

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –  
BIOQUÍMICA**

**S100B COMO MARCADOR DE LESÃO NEURAL:  
ESTUDOS EM PACIENTES COM SÍNDROME DE DOWN,  
COM DEFEITOS DO TUBO NEURAL, E DE SECREÇÃO  
PELO TECIDO ADIPOSEO**

**Cristina Brinckmann Oliveira Netto**

Orientador: Dr. Roberto Giugliani  
Co-Orientador: Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

PORTO ALEGRE

2004

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professores Roberto Giugliani e Carlos Alberto Gonçalves, pela oportunidade, confiança e incentivo.

Aos Professores Diogo Souza e Luis Valmor Portela pela imensa colaboração nos experimentos.

Aos colegas do Lab 33, em especial à Sabrina, à Marina, à Carol, à Lucia e ao Matheus, pelo auxílio nos experimentos e principalmente pela amizade. E à Carmem, pelo auxílio com a confecção das figuras.

Às colegas do Lab 32, Ionara Siqueira e Cíntia Fochesato, pela grande colaboração nos experimentos de SOD, e pelo carinho especial.

À Professora Mara Benfato, do Depto de Biofísica, UFRGS, e os bolsistas Penélope e Tiago, pela colaboração nos experimentos com adipócitos.

Aos Drs Maria da Purificação Tavares, Maria Cristina Ferreira, Temis Reverbel da Silveira, Têmis Félix, Ursula Matte e Carlos Kieling pela gentileza em fornecer as amostras dos pacientes estudados nesta tese.

Aos colegas do Serviço de Genética Médica do HCPA, em especial as amigas Maria Luisa Pereira, Rejane Gus Kessler e Maira Burin, pelo carinho e incentivo.

A todos os professores e funcionários do Depto de Bioquímica e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo carinho desde os tempos da Iniciação Científica, em especial à Cléia.

À Dra Maria Teresa Sanseverino, pela amizade tão especial, sempre presente com a palavra certa nas horas importantes, desde o tempo do mestrado.

Aos meus pais, irmãos e demais familiares, pelo apoio e compreensão.

Ao Alex, grande amor da minha vida, que mesmo assumindo um grande desafio no mesmo período de desenvolvimento desta tese, sempre esteve ao meu lado.

Às minhas filhas Isadora e Alice, por serem a luz da minha vida.

# SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>RESUMO</b>	ii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 As proteínas S100	02
1.2 A proteína S100B	05
1.2.1 O papel intracelular da S100B	07
1.2.2 O papel extracelular da S100B	07
1.2.3 A origem extracerebral da S100B	09
1.2.4 A associação dos níveis de S100B com doenças	10
1.3 A síndrome de Down	14
1.3.1 A síndrome de Down e a S100B	17
1.3.2 A síndrome de Down e a atividade da enzima superóxido dismutase	18
1.4 Os defeitos do tubo neural	19
1.4.1 Os defeitos do tubo neural e a S100B	21
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23

<b>3.MANUSCRITO I</b>	<b>24</b>
<b>4. MANUSCRITO II</b>	<b>29</b>
<b>5. MANUSCRITO III</b>	<b>33</b>
<b>6. MANUSCRITO IV</b>	<b>50</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>70</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>9. ANEXO</b>	<b>80</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>82</b>

## ABREVIATURAS

APP	proteína precursora $\beta$ -amilóide
ARNm	ácido ribonucléico mensageiro
DA	doença de Alzheimer
DPN	diagnóstico pré-natal
DTN	defeito do tubo neural
ECLAMC	estudo colaborativo latino-americano de malformações congênicas
GFAP	proteína fibrilar glial ácida (do inglês <i>glial fibrillar acidic protein</i> )
IL-1	interleucina 1
IM	idade materna
KDa	quilodalton
LA	líquido amniótico
LCR	líquido cefalorraquidiano
Mb	megabase
MF	malformação
MARCKS	substrato miristoilado da proteína cinase C rico em alanina
RAGE	receptor para produtos de glicação terminal avançada (do inglês <i>receptor for advanced glycation end products</i> )
RM	retardo mental
RN	recém nascido
SD	síndrome de Down
SOD	superóxido dismutase
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico

## RESUMO

As proteínas S100 são uma família de proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  com ampla distribuição ao longo dos tecidos de vertebrados. O gene da proteína S100B está localizado no cromossomo 21, e ela é expressa principalmente em astrócitos, estando envolvida em uma série de patologias, tanto do sistema nervoso central como em tecidos periféricos. Nesta tese estudamos o papel da proteína S100B na síndrome de Down, patologia genética que se origina da trissomia do cromossomo 21, bem como seu potencial como marcador de dano do sistema nervoso, em pacientes com defeito do tubo neural. Adicionalmente, procuramos demonstrar a presença de fontes extracerebrais de S100B.

Observamos um aumento da proteína S100B em líquido amniótico de gestações com fetos com síndrome de Down (1,24  $\mu\text{g/L}$ ; controles 0,69  $\mu\text{g/L}$ ), e mostramos que este aumento está associado com a idade gestacional. Também relatamos um aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas gestações de fetos com síndrome de Down (16,16 U/mg/prot; controles 10,78 U/mg/prot); este efeito não foi correlacionado com a idade gestacional. Sugerimos que a S100B e a SOD podem ser utilizadas como parâmetros adicionais na triagem pré-natal para síndrome de Down.

Em relação aos níveis da S100B em soro de pacientes com síndrome de Down (1,35  $\mu\text{g/L}$ ), confirmamos um aumento desta proteína em relação aos indivíduos controle (0,38  $\mu\text{g/L}$ ). Este efeito, entretanto não é dependente da idade, como nos indivíduos normais. Determinamos, pela primeira vez, o perfil ontogenético desta proteína no soro destes pacientes. Este achado pode ser associado com as lesões neurodegenerativas presentes nos pacientes com síndrome de Down.

O estudo da S100B como marcador de dano em pacientes com defeito do tubo neural (DTN; 0,860  $\mu\text{g/L}$ ) não revelou diferenças em relação aos indivíduos normais (0,580  $\mu\text{g/L}$ ). Ainda, pacientes com DTN não apresentaram variação dos níveis da proteína dependente da idade, como acontece nos indivíduos controle.

Por fim, estudamos o tecido adiposo como provável fonte extracerebral de S100B, correlacionando os níveis séricos com aqueles encontrados em LCR de ratos submetidos a jejum, e sugerimos que a S100B tenha um papel no transporte de ácidos graxos.

## **1.INTRODUÇÃO**

O íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é um importante mensageiro celular, regulando uma variedade de processos, incluindo secreção, contração, metabolismo, divisão celular e crescimento celular. Nos últimos anos tem sido demonstrado o papel do cálcio no desenvolvimento e manutenção de estados patológicos como doenças vasculares, inflamação, derrame, diabetes, entre outros. E em nenhum outro tecido, porém o papel do cálcio é tão multifuncional como no cérebro (Mooren & Kinne, 1998).

As proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  agem como moléculas receptoras de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e levam a algumas mudanças nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que podem alterar funções celulares. Com base em propriedades estruturais, estas proteínas podem ser divididas em 3 grupos: a) a superfamília calmodulina – S100 – troponina C, que contém domínios ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  com alta afinidade do tipo hélice-alça-hélice; b) aquelas contendo domínios ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  hemolisina, e; c) a família das anexinas (Zimmer e cols, 1995).

### **1.1- AS PROTEÍNAS S100**

As proteínas S100 são uma grande família multigênica de proteínas ligantes de cálcio, expressas exclusivamente em vertebrados e relacionadas com diversas atividades intra e extracelulares (Donato, 2001). Elas são localizadas no citoplasma e/ou núcleo de uma grande variedade de tecidos, tanto nervoso quanto não nervoso (Gonzalez-Martinez e cols, 2003). Já foram descritos cerca de 21 membros e, em conjunto, as proteínas S100 representam o maior subgrupo da família de proteínas ligantes de cálcio do tipo hélice-alça-hélice (Donato, 2003) (Tabela 1).

As proteínas S100 têm geralmente um baixo peso molecular (entre 9 e 13 KDa) contendo 2 sítios de ligação para o cálcio, interconectados por uma região intermediária, geralmente referida como região dobradiça (Figura 1). Cada motivo ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  compõe-se de uma alça flanqueada por  $\alpha$ -hélices. Assim, hélices I e II



**TABELA 1- Proteínas da família S100**

Nome	Papel intracelular	Papel extracelular	Símbolo prévio	Localização cromossômica	Função sugerida	Associação com doenças
S100A1	Sim	Sim	S100 $\alpha$ , S100a	1q21	Regulação do metabolismo de energia	cardiomiopatia
S100A2	Sim	Sim	S100L, CaN19	1q21	Quemotaxia, supressão de tumor, funções nucleares	câncer, supressão de tumor
S100A3	ND	ND	S100E	1q21	Supressão de tumor, secreção	-
S100A4	Sim	Sim	CAPL,P9Ka,EL98,MTS1,18A2	1q21	Regulação crescimento celular, diferenciação celular	câncer, metástases
S100A5	ND	ND	S100D	1q21	desconhecida	-
S100A6	Sim	ND	CACY,2A9,PRA,CaBP, calciclina,5BP	1q21	Transdução de sinal intracelular, regulação e liberação de insulina, secreção de prolactina	câncer, esclerose lateral amiotrófica
S100A7	Sim	Sim	PSOR1, psoriasina	1q21	Diferenciação de queratinócitos	câncer, psoríase
S100A8	Sim	Sim	CAGA,MRP8,CGLA,MIF, NIF,	1q21	Maturação das células mielóides,adesão de neutrófilos, apoptose, metabolismo ácidos graxos	inflamação, fibrose cística
S100A9	Sim	Sim	CAGB,CFAg,MRP14,CG LB	1q21	Maturação das células mielóides	inflamação, fibrose cística
S100A10	Sim	Sim	CAL12,Ca[1], CLP11, ANX2L, p10	1q21	Atividade anti-inflamatória,liberação de neurotransmissores	inflamação
S10011	Sim	Sim	S100C, MLN70	1q21	Organização de endosomos, regulação da fosforilação	câncer, doença ocular
S10012	Sim	Sim	CAAF1,CGRP,MRP6	1q21	Interação hospedeiro-parasita	inflamação, úlcera de Mooren
S10013	Sim	ND	CAAF2	1q21	Regulação da liberação de sinaptotagmine FGF-1	-
S10014	ND		BCMP84,S100A7a	1q21	-	transformação maligna
S100B	Sim	Sim	S100 $\beta$ , NEF	21q22	Regulação do metabolismo de energia, regulação do ciclo celular	doença de Alzheimer,síndrome de Down, melanoma, esclerose lateral amiotrófica, epilepsia
repetin	Sim	ND	-	1q21	Regulação da interação dos filamentos intermediários	-
S100Z	ND	ND	-	5q12-q13	Função no baço e leucócitos	aberrante em alguns tumores
S100P	ND	ND	S100P	4p16	Função na placenta	câncer próstata, mama
calbindina	Sim	ND	CALB3,lcaBP, CABP9K	Xp22	Regulação da homeostase do Ca <sup>2+</sup>	deficiência de vitamina D, mineralização anormal
profilagrina	Sim	ND	S100F-P	1q21	Regulação dos filamentos intermediários	-
trichialina	Sim	ND	S100F-T	1q21	Regulação dos filamentos intermediários	-

ND – não descrito

Adaptado de Zimmer e cols, 1995; Donato, 2003; Heizmann, e cols, 2003.

flanqueiam o laço 1 e hélices III e IV flanqueiam o laço 2. Algumas proteínas S100 também ligam zinco ( $Zn^{2+}$ ), com relativa alta afinidade, e S100B e S100A5 também ligam cobre ( $Cu^{2+}$ ). Os membros da família S100 diferem uns dos outros principalmente pelo tamanho da região dobradiça e da extensão C-terminal, sugerindo que estas duas regiões tenham um papel na especificação da atividade biológica de cada uma das proteínas (Donato, 2003). Exceto pela calbindina 9K, que é monomérica, todas as outras proteínas S100 existem dentro das células como homodímeros.

A maioria dos genes das proteínas S100 estão localizados no cromossomo 1. Elas têm alto grau de conservação na seqüência de aminoácidos, na estrutura genômica e na estrutura tri-dimensional (Zimmer e cols, 2003). A organização estrutural dos genes das proteínas S100 é altamente conservada, tanto num mesmo organismo quanto em espécies diferentes (Heizmann e cols, 2003). Um gene típico S100 é composto por 3 exons, onde o primeiro exon carrega a seqüência 5' não codificada.

A pesquisa sobre as proteínas S100 vem sendo impulsionada por uma série de achados: a) a descoberta dos seus vários tipos e a identificação de proteínas alvo das S100; b) a observação de que certos membros desta família são implicados não somente na regulação de atividades intracelulares dependentes de  $Ca^{2+}$ , mas que também podem agir no meio extracelular em tipos definidos de células; c) e a diferente expressão de alguns membros em células normais e tumorais (Donato, 2001).

## 1.2 - A PROTEÍNA S100B

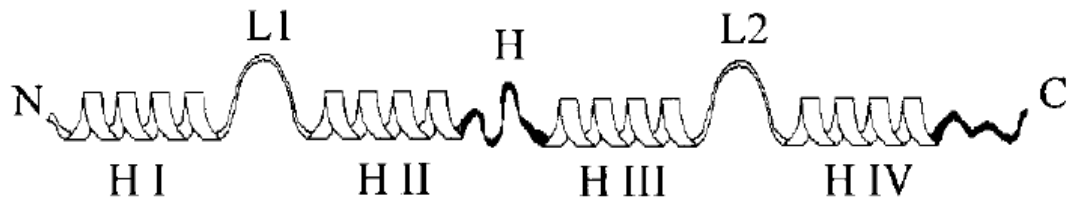
As proteínas S100 foram descritas pela primeira vez por Moore, em 1965, como proteínas ácidas, de baixo peso molecular, parcialmente solúveis em sulfato de amônia, em pH neutro. Originalmente se pensava que as proteínas desse grupo eram homogêneas, específicas do sistema nervoso, mas a caracterização molecular mostrou que a S100B representava uma fração heterogênea das proteínas ligante de  $\text{Ca}^{2+}$ , de baixo peso molecular, que não são restritas ao tecido nervoso (Jensen e cols, 1985).

A S100B tem um peso molecular de 21 KDa, existe como um homodímero, consistindo de 2 subunidades  $\beta$ , onde cada monômero tem dois sítios de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$ , mas que também podem ligar  $\text{Zn}^{2+}$  (Figura 2).

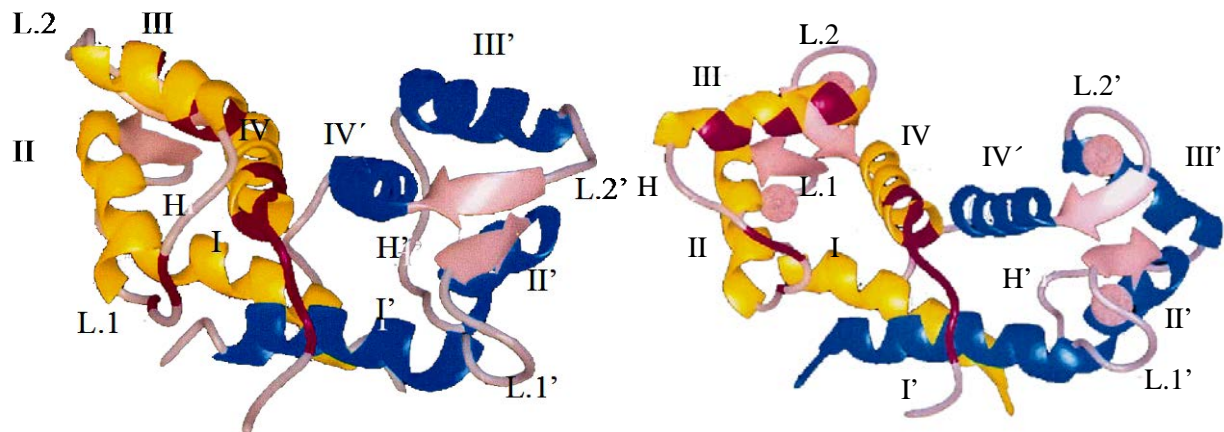
O gene da proteína S100B, diferente da maioria das proteínas S100, está localizado no braço longo do cromossomo 21 na região 22.3. A S100B é produzida primariamente pelos astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann e representa cerca de 0,2% do total das proteínas cerebrais (Heizmann e cols, 2002), tendo efeito autócrino e parácrino na glia, neurônios e microglia. O seu mecanismo de secreção ainda não foi identificado, mas postula-se que seja um mecanismo similar ao da secreção de outros fatores, como o fator neurotrófico ciliar, interleucina  $1\alpha$  e  $1\beta$  e o fator de crescimento endotelial humano.

