarke *et al.*, 2002; Eng, 1994). O

envolvimento da GFAP na formação de processos astrocitários foi demonstrado através da inibição da expressão de GFAP (Weinstein *et al.*, 1991).

Outra proteína relacionada ao astrócito, e que é objeto de interesse deste estudo é a proteína S100 β . Esta foi inicialmente descrita como proteína neuro-específica, somente estudos posteriores revelaram que a S100 β no SNC, é localizada e produzida predominantemente nos astrócitos. O local que S100 β é encontrada em células gliais, em locais como citoplasma, membrana plasmática e membranas intracelulares, assim como constituintes do citoesqueleto (Machado *et al.*, 2002, Steiner *et al.*, 2007; Gerlach *et al.*, 2006).

Os estudos destacam S100 β e astrócitos em associação nas condições patológicas, evidenciando nesses casos, atividades extracelulares da proteína, morte em células gliais e neurônios devido ao seu aumento (Eriksen, 2001). Consequentemente, essa elevação passa a ser indicativo de situação anormal (Rothermundt *et al.*, 2001).

1.3 Interação neurônio glia

Durante o desenvolvimento do SNC de mamíferos, as células da glia, mais especificamente os astrócitos, constituem o melhor substrato para a migração neuronal e o crescimento de axônios (Rakic, 2003; Lefrançois *et al.*, 1997). As interações entre neurônios e astrócitos podem ocorrer através da liberação de fatores solúveis, moléculas de sinalização celular e neurotransmissores, ou através de junções celulares do tipo “gap” (Haydon, 2000; Barres *et al.*, 2000). As moléculas que participam de processos regulatórios, tais como segundos mensageiros; proteínas ligantes de cálcio (Ca²⁺) são responsáveis pela transdução de sinais, e fatores de transcrição nuclear (Watkins *et al.*, 2003). Os astrócitos, também, atuam na

manutenção de um ambiente propício para os neurônios, através do tamponamento do potássio extracelular, que é aumentado pela atividade neuronal (Kimelberg *et al.*, 1989) e da recaptação de neurotransmissores da fenda sináptica (Nedergaard *et al.*, 2003).

Além disso, vários trabalhos têm demonstrado uma correlação entre o desenvolvimento glial e a sinaptogênese, sugerindo o envolvimento de astrócitos na formação das sinapses. Tem sido proposto que fatores solúveis derivados da glia ou de neurônios (neurotrofinas) são necessários para a maturação das sinapses no desenvolvimento *in vitro*, além de apresentarem um papel crucial no controle do número de neurônios e no crescimento de neuritos (Bibel *et al.*, 2000; Pfrieger *et al.*, 1997).

Vários trabalhos têm demonstrado que não só as neurotrofinas, mas também a proteína S100 β , potencialmente secretada pelos astrócitos, apresentam um papel importante na neurogênese (Kuhn *et al.*, 1997; Kane *et al.*, 1996) e na neuritogênese (Matinez *et al.*, 2002). A glia pode influenciar diretamente a atividade neuronal por meio de liberação de inúmeros fatores neuroquímicos e pela modulação direta de alguns segundos-mensageiros. Moléculas específicas presentes na superfície dos astrócitos ligam-se a receptores extracelulares serotoninérgicos e glutamatérgicos-metabotrópicos em neurônios. Por sua vez, esta ligação induz ao desacoplamento e à ativação de proteínas G existentes no interior da membrana plasmática destas células, levando à propagação de diversos sinais intracelulares associados ao Ca²⁺ (Dib *et al.*, 1994; Glowinski *et al.*, 1994).

1.4 Proteína S100 β

S100 β é membro da família S100 de proteínas acídicas e ligantes de Ca²⁺, amplamente expressa no cérebro e conhecida por promover sobrevivência e diferenciação neuronal através do aumento de cálcio intracelular, regulando a fosforilação de proteínas alvo e a atividade

enzimática, translocação do fator nuclear κB (NF κB) e aumentando a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Rothermundt *et al.*, 2003; Alexanian *et al.*, 1999; Castets *et al.*, 1997).

Sua liberação está associada a presença de serotonina (5-HT) e com a estimulação do receptor pós sináptico 5-HT_{1A}, presente na membrana celular do astrócito (Haring *et al.*, 1993; Whitaker-Azmitia P.M., 1990; Whitaker-Azmitia, 2001). Após sua liberação pelo astrócito no meio extracelular, os efeitos de S100 β podem ser tróficos ou tóxicos de acordo com sua quantidade extracelular local. Concentrações nanomolares parecem exercer efeitos neuroprotetores, aumentando a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento (Ueda *et al.*, 1995; Bhattacharyya *et al.*, 1992; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1990) e estimulando o crescimento neurítico (Van Elaik *et al.*, 1991; Winnigham-Major *et al.*, 1989); e concentrações micromolares de S100 β produzem efeitos neurodegenerativos através da indução do RNA mensageiro e expressão da proteína precursora do β -amilóide (Li *et al.*, 1998).

1.5 Descoberta de S100 β

Em 1965, Moore, isolou uma fração tecidual subcelular do encéfalo de Boi, onde verificou a presença de proteínas ácidas, específicas e altamente enriquecidas no tecido nervoso. Essas frações foram chamadas de S100, devido ao fato de apresentarem constituintes 100 % solúveis em solução saturada de sulfato de amônia, com pH neutro. Subsequentemente, os estudos demonstraram que estas frações continham predominantemente dois polipeptídeos classificados como S100A1 e S100 β , com alta afinidade ao cálcio. Baseado em propriedades estruturais, um grupo de proteínas ligantes de cálcio, formam a superfamília calmodulina-S100-troponina C, que associadas a domínios ligantes de cálcio do tipo EF-Hand, participam de diferentes processos celulares, como alteração do metabolismo celular, mudanças nos

níveis de cálcio intracelular, tendo como consequências mudanças na função celular. (Heizmann *et al.*, 1999).

Após o isolamento e caracterização de S100A1 e S100 β , outros estudos demonstraram a presença de mais 14 proteínas designadas como membros desta família, multifuncionais envolvidos na regulação de várias atividades celulares, baseado na sequência homóloga de aminoácidos e nas propriedades similares das estruturas.

S100 β , é encontrada em muitos tipos celulares, apresenta menor especificidade do que a proteína ácida fibrilar GFAP, exercendo efeitos autócrinos e parácrinos sobre elementos gliais e, neurônios (Adami *et al.*, 2001). Além da proteína S100 β ser um membro da superfamília S100-calmodulina-troponina ligante de Ca^{2+} , ela é também ligante de Zn^{2+} . Sua distribuição no SNC é ampla (Heizmann *et al.*, 1998). No interior das células, S100 β se apresenta na forma predominante de homodímeros de 21kDa, e influenciando respostas celulares, modulando íons Ca^{2+} por sinal de transdução, de forma a acionar diferentes pontos na cascata, fazendo com que algumas proteínas iniciem mais sinais de transdução, outras modulem o força desse sinal, e outras regulem diretamente a resposta celular, como exemplo na transcrição nuclear. (O'Callaghan *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1996)

S100 β é de uma proteína que exerce no SNC papel como marcadora de danos cerebrais. Esses resultados somente foram constatados em trabalhos que utilizaram neurônios e astrócitos *insitu* (Portela *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, foi também verificado no líquido e no soro sanguíneo, variações de seu conteúdo, em estados patológicos do SNC, passando assim a ser considerada como uma proteína biomarcadora, e assim utilizada na detecção de danos ou disfunções cerebrais (Mrak *et al.*, 2001).

1.6 S100 β intracelular

S100 β é estabelecida em células de Schwann no Sistema Nervoso Periférico (SNP), e no interior de células da glia no SNC, sendo predominante em astrócitos. (Moore, 1965, Steiner *et al.*, 2007). A maioria de S100 β encontrada nas glia esta no interior do citoplasma, membrana plasmática, apenas de 5 - 7 % é estabelecido na membrana (Ghandour *et al.*, 1981), Pelo menos cerca de 80 - 90% do total da proteína de certa forma é encontrada no cérebro, o resto esta localizado em outros tecidos. (Nagasaka *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1985).

Independente do local que a proteína aparece, ela exerce uma função de inibição de fosforilação sobre outras proteínas, por interagir com substratos quinases, bloqueando o acesso dessas proteínas quinases a esses substratos. Esse tipo de inibição ocorre em muitas proteínas, tais como GAP-43 (neuromodulina) (Lin *et al.*, 1994), proteína tau (Baudier and Cole, 198) GFAP (Ziegler *et al.*, 1998), Anexina do tipo II (Hagiwava *et al.*, 1988) and p53 (Wilder *et al.*, 1998). A função dessa inibição é desconhecida, mas alguns resultados sugerem que S100 β tem parte principalmente em diminuir sinal de transdução, particularmente por estar ligada a elevação da concentração de cálcio no citosol, o que determina fosforilação de proteínas alvo. Deste modo a habilidade de S100 β de interagir com a fosforilação de outras proteínas pode representar condições para regular etapas em alguns meios de sinalização no qual S100 β tem parte com proteínas alvo (Donato, 2001).

S100 β é também conhecida por regular atividade enzimática, e regular metabolismo energético, mantendo efeito estimulatório sobre enzimas como frutose1-6-bifosfato aldolase (Zimmer and Van Eldick, 1986).

O mecanismo de interação de S100 β com o meio intracelular se deve ao fato de exercer ação direta na modulação do Ca²⁺ (Ghandour *et al.*, 1981). Esses íons como segundos mensageiros, controlam muitos processos biológicos, dessa forma participam da comunicação

celular, por via de interação com mais proteínas ligantes de cálcio. A consequência dessa ação envolve múltiplos processos celulares, incluindo secreção, contração, metabolismo, divisão celular e desenvolvimento celular. Contudo, a grande maioria das funções dos segundos mensageiros, é realizada por intermédio do sistema de fosforilação de proteínas, que é composto pelo substrato a ser regulado, pela proteína quinase (PK) e pela proteína fosfatase (PP) (Alberts *et al.*, 1994)

A ação de S100 β sobre o sistema de fosforilação, ocorre por etapas:

Primeiro, S100 β regula a fosforilação mediada pela PK e PP, de forma que pode modificar a resposta na fase inicial da cascata de transdução do sinal; (Baudier *et al.*, 1992);

Segundo, pode regular o metabolismo energético pela modulação da atividade de várias enzimas incluindo a adenilil ciclase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e frutose-1,6-bifosfato aldolase (Donato *et al.* 1991), e inibe a polimerização da GFAP em resposta ao aumento do Ca²⁺ (Bianchi *et al.*, 1994);

Terceiro, S100 β pode regular o formato da célula, influenciando a organização do citoesqueleto, ou seja, o estado de polimerização dos 3 maiores tipos de filamentos (microtúbulos, filamentos de actina, filamentos intermediários) (Donato *et al.*, 1999; Heizmann *et al.*, 1999);

Quarto, vários membros da família S100, interagem com anexinas específicas, que apresentam a capacidade de ligação a fosfolípidos, um processo que ocorre de forma dependente de cálcio, portanto, ocorre participação no sinal de transdução intracelular. Essas interações tem sido demonstradas somente *in vitro*, a especificidade e o papel *in vivo* ainda é objeto de estudo (Harder *et al.*, 1993).