A S100B tem uma função protetora, se estiver dentro da célula, em níveis fisiológicos. Entretanto, uma vez secretada, a sua concentração local é que vai ditar seu efeito benéfico ou não. Concentrações nanomolares parecem ter efeito neuroprotetor, enquanto concentrações micromolares produzem efeitos neurodegenerativos e/ou a indução da apoptose (Donato, 2001).

A S100B é liberada constitutivamente por astrócitos e sua secreção é regulada pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5HT1A (Whitaker-Azmitia e cols, 1990), e também por glutamato, adenosina (Ciccarelli e cols, 1999) e ácido lisofosfatídico (Pinto e cols, 2000; Gonçalves e cols, 2002).



**Figura 1** – Representação esquemática da estrutura secundária da proteína S100. Cada alça (“loop”) ligante de  $\text{Ca}^{2+}$  (L1 e L2 na porção N- e C- terminal, respectivamente) está entre duas  $\alpha$ -hélices (HI e HIII para L1 e HIV para L2). Uma região de ligação (H) conecta a hélice II à hélice III. Após a hélice IV localiza-se a porção C-terminal da S100 (Donato, 2001).



**Figura 2** – Estrutura do dímero de S100B sem ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  (esquerda) e ligada ao  $\text{Ca}^{2+}$  (direita). Um dos monômeros de S100B está em amarelo e o outro em azul. As hélices estão indicadas por números romanos (I-IV em um monômero, e I'-IV' no outro monômero). A ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  a cada monômero de S100B causa a reorientação da hélice III relativa a todas as hélices com conseqüente reorientação da região de ligação (H). Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  estão representados por bolas rosa claro nas alças de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  (L1, L2 em um monômero, e L1', L2' no outro monômero). (Donato, 2001)

### 1.2.1 - O papel intracelular da S100B

Dentro do astrócito a S100B pode ser encontrada no citoplasma, em associação com membranas ou proteínas do citoesqueleto (Bianchi e cols, 1996; Karl e cols, 2000; Sorci e cols, 1998) assim como no núcleo da célula, participando de eventos como apoptose e regulação do ciclo celular (Millward e cols, 1998; Scotto e cols, 1998). Esta ampla distribuição sugere seu envolvimento em diversas funções.

A S100B apresenta como funções intracelulares:

1- Regulação da fosforilação de proteínas: em geral a S100B inibe a fosforilação protéica, interagindo com substratos das cinases, isto é, bloqueando o acesso das cinases ao substrato pertinente. Como exemplo, podemos citar a inibição da fosforilação da p53, uma proteína supressora de tumor (Donato, 2003).

2- Regulação da atividade enzimática: a S100B estimula a atividade da Ndr, uma proteína cinase importante na regulação da divisão celular; também estimula a atividade da guanilato ciclase na retina, sugerindo que a S100B tenha um papel na adaptação dos fotorreceptores ao escuro (Rambotti e cols, 1999); e trabalho de nosso grupo também mostrou que ela estimula a calcineurina (Leal e cols, 2004).

3- Regulação da homeostase do  $Ca^{2+}$ : a S100A1 e possivelmente a S100B afetam diretamente o receptor de rionidina, estimulando a liberação de  $Ca^{2+}$  induzida por  $Ca^{2+}$ .

4- Modulação dos componentes do citoesqueleto: a S100B regula os 3 constituintes principais do citoesqueleto citoplasmático glial, isto é, microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos. A S100B tem o papel de evitar o excesso de polimerização da tubulina e/ou remodelar os microtúbulos pela elevação do  $Ca^{2+}$  citosólico. A S100B atua diretamente na polimerização e na fosforilação (Donato, 2001) de filamentos intermediários. Ela se liga às proteínas associadas aos microfilamentos como a CapZ (*actin capping protein*), afetando sua polimerização (Ivanenkov e cols, 1995).

### **1.2.2 - O papel extracelular da S100B**

A S100B produzida nos astrócitos é secretada para o meio extracelular por um mecanismo ainda não esclarecido, podendo atuar sobre outras células. Recentemente, receptores de membrana RAGE (receptor para produtos de glicação terminal avançada) foram identificados como sítios de ligação para S100B em neurônios, dando um primeiro indício de como esta proteína age extracelularmente (Schmidt e cols, 2000).

A S100B extracelular tem dois tipos de efeitos em neurônios, dependendo da sua concentração:

1-Em concentrações nM, ela favorece a sobrevivência de neurônios e estimula o crescimento dos neuritos; aumenta a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento; após o dano, previne a degeneração do neurônio motor e estimula a fosforilação de ERK 1 e 2 em astrócitos (Donato 2001, 2003). Todas estas observações apontam para um papel neurotrófico da S100B secretada, o que pode ser importante durante o desenvolvimento e regeneração nervosa. A atividade pró-sobrevivência da S100B extracelular e a habilidade desta proteína de estimular o crescimento do neurito dependem da translocação nuclear do NF-kB e da super expressão do fator anti-apoptótico, Bcl-2, em neurônios alvo, que por sua vez depende da ligação da S100B com receptores RAGE.

2- Em concentrações  $\mu$ M, ela tem efeitos tóxicos, como morte neuronal via apoptose. O aumento crônico da S100B produz morte neuronal por apoptose, causando elevação das espécies reativas de oxigênio, liberação de citocromo C e ativação da cascata das caspases. Não podemos esquecer a possibilidade de que no meio extracelular, a S100B sofra oxidação e/ou oligomerização, evento favorecido pelas condições não redutoras, o que favoreceria a toxicidade da S100B (Donato, 2001).

Sabe-se que o cérebro de pacientes com síndrome de Down, doença de Alzheimer e epilepsia do lobo temporal tem níveis elevados de S100B, sugerindo que a S100B tenha um papel na patogênese de doenças neurodegenerativas. Adicionalmente tem sido relatada uma associação tanto de microglia superexpressando interleucina-1a e astrócitos superexpressando S100B. Desta forma, a S100B secretada é vista como uma citocina, como a

interleucina-1, que promove a sobrevivência neuronal em baixas concentrações, mas é neurotóxica em altos níveis (Donato, 2001).

### **1.2.3 - A origem extracerebral da S100B**

A S100B foi primeiramente descrita no tecido nervoso (Moore, 1965) e por muito tempo considerada específica do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Porém, estudos subseqüentes mostraram que a S100 é amplamente distribuída em vários tipos celulares em tecidos não neurais (Vanstapel e cols, 1986; Donato, 1986; Haimoto e cols, 1987). A S100B já foi descrita em: melanócitos, células foliculo estreladas da hipófise, linfonodos, linfócitos T, células mioepiteliais, células satélites da glândula adrenal, células foliculares da tireóide, células pancreáticas, células dos túbulos renais, células hepáticas, glândula mamária (Moller e cols, 1978; Cocchia & Michetti, 1981; Nakajima e cols, 1980; Stefansson e cols, 1982; Vanstapel e cols, 1986; Zimmer e Van Eldik, 1987). Do mesmo modo, a S100B já foi descrita em diferentes espécies, incluindo rato, camundongo, boi, coelho e porco, bem como em humanos (Kato e cols, 1983).

O papel extracerebral da S100B não é totalmente conhecido, mas Haimoto e colaboradores (1985) mostraram mudanças na localização ultra-estrutural desta proteína no citoplasma de adipócitos maduros após a incubação do tecido com adrenalina, sugerindo um papel para esta proteína como carreador de ácidos graxos no tecido adiposo durante a lipólise (Suzuki e Kato, 1986).

Posteriormente, Cinti e colaboradores (1989) mostraram que a S100B pode ser um bom marcador para diferenciar fibroblastos de pré-adipócitos, o que é importante no estudo da obesidade. Em 2001, Atanassova mostrou que a S100B é expressa em células gordurosas diferenciadas desde o princípio do desenvolvimento e da diferenciação dos adipócitos, sugerindo que a proteína provavelmente esteja envolvida na deposição lipídica e na formação das células gordurosas durante o desenvolvimento embrionário. Ela pode ter um papel importante no processo fisiológico da síntese de triglicerídeos e lipólise nas células do tecido adiposo. Este achado é essencial para o estudo da

biologia dos adipócitos, do depósito de lipídios e da formação da gordura corporal.

Atualmente, muitos autores têm levantado a hipótese de que os níveis séricos de S100B medidos em diversas patologias podem ter origem extracerebral, e não exclusivamente cerebral, especialmente em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (Anderson e cols, 2001; Kleine e cols, 2003), o que recomenda maior cautela quanto ao uso da S100B sérica como marcador de dano do sistema nervoso central.

#### **1.2.4 – A associação dos níveis de S100B com doenças**

A proteína S100B tem sido associada com diversas patologias, como podemos ver na tabela 2.

No estudo do papel da S100B nas diversas patologias, tem-se quantificado seus níveis em diversos tecidos, entre os quais podemos relatar:

1) Tecido cerebral – diversos trabalhos mostraram altos níveis da proteína, bem como do ARNm em tecido cerebral de diversas regiões do cérebro de pacientes com síndrome de Down (Mito e cols, 1993; Marks e cols, 1996; Griffin e cols, 1998).

2) Líquido cefalorraquidiano (LCR) – o LCR foi o primeiro dos vários fluidos no qual o papel da S100B como marcador de dano cerebral ativo foi demonstrado (Michetti e cols, 1979; Persson e cols, 1987). Desde então muitos estudos tem sido conduzidos, inicialmente em adultos e posteriormente em crianças, e ficou estabelecido que altas concentrações da proteína indicam a ocorrência de dano cerebral (Petzold e cols, 2003; Lamers e cols, 2003).

3) Soro – Desde os trabalhos pioneiros em LCR, vários estudos foram realizados para investigar a utilidade da S100B no sangue, tanto no soro quanto no plasma, como marcador de dano cerebral, pois sangue é o fluido mais amplamente utilizado em testes de laboratório. Os estudos são baseados na hipótese de que durante o dano cerebral ativo pelo menos parte da S100B liberada do tecido danificado possa chegar ao sistema circulatório (Persson e cols, 1987). A S100B foi medida basicamente nas patologias mencionadas anteriormente (Wiesmann e cols, 1998; Gazzolo e cols, 1988;



**Tabela 2 – S100B e associação com doenças**

<b>GRUPO</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
Doença de Alzheimer	Mrak & Griffin, 2001 Peskind e cols,2001 Rothermundt e cols,2003
Doenças Psiquiátricas, exemplos: esquizofrenia, depressão, Gilles de La Tourette	Grabe e cols, 2001 Lara e cols, 2001 Van Passel e cols, 2001
Doenças Auto-Imunes, exemplo: Lupus	Portela e cols,2002
Doenças Infecciosas, exemplos: HTLV-1, meningite	Walz e cols, 2000 Gazzollo e cols, 2004a
Esclerose Lateral Amiotrófica	Sussmuth e cols, 2003
Doença de Creutzfeld-Jakob	Nooijen e cols, 1997
Estresse	Margis e cols, 2005 Scaccianoce e cols, 2004
Paralisia Cerebral	Park e cols, 2003
Epilepsia	Griffin e cols,1995
Diagnóstico Pré-Natal, exemplo: síndrome de Down, defeito do tubo neural	Anneren e cols, 1988 Abraha e cols, 1999 Michetti & Gazzolo, 2003

de Kruijk e cols, 2001; Kleine e cols, 2003; Park e cols, 2003; Snyder-Ramos e cols, 2004). Poletaev (1996) mostrou inclusive aumento de anti-S100 no soro de mães de pacientes com paralisia cerebral. Mas mais recentemente, precaução tem sido sugerida, pois outras fontes extracerebrais que liberam S100B tem sido reconhecidas, como veremos posteriormente.

Os níveis de S100B podem ser correlacionados com a idade, apresentando altos níveis ao nascimento, decrescendo consideravelmente na primeira década de vida, e tendo novo pico na adolescência. Da mesma forma, a S100B é correlacionada com o sexo, tendo níveis mais altos em mulheres (Portela e cols, 2002; Gazzolo e cols, 2003a); e com a raça, tendo sido mostrados níveis mais altos de S100B em indivíduos negros e asiáticos, quando comparados com caucasianos (Abdesselam e cols, 2003).

4) Sangue de cordão – é importante monitorar os níveis de S100B no sangue de cordão de gestações de alto risco, como no caso de fetos com retardo de crescimento intra-uterino, nos quais um aumento dos níveis de S100B podem indicar dano cerebral (Gazzolo e cols, 2000; 2002).

5) Urina - a necessidade de se dosar repetidas vezes os níveis de S100B para se monitorar pacientes de alto-risco, principalmente prematuros, para a ocorrência de dano cerebral, fez com que novos procedimentos, menos invasivos, de investigação se desenvolvessem. Desta forma, a urina se mostrou um excelente fluido, visto que a meia vida da S100B é de aproximadamente 120 minutos e ela é eliminada basicamente pelo rim (Rothermundt e cols, 2003; Verity e cols, 2003; Jonsson e cols, 2000).

6) Placenta – Mariononi e colaboradores (2002) demonstraram que os tecidos feto-placentários também contêm S100B, sugerindo que estes tecidos, pelo menos em parte, sejam responsáveis pelo aumento da proteína encontrada na circulação fetal.

7) Líquido amniótico (LA) - a procura de um constituinte do sistema nervoso que pudesse ser usado para detectar patologias cerebrais pré-natais no líquido amniótico não é um dado novo. Alguns estudos já demonstraram a presença de S100B em gestações com espinha bífida, bem como de morte fetal (Sindic e cols, 1984; Anneren e cols, 1988). Estudos mais recentes mostraram níveis de S100B em gestações com síndrome de Down, e sua correlação com idade gestacional (Portela e cols, 2000; Gazzolo e cols, 2001b).

8) Leite materno - em 2003, Gazzolo e colaboradores (2003b) mostraram a presença de S100B no leite humano, salientando que seus níveis são mais altos no leite (principalmente no leite maduro) do que em vários fluidos, como sangue periférico, urina, LCR e LA, adicionando mais uma ferramenta na investigação da função desta proteína.

Considerando as enfermidades do sistema nervoso, a S100B já foi descrita como marcador de dano neural em diversas patologias, dentre as quais podemos salientar:

1) Trauma cerebral: A maioria dos estudos demonstra relação entre a concentração de S100B (sérica e no LCR) na fase aguda da doença e o prognóstico. Nos traumas graves e leves, a S100B claramente fornece um marcador confiável para avaliação da gravidade (Rothermundt e cols, 2003). de Kruijk e colaboradores (2001) mostraram que a S100B é um marcador útil para dano cerebral em trauma médio, e parece estar associada com vômito após o trauma. Lamers e colaboradores (2003) mostraram que a S100B está correlacionada com prognóstico clínico.

2) Tumores: vários trabalhos mostram (Glianem e cols, 2001) a utilidade da S100B como marcador para melanoma, podendo ser um marcador tumoral para novas metástases (Harpio & Einarsson, 2004).

3) Isquemia: Desde que se demonstrou que a S100B estava aumentada no sangue e no LCR após dano cerebral traumático em humanos, muitos estudos têm pesquisado os níveis de S100B em várias condições de isquemia cerebral. Níveis aumentados de S100B no LCR foram correlacionados com o prognóstico e o tamanho do infarto em pacientes de acidente vascular cerebral (Rothermundt e cols, 2003). O pico máximo da elevação de S100B se dá 2-3 dias após o evento. Recentemente, Gazzolo e colaboradores (2001a) relataram níveis aumentados de S100 na urina de recém-nascidos pré-termo, indicando hemorragia intraventricular. Estas medidas ainda requerem comprovação (Rothermundt e cols, 2003).

4) Permeabilidade da barreira hemato encefálica: Kanner e colaboradores (2003) mostraram que a S100B estava correlacionada diretamente com a extensão da disfunção da barreira hemato encefálica, sugerindo que S100B poderia ser um marcador de função desta barreira.

Adicionalmente, Marchi e colaboradores (2004) fizeram uma revisão mostrando que não somente a S100B, mas também a proteína fibrilar glial ácida (GFAP), uma outra proteína astrocítica, podem ser marcadores de dano à barreira.

### **1.3 - A SINDROME DE DOWN**

A síndrome de Down (SD) foi a primeira anomalia cromossômica autossômica a ser definida clinicamente e a primeira a ter comprovada a origem cromossômica –resultado da trissomia do 21–; sendo a causa genética mais comum para o retardo mental (RM). Como tal, tem sido o protótipo das aneuploidias autossômicas humanas e objeto de intensa investigação clínica, citogenética, epidemiológica e molecular (Epstein, 2001).

A SD tem uma frequência ao redor de 1/800 recém nascidos (RN) vivos. Contudo, estes indivíduos representam uma porção relativamente pequena de todos os conceitos com trissomia do 21, já que mais de 80% dos casos morrem intra-útero, o que corresponde de 1-2% de todos os abortos reconhecidos (Hassold & Jacobs, 1984). Desta forma, a trissomia do 21 também é uma importante causa de perda gestacional.

Clinicamente, estes pacientes podem ser diagnosticados ao nascimento ou logo após, pelas características dismórficas que, apesar da variabilidade individual, sempre produzem um fenótipo característico. Estes pacientes apresentam braquicefalia, braquidactilia, mãos largas, pregas epicânticas, clinodactilia do quinto dedo, ponte nasal achatada, hipotonia, frouxidão ligamentar, retardo mental, boca aberta, baixa estatura (Roizen & Patterson, 2003). As principais malformações (MF) associadas são: cardíacas, que são 40 vezes mais frequentes na síndrome de Down (MF atrioventriculares, defeito septal ventricular, permanência do ducto arterioso, tetralogia de Fallot), MF do trato gastro intestinal (atresia do esôfago, atresia duodenal, pâncreas anular), problemas hematológicos (1% dos pacientes com SD desenvolvem leucemia, uma taxa 20 a 50 vezes maior que a população normal) e oncológicos, do sistema imune e anormalidades endócrinas. A expectativa de vida para os pacientes com SD, nos EUA, aumentou de 25 anos, em 1983, para 49 anos em 1997 (Yang e cols, 2002).

As características dismórficas são de importância clínica, mas a principal condição clínica é o RM. O cérebro, como está envolvido na cognição e outras funções mentais altamente integradas, parece o órgão mais vulnerável aos efeitos deletérios da aneuploidia autossômica, independente do cromossomo envolvido. Adicionalmente aos efeitos sobre a inteligência e o controle do tônus muscular, no início e por toda a vida, a trissomia do 21 também é associada com o processo de neurodegeneração durante a vida adulta. Este processo, que é patologicamente semelhante ao da doença de Alzheimer (DA), resulta em mudanças patológicas significativas no cérebro e pode comprometer ainda mais as funções mentais já afetadas.

Os recém-nascidos com síndrome de Down, com exceção da profunda hipotonia, têm comportamento aparentemente normal. O retardo no desenvolvimento geralmente se torna óbvio durante os primeiros meses de vida e os marcos do desenvolvimento geralmente estão atrasados. No início, o atraso é de 2 meses (para rolar na cama, transferir objetos), chegando posteriormente a 1 ou 2 anos para funções que normalmente aparecem aos 2 anos.

A maioria dos erros que levam a trissomia 21 se devem a erros no ovo, pois cerca de 90% dos casos envolvem um cromossomo materno adicional, sendo a não-disjunção o mecanismo mais freqüente. As causas da não-disjunção não são totalmente conhecidas. Alguns estudos mostram uma associação com algum polimorfismo em genes que codificam enzimas do metabolismo do folato (Hobs e cols, 2000; Hassold & Sherman, 2000).

A associação entre idade materna e trissomia do 21 é o fator etiológico mais importante da doença. Entre mulheres com mais de 25 anos, aproximadamente 2% de todas as gestações reconhecidas são trissômicas, mas nas mulheres com mais de 35 anos este valor aumenta para 10% e aos 42 anos este valor está acima de 33% (Hassold & Chiu, 1985).

O estudo do cromossomo 21 (Hattori e cols, 2000) permite reconhecer 225 genes, mas estima-se que o cromossomo 21 tenha 329 genes. Existem grupos de genes que estão envolvidos nas mesmas rotas metabólicas ou sistemas biológicos (Roizen & Patterson, 2003; Hattori e cols, 2000). O cromossomo 21 é o menor dos autossomos e constitui aproximadamente 1-1,5% do genoma haplóide. É um cromossomo acrocêntrico, com dois braços e

o centrômero próximo à extremidade. Os genes do braço curto parecem não ser essenciais para o desenvolvimento. A maior parte do cromossomo 21 é o braço longo, que é essencial para o desenvolvimento normal. Cerca de 41% dos genes não tem função identificada. Estudos mais recentes que realizaram correlação fenótipo-genótipo sugerem que uma sub-região 21q pode conter os genes críticos e desta forma deve ser o foco dos esforços de estudo. Estes estudos levaram a proposição de que existe uma região de cerca de 4Mb entre os marcadores DS1S17 e ETS-2 que, se triplicada, é responsável pelas características clínicas da síndrome de Down. Esta região foi nomeada DSCR (do inglês *Down syndrome critical region*) (Antonarakis, 1991) e é mapeada no cromossomo 21q região 22.3. Alguns genes presentes nesta região e importantes para nosso trabalho são: proteína precursora amilóide (APP), superóxido dismutase (SOD) e S100B (Engidawork & Lubec, 2001).

Estudos de ressonância magnética mostram que indivíduos com SD desenvolvem sinais de envelhecimento cerebral em estágios precoces, com aumento da dilatação dos ventrículos e aumento da atrofia periférica. Estudos funcionais também mostram aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Roizen, 2001). O cérebro dos pacientes com síndrome de Down é caracterizado pela redução de peso, diminuição do número e da profundidade dos sulcos do córtex, heterotipias neuronais e diminuição do número de populações neuronais específicas, como as células ganglionares. A expressão alterada de proteínas, que funcionam desde a sinalização até a organização estrutural celular, pode contribuir ou refletir a disgenesia cerebral na SD. A síndrome de Down está associada com falha no desenvolvimento seguido por um processo de neurodegeneração (Engidawork e cols, 2003).

O diagnóstico da SD pode ser realizado ainda no período pré-natal pela análise cromossômica do líquido amniótico ou da vilosidade coriônica. O diagnóstico pré-natal (DPN) para anomalias cromossômicas foi introduzido originalmente em 1970, e era inicialmente restrito a amniocentese no 2º trimestre. Hoje em dia, existem testes de triagem pré-natal realizados no sangue materno, ainda no 1º trimestre, seguidos de exames confirmatórios. Esforços são concentrados em melhorar a sensibilidade e especificidade da triagem, para diminuir o número de mulheres necessitando de testes invasivos, como a amniocentese e a coleta de vilosidade coriônica. Também se pode

realizar triagem através da medida da espessura da nuca, por ultra-sonografia. Testes com células fetais na circulação materna ainda estão sob estudo (Wald e Hackshaw, 2000).

### **1.3.1 - A síndrome de Down e a S100B**

Em 1990, Allore e colaboradores mostraram que o gene que codifica a S100B está localizado no cromossomo 21 e propuseram que ele seria uma seqüência candidata para as desordens neurológicas na SD. Em 1989, Griffin e colaboradores já haviam demonstrado a expressão aumentada da S100B em tecido cerebral de indivíduos com síndrome de Down, correlacionando este aumento com a elevação concomitante de interleucina-1 (IL-1), fazendo assim a correlação com a doença de Alzheimer. Estudos posteriores mostraram que o número de astrócitos imunorreativos à S100B no cerebelo de indivíduos controles e com SD diminui durante a infância, mas existe um aumento do ARNm e da proteína nesta fase, sugerindo que uma indução desta proteína ocorra em astrócitos individuais neste período, o que é consistente com a visão de que a S100B é um marcador de maturação astrocitária. O aumento da S100B no cerebelo, em relação aos controles é consistente com o efeito de dosagem de gene (Mito e cols, 1993; Marks e cols, 1996).

Em 1998, Griffin e colaboradores mostraram aumento da expressão de S100B em tecido cerebral de pacientes com SD, desde as 17 semanas de gestação até os 68 anos, tendo os astrócitos de indivíduos com síndrome de Down expressado o dobro de S100B em relação aos controles. Foi levantada a hipótese de que a S100B aumentada contribuiria para a patogênese da anormalidade dendrítica e o RM característico da SD. Vários estudos em ratos transgênicos mostraram que o aumento do número de cópias de S100B está associado com anormalidades comportamentais e dificuldades de aprendizado (Friend e cols, 1992; Gerlai e cols, 1993, 1994, 1995).

Com os avanços médicos, houve um aumento na expectativa de vida dos indivíduos com síndrome de Down. Este aumento na expectativa de vida levou ao aparecimento de uma população mais velha de indivíduos com SD e com isto os problemas do envelhecimento precoce e da demência. Estes pacientes desenvolvem uma deterioração mental progressiva, além do RM presente ao nascimento (Wisniewski e cols, 1985).

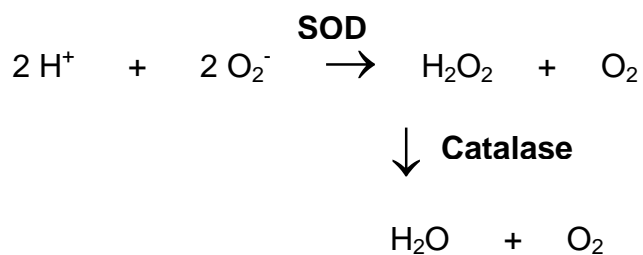
Embora a associação da SD com demência tenha sido notada há mais de 100 anos (Fraser, 1876), somente nos últimos 20 a 25 anos é que se reconheceu que a maioria dos pacientes com síndrome de Down, que vivem além dos 40 anos, apresenta lesões patológicas no cérebro, que parecem imitar a DA (Mann, 1988), sendo a SD, desta forma, considerada um modelo natural para a investigação da patogênese e da progressão da doença de Alzheimer (Cork, 1990). O que se postula atualmente é que uma combinação de fatores contribui para a neuropatologia da doença de Alzheimer na SD, sendo que o aumento da S100B precede em décadas o aparecimento das mudanças típicas da DA. Esta super-expressão da S100B junto com o aumento da  $\beta$ -APP (outra proteína cujo gene também está presente no cromossomo 21) parece contribuir para as mudanças neuropatológicas da DA vistas na síndrome de Down (Griffin e cols, 1998). A hipótese proposta por Royston e colaboradores (1999) sugere que a S100B induz uma super-expressão da  $\beta$ -APP, que levaria a um acúmulo de placas amilóides, que por sua vez levariam a uma reação glial, e esta reação resultaria num posterior aumento de S100B, criando assim um ciclo. Esta proposta coloca o processo glial como tendo um importante papel no acúmulo e na evolução das placas, e assim na evolução da doença.

Fatores adicionais devem estar envolvidos no início da demência na SD como o genótipo APOE, o sexo e a influência do estrógeno (Schupf, 2002; Head & Lott, 2004). Adicionalmente, existem outros fatores a serem considerados, como uma disfunção do sistema imune, intrínseco à SD, que pode ocorrer ou ser exacerbado após os processos neurodegenerativos.

### **1.3.2 - A Síndrome de Down e a atividade da enzima superóxido dismutase**

A enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD-1), cujo gene também está presente no cromossomo 21, é um membro da família de metalo proteínas, amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos, que tem um papel importante na proteção da célula contra derivados tóxicos de oxigênio, convertendo o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é então convertido em água pela catalase ou pela glutathione peroxidase. A SOD é geralmente vista como uma enzima protetora.





Experimentos em modelos de ratos transgênicos com superexpressão de SOD-1 ajudaram a elucidar o papel desta enzima na patogênese do neurodesenvolvimento e nas anormalidades neurodegenerativas da síndrome de Down. No SNC, uma das principais conseqüências da superexpressão de SOD-1 é um dano na estrutura dos terminais sinápticos e na proliferação dos neuritos distróficos. Muitos estudos têm relatado que a SOD-1 está aumentada em indivíduos com SD em cerca de 50% em relação aos controles, tanto em tecido cerebral fetal quanto em fibroblastos. O líquido amniótico de gestações afetadas pela SD também mostra altos níveis da atividade da SOD (Baeteman e cols, 1985), e Ognibene e colaboradores, em 1999, mostraram um aumento da SOD no soro de mães com gestações carregando fetos com síndrome de Down, dados estes confirmados posteriormente por Cuckle & Arbuzova (2000).

Na SD onde há um aumento de SOD sem aumento correspondente de catalase e glutathione peroxidase. O aumento da expressão de SOD pode levar ao aumento de peróxido de hidrogênio, que é tóxico, podendo gerar mais radicais hidroxil.

Os resultados dos estudos com SOD sugerem que o dano oxidativo possa contribuir para a neuropatologia e, por sua vez, para o déficit cognitivo que ocorre na síndrome de Down.

#### **1.4 – OS DEFEITOS DO TUBO NEURAL**

Os defeitos do tubo neural (DTN) correspondem a uma série de anomalias congênitas com alta morbidade e mortalidade. Constituem uma das malformações mais freqüentes na espécie humana, acometendo anualmente

pelo menos 300.000 recém-nascidos no mundo. O desenvolvimento e fechamento do tubo neural são normalmente concluídos ao redor do 28º dia após a concepção, muito antes da maioria das mulheres perceberem que estão grávidas. Aceita-se que os defeitos do fechamento do tubo neural são causados pela falha do tubo neural em se fechar, embora também tenha sido sugerido que um tubo fechado possa reabrir posteriormente em alguns casos. Tem sido proposto que em humanos, assim como em camundongos, o fechamento do tubo neural ocorre de forma simultânea em vários sítios e que os defeitos diferem dependendo do sítio no qual a falha ocorreu. Os defeitos mais comuns são a anencefalia e a espinha bífida. Ambos apresentam elevada mortalidade intra-útero, causando freqüentemente interrupção da gestação. A anencefalia é uma malformação letal devido à falha de fechamento superior do tubo neural. Compreende a ausência da calota craniana e de ambos os hemisférios cerebrais. Os defeitos do tubo neural envolvendo a espinha são segmentares, e são chamados de espinha bífida (Van Allen e cols, 1993). Na espinha bífida oculta, um dos arcos vertebrais não se fechou, mas externamente não há lesão aparente. Em contraste, espinha bífida cística tem um defeito externo visível. A meningocele (10% das espinhas bífidas císticas) geralmente é coberta por uma camada de pele, enquanto a mielomeningocele envolve diretamente e medula espinhal.

Os DTNs são considerados uma das malformações congênitas com maior prevalência em recém nascidos. Dados do Estudo Colaborativo de Malformações Congênitas (ECLAMC), programa que abrange aproximadamente 70 hospitais na América Latina, indicaram para o período de 1982 a 2000 uma prevalência de anencefalia de 6,89 por 10.000 nascimentos, de espinha bífida de 7,96 por 10.000 nascimentos e cefalocelos de 2,06 por 10.000 nascimentos. A prevalência de DTN ao nascimento tem caído nos últimos anos, principalmente devido à difusão de técnicas de diagnóstico pré-natal e à conseqüente interrupção da gestação nos casos positivos.

Os DTNs apresentam etiologia multifatorial, isto é, são causados pela combinação de fatores genéticos e ambientais. O ácido fólico (folato ou vitamina B11), apresenta um papel importante na etiologia dos DTN. Smithells e colaboradores (1976) relataram pela primeira vez deficiência de folato em mulheres que apresentavam filhos com DTN e sugeriram que o uso de ácido

fólico periconcepcional poderia prevenir o risco de recorrência dessas malformações (Smithells e cols, 1980). O folato é um importante substrato para o metabolismo da homocisteína e um distúrbio deste metabolismo na gestante pode desempenhar um papel relevante nos DTNs. Após ter sido relatado que mulheres que tiveram um feto ou recém nascido afetado por DTN tinham níveis aumentados de homocisteína, pesquisadores centraram no estudo do ciclo metabólico no qual a homocisteína sofre remetilação para metionina. Vários genes foram estudados, entre eles o gene que codifica a enzima 5,10-metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR). Mutações neste gene têm sido relacionadas com um aumento do risco para defeitos do tubo neural. Estudos randomizados indicam que pelo menos metade dos casos de DTN podem ser prevenidos se as mulheres consumirem quantidades suficientes de ácido fólico antes da concepção e durante o período inicial da gestação (Botto e cols, 1999).

O diagnóstico pré-natal para DTN inclui a triagem para alfa-fetoproteína no soro materno e ultra-sonografia.

#### **1.4.1 Os defeitos do tubo neural e a S100B**

Em 1980, Sarkar e colaboradores relataram que as células do líquido amniótico de fetos com DTN eram maiores em tamanho, tinham rápida aderência e que deveriam ter um potencial valor diagnóstico. Estudos posteriores em líquido amniótico mostraram aumento nos níveis de S100B no líquido amniótico de gestações com fetos apresentando defeito do tubo neural (Sindic e cols, 1984; Anneren e cols, 1988). No entanto, não há registro de estudo sobre os níveis de S100B no soro destes pacientes.