1.7 Mecanismos de liberação de S100β

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na liberação de S100β para o meio extracelular. Alguns trabalhos mostram que estímulos sob o comando de estresse metabólico (como hipoglicemia), estão associados à secreção de S100β (Gerlach *et al.*, 2006). Existe a hipótese de que esse mecanismo possa estar relacionado com o Ca^{2+} , e que isso resulte na exposição de um domínio hidrofóbico, permitindo interação com a membrana ou com proteínas de membrana, como as anexinas. (Schafer *et al.*, 1996)

Outro mecanismo está associado com ação de estruturas presentes na superfície dos astrócitos, receptores extracelulares serotoninérgicos, que após ligação com moléculas específicas, induz ao desacoplamento e à ativação de proteínas G existentes no interior da membrana plasmática destas células, levando à propagação de diversos sinais intracelulares, (Dib *et al.*, 1994; Glowinski *et al.*, 1994). Como exemplo, a ativação destas vias de segundos-mensageiros em receptores neuronais serotoninérgicos e glutamatérgicos metabotrópicos, iniciada por mecanismo glial, induz a aumento concomitante da expressão dos receptores 5HT1A. Por sua vez, o aumento da expressão dos receptores 5HT1A promove a secreção e a liberação da proteína astrogliar neurotrófica S100B (Haring *et al.*, 1993; Whitaker *et al.*, 1994; Whitaker *et al.*, 2001).

Diversos trabalhos demonstram a presença de transportadores para glutamato na membrana de astrócitos (Gegelashvili *et al.*, 1997; Stanimirovic *et al.*, 1999). A secreção do glutamato também modula a secreção da proteína S100β pelos astrócitos, de forma que níveis tóxicos (grandes quantidades) de glutamato liberados pelos neurônios, reduzem a secreção de S100β pelos astrócitos do hipocampo de ratos (Tramontina *et al.*, 2006). Além do glutamato a expressão de S100β por astrócitos tem sido associada á estimulação de interleucina-1 (IL-1) e por AMP-cíclico (Zimmer *et al.*, 1989).

1.8 Efeitos tróficos ou tóxicos no meio extracelular

A informação sobre a implicação da secreção de S100 β é limitada, mas há uma substancial evidência que S100 β secretada por astrócitos exerce efeitos tróficos ou tóxicos dependendo da concentração. A proliferação glial, extensões dos neuritos, ocorre pela presença de pequenas concentrações nanomolares (nM) extracelulares em cultura celular. Essa condição classificou a proteína como neurotrófica, aumentando a sobrevivência neuronal, estimulação e interação com fatores de transcrição (O'Callaghan *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1996; Whitaker *et al.*, 1990). Essa ação se deve ao fato da concentração nM estimular o fluxo de Ca²⁺, e que atua como segundo mensageiro. Essa hipótese foi evidenciada, em experimentos mostrando que o Ca²⁺, é necessário e suficiente para regular extensões neuríticas (Gu *et al.*, 1995).

Efeitos tóxicos da proteína S100 β estão associados a quantidades micromolares (μ M) da proteína. As concentrações μ M em células em cultura, induzem efeitos tóxicos, onde se observou apoptose de neurônios e astrócitos. O aumento da proteína induz uma resposta inflamatória mediada por NFkB (Fator de transcrição nuclear) em astrócitos, dessa forma iNOS (enzima de síntese de óxido nítrico) passa a produzir o NO (óxido nítrico), que consequentemente provoca morte celular com características definidas por apoptose (Hu *et al.*, 1996 e 1997)

Esses efeitos produzem danos neurodegenerativos através da indução do RNA (ácido ribonucleico) mensageiro e expressão da proteína precursora do β -amiloide (LI *et al.*, 1998). Da mesma forma ocorre com os níveis de cálcio intracelular, não somente alterando a função de proteínas ligantes de cálcio, como também a expressão, como documentado em doenças humanas neurodegenerativas (Fano *et al.*, 1995).

Ainda com relação à associação de condições patológicas e S100 β , mesmo que indiretamente, a elevação nos níveis de S100B induz, a aumento na liberação de óxido nítrico no cérebro de ratos (Hu *et al.*, 1996), alterações estas que podem induzir á apoptose e morte de células nervosas (Hu *et al.*, 1997).

1.9 S100 β como marcadora

S100 β é considerada proteína biomarcadora em dosagens de soro sanguíneo e líquido, de danos cerebrais possivelmente como reação ou necrose glial, ou disfunções. Estudos evidenciam que a concentração da proteína S100B no soro e no líquido, serve como potente indicador sensível de dano cerebral em distúrbios psiquiátricos.

Níveis elevados de S100 β estão correlacionados com a gravidade do acidente vascular encefálico isquêmico (Machado *et al.*, 2002), doença de alzheimer (Mrak *et al.*, 2001) e exacerbação aguda da esclerose múltipla (Lamers *et al.*, 1995). O mesmo foi demonstrado no prognóstico e detecção de metástases viscerais. (Portela *et al.*, 2002). Além disso, também foram relatados níveis elevados em distúrbios psiquiátricos: esquizofrenia (Wiesmann *et al.*, 1999), depressão melancólica (Rothermundt *et al.*, 2001) e mania bipolar (Machado *et al.*, 2002). O resultado dos níveis aumentados desta proteína durante condições patológicas pode estar associado tanto a efeitos lesivos quanto a ações tróficas reparadoras induzidos pelos astrócitos (Machado *et al.*, 2002).

Considerando o que foi exposto, o presente estudo avalia a presença da proteína S100 β no encéfalo de ratos, enfatizando a investigação da distribuição da proteína nas diferentes áreas do SNC em animais em condições basais.

OBJETIVOS

Considerando as informações obtidas a partir de dados da literatura, o presente trabalho tem como objetivos:

- Verificar distribuição da proteína S100 β em tecido nervoso de ratos Wistar em condições basais, realizando mapeamento anátomo-funcional de áreas encefálicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Exploramos inicialmente, a melhor diluição do anticorpo específico monoclonal anti-S100 β (Sigma Immunochemicals, ST, Louis, MO) em tecido nervoso, utilizando a técnica de imuno-histoquímica ABC-DAB. Após a escolha da melhor marcação e melhor concentração do anticorpo, verificamos a distribuição da proteína nas áreas encefálicas dos animais em condições basais.

3.1 Padronização da diluição do anticorpo S100 β

Para início dos experimentos, procuramos a melhor concentração do anticorpo primário monoclonal anti-S100 β (comercial- SIGMA), a ser utilizado no procedimento de imuno-histoquímica, com objetivo de minimizar marcações inespecíficas pela presença exagerada do anticorpo primário. Dessa forma, testamos diferentes diluições do anticorpo.

O que se pretende com a padronização é obter uma marcação específica do antígeno com ausência de marcação inespecífica de fundo. Toda via, para que tal marcação seja possível, é fundamental conhecer os atributos do tipo de soro a aplicar. Dessa forma, características como especificidade, condições de manuseamento, revelam-se essenciais para a interpretação de resultados, bem como para a avaliação da qualidade da técnica. Para isso uma correta e eficaz realização da técnica imuno-histoquímica foi imprescindível, para determinação de uma marcação estável com intensidade suficiente, que não deixasse dúvidas relativamente à presença ou ausência do antígeno no tecido.

TABELA 1. Análise de Imunoreatividade das diferentes diluições do anticorpo monoclonal anti-S100β no tecido nervoso

Anticorpo	Monoclonal anti-S100 (β-subunidade)
Fabricante	SIGMA
Diluições	1:5000 1:10000 1:20000 1:30000

TABELA 1. As diferentes concentrações testadas do anticorpo primário monoclonal anti-S100β.

TABELA 2. Anticorpos utilizados na aplicação da técnica de imuno-histoquímica.

<u>Anticorpo(AC)</u>	<u>Fabricante</u>
AC primário S100β	Mouse Monoclonal anti-S100(beta subunidade) Sigma Product
Soro Normal	Normal Goat Serum Vector S1000
Biotinilado	Biotinylated goat anti-mouse Jackson

3.2 Animais

Foram utilizados para esse trabalho, 6 ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem wistar) machos jovens (60 dias), peso aproximado de 200g. Estes animais foram mantidos no

Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III-USP, em condições de temperatura constante (23°), ciclo claro/escuro de 12h:12h (início do claro às 7:00h) e com alimento (Labina) e água *ad libitum*. Os procedimentos foram autorizados pela comissão de Ética, do Instituto de Ciências Bioédicas- USP (protocolo nº 133/2005), e obedeceram aos princípios da International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for Neuroscience, 1991) e Cobeia, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991.

3.3 Manipulação dos animais

Os animais foram transferidos para sala apropriada, acusticamente isolada, respeitando o período de uma semana antes do início dos experimentos para adaptação. Foram mantidos dois animais por gaiola. Para estudo da condição basal, os animais foram acompanhados durante o período de adaptação, sendo feita à observação do momento de atividade normal (no caso do dia, a atividade normal é o repouso), sendo tomados todos os cuidados para evitar qualquer tipo de estímulo. De acordo com as observações feitas sobre a condição basal de cada animal, determinamos adequada a perfusão no período anterior às 11:00, momento no qual os animais se encontravam em repouso ou dormindo.

3.4 Processamento do material biológico

Após a verificação da condição de repouso, os animais foram profundamente anestesiados através de injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 35%. Após comprovação do grau de profundidade da anestesia pelo pinçamento da cauda, os animais foram

posicionados na cuba de perfusão, imobilizados e perfundidos conforme procedimento usual do laboratório (Nogueira *et al.*, 1997).

A dissecação iniciou-se com um corte na pele do abdome para exposição do apêndice xifóide, que foi preso por pinça dente-de-rato e cortado, juntamente com as costelas, em forma de “V”. Com a pinça hemostática, o apêndice xifóide foi rebatido e preso à cuba de perfusão, expondo o coração. A aorta descendente foi pinçada com uma pinça hemostática curva para que durante a perfusão, o fixador não atingisse os membros inferiores, garantido uma melhor fixação do encéfalo do animal, com menor gasto de solução. Em seguida, o ápice cardíaco foi cortado, abrindo o ventrículo esquerdo para inserção da cânula até a aorta, passando pela valva semilunar aórtica.

Foram bombeados 150 ml de solução salina 0,9 %, pH 7,4, em temperatura ambiente, com a finalidade de retirar o sangue dos vasos, prevenindo a formação de coágulos e possibilitando a correta penetração do fixador nos tecidos. A fixação foi realizada com perfusão de 300 ml de solução de formaldeído e bórax 4%, pH 9,5, 4 °C durante 5 minutos em fluxo rápido e mais 15 minutos em fluxo lento. Durante a fixação, a cabeça do animal é coberta com gelo picado para preservar a natureza química dos componentes teciduais.

Os encéfalos foram removidos, pós-fixados (paraformoldeído 4% e sacarose 20%) durante 4h a 4 °C, e crioprotetidos PBS (tampão sódio fosfato em salina 0,1 M, pH 7,4) mais sacarose 20% durante 24 h a 4-°C. Em seguida os encéfalos foram crio-seccionados em criomicrotomo Leica em cortes coronais de 40 µm de espessura. Os cortes foram coletados em 5 séries de 6 compartimentos, e armazenados em congelador (-20 °C) em solução anti-congelante.