## **2.OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o conteúdo da proteína S100B em pacientes com síndrome de Down e com defeitos de tubo neural, e estudar suas prováveis fontes extracerebrais.

## **2.2 Objetivos Específicos**

### **2.2.1 S100B em líquido amniótico**

2.2.1.1 Avaliar o potencial da proteína S100B em líquido amniótico como provável marcador para síndrome de Down;

2.2.1.2 Avaliar o potencial da enzima superóxido dismutase em líquido amniótico como marcador pré-natal para síndrome de Down;

### **2.2.2 S100B em soro**

2.2.2.1 Avaliar o papel da S100B em soro de pacientes com síndrome de Down;

2.2.2.2 Avaliar os níveis séricos da proteína S100B em pacientes com defeito de tubo neural;

2.2.2.3 Estudar a ontogenia da proteína S100B nos pacientes com síndrome de Down e em pacientes com defeito do tubo neural, comparando com indivíduos normais;

### **2.2.3 S100 e liberação periférica**

2.2.3.1 Estudar o efeito do jejum sobre os níveis de S100B.

2.2.3.2 Estudar a liberação de S100B induzida por adrenalina em adipócitos dissociados de ratos.

### **3.MANUSCRITO I**

## S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome<sup>☆</sup>

Cristina B. Netto,<sup>a,\*</sup> Ionara R. Siqueira,<sup>a</sup> Cíntia Fochesatto,<sup>a</sup> Luis V. Portela,<sup>a</sup> Maria da Purificação Tavares,<sup>b</sup> Diogo O. Souza,<sup>a</sup> Roberto Giugliani,<sup>c</sup> and Carlos-Alberto Gonçalves<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Universidade do Porto e Centro de Genética Clínica, Porto, Portugal

<sup>c</sup>Depto Genética, IB, UFRGS e Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 27 May 2003; received in revised form 7 August 2003; accepted 27 September 2003

### Abstract

**Objectives:** We measured S100B levels and superoxide dismutase (SOD) activity retrospectively in amniotic fluid samples from pregnancies with normal and Down syndrome (DS) fetuses.

**Design and methods:** Samples from 26 normal and 71 Down syndrome fetuses were studied. S100B protein levels were determined using LIA-mat Sangtec kit, and SOD activity was measured with the RANSOD kit.

**Results:** We observed significantly higher levels of S100B in the Down group (median of 1.24 µg/l) than in the control group (median 0.69 µg/l). S100B concentration in DS samples increased from the 13th to the 18th week of gestation and was positively correlated with gestational age. The amniotic fluid SOD activity in the DS group (16.60 U/mg/prot) was significantly higher than in the normal one (10.78 U/mg/prot).

**Conclusions:** This study indicates that S100B and SOD in amniotic fluid could be used as additional parameters for prenatal screening of trisomy 21 and that S100B values are associated with the gestational age.

© 2003 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

**Keywords:** S100B; Down syndrome; SOD; Chromosome 21; Prenatal diagnosis; Amniotic fluid

### Introduction

Down syndrome (DS) is the most common chromosome abnormality associated with mental retardation, neurological compromise, and many other problems. Knowledge of the pathological mechanism involved in DS is far from complete, but overexpression of genes in chromosome 21 is considered to be the central point for the DS phenotype [1]. The incidence of DS increases with maternal age, and advanced maternal age (over 35 years) is presently a common indication for prenatal diagnosis of this chromosome anomaly [2]. However, as the vast majority of babies are delivered by women <35 years of age, about 75–80%

of all infants born with DS are from young mothers [3], not included in high-risk groups for prenatal diagnosis.

It has therefore been suggested that prenatal screening programs that facilitate the detection of pregnancies at increased risk for DS should be performed during the first and/or second trimester in all pregnant women, irrespective of their age [4,5]. Most of these programs are based on the measurement of biochemical markers in maternal blood, including alpha-fetoprotein, unconjugated estriol, human chorionic gonadotrophin, inhibin-A, pregnancy-associated plasma protein A, and the free beta subunit of hCG, with or without first trimester nuchal translucency measurement [4–6].

Two putative markers, S100B protein and superoxide dismutase 1 (SOD-1), are mapped at the 22.2–22.3 region of the long arm of chromosome 21, a critical region in the development of Down syndrome. S100B is a calcium-binding protein expressed and secreted by astrocytes in both developing and mature nervous system [7]. It has an

<sup>☆</sup> Ethical approval (200258, UFRGS).

\* Corresponding author. Rua Euripedes Monteiro Duarte 10/305, Porto Alegre, RS 90830-250, Brazil. Fax: +55-51-33165540.

E-mail address: [cristina.netto@ufrgs.br](mailto:cristina.netto@ufrgs.br) (C.B. Netto).



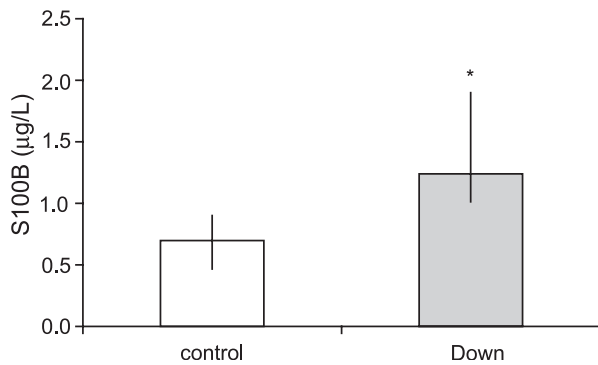


Fig. 1. Concentration of S100B in amniotic fluid for 26 controls and 71 Down syndrome pregnancies. Data are expressed as median and interquartile range. The difference between groups was statistically significant ( $P < 0.001$ ).

intracellular putative role in the modulation of cytoskeleton and cell cycle. Extracellular S100B is possibly involved in survival and neural plasticity [7–9]. SOD is a member of a family of metallo-proteins, widely distributed in mammalian tissue, which plays a major role in protecting the cells against toxic oxygen derivatives, converting superoxide anion into  $H_2O_2$ . Some evidence suggests that these proteins could be involved in the pathology of the neurodegenerative disease associated to DS [10].

In order to verify a possible increase of S100B content and SOD activity and its involvement in prenatal screening, its content on the amniotic fluid was measured retrospectively in samples from pregnancies with normal and Down syndrome fetuses.

## Methods

### Samples

Amniotic fluid samples from 26 normal and 71 Down syndrome fetuses, diagnosed by karyotype analysis of cultured amniotic fluid cells, were included in this study. Amniocentesis was performed between the 12th and the 30th gestational week, as estimated by ultrasound scan. The amniotic fluid supernatant was kept frozen ( $-70^\circ\text{C}$ ) until the protein measurement was performed.

### S100B immunoassay

S100B protein levels were determined using sensitive commercial luminescence assay (BYK-Sangtec). This is a monoclonal two-site immunoassay that uses an antibody covalently bound to isoluminol as a tracer and presents a limit of detection of  $0.02 \mu\text{g/l}$ . After automatic injection of an isoluminol oxidation solution, the luminescence produced was measured in a luminometer (Magic lite). Samples were measured in duplicate, and those with a coefficient of variation  $>7\%$  were repeated. The interassay coefficient of

variation in our sample was  $<9\%$ . This method is specific for the B subunit of the protein, which is known to be the predominant form (80–96%) in the human brain [11,12].

### SOD assay

SOD activity was carried out with the RANSOD kit (Randox, USA). This method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) and superoxide radical (produced in the incubation medium from xanthine oxidase reaction), which is assayed in a spectrophotometer at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD, and specific activity is expressed as units per milligram protein. We assumed that SOD activity found in amniotic fluid is mainly due to SOD-1 activity [13].

*Protein measurement* was performed according to Lowry method [14].

*Statistical analysis* was performed using Kruskal–Wallis one way ANOVA followed by Mann–Whitney two-tailed test when indicated. Data are expressed as median ( $M$ ) and interquartile range (IQ 25/75). Spearman rank correlation coefficient was calculated for S100B levels and gestational age.

## Results

Pregnancies with DS presented significantly higher amniotic fluid S100B levels ( $M=1.24\mu\text{g/l}$ ; IQ = 0.91/1.89) than the group of normal pregnancies ( $M = 0.69 \mu\text{g/l}$ ; IQ = 0.46/0.90) as shown in Fig. 1.

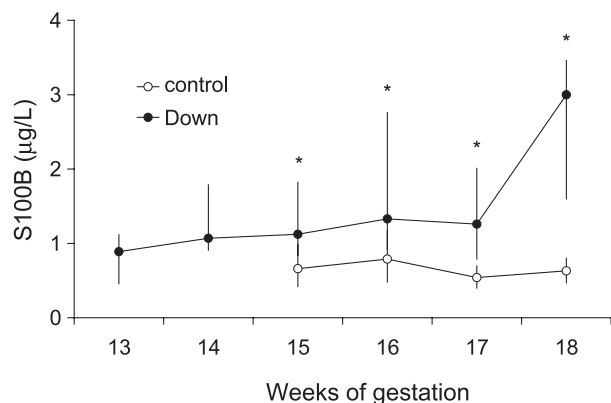


Fig. 2. Association of S100B protein amniotic fluid concentration ( $\mu\text{g/l}$ ) with gestational age (weeks). In the Down syndrome, groups were between 13 and 18 weeks of gestation and control group between 15 and 18 weeks of gestation. Difference between control and Down syndrome cases were observed in all investigated weeks. A significant correlation was found between levels of S100B and gestational age in Down syndrome cases ( $P < 0.003$ ), but not in controls.

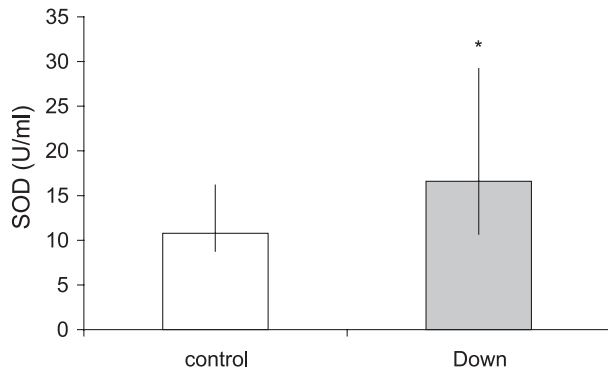


Fig. 3. SOD activity in amniotic fluid for Down syndrome and control cases. Results are expressed as median and interquartile range. The difference between groups was statistically significant ( $P < 0.02$ ).

S100B concentration in the amniotic fluid of DS pregnancies increased progressively from the 13th ( $M=0.88 \mu\text{g/l}$ ;  $\text{IQ} = 0.45/1.12$ ) to the 18th ( $M=2.99 \mu\text{g/l}$ ;  $\text{IQ} = 1.59/3.46$ ) week of gestation and was positively associated with gestational age ( $P < 0.05$ ; Fig. 2). No differences were found in the normal pregnancies. Spearman rank correlation revealed a chi square of 0.3317,  $P < 0.003$ . Correlation analysis in Down group revealed a significant linear regression of S100B and gestational age,  $r = 0.3759$ ,  $F(55) = 10.53$ ,  $P < 0.002$ .

The amniotic fluid SOD activity (median and interquartile range) in the DS group ( $M = 16.60 \text{ U/mg/prot}$ ;  $\text{IQ} = 10.77/29.22$ ) was significantly higher than in the normal one ( $M = 10.78 \text{ U/mg/prot}$ ;  $\text{IQ} = 8.77/16.18$ ) as shown in Fig. 3. There was no association between SOD activity and gestational age ( $P > 0.05$ ).

## Discussion

The aim of screening by peripheral markers is to identify women who should be offered chorionic villous sampling or amniocentesis, as diagnosis of DS requires chromosomal studies [5,15]. Although the conventional chromosome studies offer a highly accurate diagnosis, they are expensive and the analysis procedure may be lengthy, and the PCR-based technique is potentially useful, but they are very expensive and laborious. In due course, a screening method to select patients at risk, who will perform invasive procedures, would be worthwhile.

This study confirmed our preliminary observation of a high immunocent of S100B protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome [16]. In spite of the high S100B immunocent levels in amniotic fluid as well as in fetal blood [17] and fetal brain tissue [18,19], no increment was observed in maternal serum [20]. Abraha et al. assume that S100B protein does not cross the placenta. However, another work suggests that high levels of fetal S100B could enter the maternal circulation [21].

This increment in amniotic fluid S100B levels was associated with weeks of gestation in the Down syndrome group, representing the first observation of high levels of S100B according to gestational age.

The present data provide reference values for S100B in amniotic fluid from the 15th to 18th week of gestation, corroborating the findings of 2nd trimester reported by Gazzolo et al. [22]. However, we did not find any statistical association between S100B and gestational age in normal pregnancy, as did that study. One possible explanation for this discrepancy is that the number of normal samples is one feature that can contribute to understanding this difference. They have found a moderate correlation ( $r=0.21$ ) by the use of a large sample ( $n=322$ ), as compared to our study.

Elevated levels of S100B protein during fetal age seem to be consistent with the hypothesis that as a cytokine, S100B exerts a neurotrophic role [7]. However, high levels of this protein (as observed in Down syndrome and other neurodegenerative diseases) have been associated with neural abnormalities in cytoskeletal and synaptic proteins [23–25].

S100B detected in amniotic fluid is probably from the fetal nervous tissue. Griffin et al. [18] and Mito and Becker [19] had shown that the number of S100B immunoreactivity cells in the hippocampus of DS was almost twice that of the control at 39 weeks of gestation. This means we do have cells producing S100B protein in the fetus, and this high level could lead to an alteration in the differentiation and growing of the neural cells in DS. On the other hand, it is possible that S100B could also be released, at least in part, from other sites in which it is concentrated, such as placental and umbilical tissue [26].

It has been suggested that the extra SOD-1 gene in DS is responsible for some of the manifestations of DS. Theoretically, any imbalance in the relative levels of SOD, glutathione peroxidase and catalase may have deleterious effects on cell membranes [27]. Our results on SOD confirm a previous study that showed an increase of SOD in amniotic fluid and fibroblast cells of DS patients [13], and is in agreement with other studies that demonstrated that SOD is overexpressed by a factor of 1.5 in cells and tissue of DS patients [27] and in maternal serum of women carrying a DS-affected fetuses [10].

Many studies proposed a genetic component that predisposes DS subjects to develop Alzheimer disease. Overexpression of SOD as a result of gene loading is suggested to be responsible for this, because of the damage from oxidative processes in trissomy 21, since SOD plays an important role in scavenging of oxygen radical in cells [28,29]. SOD activity was not correlated to the age of gestation.

In summary, this study shows that S100B and SOD, most probably SOD-1—two proteins possibly involved in neurodegenerative features of Down syndrome—could be additional prenatal markers for this disorder. A strong association of S100B concentration and gestational age in Down syndrome cases may be related to a possible neurotoxic role of the S100B protein in brain development.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, CAPES and FAPERGS, PlanoSul Program.

## References

- [1] Engidawork E, Lubec G. Protein expression in Down syndrome brain. *Amino acids* 2001;21(4):331–61.
- [2] Fergunson-Smith MA, Yates JRW. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 1984;4:5–44.
- [3] Copel JA, Bahado-Sigh RO. Prenatal screening for Down syndrome—A search for the families values. *N Engl J Med* 1999;341:521–2.
- [4] Haddow JE, Palomaki GE, Knight JG, Williams J, Miller AW, Johnson A. Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *N Engl J Med* 1998;338:955–61.
- [5] Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK. Integrated screening for Down syndrome based on tests performed during the first and second trimesters. *N Engl J Med* 1999;341:461–7.
- [6] Wald NJ, Watt HC, Haddow JE, Knight JG. Screening for Down syndrome at 14 weeks of pregnancy. *Prenat Diagn* 1998;18:291–3.
- [7] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:637–68.
- [8] Gonçalves DS, Lenz G, Karl J, Gonçalves CA, Rodnight R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocytes cultures. *NeuroReport* 2000;11:807–9.
- [9] Portela LV, Tort AB, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002;48:950–2.
- [10] Ognibene A, Ciuti R, Tozzi P, Messeri G. Maternal serum superoxide dismutase (SOD): a possible marker for screening Down syndrome affected pregnancies. *Prenat Diagn* 1999;19:1058–60.
- [11] Baudier J, Glasser N, Haglid K, Gerard D. Purification, characterization and ion binding properties of human brain S100B protein. *Biochim Biophys Acta* 1984;790:164–73.
- [12] Jensen R, Marshak DR, Andersen C, Lukas TJ, Watterson DM. Characterization of human brain S100 protein fraction: amino acid sequence of S100B. *J Neurochem* 1985;45:700–5.
- [13] Baetman MA, Mattei MG, Baret A, Gamere M, Mattei JF. Immuno reactive SOD-1 in amniotic fluid cells and fibroblast from trisomy 21 fetus. *Acta Paediatr Scand* 1985;74:697–700.
- [14] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Rosendall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265–75.
- [15] Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, Cinningham GC, Lustig LS, Boyd PA. Reducing the need for amniocentesis in women 35 years of age or older with serum markers for screening. *N Engl J Med* 1994;330:1114–8.
- [16] Portela LC, Tort ABL, Neto EC, Kessler RG, Penchaszadeh V, Souza DO, et al. High immunocent of S100B protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16:590–3.
- [17] Gazzolo D, Vinesi P, Marinoni E, Di Iorio R, Marras M, Lituania M, et al. S100B protein concentrations in cord blood: correlations with gestational age in term and preterm deliveries. *Clin Chem* 2000; 46(7):998–1000.
- [18] Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, Machead V, Perrot LJ, et al. Brain interleukin I and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 (October);86(19):7611–5.
- [19] Mito T, Becker LE. Developmental changes of S100 protein and glial fibrillary acidic protein in the brain in Down syndrome. *Exp Neurol* 1993;120:170–6.
- [20] Abraha HD, Noble PL, Nicolaidis KH, Sherwood RA. Maternal serum S100 protein in normal and Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 1999;19:334–6.
- [21] Poletaev A. Elevated serum immunoreactivity to S-100 protein in healthy mothers and their sick children: possible significance in in-born psycho neuropathology. *Dev Brain Dysfunct* 1996;9:17–21.
- [22] Gazzolo D, Bruschetini M, Corvino V, Oliva R, Sarli R, Lituânia M, et al. S100B protein concentrations in amniotic fluid correlate with gestational age and with cerebral ultrasound scanning results in healthy fetuses. *Clin Chem* 2001;47(5):954–6.
- [23] Whitaker-Azmitia P, Wingate M, Borella A, Gerlai R, Roder J, Azmitia E. Transgenic mice over expressing the neurotrophic factor S-100B show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimers and Downs syndrome. *Brain Res* 1997;776:51–60.
- [24] de la Monte S. Molecular abnormalities of the brain in Down syndrome: relevance to Alzheimer neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* 1999;57:1–19.
- [25] Hu J, Van Eldik LJ. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta* 1996;1313:239–45.
- [26] Marinoni E, Di Iorio R, Gazzolo D, Lucchini C, Michetti F, Corvino V, et al. Ontogenetic localization and distribution of S100B protein in human placental tissues. *Obstet Gynecol* 2002;99(6):1093–9.
- [27] Percy ME, Dalton AJ, Markovic VD, McLachlan DR, Hummel JT, Rusk AC, et al. Red cell superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Down syndrome patients with and without manifestations of Alzheimer disease. *Am J Med Genet* 1990;35:459–67.
- [28] Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit* 2002;8(9):RA210–5.
- [29] Turrens JF. Increased superoxide dismutase and Down syndrome. *Med Hypotheses* 2001;56(6):617–9.

## **4.MANUSCRITO II**

## Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients

Cristina B.O. Netto<sup>a,\*</sup>, Luis V. Portela<sup>a</sup>, Cristina T. Ferreira<sup>b</sup>, Carlos Kieling<sup>b</sup>, Ursula Matte<sup>c</sup>,  
Têmis Felix<sup>c</sup>, Themis Reverbel da Silveira<sup>b</sup>, Diogo O. Souza<sup>a</sup>,  
Carlos-Alberto Gonçalves<sup>a</sup>, Roberto Giugliani<sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Dept. Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Euripedes Monteiro Duarte 10/305, Porto Alegre, RS, 90830-250, Brazil

<sup>b</sup>Dept. de Pediatria e Puericultura, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Dept. Genética, IB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 13 September 2004; received in revised form 6 December 2004; accepted 31 December 2004

Available online 16 February 2005

### Abstract

**Background:** It has been shown that Down syndrome (DS) patients have elevated S100B levels in brain tissue.

**Design:** Measurements of S100B were performed in serum samples from 48 DS patients and 42 ostensibly healthy age-matched controls.

**Results:** We observed higher levels of S100B in the DS group than in the control group. Moreover, serum S100B in DS patients was not age-dependent as it is in normal individuals.

**Conclusion:** The higher levels of S100B in DS patients may reflect a general and persistent increase in the extracellular space and may be associated with neurodegenerative lesions observed in DS patients.

© 2005 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

**Keywords:** S100B; Down syndrome; serum marker

### Introduction

Down syndrome (DS) is the most common genetic cause of mental retardation having an incidence of approximately 1/700 pregnancies. Most cases (about 95%) result from trisomy of human chromosome 21 and overexpression of genes residing in the denominated DS critical region (DSCR), at the 21q22. 2-q22.3 segment, is considered causative of DS. Some of the genes present at the DSCR express proteins commonly associated with neurodegenerative disorders, including APP, SOD-1, and S100B [1].

The S100B protein belongs to the S100 family of calcium binding proteins involved in cell growth and differentiation [2,3]. In the nervous system, this protein is primarily expressed by astrocytes and secreted to play a neurotrophic role on neighboring cells. On the other hand,

micromolar levels of S100B can induce apoptosis in astrocytes and neurons and high extracellular levels of S100B could be involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease [4]. In fact, many studies are consistent with the idea that the chronic overexpression of S100B, seen in DS, may confer increased risk for later development of Alzheimer disease, by promoting  $\beta$ -amyloid plaque formation and progression [5].

Previous studies have demonstrated age-related changes in S100B tissue expression and distribution in the central nervous system in mammals, which may be related to the different roles of this protein in distinct brain regions during the fetal period, adulthood, and aging [2,3].

It has also been shown that DS patients present elevated S100B protein and mRNA in brain tissue at different ages [4,6]. However, there is little information about the extracellular levels of this protein in DS children [7] and its ontogenetic profile. The aim of this study was to investigate whether serum S100B protein concentration in

\* Corresponding author. Fax: +55 51 33165540.

E-mail address: [cristina.netto@ufrgs.br](mailto:cristina.netto@ufrgs.br) (C.B.O. Netto).

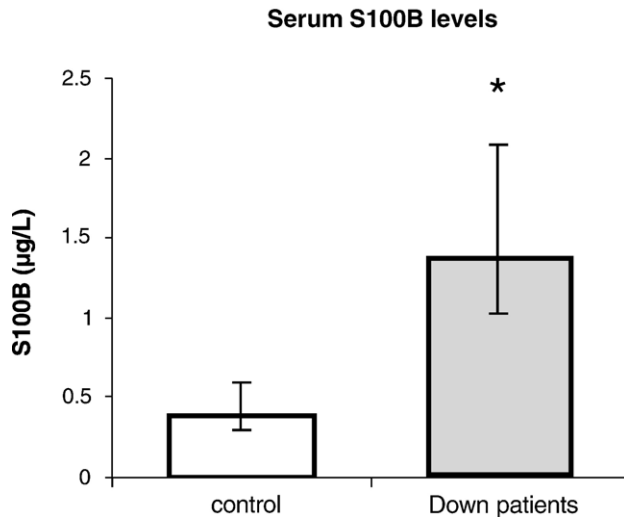


Fig. 1. Concentration of S100B ( $\mu\text{g/L}$ ) in serum for 42 controls and 48 Down syndrome patients. Data are expressed as median and interquartile range. The difference between groups was statistically significant ( $P < 0.0001$ ).

DS children was increased and exhibited an ontogenetic variation, compared to control individuals [8].

## Methods

### Patients

Blood samples were collected from 48 DS patients (12–132 months) and 42 control subjects (6–120 months), undergoing routine clinical and laboratory evaluation. Control subjects had no previous history of neurologic deficits or any serious disorder. All DS patients examined were confirmed to possess the chromosome abnormality (trisomy 21). This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Informed consent was obtained from each patient's family. Patients and controls were matched for sex and age.

### Blood sampling

All blood samples were collected, without anticoagulants, by venipuncture. Serum was obtained by centrifugation at  $3000 \times g$  for 5 min and frozen at  $-70^\circ\text{C}$  until analysis.

### Immunoassay for S100B

Serum S100B protein levels were determined using commercial luminescence assay (BYK-Sangtec), as previously described [8]. Samples were measured in duplicate, and those with a coefficient of variation  $>7\%$  were repeated. The interassay coefficient of variation in our sample was  $<9\%$ . This method is specific for the beta subunit of the protein.

### Statistical analysis

Statistics were performed using Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by Mann–Whitney two-tailed test when indicated. Data are expressed as median and interquartile range (IQ 25/75). Parametric correlation analysis was performed to equate serum S100B content and age.

## Results

Fig. 1 shows that DS patients had significantly higher serum levels of S100B (Median =  $1.354 \mu\text{g/L}$ , IQ =  $1.026/2.086$ ) compared to the control group (Median =  $0.38 \mu\text{g/L}$ , IQ =  $0.30/0.59$ ).

When groups were classified according to age, serum S100B decreases in control over than 4 years old (Median =  $0.37$ , IQ =  $0.29/0.41$ ), as compared to younger ones (Median =  $1.10$ , IQ =  $0.72/1.23$ ). This effect is not seen in DS sub-groups, moreover, DS serum protein levels are higher than both of control sub-groups (Median =  $1.49$ , IQ =  $1.17/2.10$  for less than 4 years old; Median =  $1.26$ , IQ =  $0.92/1.77$  for more than 4 years old).

In agreement with the results obtained by Portela et al. [8], we also found a negative log correlation between serum S100B and age (Fig. 2,  $r = 0.406$  and  $P < 0.0001$ ). However, there was no correlation ( $P > 0.05$ ) between protein levels and age in the DS group.

## Discussion

This study shows that serum S100B in Down syndrome patients is higher than in the ostensibly normal control

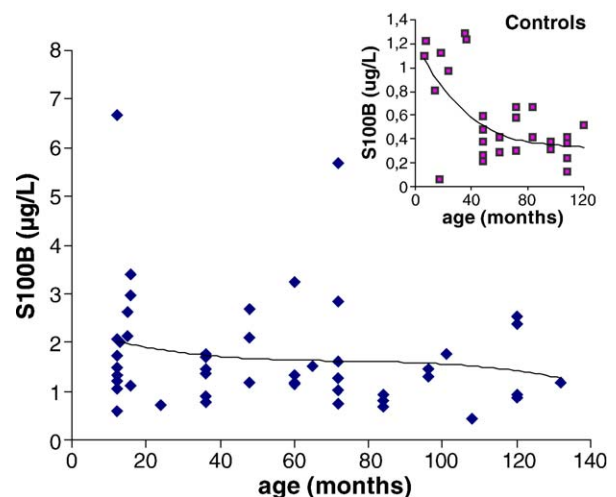


Fig. 2. Correlation of serum S100B protein concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) in Down syndrome patients with age. Insert shows serum S100B in control individuals. A statistically significant negative correlation was observed in the control group ( $r = 0.406$ ;  $P < 0.0001$ ), but not in the Down patients. The fitted curve (solid line) was obtained using a third-degree polynomial regression.

individuals included here; moreover, S100B in DS patients does not appear to be age-dependent as it is in normal individuals. To our knowledge, there has been only one study [7] reporting on S100B in the blood of DS patients, which showed a 50% enhancement of S100B in DS patients older than 10 years. This work is supportive of this notion and extends this observation to a younger population of DS patients.

It has been shown that S100 (most probably S100B) increases in brain tissue during the first three post-natal weeks in rodents [2], a critical period for synaptogenesis. Assuming its putative role in synaptogenesis, a decrease in extracellular levels of S100B with aging would be expected. In fact, it was recently observed an accumulation of S100B in brain tissue accompanied by a negative correlation between S100B content in cerebrospinal fluid in rats between 15 and 90 days [9]. This finding could indicate that a progressively smaller fraction of S100B is released into the cerebrospinal fluid in adult brain, implying reduced release of S100B, an increased adhesiveness of the protein to the brain extracellular matrix, or both. Moreover, it has been shown that serum S100B level in humans is dependent on age [8].

In the present study, individuals were divided into two sub-groups: younger and older than 4 years old. This age was chosen based on a previous study showing a critical change in brain development at this period, as concerns to energetic metabolism and synaptogenesis [10]. Normal control individuals exhibited a negative correlation between age; this effect is not shown for DS patients, which exhibited an elevated and persistent increase of serum S100B.

In summary, our results support and extend previous findings of elevated levels of serum S100B in DS children younger than 10 years. Moreover, our results indicate an ontogenetic profile of serum S100B in DS patients that is different from control children, possibly reflecting a general and more persistent increment of this protein in the extracellular space. These findings suggest that S100B

may have an association with the neurodegenerative lesions commonly observed in DS patients.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, CAPES, and FAPERGS, Plano Sul Program.

### References

- [1] de la Monte S. Molecular abnormalities of the brain in DS: relevance to Alzheimer neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* 1999;57:1–19.
- [2] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Inter J Biochem Cell Biol* 2001;33:637–68.
- [3] Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:97–108.
- [4] Griffin WST, Sheng JG, McKenzie JE, et al. Life-long overexpression of S100B in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 1998;19:401–5.
- [5] Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, et al. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in APPV717F mice. *J Neurochem* 2000;74:295–301.
- [6] Mito T, Becker LE. Developmental changes of S100 protein and glial fibrillary acid protein in the brain in Down syndrome. *Exp Neurol* 1993;120:170–6.
- [7] Kato K, Suzuki F, Kurobe N, et al. Enhancement of S-100 beta protein in blood of patients with Down's syndrome. *J Mol Neurosci* 1990;2:109–13.
- [8] Portela LCV, Tort ABL, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002;49:950–2.
- [9] Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, et al. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid and astrocyte culture in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:373–8.
- [10] Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001 (Aug 15);62:401–5.

## **5.MANUSCRITO III**



## Serum S100B levels in patients with neural tube defects

Cristina B.O. Netto <sup>a,\*</sup>, Luis V. Portela <sup>a</sup>, Têmis M. Félix <sup>b</sup>, Diogo O. Souza <sup>a</sup>,  
Carlos-Alberto Gonçalves <sup>a</sup>, Roberto Giugliani <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Genética, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 18 November 2004; received in revised form 20 July 2005; accepted 20 July 2005

Available online 6 September 2005

### Abstract

**Background:** We investigated the levels of S100B protein in the serum of patients with neural tube defects (NTD), and the ontogenetic variation on this group of patients.

**Methods:** Samples from 24 control individuals and 25 patients with NTD were studied. S100B protein levels were determined using LIA-mat Sangtec kit.

**Results:** We observed no difference between the levels of S100B in NTD patients (median 0.860 µg/l) and control individuals (median 0.580 µg/l). When groups were classified according to age, decreased levels were observed in subjects  $\geq 4$  y compared to the younger ones, on the control group; no significant difference was observed when the same comparison is performed on the group of patients with NTD.

**Conclusions:** This study indicates that the serum concentration of S100B in patients with NTD is similar to that of normal individuals; however, patients with NTD do not show the negative correlation with age which was observed on normal individuals.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** S100B; Neural tube defects; Myelomeningocele; Brain development

### 1. Introduction

S100B is a member of a multigenic family of calcium-modulated proteins involved in cell growth and differentiation. In the nervous system this protein is primarily expressed by astrocytes and secreted by these cells playing a neurotrophic role on neighboring cells [1]. On the other hand, micromolar levels of S100B can induce apoptosis in astrocytes and neurons and high extracellular levels of S100B could be involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease [2].

Serum S100B has been studied and proposed as a general marker of brain injury [2]. In fact, its increase in peripheral blood has been reported during the acute stage of several

neurological diseases (e.g. traumatic brain damage and ischemia), and a positive correlation between S100B level and the severity of brain injury has been found in many studies. Furthermore, the elevation of S100B has also been noted in chronic neurologic conditions such as Down syndrome (DS), dementia and schizophrenia. However, contrary to the elevation of S100B protein in acute cerebral injury, its clinical relevance and the mechanisms underlying its elevation in chronic neurological disease remain uncertain [3].

Previous studies have demonstrated age-related changes in S100B tissue expression and its distribution in the central nervous system in mammals [4,5], suggesting different roles for this protein in distinct brain regions during development [6]. In fact, we observed a negative correlation between age and serum S100B in normal children [7]. More recently, we found increased levels of serum S100B in DS children [8] extending previous reports of elevated levels of the protein and its mRNA in brain tissue [4,9,10]. We also found a

\* Corresponding author. Rua Euripedes Monteiro Duarte 10/305, Porto Alegre, RS, 90830-250, Brazil. Fax: +55 51 33165540.

E-mail address: [cristina.netto@ufrgs.br](mailto:cristina.netto@ufrgs.br) (C.B.O. Netto).

similar ontogenetic profile of serum S100B in DS children [8].