Uma série de cada animal foi processada com técnicas de imuno-histoquímica ABC-DAB contra S100β. Uma série adjacente foi corada com tionina, método de Nissl, e usada como controle citoarquitetônico.

3.5 Imuno-histoquímica

Inicialmente os cortes foram lavados em tampão PBS (3 x 10min), em seguida incubados em solução de tampão PBS mais Triton X-100, 2% de soro normal (Chemicon International Inc., Temecula, CA), e o anticorpo primário anti-S100 β , (Sigma Immunochemicals, ST, Louis, MO, feito em camundongo) 1:10000 por 48 horas a 4°C.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em tampão PBS (3 x de 10min) e incubados em Triton X-100 (loaded) 0,3%, soro normal de cabra, anticorpo secundário biotinilado (Vector labs, feito em cabra contra camundongo, 1:200) durante 90 min. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão PBS (3 x de 10min) e incubados em complexo avidina-biotina (Vectastain Kit Elite, Vector Labs 1:200), e Triton X-100 0,3%, durante 90 minutos. Após novas lavagens em tampão PBS seguidas por lavagens em tampão sódio acetato (0,1 M, pH 6,0). A imunoreatividade para S100 β foi evidenciada pelo método de imunoperoxidase avidina biotina (ABC), utilizando a 3'3 diamino benzina tetrahydroclorato (DAB) como cromógeno, glucose oxidadase e níquel amônio sulfato.

A reação foi interrompida com novas lavagens em tampão sódio acetato, seguido por lavagens em tampão PBS. Os cortes seriados foram montados sequencialmente em lâminas gelatinizadas e secos em temperatura ambiente por cerca de 8 horas. Os cortes foram desidratados em séries crescentes de álcoois seguidos de diafanização em xilol, posteriormente às lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando DPX como meio de montagem.

3.6 Análise da citoarquitetura

Em termos citoarquitetônicos, utilizamos cortes frontais corados pelo método de Nissl, buscando um detalhamento maior do que o exposto em atlas. A montagem foi feita em cortes seriados com distância em intervalos fixos de 40µm.

3.7 Análise microscópica

Primeiramente, foi realizado o mapeamento das diferentes áreas do encéfalo com auxílio do atlas estereotático (*Paxinos e Watson, 1998*), permitindo a correta localização de cada estrutura. Em seguida, as lâminas foram analisadas, e as imagens que apresentaram marcação da proteína S100β, foram capturadas em microscopia de campo claro, com utilização do microscópio *Nikon Eclipse E1000*, adaptado a câmera digital *CoolSNAP-Pro Color*, e microcomputador com *software Image-Pro®Plus* (Média Cybernetics, Silver Spring, MA, Estado Unidos).

As imagens foram capturas e analisadas por estudo semiquantitativo. Esse procedimento possibilitou padronizar as imagens com número de células marcadas, nesse caso, grande quantidade de células como alta (+++), número moderado de células como moderado (++), e pequeno número de células como baixa (+). (Métodos em Neurociências, Shieh, 2003)

Para validar esse parâmetro, a análise semiquantitativa foi feita na área total de cada imagem capturada que S100β apresentou imunoexpressão. Foi tirada mais de uma foto em áreas de grande extensão em que a proteína imunoexpressou. Para cada imagem consideramos apenas glias com marcação evidente e bem focada, enquanto que células com marcação fraca ou fora de foco foram desprezadas.

Figura 1. Representação do *software Image-Pro®Plus*, evidenciando capturas de imagens em campo claro de cortes coronais (40µm) do encéfalo de rato Wistar, com elementos gliais marcados na região do hipocampo. As fotomicrografias representam marcação alta (+++), moderada (++) e baixa (+).

3.8 Apresentação de esquemas de locais com marcação de S100β e fotomicrografias em campo claro

As estruturas que apresentaram marcação da proteína S100β foram capturadas em microscopia de campo claro, com utilização do microscópio *Nikon Eclipse E1000*, adaptado a câmera digital *CoolSNAP-Pro Color*, e microcomputador com *software Image-Pro®Plus* (Média Cybernetics, Silver Spring, MA, Estado Unidos). Da mesma forma foram feitas as capturas das imagens de estudo citoarquitetônico pelo método de Nissl.

A seguir foram escaneadas imagens do atlas *Paxinos & Watson* (1998) para complementar esquema de distribuição da proteína. As imagens foram trabalhadas com auxílio do programa Adobe Photoshop, ajustando-se brilho, contraste e foco (Saper, 1999, Schenk et al., 1999).

A distribuição espacial de S100 β -imunopositiva, foi esquematizada com auxílio das secções frontais do atlas de coordenadas estereotáxicas *Paxinos & Watson* (1998) de encéfalo de rato. As respectivas estruturas pintadas nas imagens do atlas, evidenciam locais onde foi encontrado S100 β imunopositiva.

4.1 Resultado dos experimentos preliminares - padronização das diluições do anticorpo anti-S100β.

Entre todas as diluições realizadas com variadas concentrações do anticorpo monoclonal anti-S100β, a melhor marcação que obtivemos da proteína S100β, foi encontrada nas reações de imuno-histoquímica com a diluição de 1:10000. Essa diluição foi determinada como a melhor, devido à marcação específica do antígeno com ausência de marcação inespecífica de fundo. Dessa forma, a diluição escolhida, foi utilizada durante todos os experimentos envolvendo o método imuno-histoquímico.

Os resultados das diferentes diluições do anticorpo monoclonal anti-S100β, estão demonstradas nas figuras 2 e 3 .

A

Figura 2. Fotomicrografias do teste de adsorção com anticorpo monoclonal anti-S100b, com concentração de 1:5000 (B e C), e 1:10000 (D e E). Esquema A (*Paxinos e Watson*) e figuras B, C, D, E de cortes coronais de encéfalos ratos Wistar. As figuras B e D (escala 100μm); figura C e E (50μm). Todas as figuras demonstram marcação da proteína S100β, na fímbria da região hipocampal, por utilização da técnica imuno-histoquímica através do método indireto contra S100β.

Figura 3. Fotomicrografias do teste de absorção com anticorpo monoclonal anti-S100 β , com concentração de 1:20000 (B e C), e 1:30000 (D e E). Esquema A (*Paxinos e Watson*) e figuras B, C, D, E de cortes coronais de encéfalos ratos Wistar. As figuras B e D (escala 100 μ m); fotografias C e E (escala de 50 μ m). As figuras B, C, D e E demonstram marcação moderada da proteína S100 β , na fímbria da região hipocampal, por utilização da técnica imuno-histoquímica através do método indireto contra S100 β .

4.2 Resultado da análise microscópica

Estabelecemos um padrão semiquantitativo nas análises considerando como parâmetros à presença de células com marcação evidente e claramente visíveis (setas vermelhas), enquanto que células com marcação fraca ou fora de foco (setas azuis) foram desprezadas.

Figura 4 – Fotomicrografia do hipocampo de rato (Atlas *Paxinos e Watson*, nível do bregma – 2,80 mm) evidenciando células imunorreativas a proteína S100 β (100 μ m). As setas vermelhas indicam células da glia utilizadas na análise semiquantitativa, com marcação evidente e no foco correto; as setas azuis indicam células descartadas, com marcação fraca e desfocada.

4.3 Resultado da análise semiquantitativa

A análise semiquantitativa foi feita em todas as imagens capturadas que apresentaram S100 β imunopositiva. Foram analisadas, diferentes áreas do encéfalo, como estruturas de áreas corticais e subcorticais, componentes do sistema límbico, mesencéfalo, tronco encefálico e cerebelo.

Os parâmetros utilizados na análise semiquantitativa de células S100 β imunopositivas formaram a seguinte classificação: valores de pouca marcação classificado baixo (+), marcação moderada (++), e marcação elevada, como alto (+++). Essa padronização esta representada na FIGURA 5.

Figura 5. Padrão de quantificação de células S100 β imunopositivas. Fotografias (imunohistoquímica, através do método indireto contra S100 β) de campos representativos da análise semiquantitativa de células marcadas. A- +++ número elevado de células; B- ++ número moderado de células; C- + número baixo de células. (100 μ m)

4.4 Resultado imuno-histoquímico da distribuição de S100 β em áreas encefálicas.

O uso do anticorpo monoclonal anti-S100 β , resultou em imunorreatividade da proteína em elementos gliais de vários locais do encéfalo. A partir desses resultados foi feito mapeamento verificando as diferenças na quantidade de células marcadas em relação às áreas analisadas.

O mapeamento evidenciou marcação similar de elementos gliais distribuídos no encéfalo entre os animais, porém a marcação foi encontrada somente em estruturas específicas das diferentes regiões analisadas. As células com S100 β imunopositivas, apresentaram em sua maioria formato pequeno, irregular, com preenchimento do corpo celular, em alguns casos, houve somente a borda citoplasmática marcada, e dependendo do local, células com poucas ramificações citoplasmáticas.

Células S100 β imunopositivas foram evidenciadas em regiões como córtex cerebral, região septal, núcleos da base, corpo caloso, formação hipocampal, amígdala, tálamo, epitálamo, hipotálamo, ependima, mesencéfalo, bulbo e cerebelo. A descrição das respectivas estruturas será feita a seguir.

4.5 Distribuição da proteína S100 β em estruturas encefálicas

4.5.1 Telencéfalo

4.5.1.1 Córtex lobo frontal

No córtex do lobo frontal, encontramos a única evidência de imunoexpressão de S100 β entre todos os lobos do telencéfalo. S100 β foi encontrada especificamente na área pré frontal

do córtex, parte anterior não motora do lobo frontal, e que ocupa aproximadamente $\frac{1}{4}$ da superfície do córtex cerebral (Machado, 2004). Nessa região há presença de muitas células marcadas, distribuídas no córtex orbital medial, área 1 e 2 do córtex do cíngulo (Figura ..), sendo predominante nas porções mais rostrais, havendo uma diminuição progressiva de marcação no sentido caudal. Há também uma quantidade moderada de células no córtex infra e pré-límbico, as quais formam um só complexo com as do córtex do cíngulo. As células encontradas apresentaram formato oval, sem prolongamentos ou ramificações.

4.5.1.2 Corpo caloso – face medial do telencéfalo

O corpo caloso é a maior das comissuras inter-hemisféricas formada por grande número de fibras mielínicas de associação. Essa estrutura se estende por todo comprimento do lobo parietal e grande parte do lobo frontal. Em sua porção anterior denominada de genu (joelho do corpo caloso) foi verificada a presença de marcação de S100 β , sendo mais predominante nessa região quando comparado com sua porção posterior, denominada esplênio (Machado, 2004). Tanto as células de formato oval como algumas com poucas ramificações, foram encontradas no corpo caloso, e em alguns locais mais rostro-laterais do giro do cíngulo.

4.5.1.3 Região septal – face medial do telencéfalo

A área septal é a região situada abaixo do rostro do corpo caloso e adiante da comissura anterior e lâmina terminal. Nessa porção encontram-se os núcleos septais, classificados como núcleos septais dorsal, médio e ventral. Classificamos esse grupo, uma das estruturas que mais apresentou marcação da proteína S100 β . As células marcadas foram observadas em toda a extensão rostro-caudal do núcleo septal lateral (porção dorsal, intermédia, ventral), envolvendo predominantemente a porção dorsal (LSD).

4.5.1.4 Formação Hipocampal – face inferior do telencéfalo

A formação hipocâmpica, uma estrutura que reveste a porção medial do lobo temporal, estendendo da amígdala até o istmo do giro cíngulo. A formação hipocâmpica é constituída por três divisões classificadas como giro denteado (CA₄), hipocampo propriamente dito (CA₁, CA₂, CA₃), e subículo. Em todos os casos analisados na região da formação hipocampal, observamos grande número de células marcadas com S100 β . O local com maior presença da proteína foi evidenciado na fímbria do hipocampo, estrutura que liga o hipocampo as pernas do fórnix. A marcação de elementos gliais resultou em distribuição em todo sentido de rostro-caudal da formação hipocâmpica.

4.5.1.5 Núcleos da base – porção interna dos hemisférios

Os núcleos da base, também chamados de gânglios da base, constituem formações de massas cinzentas no interior do centro branco medular do cérebro, porção interna dos hemisférios. Eles se dividem em núcleo caudado, núcleo lentiforme (putâmen e globo pálido), claustrum, corpo amigdalóide, núcleo accumbens, e o núcleo basal de Meynert (Machado, 2004). O resultado da distribuição da proteína S100 β nesses núcleos foi semelhante entre os animais. O núcleo claustrum mostrou baixa marcação da proteína na região mais próxima do córtex da ínsula. O mesmo ocorreu com o corpo estriado.

O núcleo caudado, mais núcleo putâmen, apresentaram células marcadas em porções anteriores (cabeça do núcleo caudado), e em toda a extensão relacionada com os ventrículos laterais. O globo pálido evidenciou marcação da proteína em porções caudais também.

4.5.1.6 Complexo amigdalóide

Na extremidade da cauda do núcleo caudado do lobo temporal, observa-se uma discreta eminência arredondada, formada pelo corpo amigdalóide. Essa estrutura faz parte do sistema

límbico, como centro regulador do comportamento sexual e agressividade, e é constituído por numerosos subnúcleos (Alheid et al., 1995; Everitt, 1995). A imunoexpressão da proteína foi verificada no núcleo cortical amigdalóide pósteromedial, somente em sua porção rostral, e em toda extensão do núcleo amigdalóide medial pósteromedial.

4.5.2 Diencefalo

O diencefalo constitui a porção mais caudal do prosencéfalo, associado ao telencéfalo forma o cérebro. Ele apresenta divisões classificadas como tálamo, hipotálamo, epitálamo, e subtálamo. Sua cavidade forma o terceiro (III) ventrículo, que se comunica com o quarto (IV) ventrículo.

4.5.2.1 Hipotálamo

Hipotálamo se dispõe nas paredes do III ventrículo, situado abaixo do sulco hipotalâmico, que o separa do tálamo. Ele apresenta ainda na porção inferior do cérebro, formações anatômicas, como o quiasma óptico, túber cinéreo, o infundíbulo e os corpos mamilares. A distribuição da proteína S100 β no hipotálamo, resultou em grande quantidade de células marcadas ao longo do III ventrículo. Essa imunoexpressão foi verificada no núcleo periventricular hipotalâmico (PE), desde sua porção mais rostral, na área pré-óptica medial do hipotálamo, até a porção mais caudal da área tuberal do hipotálamo, marcando também, porém com poucas células, o núcleo arqueado porção medial e medial posterior. Muitas células com formato oval, sem a presença de ramificações, também foram encontradas na região da área hipotalâmica posterior, ao redor do III ventrículo, e fortemente marcadas nas células endoteliais do mesmo ventrículo.

4.5.2.2 Tálamo

O tálamo apresenta vários núcleos, e esses podem ser divididos em cinco grupos, que são anterior, posterior, mediano, medial e lateral. Somente o núcleo paraventricular (PV) do tálamo do grupo mediano em toda sua porção antero-posterior, apresentou marcação de S100 β . Os núcleos desse grupo são localizados próximo ao plano sagital mediano, na aderência intertalâmica ou substância cinzenta periventricular, outro local também com presença de S100 β .

4.5.2.3 Epitálamo

Epitálamo está localizado na parte superior e posterior do diencéfalo, limita-se posteriormente ao III ventrículo. Células com marcação bem evidentes de S100 β foram encontradas nos núcleos da habênula do epitálamo na porção medial (MHb) em todo sentido rostro-caudal. Moderada quantidade de células marcadas também no núcleo da habênula lateral e na porção mais caudal da comissura da habênula.

4.5.2.4 Subtálamo

As estruturas que formam o subtálamo foram dês providos da marcação da proteína S100 β .

4.5.3 Tronco encefálico

O tronco encefálico está localizado entre a medula e o diencéfalo. O mesencéfalo situado cranialmente, medula oblonga ou bulbo caudalmente, e a ponte entre eles, constituem o tronco encefálico. Em sua constituição é encontrada a presença de núcleos, fascículos ou tractos.

4.5.3.1 Mesencéfalo

O mesencéfalo fica localizado entre a ponte e o cérebro. O IV ventrículo se estreita para formar o aqueduto cerebral (Aq), que une o III ventrículo ao IV. Ao redor do Aq, há uma porção central proeminente de substância cinzenta, a substância cinzenta periaquedutal (PAG). Nessa região foi encontrado um número moderado de células marcadas com S100 β . A distribuição foi verificada na porção mais rostral da substância cinzenta periaquedutal, próximo à comissura posterior porção rostral, se estendo ao longo do Aq até porções mais caudais, próximo do núcleo dorsal da rafe (DR) porção caudal. Ainda na porção caudal do IV ventrículo, observamos marcação bem evidente de S100 β em células endoteliais

4.5.3.2 Ponte

As estruturas que formam a ponte foram praticamente desprovidas da marcação da proteína S100 β .

4.5.3.3 Bulbo

Bulbo é a divisão mais caudal do tronco encefálico. Sua constituição é definida pela presença de núcleos próprios do bulbo, decussação das pirâmides, decussação de lemniscos, e abertura do IV ventrículo. Nessa estrutura verificamos S100 β na região da pirâmide distribuída em todo sentido rostro-caudal, igualmente encontrada no núcleo pálido da rafe (RPa), interposto entre as pirâmides. Na substância cinzenta do bulbo, o núcleo do tracto solitário também evidenciou células marcadas por S100 β . Essa distribuição da proteína foi verificada somente na extensão rostral dos tubérculos gráteis, onde aparece a área postrema, também levemente marcada.

4.5.4 Cerebelo

Na superfície dorsal da ponte está situado o cerebelo. O cerebelo está preso à ponte pelos pedúnculos cerebelares (superior, médio e inferior). Ele apresenta três camadas corticais, classificadas como camada das células granulares na porção mais profunda, camada molecular, mais superficial, e células de Purkinje, que fica entre as duas. A camada de Purkinje foi a que mais apresentou células marcadas com S100 β , tendo distribuição moderada. A camada granular teve baixa distribuição, enquanto que a camada molecular não imunoexpressou S100 β .

4.6 Análise semiquantitativa da distribuição da proteína S100 β

TABELA 3

	Proteína S100 β
Imunorreação de S100 β em várias regiões do encéfalo	
Córtex	
Córtex orbital médio	++
Córtex do cíngulo, área 1	++
Córtex do cíngulo, área 2	++
Córtex pré-límbico	++
Córtex infra-límbico	++
Córtex peduncular dorsal	++
Córtex motor secundário	-
Córtex motor primário	-
Corpo caloso	+
Comissura anterior	-
Região Septal	
Núcleo septal lateral, porção dorsal	+++
Núcleo septal lateral, porção intermédia	+++

Núcleo septal lateral, porção ventral	++
Núcleo triangular septal	-
Fórnix	-
Fórnix dorsal	-
Núcleo septo fimbrial	-
Formação Hipocampal	
Giro denteado (CA ₄)	+++
Hipocampo propriamente dito (CA ₁ , CA ₂ , CA ₃)	++
Subículo	++
Fímbria	+++
Núcleos da Base	
Núcleo caudado	+
Putâmen	+
Globo Pálido	+
Clastrum	+
Amígdala	
Núcleo medial, porção pósterodorsal	-
Núcleo medial, porção pósteroventral	++
Núcleo cortical amigdalóide póstero medial	++
Tálamo	
Núcleo paraventricular anterior do tálamo	+
Núcleo paraventricular do tálamo	+
Núcleo paraventricular posterior do tálamo	++
Estria medular do tálamo	-
Epitálamo	
Núcleo habenular lateral	++
Núcleo habenular medial	++
Comissura habenular	+
Subtálamo	
Zona incerta	-
Hipotálamo	
Área pré óptica medial	-
Núcleo pré óptico mediano	-
Núcleo periventricular	+++
Área hipotalâmica lateral	-
Núcleo supraquiasmático	-
Núcleo paraventricular	-
Zona subparaventricular, porção ventral	-
Área hipotalâmica anterior, porção posterior	-
Área hipotalâmica anterior, porção central	-
Área hipotalâmica anterior, porção anterior	-
Núcleo ventromedial, porção anterior	-
Núcleo ventromedial, porção dorsomedial	-
Núcleo ventromedial, porção central	-

Núcleo ventromedial, porção ventrolateral	-
Área hipotalâmica posterior	+
Núcleo pré-mamilar dorsal	-
Núcleo mamilar medial, porção mediana	-
Núcleo mamilar medial, porção medial	-
Núcleo mamilar medial, porção lateral	-
Núcleo mamilar lateral	-
Núcleo arqueado porção medial	+
Tronco encefálico	
Substância negra	-
Colículo superior	-
Colículo inferior	-
Núcleo grácil	-
Núcleo cuneiforme	-
Pirâmide	+
Nervo facial	-
Nervo hipoglosso	-
Núcleo reticular lateral	-
Núcleo vestibular medial	-
Núcleo vestibular inferior	-
Núcleo trato solitário	+
Área postrema	-
Substância cinzenta periaquedutal, dorso lateral	+++
Substância cinzenta periaquedutal, ventro lateral	+++
Células ependimárias	
Locus coeruleus	-
Núcleo tegmental dorsal	-
Núcleo tegmental ventral	-
Núcleos da Rafe	
Núcleo dorsal da rafe	-
Núcleo rostral/caudal linear da rafe	-
Núcleo mediano e paramediano da rafe	-
Núcleo magno da rafe	-
Núcleo obscuro da rafe	-
Núcleo pálido da rafe	+
Núcleo pontino da rafe	-
Córtex Cerebelo	
Camada molecular	-
Células de Purkinje	++
Camada granulosa	+

TABELA 3. Análise semiquantitativa da distribuição da proteína S100 β no encéfalo de ratos Wistar, em condição basal. Quantidade de células marcadas representadas como alto (+++), moderado (++) e baixo (+), ausência (-).

4.7 Esquema de distribuição espacial de S100 β -imunopositiva, em cortes coronais de encéfalo de rato.

A seguir será apresentado esquema ilustrativo da distribuição espacial da proteína S100 β no encéfalo de ratos. Os pontos simulam regiões do encéfalo onde foram encontradas células S100 β imunopositivas. As regiões marcadas são representadas em cortes coronais, de acordo com a nomenclatura de *Paxinos e Watson, 1998*.