Neural tube defects (NTDs) are among the most common human congenital malformations, affecting 0.6 per 1000 live births in the U.S. NTDs include all congenital anomalies that involve a failure of the neural tube to close during the fourth week of human embryogenesis, with defects occurring at any point along the formation of the spinal cord. Although the diagnosis is easy, NTDs etiology is quite complex and multifactorial, involving both environmental and genetic components. These defects vary in their severity depending on the type and the level of the lesion [11,12].

S100B has been studied in fetal malformations [13,14] and it could be a useful peripheral marker for evaluation of NTD patients. However, there is little information about the extracellular levels of this protein in NTD patients and none about its ontogenetic profile. The aim of this study was to investigate whether serum S100B protein concentration in NTD patients is increased and exhibit an ontogenetic variation as observed in normal individuals.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

Blood samples were collected from 25 NTD patients (6 months to 20 y) and 24 control subjects (6 months to 16 y), who were invited to participate in the study. The control subjects had no previous history of neurologic defects or any serious disorder. All NTD patients were examined and a complete clinical chart was filled. All patients had myelomeningocele, and the defect was surgically corrected in all of them. The patients were matched for sex and age. This study was approved by local Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 2.2. Blood sampling

All blood samples were collected by venipuncture without anticoagulants. Serum was obtained by centrifugation at 3000  $\times$ g for 5 min and was frozen at  $-70$  °C until analysis.

### 2.3. Immunoassay for S100B

Serum S100B protein levels were determined using commercial luminescence assay (BYK-Sangtec) as previously described [15]. This is a monoclonal immunoassay that uses an antibody covalently bound to isoluminol as a tracer and presents a limit of detection of 0.02 ng/ml. After automatic injection of an isoluminol oxidation solution, the luminescence produced was measured in a luminometer (Magic lite). Samples were measured in duplicate, and those with a coefficient of variation  $>7\%$  were repeated. The interassay CV was  $<9\%$ . This method is specific for the  $\beta$  subunit of the protein.

### 2.4. Statistical methodology

Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis 1-way ANOVA followed by Mann–Whitney 2-tailed test when indicated. Data are expressed as median (M) and interquartile range (IQ 25/75). The Spearman correlation coefficient was used to evaluate correlation between serum S100B and age.

## 3. Results

There was no difference in the levels of S100B between the NTD patients (median=0.664 ng/ml; IQ=0.535/0.880) and the control group (median=0.467 ng/ml; IQ=0.285/0.885). However, when groups were classified according to age, serum S100B was increased in the NTD group  $\geq 4$  y (median=0.625, IQ=0.544/0.980), as compared to control children (median=0.395, IQ=0.270/0.550). This difference was not observed in patients  $<4$  y. We found a negative correlation between serum S100B and age in controls (Fig. 1A,  $R^2=0.3514$  and  $p<0.01$ ), however there was no such correlation in the NTD group (Fig. 1B).

## 4. Discussion

This is the first study to show the levels of serum S100B in patients with NTD. We found no difference in the levels of

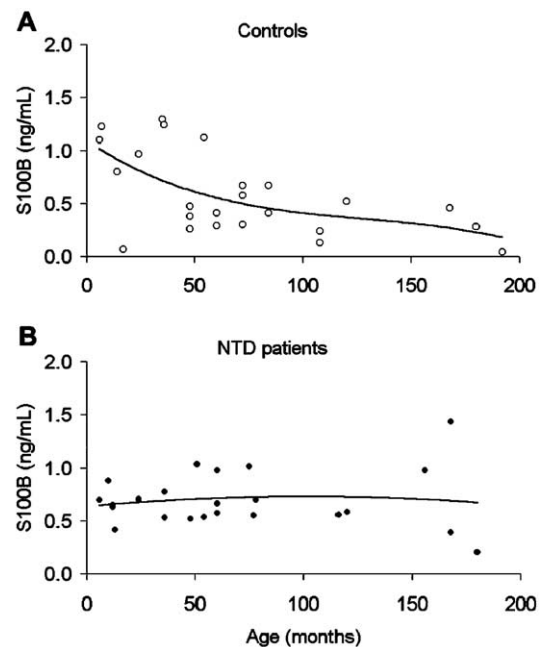


Fig. 1. Correlation of serum S100B protein concentration (ng/ml) in controls with age (A). Graphic (B) shows serum S100B in NTD patients. A significant negative correlation was observed in the control group ( $R^2=0.3514$ ;  $p<0.01$ ), but not in the NTD patients. The fitted curve (solid line) was obtained using a third-degree polynomial regression.

S100B between the NTD patients and the control patients, but a clear difference was observed in the ontogenetic profile of serum S100B from  $\geq 4$  y.

It has been shown that S100 (most probably S100B) increases in brain tissue during the first 3 post-natal weeks in rodents [16,17], a critical period for synaptogenesis. Assuming its putative role in synaptogenesis, it would be expected a decrease in extracellular levels of S100B with development. In fact, we found a negative correlation between S100B content in cerebrospinal fluid in rats between 15 and 90 days [5]. In parallel, it has shown that serum S100B level in humans is dependent on age [7,18].

In the present work we divided individuals into 2 sub-groups:  $\geq 4$  and  $< 4$  y. This age was chosen based on a previous study showing a critical change at this period of brain development, as concerns to energetic metabolism and synaptogenesis [19,20]. Normal individuals exhibited a negative correlation between age, but this profile is not observed in patients with NTD.

Many reports are consistent with the idea that the chronic overexpression of S100B, observed in Down syndrome, may confer increased risk for later development of Alzheimer disease, by promoting  $\beta$ -amyloid plaque formation and progression [10,21]. However, the clinical relevance and mechanisms underlying S100B elevation in chronic neurological disease remains to be clarified [3].

In this sense, the increased concentration of S100B in patients with NTD levels may have some effect on brain plasticity and should be further investigated. Myelomeningocele, also named spina bifida cystica, is one of the most common and devastating birth defects. The designation myelomeningocele includes open defects in which either meninges or neural tissue is exposed. Sindic et al. [13] and Anneren et al. [14] had suggested that the levels of S100B in amniotic fluid of gestations with neural tube defects could be considered a biological sign of cell injury of exencephalic brain.

Our results indicate persistent increased concentrations of this protein even after corrective surgery. Infants with spina bifida who survive corrective surgery are likely to have severe life-long disabilities [22]. Since many studies have suggested a putative role of S100B on neural plasticity [1,6] it would be possible to conceive that these persistent elevated levels of S100B are associated with neurological deficit observed in these patients. However, a correlation between serum S100B and neurological disorders was not established and needs further investigation.

It is important to mention that, in spite of the abundant expression of this protein by astrocytes, extracerebral sources (including adipocytes, marrow cells and chondrocytes) can contribute to serum levels of S100B observed in healthy and DS individuals [1].

In summary, we have shown that the concentrations of serum S100B protein in NTD patients are similar to those in normal individuals; however, patients with NTD do not show the negative correlation with age, which are observed

in controls. This pilot study contributes to the concept of S100B protein as a marker of brain injury and suggests its use in the follow up of NTD patients to evaluate a possible correlation with risks and/or severity of neurological sequels.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Brazilian funds CNPq, CAPES, and FAPERGS. <sup>#</sup>Ethical approval (200258, UFRGS).

## References

- [1] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Inter J Biochem Cell Biol* 2001;33:637–68.
- [2] Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Micros Res Tech* 2003;60:614–32.
- [3] Park Es, Park C, Choi KS, et al. Over-expression of S100B protein in children with cerebral palsy or delayed development. *Brain Res* 2003; 26:190–6.
- [4] Tiu SC, Chan WY, Heizmann CW, et al. Differential expression of S100B and S100A6 in the human fetal and aged cerebral cortex. *Dev Brain Res* 2000;119:159–68.
- [5] Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, et al. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocytes culture in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:373–8.
- [6] Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:97–108.
- [7] Portela LCV, Tort ABL, Schaf DV, et al. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002;49:950–2.
- [8] Netto CBO, Portela LV, Kieling C, et al. Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem* 2005;38:433–5.
- [9] Marks A, O'Hanlon D, Lei M, et al. Accumulation of S100B mRNA and protein in cerebellum during infancy in Down syndrome and control subjects. *Mol Brain Res* 1996;36:343–8.
- [10] Griffin WST, Sheng JG, Mckenzie JE, et al. Life-long overexpression of S100B in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 1998;19:401–5.
- [11] Fimmel R, Gould A, Spiegelstein O. Pathobiology and genetics of neural tube defects. *Epilepsia* 2003;44:1–10.
- [12] Verity C, Firth H, Constant CF. Congenital abnormalities of the central nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:i3–8.
- [13] Sindic CJ, Freund M, Van Regemorter N, et al. S-100 protein in amniotic fluid of anencephalic fetuses. *Prenat Diagn* 1984;4:297–302.
- [14] Anneren G, Esscher T, Larsson L, et al. S100 protein and neuron-specific enolase in amniotic fluid as markers of abdominal wall and neural tube defects in the fetus. *Prenat Diagn* 1988;8:323–8.
- [15] Netto CBO, Siqueira IR, Fochesatto C, et al. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem* 2004;37:134–7.
- [16] Cicero TJ, Ferrendelli JA, Suntzeff V, Moore BW. Regional changes in CNS levels of the S-100 and 14-3-2 proteins during development and aging of the mouse. *J Neurochem* 1972;19:2119–25.
- [17] Haglid KG, Hansson HA, Ronnback L. S-100 in the central nervous system of rat, rabbit and guinea pig during postnatal development. *Brain Res* 1977;123:331–45.
- [18] Gazzolo D, Michetti F, Bruschetti M, et al. Padiatric concentration of S100B protein in blood age- and sex-related changes. *Clin Chem* 2003;49:967–70.

- [19] Chugani HT. A critical period of brain development: studies of cerebral glucose utilization with PET. *Prev Med* 1998;27:184–8.
- [20] Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001;62:401–5.
- [21] Sheng JG, Mrak RE, Bales KR, et al. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in APPV717F mice. *J Neurochem* 2000;74:295–301.
- [22] Coop AJ. The neural tube. In: Thorogood P, editor. *Embryos, genes and birth defects*. Chichester, England: John Wiley; 1997. p. 133–52.

## **6.MANUSCRITO IV**

BRIEF REPORT

Serum S100B Protein Is Increased in Fasting Rats

Cristina B.O. Netto,<sup>a,d</sup> Sabrina Conte,<sup>a</sup> Marina C. Leite,<sup>a</sup> Caroline Pires,<sup>a</sup> Tiago L. Martins,<sup>b</sup> Penélope Vidal,<sup>b</sup> Mara S. Benfato,<sup>b</sup> Roberto Giugliani,<sup>c,d</sup> and Carlos-Alberto Gonçalves<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dept. Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, <sup>b</sup>Dept. Biofísica and <sup>c</sup>Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Brazil  
<sup>d</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Received for publication August 25, 2005; accepted November 16, 2005 (ARCMED-D-05-00337).

**Background.** S100B is a calcium-binding protein expressed and secreted by astrocytes; serum and cerebrospinal fluid (CSF) S100B elevation has been proposed as an index of brain damage. However, other tissues are shown to produce this protein and the clinical significance of serum S100B elevation has been discussed.

**Methods.** We investigated the levels of serum and CSF S100B in fasting Wistar rats. Animals were divided into two groups, control and fasting for 48 h, and S100B levels in serum and CSF were determined by ELISA. S100B secretion in dissociated epididymal fat cells was investigated in the presence of epinephrine.

**Results.** We observed a significant >2-fold increase of S100B levels in serum of fasting rats, without changes in its CSF content. Moreover, we demonstrated *in vitro* epinephrine stimulated S100B release from fat cells.

**Conclusions.** Present results reinforce that extracerebral sources of S100B, particularly adipocytes, contribute to its serum levels and support the idea that caution is needed when interpreting serum S100B increase as a clinical marker of brain damage. © 2006 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Adipocytes, Epinephrine, Fasting, S100B, Brain damage marker.

Introduction

S100B is a calcium-binding protein expressed by astrocytes in both developing and mature nervous system (1). It was initially described as a neuron-specific protein (2), but subsequent characterization revealed that S100B in the central nervous system is mainly localized in glial cells (3). Moreover, it was also found among various cells in non-neural tissues (4–6), as adipocytes (7), chondrocytes (8) and melanoma cells (9).

Many intracellular targets of S100B have been identified, particularly in astrocytes (see Reference 10 for a review); interestingly, astrocytes secrete S100B and many extracellular activities of this protein have been reported.

High extracellular levels of this protein play a toxic role in both neuron and glial cells; consequently, it has been proposed that serum and cerebrospinal fluid (CSF) elevations of S100B are indicative of brain damage (11). However, the clinical significance of elevated S100B activity has not been thoroughly discussed, particularly in respect to the extracellular sources of serum S100B.

In fact, extracerebral sources have been shown to contribute to the elevated levels of this protein in serum after cardiac surgery and multitrauma patients (12). It is important to mention that S100B has been shown to be of use in staging malignant melanoma, establishing prognosis, evaluating treatment success and predicting relapse (13). However, in a different manner from astrocytes, melanoma cells appear to release S100B only after necrosis (14).

Adipose tissue produces S100B in comparable quantities to those found in the central nervous tissue (6–8), and the protein secretion is regulated by catecholamines (15–16). Although the biological significance of extracellular

Address reprint requests to: Carlos-Alberto Gonçalves, Instituto de Ciências Básicas da Saúde–Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600-anexo, Porto Alegre, 90035-003, Brazil; E-mail: casg@ufrgs.br

S100B from adipose tissue is still unclear, it is likely that this tissue might be an important source of serum S100B in situations related, or not, with brain damage (12,17). In the present work we investigate the levels of serum and CSF in fasting adults rats.

## Materials and Methods

### Animals

Thirty male 60-day-old Wistar rats from the local breeding colony were divided into two groups: C, control rats that were regularly fed and F, rats that were maintained fasting for 48 h before experiment. All animals received water ad libitum. All procedures with animals were in accordance with the NIH guidelines (U.S.) for the care and use of laboratory animals and were approved by local authorities.

### CSF and Serum Samples

Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight) and positioned in a stereotaxic apparatus. Cerebrospinal fluid was obtained by cisterna magna puncture using a 0.33-mm diameter needle that was inserted no more than 1.5 mm and a maximum volume of 30  $\mu$ L was collected during a 3-min period to minimize risk of brainstem damage. Rats were then removed from the stereotaxic apparatus and placed in a flat place; whole blood was obtained from intracardiac puncture using a 0.37-mm diameter needle that was inserted in the intercostal space above the sternum. Serum was separated by centrifugation at  $3000 \times g$  for 5 min. CSF and serum samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### Quantification of S100B

S100B content in CSF and serum were measured by ELISA, as previously described (18). Briefly, 50  $\mu$ L of sample plus 50  $\mu$ L of barbital buffer were incubated for 3 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal antibody anti-S100B (SH-B; Sigma, St. Louis, MO). Peroxidase-conjugated anti-S100B (DAKO, Carpinteria, CA) was then incubated for 1 h. Color reaction with O-phenylenediamine was measured at 492 nm.

### S100B Secretion in White Fat Preparations

Epididymal fat pads were dissected out, incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) containing collagenase, and mechanically dissociated (16). Cell suspension was diluted in DMEM (pH 7.6) supplemented with 8.4 mM HEPES/24 mM  $\text{NaHCO}_3$  and maintained in a  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 h in presence of 10  $\mu$ M epinephrine or absence (control). Samples were collected for S100B measurement immediately (at 0 h) and 1 h afterwards.

### Statistical Analysis

Statistics were performed using SPSS 11.0 running on a personal computer. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error and compared by independent Student's t-test; values of  $p < 0.05$  were considered significant.

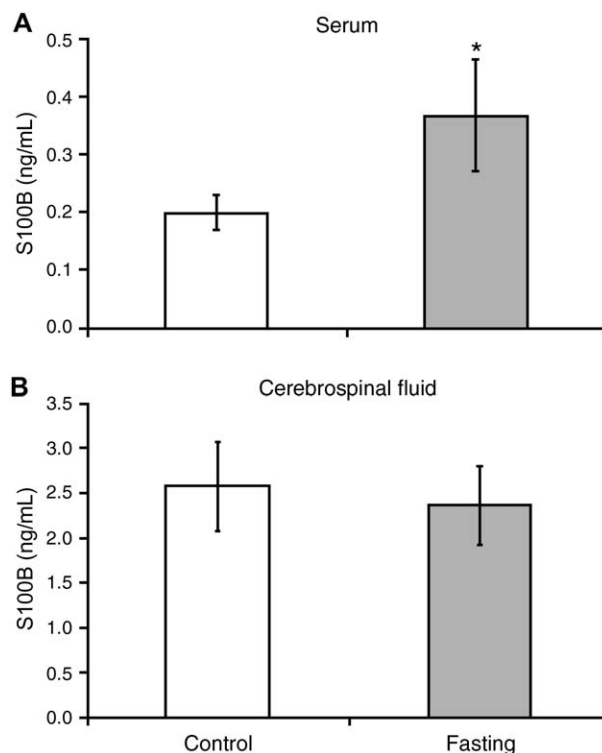
## Results

A significant increase on S100B levels was observed in serum ( $0.37 \text{ ng/mL} \pm 0.10$ ) of fasting rats (Figure 1A) when compared to control animals ( $0.20 \text{ ng/mL} \pm 0.03$ ); this change was not seen in the cerebrospinal fluid (Figure 1B).