B

C

60

D

-0.26 mm a partir do Bregma

E

-1.20 mm a partir do Bregma

F

-3.14 mm a partir do Bregma

G

-4.16 mm a partir do Bregma

H

-5.60 mm a partir do Bregma

I

-13.68 mm a partir do Bregma

4.8 Fotomicrografias de cortes coronais de encéfalo de rato evidenciando S100 β imunopositiva.

A seguir será apresentado fotomicrografias de campo claro representando as estruturas encefálicas com células imunopositivas S100 β .

Paxinos e Watson, 2.70 mm a partir do Bregma

A **B**

Paxinos e Watson, -0.26 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, - 0.26 mm a partir Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, 1.70 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, -3.14 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, -3.14 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, -1.30 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, -1.30 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, -3.60 mm a partir Bregma

C **D****D3V**

A

B

Paxinos e Watson, -3.60 mm a partir do Bregma

C

D

A **B**

Paxinos e Watson, -1.30 mm a partir do Bregma

C **D**

A **B**

Paxinos e Watson, -6.30 mm a partir do Bregma

C **D**

Paxinos e Watson, -13.24 mm a partir do Bregma

Este estudo identifica a distribuição restrita de S100 β , em áreas encefálicas de condições basais.

Os experimentos preliminares foram decisivos na definição da melhor diluição do anticorpo contra a proteína S100 β . Dessa forma nos preocupamos em obter uma marcação específica do antígeno com ausência de marcação inespecífica de fundo. O anticorpo monoclonal foi escolhido devido a sua característica de estrutura, especificidade e afinidade (Kohler *et al.*, 1984). A metodologia imuno-histoquímica empregada apresentou excelentes resultados uma vez que os elementos gliais puderam ser nitidamente identificados.

Utilizamos o método de Nissl em cortes coronais, seriados com distância em intervalos fixos, buscando maior detalhamento citoarquitetônico. Foram analisados animais em situação basal submetidos a condições controladas e padronizadas de alimentação, temperatura, umidade e luminosidade. Após período de adaptação ao ambiente, foram identificadas características para determinação do comportamento basal. Os ratos são animais de hábitos noturnos, apresentando comportamento de repouso logo após as luzes se ascenderem (Menna-Barreto, 1997), assim esse momento foi escolhido para validar o modelo de animais em condição basal. Esta condição está relacionada ao metabolismo basal, definido como conjunto de reações suficiente apenas para manter a vida do organismo sem considerar as reações necessárias para as atividades físicas, a caça, ingestão e digestão de alimentos, práticas reprodutivas etc. (Weir, 1949).

Estudos prévios de S100 β no tecido nervoso foram investigados em várias espécies, incluindo ratos, gatos, e lagartos (Rickmann *et al.*, 1995; Deloulme *et al.*, 2004), mas em relação à predileção, por enquanto que tem sido feita somente em regiões limitadas. (Goto *et al.*, 1988; Bhattacharyya *et al.*, 1992; Dong *et al.*, 2006; Hachem *et al.*, 2007).

A distribuição imunorreativa da proteína S100 β em células da glia apresentou características morfológicas de elementos gliais marcados no corpo celular com formato oval,

elementos caracterizados somente pelo contorno citoplasmático, sem marcação no seu interior, e dependendo do local, células com algumas ramificações. De acordo com a morfologia e localização, a literatura estabeleceu a presença de S100 β imunorreativa, em células da glia, como em astrócitos, células ependimárias, oligodendrócitos e microglias (Netto *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2007). No Sistema Nervoso Periférico SNP foi encontrada S100 β em células de Schwann, sugerindo envolvimento na produção de mielina, e manutenção da meninge pia mater. (Sugimura *et al.*, 1989; Mata *et al.*, 1990).

Os elementos gliais marcados com a proteína S100 β , no presente estudo, foram evidenciados em regiões prosencefálicas, diencefálicas, mesencefálicas, tronco encefálico e cerebelo. Apesar da distribuição difusa dessa proteína no encéfalo, os resultados evidenciaram S100 β restrita em algumas estruturas, de maneira a caracterizar resultados similares entre os animais analisados. Esse resultado pode estar relacionado à conservação da distribuição de S100 β como padrão dentro da espécie, apresentando assim, predileção por áreas específicas. Outra suspeita é que se a distribuição da proteína encontrada esta sendo imunoexpressa em subpopulações de glias específicas, essas são somente encontradas em regiões específicas do encéfalo (Doetsch, 2003), o que justifica a irregular distribuição entre a porção caudal, e rostral.

5.1 Citoarquitetura da proteína S100 β em áreas encefálicas

Através do estudo da citoarquitetura da proteína S100 β no encéfalo dos animais confirmamos uma predileção de S100 β em sua distribuição de acordo com a marcação encontrada.

5.1.1 Telencéfalo

5.1.1.1 Córtex

Em termos funcionais no córtex pré frontal, o córtex do cíngulo e córtex pré límbico, integram informações de estruturas isocorticais e límbicas, transmitindo informações principalmente de regiões diencefálicas e límbicas não diretamente envolvidas com circuitos límbicos. (Domesick, 1969). Nessa região que representa a porção medial do córtex pré frontal (Zilles *et al.*, 1995), a proteína S100 β imunoexpressou em elementos gliais com formato oval sem ramificações semelhantes aos que estudos demonstraram grande quantidade de S100 β em astrócitos dessa região (Dong *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 1990; Akhisaroglu *et al.*, 2003).

A literatura descreve também estudos imuno-histoquímicos feitos na região do córtex frontal e temporal de humanos com a doença de alzheimer e síndrome de down por exemplo, fazendo referência também a presença de S100 β nos astrócitos, mas agora associado a grandes quantidades da proteína (Wunderlich *et al.*, 1999; Deloulme *et al.*, 2004; Boyer *et al.*, 1991; Akhisaroglu *et al.*, 2003). Podemos sugerir que a S100 β na região do córtex dos animais analisados no presente estudo seja expressa nessas células gliais específicas, devido à semelhança morfológica das células ovais e sem ramificações encontradas (Nishiyama *et al.*, 2002). A proteína S100 β pode ser sintetizada em neurônios de locais específicos, e liberada por células da glia e simplesmente serem atadas na membrana de neurônios devido à afinidade com os constituintes do citoesqueleto (Zimmer *et al.*, 1995).

5.1.1.2 Hipocampo- fímbria- área septal

Segundo Witter *et al.*, 1995, descreveram anatomicamente, que a formação do hipocampo estende-se do núcleo septal até o diencefalo. Os núcleos septais recebem conexões aferentes do hipocampo propriamente dito, por via de fibras pré-comissurais do fórnice. Tanto

formação hipocampal, e núcleos septais, pertencem ao sistema límbico (Machado, 2004). Essas estruturas além de terem apresentado resultados similares entre os animais do presente estudo, foram os locais com maior número de células marcadas com S100 β , caracterizando a alta marcação. É possível que outros fatores estejam envolvidos nessa distribuição. A literatura associa imunoexpressão de S100 β em astrócitos na região hipocampal a fatores de neuroplasticidade (Schroeter *et al.*, 2002; Tramontona *et al.*, 2002). A descrição de S100 β também é feita nas condições neurotóxicas, onde é encontrado o aumento da proteína na região do hipocampo pela presença de processos neurodegenerativos de animais idosos (Akhisaroglu *et al.*, 2003). O processo neurodegenerativo da doença de alzheimer nos núcleos septais, também, além de provocar o aumento da proteína, leva a perda neuronal (Jarvis *et al.*, 2007; Akhisaroglu *et al.*, 2003).

O fato da proteína S100 β ser encontrada em maior quantidade nessas regiões pode estar relacionado à sua ação neuroprotetora vinculada plasticidade (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1990; Jason *et al.*, 2001, Selinfreund *et al.*, 1991), visto que a formação hipocampal, é considerada umas das estruturas do SNC em que mais ocorre neurogênese (Gage, 2002 e 2004).

5.1.1.3 *Corpo caloso*

No corpo caloso verificamos marcação moderada de S100 β ao longo do seu eixo antero posterior. Nessa estrutura os elementos gliais apresentaram formato diferente daquele encontrado no córtex, formação hipocampal e áreas septais, pois as células aparecerem com pequenas projeções citoplasmáticas. A S100 β foi encontrada nos oligodendrócitos no corpo caloso de camundongos (Deloulme *et al.*, 2004). Da mesma forma Raponi *et al.*, (2007), encontraram S100 β no corpo caloso de camundongos, em diferentes fases do desenvolvimento. Neste estudo, porém, a S100 β foi localizada em astrócitos pela utilização do marcador GFAP e a colocalização com S100 β . Isto sugere que a imunoexpressão da

proteína em diferentes tipos de glias da mesma estrutura. Esse resultado pode estar relacionado às diferenças de condições experimentais, mas de qualquer forma abre perspectivas para novas abordagens dessa questão.

Estudos, amplamente encontrado na literatura estudos que usam o marcador de astrócitos GFAP associado a S100 β , com objetivos de verificar a colocação dessas proteínas, e assim relacionar S100 β às propriedades de marcadora glial específica de astrócitos (Wunderlich *et al.*, 1999; Deloulme *et al.*, 2004; Raponi *et al.*, 2007). Todavia, S100 β , até o momento, não é classificada como proteína específica marcadora de astrócitos. Essa situação somente aparece em disfunções do SNC, onde seu conteúdo aumentado é verificado no soro ou no líquido (Aurell *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1996, 1997; Murphy, 2000). De fato, S100 β não apresenta as mesmas propriedades de GFAP, como marcadora, mas desempenha ação direta sobre diferentes proteínas do citoesqueleto, respectivamente, filamentos intermediários, microtúbulos e GFAP, no interior das glias (Bianchi *et al.*, 1993; Donato *et al.*, 1999; Whitaker-Azmitia, 2001; Donato, 2003).

5.1.1.4 Gânglios da base

Entre todos os núcleos da base, o corpo estriado foi o que mais apresentou marcação da proteína S100 β , concordando com resultados de outros estudos (Raponi *et al.*, 2007). Encontramos também uma pequena população de células marcadas na porção intermédia do claustrum no sentido rostro caudal, o que corresponde à zona sensorio-motora do claustrum. Essa região reflete a função do claustrum como estrutura satélite do córtex cerebral, integrando informações áudio-visuais. (Arruda, 1996; Mink, 1999).

Os núcleos da base formam um conjunto de núcleos subcorticais derivados tanto no telencéfalo, como no diencefalo (Mink, 1999). Eles se organizam em diferentes “circuitos” que, estrutural e funcionalmente, integram regiões corticais, os próprios núcleos da base, o

tálamo e mesmo outras estruturas do tronco encefálico. Esses circuitos são paralelos, transmitem informações distintas, provenientes de diferentes regiões corticais. Cada um dos circuitos recebe impulsos de determinada região cortical e os envia de volta a uma área restrita que é o seu alvo na região cortical de origem (Noback *et al.*, 1999).

Alexander e Crutcher, em 1990 apontaram o núcleo estriado como o principal núcleo do circuito motor, através do qual circula um grande fluxo de informações provenientes do córtex cerebral e que partem do estriado para outros núcleos (Stoof *et al.*, 1999; Vianna & Glauce, 1999).

Alterações na quantidade de S100 β estão relacionadas com patologias decorrentes de disfunções nos circuitos dos núcleos da base, como a Doença de Parkinson é que mais se destaca (Stoof *et al.*, 1999; Vianna, 1999; Heizmann *et al.*, 2002).

5.1.1.5 Amígdala

Evidenciamos em nosso estudo marcação moderada da proteína S100 β , respectivamente nos núcleos PMCo e McPV dos animais. Com esses resultados podemos sugerir predileção da S100 β por mais uma área límbica. O complexo amigdalóide que se constitui de núcleos subcorticais situados no lobo temporal, lateral ao hipotálamo e ventral ao estriado (Alheid *et al.*, 1995; Everitt, 1995). A amígdala se destaca no sistema límbico devido a suas funções, como: resposta a estímulos gerados por medo e ansiedade, percepções de estímulos olfativos e hormonais, modulação do comportamento reprodutivo participação na aquisição do aprendizado e da memória condicionada (Rasia *et al.*, 1991; Kling *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 2000).

5.1.2 Diencefalo

Apesar da escassa literatura sobre a localização de S100 β no diencefalo, nossos resultados evidenciaram em algumas estruturas específicas a imunoexpressão da proteína com localização ao redor do III ventrículo.

5.1.2.1 Hipotálamo

O hipotálamo, como um todo, tem papel importante em assegurar à sobrevivência do indivíduo e da espécie, através de respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais que garantem a homeostase do indivíduo e da manutenção da espécie (Swanson, 1987). Entre os muitos núcleos hipotalâmicos apenas o núcleo periventricular apresentou alta marcação da proteína S100 β ao longo do III ventrículo. Esse núcleo está relacionado à produção do hormônio inibidor da secreção do hormônio de crescimento (GHIH). (Tannenbaum, 1981)

5.1.2.2 Tálamo

No tálamo, encontramos células com a presença de S100 β imunopositiva no núcleo paraventricular. O tálamo de mamíferos é subdividido em vários núcleos. Estes podem ser agrupados em: núcleos relés principais, núcleos intralaminares e núcleo reticular do tálamo (Price, 1995). O PV é um dos integrantes do complexo nuclear da linha média, situado na porção mais dorsal do tálamo.

5.1.2.3 Epitálamo

Nosso trabalho evidenciou nos núcleos das habênulas, imunoexpressão de S100 β tanto em sua porção lateral como medial. O mesmo foi verificado na comissura habenular. O epitálamo constitui-se de estruturas presentes na parte superior e posterior do diencefalo. As estruturas a serem consideradas: glândula pineal, núcleo das habênulas, comissura das

habênulas, estrias medulares e comissura posterior. A estria medular é um feixe que corre ao longo da parede medial do tálamo, conectando a habênula com os núcleos septais, partes do hipotálamo, e do grupo nuclear anterior do tálamo principal (Kingsley, 2001).

5.1.3 Tronco encefálico

5.1.3.1 Substância cinzenta periaquedutal

A literatura não apresenta dados que correlacionam o aparecimento da proteína S100 β com a PAG. Há imunoreatividade a S100 β imediatamente em torno do Aq, na porção central proeminente de substância cinzenta, a PAG. A porção ventral da PAG apresenta participação importante na organização das respostas de medo condicionado. Em particular, a resposta passiva de congelamento a estímulos condicionados contextuais de medo é também elaborada nesta região mesencefálica (Carrive et al., 1997; Walker et al., 2003).

5.1.3.2 Células epêndimárias

As células epêndimárias, forram as paredes dos ventrículos cerebrais, do Aq e do canal central da medula espinal. Essas células formam os plexos corioides, responsáveis pela formação do líquido (Masaaki, 2001). Em ratos, camundongos e humanos a proteína S100 β , é fortemente marcada em células epêndimárias (Sarnat, 1998; Steiner et al., 2007). Em nossas análises, as células epêndimárias apresentaram esse tipo de marcação. Consideramos nossos resultados complementares aos estudos que avaliaram S100 β nos diferentes mamíferos, e apoiamos a idéia S100 β tem predileção por essas células, que possivelmente exercem funções similares entre os mamíferos.

5.1.3.3 Bulbo

No presente estudo, apenas em algumas estruturas do bulbo foi verificada marcação da proteína S100 β . O bulbo, apesar de ser uma parte relativamente pequena no SNC, é constituído por vários núcleos, e percorrido por grande número de tractos motores e sensitivos. O núcleo Rpa foi uma estrutura que apresentou poucas células de formato oval marcadas com S100 β . O núcleo Rpa é um denso grupamento encontrado entre as pirâmides, próximo à superfície ventral da medula (Ribeiro, 1997). Sua função está relacionada também ao sistema grástrico, estimulando secreção (Yang et al., 1993). Lateral ao núcleo encontra-se a pirâmide, estrutura que também apresentou S100 β , mas em células com pequenas projeções citoplasmáticas.

O núcleo do trato solitário foi outra estrutura da região do bulbo, no tronco encefálico, que encontramos presença da proteína. Esse núcleo é sensitivo e recebe fibras aferentes viscerais gerais e especiais que entram pelo VII (facial), IX (glossofaríngeo), e X (vago) pares cranianos, e envia projeções diretamente para o núcleo paraventricular e para a área hipotalâmica lateral (Card et al., 1999). A marcação dessas estruturas na região do bulbo coincidentemente foi encontrada ao nível da área postrema, uma pequena elevação na superfície do bulbo, próximo à extensão rostral dos tubérculos gráceis (Kingsley, 2001). Esses resultados foram similares aos encontrados no trabalho de Yamashita et al., (1999), que verificaram distribuição de S100A6, outro membro da família S100 no SNC.

5.1.4 Cerebelo

O cerebelo é considerado, hoje, como uma estrutura especializada na regulação de funções perceptivas, cognitivas e motoras geradas em outras porções do sistema nervoso. O estudo das conexões do cerebelo mostra que cada hemisfério cerebelar controla os neurônios

motores do seu lado, o que é uma importante diferença com os hemisférios cerebrais que controlam o neurônio motor do lado oposto. Outra importante diferença entre o cérebro e o cerebelo é que esse funciona sempre em nível involuntário e inconsciente. (Kandel 2000; Thach *et al.* 1992).

No cerebelo, foram encontradas células imunopositivas na região do córtex, na camada granular e na camada de células de Purkinje. A imunoexpressão de S100 β foi similar ao resultado apresentado em outro estudo, em que avaliaram S100 β no córtex cerebelar de mamíferos. Os autores compararam a presença de S100 β no cerebelo de galinhas com encéfalos de mamíferos (rato, gato), e verificaram resultados diferentes entre as espécies, de forma que o resultado encontrado nos mamíferos foi similar, e evidenciou S100 β imunorreativa principalmente na camada molecular e na camada de Purkinje do córtex cerebelar. (Rickmann et al., 1995).

5.2 Considerações finais

Os parâmetros utilizados neste trabalho para realização do mapeamento da proteína S100 β , resultaram em referência de distribuição da proteína em áreas específicas no encéfalo. Com especial atenção, destacamos as estruturas com maior número de células imunoexpressas com S100 β , que foram: formação hipocampal e fímbria, núcleos septais, núcleo periventricular do hipotálamo, núcleos das habênulas, núcleo paraventricular do tálamo, células ependimárias, substância cinzenta periaquedutal.

Essa constatação não impede de considerarmos predileção de S100 β com essas estruturas, que apresentam localização em áreas do encéfalo respectivamente próximas as cavidades por onde circular o líquido, nos ventrículos e aqueduto cerebral.

Esses dados reforçam nossa suspeita de que S100 β mantém uma relação específica com essas estruturas. Faz-se necessário, no entanto, aprimorar o estudo, de maneira que possibilite responder essas suspeitas. Deste estudo temos, portanto, perspectivas de novas abordagens para o entendimento morfofuncional da proteína S100 β no encéfalo.

CONCLUSÕES

1- Distribuição imunopositiva da proteína S100 β nos encéfalos dos animais em condição basal foi encontrada em estruturas específicas do encéfalo. Nossa hipótese esta associada à predileção de S100 β por esses locais.

2- A possível predileção da proteína S100 β , em áreas específicas do encéfalo, resultou em dados similares entre os animais analisados, esses dados sugerem que a distribuição possa ser conservada como padrão dentro da espécie.

3- S100 β foi imunopositiva em elementos gliais, e mostrou distribuição irregular entre em regiões da porção cranial, e caudal. A partir desses dados é possível sugerir que a proteína é encontrada em subpopulações de glias específicas, e que essas possivelmente sejam encontradas somente em regiões limitadas do encéfalo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, N.J.. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.*, 200, 629-638, 2002.

Adami, C., G. Sorci, E. Blasi, A.L. Agnietti, F. Bistoni, R. Donato, S100 β expression in effects on microglia. *Glia* 33:131-42, 2001.

Aguirre A, Vives V, Marks A, Gallo V, Legraverend C: Spatial and temporal expression of S100B in cells of oligodendrocyte lineage. *Glia*, 51:81-97, 2005.

Akhisaroglu M, Manev R, Akhisaroglu E, Uz T and Manev H. Both aging and chronic fluxetine increase S100B content in the mouse hippocampus. *Neuroreport* 14: II: 1471-1473, 2003

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D., *Cell Junctions, Cell Adesion, and the Extracellular-Matrix*. In: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garland Publishing, New York, NY, 1994.

Alheid, G.F.; De Olmos, J.S.; Beltramino, C, A.; Amygdala and extended amygdala. In; Paxinos, G. *The rat nervous system*. San Diego, Academic Press., p. 495-598, 1995.

Alexander, G. & Crutcher, M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, Cambridge, 13 (8): 266-271, 1990.

Alexanian, A. R. & Bamburg, J. R. Neuronal survival activity of S100 β betabeta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-kappaB. *FASEB J.* 13: 1611-1620, 1999.

Arruda, W.O. & Meneses, M.S. *Anatomia dos Gânglios da Base*. In: Meneses, M.S.; Teive, H.A.G. *Doença de Parkinson*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

Aurell, A., Rosengren, E.L., Larlsson, B., Olsson, E.J., Zbornikova, V., Haglid, G.K.. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke* 22, 1254–1258, 1991.

Barres, B. A. & Brade, Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr. Opin. Neurob.* 10: 642-648, 2000.

Baudier, J. Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b – binding protein. *Proc. Nat/ Acad. Sci.USA* 89,11627-11631,1992.

Baudier, J.; Cole, R. D. Interactions between the microtubule-associated r proteins and SIOOb regulate 7 protein phosphorylation by the Ca-calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 263:5876-5883; 1988.

Bhattacharyya, A.; Oppenheim, R. W.; Prevette, D.; Moore, B. W.; Brackenbury, R. & Ratner, N. S100 is present in developing chicken neurons and schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. *J. Neurobiol.* 23: 451-466, 1992.

Bianchi, R., Giambanco, I., Donato, R. S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca (2)-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 268, 12669-12674, 1993.

Bianchi, R., Garbuglia, M., Verzini, M., Giambanco, I., Donato, R., Mechanism of S100 Protein-Dependent Inhibition of GFAP Polymerization. *BBA*, 1223, 354-360, 1994.

Bibel, M. & Barde, Y. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous systems. *Genes & Dev.* 14: 2919-2937, 2000.

Boyer S, Montagutelli X, Gomes D, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Dupouey P: Recent evolutionary origin of the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lens epithelial cells. A molecular and genetic analysis of various mouse species. *Brain Res Mol Brain Res*, 10:159-166, 1991.