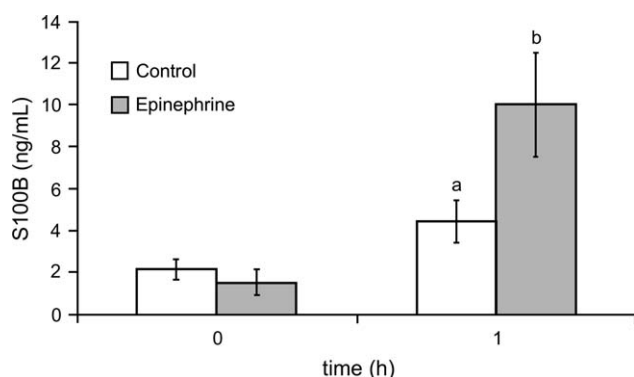
Dissociated fat cells from rat epididymis after 1 h of incubation presented higher levels of S100B in the medium and this increment was significantly higher in the presence of epinephrine (Figure 2). Measurement of extracellular S100B was referred to as "secretion" because no parallel increase of LDH in the medium was observed (data not shown).

## Discussion

Present results show that rats submitted to 48 h fasting have higher serum levels of S100B when compared to control



**Figure 1.** Serum and cerebrospinal fluid (CSF) S100B levels in fasting animals. (A) Serum content of S100B protein (ng/mL) controls ( $n = 15$ ) and fasting animals ( $n = 15$ ) for 48 h. (B) CSF S100B controls and fasting animals. S100B was measured by ELISA. Data are expressed as mean and standard error. \*Difference between groups was statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Immunocontent of S100B in extracellular medium of dissociated adipocytes. Dissociated fat cells from rat epididymis after 1 h of incubation in DMEM 'secreted' S100B compared to time "0" (<sup>a</sup> $p < 0.05$ ) and the secretion in the presence of 10  $\mu$ M epinephrine was significantly higher than basal at 1 h (<sup>b</sup> $p < 0.05$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error from two different experiments performed in triplicate.

animals. Lipid mobilization from adipose tissue has occurred in this period, because rat metabolism is able to adapt to such a challenging situation. Considering these animals do not bear any central nervous system lesion and that levels of CSF S100B were not modified, we assume the serum protein measured came from extracerebral sources, particularly adipocytes.

Supporting this finding and confirming previous results (15), we observed that S100B secretion in fat cell preparation is induced by epinephrine. Previous studies have suggested that S100B in adipocytes might serve as a carrier protein for free fatty acids and that it may be released into the blood under conditions when lipolytic activity is enhanced (5,19). Moreover, these authors suggested that S100B protein may play a role in the process of adipocyte differentiation, as well as in functions in differentiated adipocytes (20).

We did not find any change in CSF S100B in fasting rats. However, it is important to mention that rats fed a ketogenic diet for 6–8 weeks showed low levels of CSF S100B (21), and that this reduction could be mediated by ketone bodies, because a previous work observed a decrease in extracellular levels of S100B in rat cultures treated with  $\beta$ -hydroxybutyrate (22).

The presence of high levels of S100B protein in adipocytes and the selective response of adipose S100B protein to catecholamines suggest the participation of this protein in cellular function(s) peculiar to adipocytes. Since leptin discovery, adipose tissue has been characterized as an endocrine organ (23). In fact, this tissue is now known to express and to secrete a variety of bioactive polypeptides, called adipokines, acting both at local and systemic levels (see Reference 24 for a review); S100B from adipose tissue has enough characteristics to be considered as an adipokine.

In addition, reports on cardiac surgical patients suggest that the sources of serum S100B elevation seen after

cardiac operation are mainly extracerebral (12,25,26), and that this protein may not be a specific marker of brain injury, as earlier suggested. Also, studies on patients with multi-organ dysfunction or with severe head injury show that S100B may be released from non-nervous tissues (27).

Serum S100B increment in humans during physical activity (17,28) reinforces the peripheral origin of this protein during exercise, possibly associated with lipolysis induced by adrenergic stimulation. In addition, Scaccianoce et al. (29) showed a correlation between restraint stress and circulating levels of S100B. Present results reinforce the idea that extracerebral sources, particularly adipocytes, contribute to serum S100B levels.

In summary, we presented data here that show an increase of serum S100B not accompanied by changes in CSF S100B in 48-h fasting rats. Moreover, we confirmed the finding that *in vitro* S100B secretion in adipocytes is induced by epinephrine, and we suggest that this protein might be considered an adipokine, released during exercise and fasting. Together these results confirm the importance of adipose tissue as a source of extracellular S100B and emphasize that caution is needed when interpreting results of serum S100B as a clinical marker of brain damage.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

#### References

1. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:97–108.
2. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;19:739–744.
3. Boyes BE, Kim SU, Lee V, Sung SC. Immunohistochemical co-localization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Neuroscience* 1986;17:857–865.
4. Vanstapel MJ, Gatter KC, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Desmet VD. New sites of human S100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 1986;85:160–168.
5. Haimoto H, Hosada S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest* 1987;57:489–498.
6. Zimmer DB, Song W, Zimmer WE. Isolation of rat S100 $\alpha$  cDNA and distribution of its mRNA in rat tissues. *Brain Res Bull* 1991;27:157–162.
7. Michetti F, Dell'anna E, Tiberio G, Cocchia D. Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res* 1983;262:352–356.
8. Stenfansson K, Wollmann RL, Moore BW, Arnason BGW. S100 protein in human chondrocytes. *Nature* 1982;295:63–64.
9. Cocchia D, Michetti F, Donato R. Immunochemical and immunocytochemical localization of S100 antigen in normal skin. *Nature* 1981;294:85–87.
10. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:637–668.



11. Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003;60:614–632.
12. Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Liska J, Settergren G, Vaage J. Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources. *Ann Thoracic Surg* 2001;71:1512–1517.
13. Harpio R, Einarsson R. S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 2004;37:512–518.
14. Ghanem G, Loir B, Morandini R, Sales F, Lienard D, Eggemont A, et al. On the release and half-life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer* 2001;9:586–590.
15. Suzuki F, Kato K, Nakajima T. Enhancement of adipose S-100 protein release by catecholamines. *J Biochem* 1983;94:1707–1710.
16. Suzuki F, Kato K, Nakajima T. Hormonal regulation of adipose S-100 protein release. *J Neurochem* 1984;43:1336–1341.
17. Dietrich MO, Tort AB, Farina M, Gonçalves CA, Souza DO, Portela LV. Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can J Appl Physiol* 2003;28:710–716.
18. Tramontina F, Conte S, Gonçalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, et al. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocytes culture in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:373–378.
19. Haimoto HL, Kato K, Suzuki F, Nagura H. The ultrastructural changes of S100 protein localization during lipolysis in adipocytes. *Am J Pathol* 1985;121:185–191.
20. Kato K, Suzuki F, Ogasawara N. Induction of S100 protein in 3T3-L1 cells during differentiation to adipocytes and its liberating by lipolytic hormones. *Eur J Biochem* 1988;177:461–466.
21. Ziegler D, Oliveira DL, Pires C, Ribeiro L, Leite M, Mendez A, et al. Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neurosci Res* 2004;50:375–379.
22. Leite M, Frizzo JK, Nardin P, Almeida LMV, Tramontina F, Gottfried C, et al.  $\beta$ -hydroxy-butyrate alters the extracellular content of S100B in astrocyte cultures. *Brain Res Bull* 2004;64:139–143.
23. Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425–432.
24. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metabol* 2004;89:2548–2556.
25. Jonsson H, Johnsson P, Alling C, Westaby S, Blomquist S. S100beta after coronary artery surgery: release pattern, source of contaminations, and relation to neuropsychological outcome. *Ann Thoracic Surg* 1999;68:2202–2208.
26. Jonsson H. S100B and cardiac surgery: possibilities and limitations. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:151–157.
27. Kleine TO, Benes L, Zofel P. Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Res Bull* 2003;61:265–279.
28. Hasselblatt M, Mooren FC, von Ahsen N, Keyvani K, Fromme A, Schwarze-Eicker K, et al. Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology* 2004;62:1634–1636.
29. Scaccianoce S, Bianco PD, Pannitteri G, Passarelli F. Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. *Brain Res* 2004;1004:208–211.

## **7.DISSCUSSÃO**

## 7.1 - SINDROME DE DOWN e S100B

Os estudos recentes em síndrome de Down têm se concentrado mais intensamente nas áreas da triagem pré-natal, desenvolvimento da linguagem, diagnóstico e no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Roizen, 2001). Neste trabalho, investigamos dois destes importantes aspectos do estudo desta patologia: a triagem pré-natal e os aspectos comuns com a doença de Alzheimer.

É conhecido que a incidência da SD aumenta em gestações de mulheres a partir dos 35 anos, como também estamos cientes de que a maioria das gestações ocorrem em mulheres com menos de 35 anos, onde se concentram cerca de 75-80% de todos os casos de SD. Todos estes dados têm motivado muitos estudos a respeito de novos marcadores para a triagem de mulheres em risco para a SD. Assim, estudamos dois marcadores em líquido amniótico de gestações com fetos portadores de SD, a proteína S100B e a enzima superóxido dismutase.

No MANUSCRITO I estudamos gestações com síndrome de Down e relatamos uma associação dos níveis de S100B no líquido amniótico com a idade gestacional; este é o primeiro relato publicado sobre tal associação. Os valores de referência para S100B para as idades gestacionais entre 15 e 18 semanas corroboram os achados de segundo trimestre de Gazzolo e colaboradores (2001b). Entretanto, não encontramos nenhuma relação entre os níveis de S100B e idade gestacional nas gestações normais, diferente do encontrado naquele mesmo trabalho. Uma possível explicação para esta diferença pode ser o número de amostras controle estudadas. Eles encontraram uma correlação moderada ( $r=0.21$ ) pelo uso de uma amostra numerosa ( $n=322$ ); nosso estudo possui 26 sujeitos controle. Ainda, confirmamos os dados prévios do nosso grupo, demonstrando a presença de altos níveis de S100B no líquido amniótico de gestações com SD.

Níveis elevados de S100B durante a vida fetal parecem ser consistentes com a hipótese de que, como uma citocina, a S100B exerça um papel neurotrófico (Donato, 2001). Entretanto, altos níveis desta proteína, como observado na síndrome de Down e em outras doenças neurodegenerativas, têm sido associados com anormalidades em proteínas sinápticas e do

citoesqueleto (Hu & Van Eldik, 1996; Whitaker-Azmitia e cols, 1997; de la Monte, 1999).

A S100B detectada no LA é originária provavelmente, do sistema nervoso do feto. Mito & Becker (1993) e Griffin e colaboradores (1989) mostraram que o número de células S100B reativas no hipocampo de pacientes com SD era praticamente o dobro do que o controle em fetos com 39 semanas de gestação. Isto pode significar que há células produzindo S100B no feto e que estes altos níveis podem levar a uma alteração na diferenciação e no crescimento das células neurais na SD. Por outro lado, é possível que a S100B seja liberada, pelo menos em parte, de outros sítios, como a placenta e tecido umbilical.

Estudos prévios demonstraram mudanças nos níveis de expressão e distribuição de S100B no sistema nervoso central correlacionados com a idade (Tiu e cols, 2000; Tramontina e cols, 2002), o que pode estar relacionado a diferentes papéis desta proteína em distintas regiões cerebrais durante o desenvolvimento fetal, a vida adulta e o envelhecimento (Van Eldik e Wainwright, 2003).

Alguns trabalhos realizados em síndrome de Down mostraram níveis elevados da proteína S100B e de seu ARNm, em tecido cerebral de pacientes com diferentes idades (Marks e cols, 1996; Griffin e cols, 1998; Tiu e cols, 2000). Kato e colaboradores (1990) mostraram aumento nos níveis extracelulares desta proteína em pacientes com síndrome de Down, mas nenhum dado existia a respeito do seu perfil ontogenético.

Nos dados apresentados no MANUSCRITO II confirmamos que os níveis da proteína S100B em soro de pacientes com SD estão aumentados cerca de 50%, quando comparados a indivíduos normais. Realizamos um estudo de correlação entre S100B e idade, dividindo os indivíduos em dois grupos: menores de 4 anos e maiores de 4 anos. Esta idade foi escolhida baseado num estudo prévio que mostrou uma mudança crítica do desenvolvimento cerebral neste período, no que concerne o metabolismo energético e a sinaptogênese (Chugani e cols, 1998; Ikonomidou e cols, 2001). Indivíduos normais exibem uma correlação negativa com a idade, mas nos pacientes com SD esta associação não é vista.

Os níveis mais elevados e persistentes de S100B nos pacientes com SD estão presentes desde o período fetal, possivelmente devido a um efeito de dosagem do gene no início da vida fetal. Isto contribui para a idéia geral de que a presença da S100B precede o aparecimento da placa amilóide na doença de Alzheimer. De fato, está relatado na literatura que a grande maioria dos pacientes com síndrome de Down irão desenvolver doença de Alzheimer (Mann, 1988; Griffin e cols, 1998). A síndrome de Down provavelmente representa o melhor modelo natural pré-programado da neuropatologia da doença de Alzheimer. De acordo com Griffin e colaboradores (1998) os níveis elevados de S100B podem disparar uma super-expressão neuronal de APP (também mapeado na região DSCR), conseqüentemente gerando o peptídeo  $\beta$ -amilóide. Este peptídeo pode então induzir a liberação de citocinas, incluindo a S100B nos astrócitos, bem como a gliose reativa.

Outros achados encontrados em tecido cerebral de pacientes com síndrome de Down e doença de Alzheimer atribuídas a S100B, também observadas em ratos transgênicos que superexpressam S100B, incluem alterações do citoesqueleto, extensão neurítica anômala e morte neuronal (Sheng e cols, 2000).

#### 7.1.1 - SINDROME DE DOWN e SOD

Muitos estudos têm proposto um componente genético que predispõe os indivíduos com síndrome de Down a desenvolver a doença de Alzheimer. A superexpressão da SOD como um resultado da carga genética é sugerida como a responsável por esta associação com a doença de Alzheimer, devido ao dano dos processos oxidativos na trissomia do 21, pois a SOD tem um papel importante na remoção dos radicais livres (Turrens, 2001; Noor e cols, 2002).

Tem sido sugerido que uma cópia extra do gene da enzima superóxido dismutase-1 na síndrome de Down seja responsável por algumas das manifestações clínicas da doença. Teoricamente, qualquer desequilíbrio nos níveis relativos de SOD, glutatona peroxidase e catalase (duas outras enzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo) podem ter efeitos deletérios na membrana celular (Percy e cols, 1990). Nossos resultados da atividade da SOD (MANUSCRITO I) confirmam os achados de estudo prévio que mostrou

aumento de atividade no líquido amniótico e em fibroblastos de pacientes com síndrome de Down (Baetman e cols, 1985), bem como estão de acordo com outros relatos que demonstram superexpressão da enzima de cerca de 1,5 vezes em células e tecidos de pacientes com SD (Percy e cols, 1990) e soro de mães com fetos com síndrome de Down (Ognibene e cols, 1999). Curiosamente, não encontramos qualquer associação em relação a atividade da SOD com a idade gestacional.

## **7.2 - S100B EM PACIENTES COM DEFEITO DO TUBO NEURAL**

Como visto no estudo da S100B na síndrome de Down, esta proteína tem sido amplamente estudada como marcador de diversas doenças, bem como de injúria do sistema nervoso central. Tentando aprofundar nossa compreensão sobre seu papel neste contexto, estudamos os níveis da S100B em pacientes com defeito de tubo neural.

Descrevemos, originalmente, os níveis séricos de S100B em pacientes com defeito do tubo neural. Como apresentado no MANUSCRITO III, não encontramos diferença nos níveis de S100B entre os pacientes e os indivíduos controle.

Assim como no MANUSCRITO II, dividimos os indivíduos em dois subgrupos: menores e maiores que 4 anos. Como já havia sido demonstrado, os indivíduos normais apresentaram uma correlação negativa com a idade, mas este efeito não foi observado em pacientes com defeito de tubo neural.