Card, J.P.; Swanson, L.W.; Moore, R.Y. The hypothalamus: an overview of regulatory systems. In: Zigmond, M.J. et al. *Fundamental neuroscience*. San Diego: Academic Press., p. 1013 – 1026, 1999

Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G. Conditioned fear to context is associated with increased fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience*;78(1):165-77, 1997.

Castets, F.; Griffin, W. S.; Marks, A. & Van Eldik, L. J. Transcriptional regulation of the human S100 beta gene. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 46: 208-216, 1997.

Clarke, E. J. & Allan, V. Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr. Biol.* 12:596-598, 2002.

Davis, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In Aggleton, J.P. *The Amygdala*. New York, Wiley-Piss., p. 255-306, 2000.

Del Zoppo, G.J. & Hallenbeck, J.M.. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.*, 98, 73-81, 2000.

Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J: Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci*, 27:453-465, 2004.

Dib, K.; EL Jamali, A.; Jacquemin, C.; Correze, C. – Cyclic AMP Regulation of Messenger RNA Level of the Stimulatory GTPBinding Protein Gs alpha. Isoproterenol, Forskolin and 8-Bromoadenosine 3':5'-Cyclic Monophosphate Increase the Level of Gs Alpha mRNA in Cultured Astroglial Cells. *Eur J Biochem* 219: 529-37, 1994

Doetsch, F.. The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*, Volume 6, number 11, 2003.

Domesick, V.B. Projections from the cingulate cortex in the rat. *Brain Res*, v.12, n.2, p. 296-320, 1969.

Donato, R., Battaglia, F., Cocchia, D.. Characteristics of the effect of S-100 proteins on the assembly-disassembly of brain microtubule proteins at alkaline pH in vitro. *Cell Calcium* 8, 299-313, 1987.

Donato, R. Perspectives in S-100 protein biology *Cell Calcium* 12:713-726, 1991.

Donato, R.. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* 60, 540–551, 2003.

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

Dong-Ri Li, Bao-Li Zhu, Takaki Ishikawa, Dong Zhao, Tomomi Michiue, Hitoshi Maeda Immunohistochemical distribution of S-100 protein in the cerebral cortex with regard to the cause of death in forensic autopsy *Legal Medicine* 8, 78–85, 2006

Dringen, R. & Hamprecht, B. Glucose, insulin and insulin like growth factor I regulate the glycogen content in astroglial-rich primary cultures. *J. Neurochem.* 58: 511-517, 1992.

Dyck RH, Van Eldik LJ, Cynader MS: Immunohistochemical localization of the S-100 beta protein in postnatal cat visual cortex: spatial and temporal patterns of expression in cortical and subcortical glia. *Brain Res Dev Brain Res*, 72:181-192, 1993.

Dyck RH., Bogoch I I., Marksc A, Melvinb NR., Campbell GT Enhanced epileptogenesis in S100B knockout mice *Molecular Brain Research* 106 (2002) 22–29 Eng, L. F. GFAP: the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 8: 203-214, 1985.

Eng, L. F. & Ghirnikar, R. S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4: 229-237, 1994.

Eriksen JL, Druse MJ. Potential involvement of S100B in the protective effects of a serotonin-1a agonist on ethanol-treated astrocytes. *Brain Res Dev Brain Res.* Jun 29;128(2):157-64, 2001.

Everitt, B. Limbic lobe and olfactory pathways. In: Berry, M.M.; Bannister, L.H.; Standring, S.M. *Gray's Anatomy*. London, Churchill Livingstone., p. 1115-1141, 1995.

Fano, G. et al. The S100: a protein family in search of a function. *Prog. Neurobiol.* 46,71-82, 1995.

Gabbott P.L.A., Warner T.A., Jays P.R.L., Salway, and Busby S. J.. Prefrontal Cortex in the Rat: Projections to Subcortical Autonomic, Motor, and Limbic Centers. *The Journal of Comparative Neurology* 492:145–177 (2005)

Gage FH: Neurogenesis in the adult brain. *J Neuroscience*; 22(3):612-613, 2002

Gage FH: Structural plasticity of the adult brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6:135-141, 2004.

- Ghandour MS, Langley OK, Labourdette G, Vincendon G, Gombos G. Specific and artefactual cellular localizations of S 100 protein: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev Neurosci.*; 4(1):66-78; 1981
- Gegelashvili, G. & Schousboe, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* 62: 6-15, 1997.
- Gerlach R, Demel G, König HG, Gross U, Prehn JH, Raabe A, Seifert V, Kogel D. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience.* Sep 15;141(4):1697-701, 2006.
- Glowinski, J.; Marin, P.; Tence, M.; Stella, N.; Giaume C.; Premont, J.. Glial Receptors and their Intervention in Astrocytoastrocytic and Astrocyto-neuronal Interactions. *Glia* 11:201- 8, 1994.
- Goto, S., Matsukado, Y., Uemura, S., Mihara, Y., Inoue, N., Ikeda, J., Miyamoto, E.,. A comparative immunohistochemical study of calcineurin and S-100 protein in mammalian and avian brains. *Exp. Brain Res.* 69, 645-650, 1988
- Gu, X. and Spitzer, N. C. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature* 375, 784-787, 1995.
- Hachem S, Laurenson AS, Hugnot JP, Légraverend C. Expression of S100B during embryonic development of the mouse cerebellum. *BMC Dev Biol.* Mar 15;7:17, 2007
- Hagiwara M, Ochiai M, Owada K, Tanaka T, Hidaka H.. Modulation of tyrosine phosphorylation of p36 and other substrates by S100 protein. *J Biol Chem* 263:6438–6441, 1988.
- Hansson, E. and Ronnback, L., , Astrocytes in Glutamate Neurotransmission. *Faseb J.*, 9, 343-350, 1995.
- Harder, T. and Gerke. V. The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11 (2) complex. *J. Cell Biol.* 123, 1119-1132, 1993
- Haring J.H., Hagan A., Olson J.; Rodgers B., Hippocampal serotonin levels influence the expression of S100 β detected by immunocytochemistry , *Brain Res.*, 631119-123, 1993
- Heizmann C.W., G. Fritz, B.W. Schafer, S100 proteins: structure, functions and pathology, *Front. Biosci.* 7 , dl356-dl368, 2002.
- Heizmann CW, Cox Jos A.. New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca^{2+} -, Zn^{2+} - and Cu^{2+} -binding protein family. *BioMetals*, 11, 383–397, 1998
- Heizmann CW. Calcium binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res.*;24:1097-100, 1999
- Haydon, P. G. Neurons and glia talk to each other. *Curr. Biol.* 10: 712-714, 2000.

- Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem* 271:2543-2547, 1996.
- Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100 beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69:2294-2299, 1997.
- Jarvis K, Assis-Nascimento P, Mudd LM, Montague JR. Beta-amyloid toxicity and reversal in embryonic rat septal neurons. *Neurosci Lett*. 2007 Aug 23;423(3):184-8. Epub Aug 9, 2007.
- Jason L. Eriksen, Mary J. Druse: Astrocyte- mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100b, 9-15, 2001
- Johann Steiner, Hans-Gert Bernstein, Hendrik Bielau, Annika Berndt, Ralf Brisch, Christian Mawrin, Gerburg Keilhoff and Bernhard Bogerts Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human Brain, 2007
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T. M. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2000.
- Kane, C. J. M.; Brown, G. J. & Phelan, K. D. Transforming growth factor- β 2 stimulates and inhibits neurogenesis of rat cerebellar granule cells in culture. *Dev. Brain Res.* 96: 46- 51, 1996.
- Kato, K., Suzuki, F., Morishita, R., Asano, T., Sato, T.. Selective increase in S-100 beta protein by aging in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 54, 1269 - 1274, 1990
- Kimelberg, H. K. & Norenberg, M. D. Astrocytes. *Scient. Amer.* 260: 44-52, 1989.
- Kimelberg, H.. Receptors on astrocytes – what possible functions? *Neurochem. Int.*, 26, 27-40, 1995.
- Kling, A S; Brothers, L A. The amygdale and social behavior. In; Aggleton, J.P. The amygdale. New York. Wiley-Liss., p. 353-377, 1992.
- Kingsley R E. Manual de Neurociências. Editora Guanabara, segunda edição, 2001.
- Kohler GJ, Milstein C. The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, *Scand J Immunol.* 1993 Feb;37(2):117-29. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. 1984
- Kuhn, H. G.; Winkler, J. Kempermann, G. Thal, L. J. & GAGE, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 17: 5820-5829, 1997.
- Lamers K.J.B., Van Elgelen B.G.M., Gabreels F.J.M., Hommer OR, Borm G.F., Wevets R.a.: Cerebrospinal neuron –specific enolase, S100 and myelin basic protein in neurological disorders. *Acta Neurol Scand* 92: 247 –25 , 1995 .

- Lefrançois, T.; Fages, C.; Peschanski, M. & Tardy, M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. *J. Neurosci.* 17: 4121-4128, 1997.
- Levitt, S. P. & Rakic, P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in adial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193: 815-840, 1980.
- Li, Y.; Wang, J.; Sheng, J. G.; Liu, L.; Barger, S. W.; Jones, R. A.; Van Eldik, L. J.; Mrak, R. E. & Griffen, W. S. T. S100 β increases levels of β -amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J. Neurochem.* 71: 1421-1428, 1998.
- Lin, L.-H; Van Eldik, L. J.; Osheroff, N.; Nordon, J. J. Inhibition of protein kinase C- and casein kinase II-mediated phosphorylation of GAP-43 by S100 β . *Mol. Brain Res.* 25:297-309; 1994.
- Liu Y, Rao MS: Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell*, 96:279-290, 2004.
- M. Khurgel, G.O. Ivy, Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis, *Epilepsy Res.* 26 163–175, 1996.
- Machado, A. Neuroanatomia Funcional, Editora Atheneu, segunda edição, 2005.
- Machado Vieira R.; ouza D.O.; Kapczinsk I F: Neuropatologia de células gliais em modelo de integração neurônio glia no transtorno de humor bipolar . *Ver. Psiq Clín* 29 (4): 97-203, 2002.
- Martinez, R. & Gomes, F. C. A. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 277: 49311-49318, 2002
- Marques, N.E. Menna-Barreto, L.. Cronobiologia: Princípios e aplicações. Pp 66-67. 1997
- Masaaki Kitada, Shushovan Chakraborty, Naoya Matsumoto, Masanori Taketomi, and Chizuka Ide Differentiation of Choroid Plexus Ependymal Cells into Astrocytes After Grafting into the Pre-lesioned Spinal Cord in Mice 36:364–374 2001.
- Mata, M., Alessi, D., Fink, D.J.. S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. *J. Neurocytol.* 19, 432 – 442, 1990.
- Meneses, M.S.; Teive, H.A.G. Anatomofisiologia dos gânglios da base. In: Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- Menet, V.; Ribota, M. G.; Chauvet, N.; Cria, M. J.; Lannoy, J.; Colucciguyon, E. & Privat, A. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J. Neurosci.* 16: 6147-6158, 2001.

- Mink, J.W. Basal Ganglia. In: Zigmond, M.J. et al. Fundamental neuroscience. San Diego: Academic Press, p. 951 – 971, 1999.
- Miura. K. Increase in S-100 β protein content in thyroid carcinoma. *Metabolism* 36:388-391; 1987.
- Mrak, R.E.; Griffin, W.S.T.: The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100 β in the pathogenesis of Alzheimer`s disease. *Neurobiol. Aging* .22: 915-22, 2001.
- Moore., B. A soluble protein characteristic of the nervous system. *B&hem. Biophys. Res. Comm.* 19:739-744; 1965.
- Murphy, S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29, 1–13, 2000.
- Nagasaka, A.; Umekawa, H.; Hidaka, H.; Iwase, K.; Nakai, A.; Anyoshi, Y.; Okyama, T.; Aona. T.; Nakagawae, H.; Ohtani, S.; Shinoda. S.; Mivakawa. S.; Kawase, K.; Nedergaard, M., Ranson, B., Goldman, S.A.. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.*, 26, 523-530, 2003.
- Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R, Goncalves CA: Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res*, 37:683-686, 2006.
- Nishiyama H, Kno T, Endo S, and Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity *March* 19, vol. 99 no. 6 4037–4042, 2002.
- Noback, C.R.; Strominger, N.L. & Demarest, R.J. Neuroanatomia: estrutura e função do sistema nervoso humano. 5.^a ed. São Paulo: Premier, 1999.
- Norenberg, M.D.. Astrocyte responses to CNS injury. *J NeuropatholExp Neurol.*, 53, 213-220, 1994.
- Norenberg, M.D. Active and passive roles of astrocytes in neurologic disease: commentary on forum position paper. *Neurotoxicol.*, 19, 23-26, 1998.
- Nogueira MI, Felício LF. Métodos quantitativos estruturais e dosagens em neurociências in Bittencourt JC, Elias CF. Métodos em Neurociências. São Paulo: Roca, 199-222, 2007.
- O’Callaghan JP. Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci*;4:197-206, 1991
- Paul L.A. Gabbott, Tracy A. Warner, Paul R.L. Jays, Phillip Salway, and Sarah J. Busby Prefrontal Cortex in the Rat: Projections to Subcortical Autonomic, Motor, and Limbic Centers *The Journal of Comparative Neurology* 492:145–177 (2005)
- Paxinos, G.; Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press, 1998.

- Pfriege F. W. & Barres, B. A. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277: 1684-1687, 1997.
- Price, J.L., Thalamus. In: Paxinos, G., ed. *The rat nervous system*. 2nd.ed San Diego, Academic Press, p. 629-48, 1995.
- Portela L.V., Brenol J.C., Walz r., et al.: Serum S100 β levels in patients with lupus erythematosus, preliminary observation . *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9:164-166, 2002.
- Raff, M. C.; Miller, R. H. & Noble, M. A glia progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390-396, 1983.
- 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*. Jan 15;55(2):165-77, 2007.
- Rakic, P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study in Macacus rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141: 283-312, 1971.
- Rakic, P. Elusive Radial Glial Cells: Historical and Evolutionary Perspective. *Glia*: 43: 19-32, 2003.
- Rasia-Filho AA, Xavier LL, dos Santos P, Gehlen G, Achaval M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res Bull.* May;58(1):67-75, 2002.
- Rasia-filho, A. A.; Pres, T.M.; Cubilla-Gutierrez, F.H.; Lucion, A.B. Effect of estradiol implanted in the corticomedial amygdala on the sexual behavior of castrated male rats. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, v. 24, p. 1041-1049, 1991.
- Ribeiro do Valle, L.E. Serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei discharge in association with activity of masticatory muscles. *Brás. J. Méd. Biol. Res.* 30:79-83, 1997
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*, 20, 570-577, 1997.
- Rickmann M, Wolff JR: S100 immunoreactivity in a subpopulation of oligodendrocytes and Ranvier's nodes of adult rat brain. *Neurosci Lett*, 186:13-16, 1995.
- Rothermundt M., Arolt V., Wiesmann et al.: S100 β is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J. Affect Disord* 66:89 –93, 2001.
- Rothermundt, M.; Peters, M.; Prehn, H. M. & Arolt, V. S100 β in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60: 614-632, 2003.
- Saper, C.B. Image is everything. *J Comp Neurol*, v.412, n.3, p. 381-2, 1999.
- Sarnat HB: Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microsc Res Tech*, 41:14-28, 1998.

Schafer B.W., Heizmann C.W., The S100 family of Efhand calcium-biding proteins functions and pathology. Trends Biochem. Sci . 21:134-140, 1996.

Schenk, M.P., Manning, R.J. and Paalman, M.H. Going digital: image preparation for biomedical publishing. Anat Rec, v. 257, n.4, p. 128-36.

Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Diefenbacher A and Blasing IE (2002) S100b is increased in mood disorders and may be reduced by antidepressive treatment. Neuroreport 13(13): 1675-78, 2002.

Selinfreund, R.H.; Barger S.W.; Pledger, W.J.; L. J. Van Eldik: Neurotrophic protein S100b stimulates glial cell proliferation, Proc. Nah.Acad. Sci USA, 88 3554-3558 (1991)

Staimirovic, D. B.; Ball, R.; Small, D. L. & Muruganandam, A. Developmental regulation of glutamate transporters and glutamine synthetase activity in astrocytes cultures differentiated in vitro. Int. J. Devl. Neurosc. 17: 173-184, 1999.

Steiner J., Bernstein Hans-Gert, Bielau H., Berndt A., Brisch R., Mawrin C., Keilhoff G., Bogerts B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S00B in human brain. BMC Neuroscience, 2007

Stoof, J.C.; Winogrodzka, A.: Van Muiswinkel, F.L.; Wolters, E.C.; Voorn, P.; Groenewegen, H.J.; Booij, J.; Drukarch, B. Leads for the development of neuroprotective treatment in parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. European Journa01 of Pharmacology, v. 375, p. 75-86, 1999.

Sugimura, K., Haimoto, H., Nagura, H., Kato, K., Takahashi, A., Immunohistochemical differential distribution of S-100alpha and S100beta in the peripheral nervous system of the rat. Muscle Nerve 12, 929-935, 1989

Swanson, L.W. The hypothalamus. In: Bjorklund, A., Hörklund, A., HöKfelt, T. and Swanson, L.W., Handbook of chemical neuroanatomy. Vol.5 Integrated systems of the CNS. Elsevier Science Publisher, p.1-124, 1987.

Tannenbaum, G. S. Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: Evidence of a role endogenous circulating somatostatin. Endocrinology. 108:76-82, 1981.

Thach, W.T., Goodkin, H.P., & Keating, J.G. The cerebellum and the adaptive coordination of movement. Annu. Rev. Neurosci. 15: 403-442, 1992.

Tramontina F, Leite MC, Goncalves D, Tramontina AC, Souza DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk ST, Goncalves CA: High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. Neurochem Res, 31:815-820, 2006.

Tramontana F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, and Gonçalves CA. Developmental Changes in S100B Content in Brain Tissue, Cerebrospinal Fluid, and Astrocyte Cultures of Rats Received June 6, 2002; accepted July 22, 2002

- Ueda, S.; Kokotos Leonardi, E. T.; Bell III, J. & Azmitia, E. C. Serotonergic sprouting into transplanted C-6 gliomas is blocked by S100 β antisense gene. *Mol. Brain Res.* 29: 365-368, 1995.
- Van Elaik, L. J.; Christie-Pode, B.; Bolin, L. M.; Shooter, E. M. & Whetseel Jr, W. O. Neurotrophic activity of S100 β in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res.* 542: 280-285, 1991.
- Viana, G.S.B. Doenças neurodegenerativas. In: Graeff, F.G. & Brandão, M.L. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5.^a ed. São Paulo: Lemos, 1999.
- Walker P, Carrive P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual fear and poststress recovery. *Neuroscience*;116:897-912, 2003
- Watkins, L.R., Maier, S.F.. Glia: a novel drug Discovery target for clinical pain. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2, 973-985, 2003.
- Weinstein, D. E.; Shelanski, M. L. & Liem, R. K. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J. Cell Biol.* 112: 1205-1213, 1991.
- Weir, J.B.V.: New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol. Lond.*, 109:1-9, 1949.
- Winnigham-Major, F.; Staecker, J. L.; Barger, S. W.; Coats, S. & Van Eldik, L. J. Neurite expansion and neuronal survival activities of recombinant S100 β proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J. Cell Biol.* 109: 3063-3071, 1989.
- Whitaker–Azmitia, P.M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*, v. 56, p. 479 – 485, 2001.
- Whitaker–Azmitia P.M., R. Murphy, E.C. Azmitia, Stimulation of astroglial 5-HT1a receptors releases the serotonergic growth factor, protein S100b, and alters astroglial morphology, *Brain Res.*, 528 155-158, 1990.
- Whitaker–Azmitia, P.M., R. Murphy, E.C. Azmitia, S100 protein is released from astroglial cells by stimulation of 5-HT1a receptors, *Brain Res.* 528, 155-158, 1990.
- Whitaker-Azmitia, P.M.; Azmitia, E.C. – Astroglial 5-HT1a Receptors and S-100 Beta in Development and Plasticity. *Perspect Dev Neurobiol* 2: 233-8, 1994.
- Wiesmann M., Wandering K.P., Mis Ler Sr, Eckhoff D., Rothermundt M. Arolt V. Kirchner H., Elevated plasma levels of S100 β protein in schizophrenic patients. *Biol. Psych* 45: 1511-1511, 1999.
- Wilder PT, Rustandi AC, Drohat DJ, Weber DJ.. S100B inhibits the PKC dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a calcium dependent manner. *Protein Sci* 7:794–798, 1998.

Witter, M. P.; Amaral D. G. The rat nervous system. Cap.21. Academic Press, Inc, 1995.

Wolf DS, Gearing M, Snowdon DA, Mori H, Markesbery WR, Mirra SS. Progression of regional neuropathology in Alzheimer disease and normal elderly: findings from the Nun study. *Alz Dis Assoc Dis*;13:226–31, 1999.

Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M: Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke*, 30:1190-1195, 1999.

Yang, H. Ohning, G.; Tache, Y. TRH in dorsal vagal complex mediates acid response to excitation of nucleus pallidus in rats. *Am.J. Physiol* 265 (Gastrointest. Liver Physiol. 28) : G880-G886, 1993

Yamashita N., ILG E C., Fer B W. S, Heizmann C W., and Toshio Kosaka Distribution of a Specific Calcium-Binding Protein of the S100 Protein Family, S100A6 (Calcyclin), in Subpopulations of Neurons and Glial Cells of the Adult Rat Nervous System *The Journal of Comparative Neurology* 404:235–257 (1999)

Zheng, T.; Wilson, C.J. Corticostriatal combinatorics: the implications of corticostriatal axonal arborizations. *J Neurophysiol*, v. 87, p. 1007 - 1017, Feb, 2002.

Ziegler DR, Innocente RB, Leal R. 1998. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from mature rat hippocampus. *Neurochem Res* 23:1259–1263

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

Zirmner. D. B.; Van Eldik, L. J. Identification of a molecular target for the calcium-modulated protein S 100 Fructose- 1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.* 261: 11424-11428; 1986.

Zilles, K. and Wree, A. Cortex areal and laminar structure. In: Paxinos, G., ed. *The rat nervous system*. 2nd.ed. San Diego, Academic Press, p. 649-85, 1995.