Muitos estudos são consistentes com a idéia de que a expressão crônica de S100B, como a observada na síndrome de Down, pode aumentar o risco de posterior desenvolvimento de doença de Alzheimer pela promoção do desenvolvimento da placa amilóide (Griffin e cols, 1998; Sheng e cols, 2000).

A exposição dos pacientes com defeito do tubo neural a níveis aumentados de S100B pode ter algum efeito e deve ser mais investigada. Sindic e colaboradores (1984) em seu estudo dos níveis de S100B em líquido amniótico de gestações com fetos anencefálicos sugeriu que estes níveis podem ser considerados um sinal biológico de injúria celular do cérebro exencefálico.

Os resultados apresentados no MANUSCRITO III indicam a persistência de níveis elevados desta proteína após a correção cirúrgica. Muitos autores têm sugerido um papel da S100B na plasticidade neural (Donato e cols, 2001; Van Eldik e Wainwright, 2003), logo seria possível sugerir que os níveis persistentes de S100B estão associados com o déficit neurológico observado nestes pacientes.

### **7.3 – FONTE EXTRACEREBRAL DE S100B**

Como mencionado na introdução desta tese, a S100B foi descrita inicialmente como específica de neurônio (Moore, 1965), mas sua posterior caracterização revelou que esta proteína é localizada principalmente nas células gliais (Boyes e cols, 1986). Ainda, sua presença foi evidenciada em várias células de tecidos não nervosos (Vanstapel e cols, 1986; Haimoto e cols, 1987).

Inicialmente o nível de S100B no tecido adiposo foi comparado ao do cérebro (Suzuki e cols, 1982; Micheti e cols, 1983; Zimmer e cols, 1991) e, embora o significado biológico da proteína neste tecido periférico não seja conhecido, o perfil do desenvolvimento da S100B em ratos sugere que este possa ser controlado por hormônios e/ou pela dieta (Kato e cols, 1983). Normalmente os níveis de S100B não são detectáveis no soro humano, entretanto níveis séricos elevados têm sido encontrados em várias condições neuropatológicas e os investigadores acreditam que esta elevação é causada por dano no SNC (Kanner e cols, 2003).

Os resultados do MANUSCRITO IV demonstram que ratos submetidos a 48 horas de jejum apresentam níveis mais altos de S100B quando comparados com animais controle e que esta diferença não é observada no LCR.

Suzuki e Kato (1986) sugeriram que esta proteína possa participar no processo de diferenciação dos adipócitos além de exercer alguma função no adipócito diferenciado. A presença de altos níveis de S100B nos adipócitos e a sua resposta seletiva às catecolaminas sugere uma participação desta proteína numa função celular peculiar ao tecido adiposo. Dados de Suzuki e colaboradores (1984) e estudos preliminares em nosso laboratório, indicam que este efeito possa ser mediado por AMPc.

Estudos em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sugerem que a fonte da S100B sérica presente após tal procedimento é basicamente extracerebral, o que enfraquece seu papel como marcador de injúria cerebral, como sugerido anteriormente (Anderson e cols, 2001; Jonsson e cols, 1999, 2003). Ainda, estudo em pacientes de UTI com disfunção em múltiplos órgãos ou pacientes com trauma encefálico sugerem que a S100B possa ser liberada de fonte extracerebral (Kleine e cols, 2003). Trabalhos recentes medindo os níveis de S100B durante a atividade física mostraram altos níveis de S100B, corroborando uma origem periférica (Dietrich e cols, 2003; Hasselblatt e cols, 2004). Scaccianoce e colaboradores (2004) também demonstraram uma correlação entre S100B e estresse, sugerindo cautela ao se usar esta proteína como marcador de lesão neural.

Desde a descoberta da leptina, o tecido adiposo tem sido caracterizado como um órgão endócrino (Zhang e cols, 1994). De fato, sabe-se que este tecido expressa e secreta uma variedade de polipeptídeos, chamados de adipocinas, que agem tanto localmente como ao nível sistêmico (Kershaw e Flier, 2004). A S100B tem características suficientes para ser considerada uma adipocina. Nosso resultado reforça a idéia sobre as fontes extracerebrais contribuindo para os níveis séricos de S100B, particularmente os adipócitos.

Nesta tese estudamos o papel da proteína S100B na síndrome de Down, bem como seu papel como marcador de injúria do sistema nervoso, em pacientes com defeito de tubo neural e adicionalmente, procuramos demonstrar a presença de fontes extracerebrais de S100B. Observamos um aumento da proteína S100B em líquido amniótico de gestações com fetos com síndrome de Down, e mostramos que este aumento está associado com a idade gestacional; e no soro de pacientes com síndrome de Down determinamos o perfil ontogenético desta proteína. O estudo da S100B como marcador de injúria em pacientes com defeito de tubo neural não revelou diferenças em relação aos indivíduos normais, e estes pacientes não apresentam variação dos níveis da proteína dependente da idade, como acontece nos indivíduos controle. Também investigamos o tecido adiposo como provável fonte



extracerebral de S100B, correlacionando os níveis séricos com aqueles encontrados em LCR de ratos submetidos a jejum.

## **7.DISSCUSSÃO**

## 7.1 - SINDROME DE DOWN e S100B

Os estudos recentes em síndrome de Down têm se concentrado mais intensamente nas áreas da triagem pré-natal, desenvolvimento da linguagem, diagnóstico e no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Roizen, 2001). Neste trabalho, investigamos dois destes importantes aspectos do estudo desta patologia: a triagem pré-natal e os aspectos comuns com a doença de Alzheimer.

É conhecido que a incidência da SD aumenta em gestações de mulheres a partir dos 35 anos, como também estamos cientes de que a maioria das gestações ocorrem em mulheres com menos de 35 anos, onde se concentram cerca de 75-80% de todos os casos de SD. Todos estes dados têm motivado muitos estudos a respeito de novos marcadores para a triagem de mulheres em risco para a SD. Assim, estudamos dois marcadores em líquido amniótico de gestações com fetos portadores de SD, a proteína S100B e a enzima superóxido dismutase.

No MANUSCRITO I estudamos gestações com síndrome de Down e relatamos uma associação dos níveis de S100B no líquido amniótico com a idade gestacional; este é o primeiro relato publicado sobre tal associação. Os valores de referência para S100B para as idades gestacionais entre 15 e 18 semanas corroboram os achados de segundo trimestre de Gazzolo e colaboradores (2001b). Entretanto, não encontramos nenhuma relação entre os níveis de S100B e idade gestacional nas gestações normais, diferente do encontrado naquele mesmo trabalho. Uma possível explicação para esta diferença pode ser o número de amostras controle estudadas. Eles encontraram uma correlação moderada ( $r=0.21$ ) pelo uso de uma amostra numerosa ( $n=322$ ); nosso estudo possui 26 sujeitos controle. Ainda, confirmamos os dados prévios do nosso grupo, demonstrando a presença de altos níveis de S100B no líquido amniótico de gestações com SD.

Níveis elevados de S100B durante a vida fetal parecem ser consistentes com a hipótese de que, como uma citocina, a S100B exerça um papel neurotrófico (Donato, 2001). Entretanto, altos níveis desta proteína, como observado na síndrome de Down e em outras doenças neurodegenerativas, têm sido associados com anormalidades em proteínas sinápticas e do

citoesqueleto (Hu & Van Eldik, 1996; Whitaker-Azmitia e cols, 1997; de la Monte, 1999).

A S100B detectada no LA é originária provavelmente, do sistema nervoso do feto. Mito & Becker (1993) e Griffin e colaboradores (1989) mostraram que o número de células S100B reativas no hipocampo de pacientes com SD era praticamente o dobro do que o controle em fetos com 39 semanas de gestação. Isto pode significar que há células produzindo S100B no feto e que estes altos níveis podem levar a uma alteração na diferenciação e no crescimento das células neurais na SD. Por outro lado, é possível que a S100B seja liberada, pelo menos em parte, de outros sítios, como a placenta e tecido umbilical.

Estudos prévios demonstraram mudanças nos níveis de expressão e distribuição de S100B no sistema nervoso central correlacionados com a idade (Tiu e cols, 2000; Tramontina e cols, 2002), o que pode estar relacionado a diferentes papéis desta proteína em distintas regiões cerebrais durante o desenvolvimento fetal, a vida adulta e o envelhecimento (Van Eldik e Wainwright, 2003).

Alguns trabalhos realizados em síndrome de Down mostraram níveis elevados da proteína S100B e de seu ARNm, em tecido cerebral de pacientes com diferentes idades (Marks e cols, 1996; Griffin e cols, 1998; Tiu e cols, 2000). Kato e colaboradores (1990) mostraram aumento nos níveis extracelulares desta proteína em pacientes com síndrome de Down, mas nenhum dado existia a respeito do seu perfil ontogenético.

Nos dados apresentados no MANUSCRITO II confirmamos que os níveis da proteína S100B em soro de pacientes com SD estão aumentados cerca de 50%, quando comparados a indivíduos normais. Realizamos um estudo de correlação entre S100B e idade, dividindo os indivíduos em dois grupos: menores de 4 anos e maiores de 4 anos. Esta idade foi escolhida baseado num estudo prévio que mostrou uma mudança crítica do desenvolvimento cerebral neste período, no que concerne o metabolismo energético e a sinaptogênese (Chugani e cols, 1998; Ikonomidou e cols, 2001). Indivíduos normais exibem uma correlação negativa com a idade, mas nos pacientes com SD esta associação não é vista.

Os níveis mais elevados e persistentes de S100B nos pacientes com SD estão presentes desde o período fetal, possivelmente devido a um efeito de dosagem do gene no início da vida fetal. Isto contribui para a idéia geral de que a presença da S100B precede o aparecimento da placa amilóide na doença de Alzheimer. De fato, está relatado na literatura que a grande maioria dos pacientes com síndrome de Down irão desenvolver doença de Alzheimer (Mann, 1988; Griffin e cols, 1998). A síndrome de Down provavelmente representa o melhor modelo natural pré-programado da neuropatologia da doença de Alzheimer. De acordo com Griffin e colaboradores (1998) os níveis elevados de S100B podem disparar uma super-expressão neuronal de APP (também mapeado na região DSCR), conseqüentemente gerando o peptídeo  $\beta$ -amilóide. Este peptídeo pode então induzir a liberação de citocinas, incluindo a S100B nos astrócitos, bem como a gliose reativa.

Outros achados encontrados em tecido cerebral de pacientes com síndrome de Down e doença de Alzheimer atribuídas a S100B, também observadas em ratos transgênicos que superexpressam S100B, incluem alterações do citoesqueleto, extensão neurítica anômala e morte neuronal (Sheng e cols, 2000).

#### 7.1.1 - SINDROME DE DOWN e SOD

Muitos estudos têm proposto um componente genético que predispõe os indivíduos com síndrome de Down a desenvolver a doença de Alzheimer. A superexpressão da SOD como um resultado da carga genética é sugerida como a responsável por esta associação com a doença de Alzheimer, devido ao dano dos processos oxidativos na trissomia do 21, pois a SOD tem um papel importante na remoção dos radicais livres (Turrens, 2001; Noor e cols, 2002).

Tem sido sugerido que uma cópia extra do gene da enzima superóxido dismutase-1 na síndrome de Down seja responsável por algumas das manifestações clínicas da doença. Teoricamente, qualquer desequilíbrio nos níveis relativos de SOD, glutatona peroxidase e catalase (duas outras enzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo) podem ter efeitos deletérios na membrana celular (Percy e cols, 1990). Nossos resultados da atividade da SOD (MANUSCRITO I) confirmam os achados de estudo prévio que mostrou

aumento de atividade no líquido amniótico e em fibroblastos de pacientes com síndrome de Down (Baetman e cols, 1985), bem como estão de acordo com outros relatos que demonstram superexpressão da enzima de cerca de 1,5 vezes em células e tecidos de pacientes com SD (Percy e cols, 1990) e soro de mães com fetos com síndrome de Down (Ognibene e cols, 1999). Curiosamente, não encontramos qualquer associação em relação a atividade da SOD com a idade gestacional.

## **7.2 - S100B EM PACIENTES COM DEFEITO DO TUBO NEURAL**

Como visto no estudo da S100B na síndrome de Down, esta proteína tem sido amplamente estudada como marcador de diversas doenças, bem como de injúria do sistema nervoso central. Tentando aprofundar nossa compreensão sobre seu papel neste contexto, estudamos os níveis da S100B em pacientes com defeito de tubo neural.

Descrevemos, originalmente, os níveis séricos de S100B em pacientes com defeito do tubo neural. Como apresentado no MANUSCRITO III, não encontramos diferença nos níveis de S100B entre os pacientes e os indivíduos controle.

Assim como no MANUSCRITO II, dividimos os indivíduos em dois subgrupos: menores e maiores que 4 anos. Como já havia sido demonstrado, os indivíduos normais apresentaram uma correlação negativa com a idade, mas este efeito não foi observado em pacientes com defeito de tubo neural.

Muitos estudos são consistentes com a idéia de que a expressão crônica de S100B, como a observada na síndrome de Down, pode aumentar o risco de posterior desenvolvimento de doença de Alzheimer pela promoção do desenvolvimento da placa amilóide (Griffin e cols, 1998; Sheng e cols, 2000).

A exposição dos pacientes com defeito do tubo neural a níveis aumentados de S100B pode ter algum efeito e deve ser mais investigada. Sindic e colaboradores (1984) em seu estudo dos níveis de S100B em líquido amniótico de gestações com fetos anencefálicos sugeriu que estes níveis podem ser considerados um sinal biológico de injúria celular do cérebro exencefálico.

Os resultados apresentados no MANUSCRITO III indicam a persistência de níveis elevados desta proteína após a correção cirúrgica. Muitos autores têm sugerido um papel da S100B na plasticidade neural (Donato e cols, 2001; Van Eldik e Wainwright, 2003), logo seria possível sugerir que os níveis persistentes de S100B estão associados com o déficit neurológico observado nestes pacientes.

### **7.3 – FONTE EXTRACEREBRAL DE S100B**

Como mencionado na introdução desta tese, a S100B foi descrita inicialmente como específica de neurônio (Moore, 1965), mas sua posterior caracterização revelou que esta proteína é localizada principalmente nas células gliais (Boyes e cols, 1986). Ainda, sua presença foi evidenciada em várias células de tecidos não nervosos (Vanstapel e cols, 1986; Haimoto e cols, 1987).

Inicialmente o nível de S100B no tecido adiposo foi comparado ao do cérebro (Suzuki e cols, 1982; Micheti e cols, 1983; Zimmer e cols, 1991) e, embora o significado biológico da proteína neste tecido periférico não seja conhecido, o perfil do desenvolvimento da S100B em ratos sugere que este possa ser controlado por hormônios e/ou pela dieta (Kato e cols, 1983). Normalmente os níveis de S100B não são detectáveis no soro humano, entretanto níveis séricos elevados têm sido encontrados em várias condições neuropatológicas e os investigadores acreditam que esta elevação é causada por dano no SNC (Kanner e cols, 2003).

Os resultados do MANUSCRITO IV demonstram que ratos submetidos a 48 horas de jejum apresentam níveis mais altos de S100B quando comparados com animais controle e que esta diferença não é observada no LCR.

Suzuki e Kato (1986) sugeriram que esta proteína possa participar no processo de diferenciação dos adipócitos além de exercer alguma função no adipócito diferenciado. A presença de altos níveis de S100B nos adipócitos e a sua resposta seletiva às catecolaminas sugere uma participação desta proteína numa função celular peculiar ao tecido adiposo. Dados de Suzuki e colaboradores (1984) e estudos preliminares em nosso laboratório, indicam que este efeito possa ser mediado por AMPc.

Estudos em pacientes submetidos a cirurgia cardíaca sugerem que a fonte da S100B sérica presente após tal procedimento é basicamente extracerebral, o que enfraquece seu papel como marcador de injúria cerebral, como sugerido anteriormente (Anderson e cols, 2001; Jonsson e cols, 1999, 2003). Ainda, estudo em pacientes de UTI com disfunção em múltiplos órgãos ou pacientes com trauma encefálico sugerem que a S100B possa ser liberada de fonte extracerebral (Kleine e cols, 2003). Trabalhos recentes medindo os níveis de S100B durante a atividade física mostraram altos níveis de S100B, corroborando uma origem periférica (Dietrich e cols, 2003; Hasselblatt e cols, 2004). Scaccianoce e colaboradores (2004) também demonstraram uma correlação entre S100B e estresse, sugerindo cautela ao se usar esta proteína como marcador de lesão neural.

Desde a descoberta da leptina, o tecido adiposo tem sido caracterizado como um órgão endócrino (Zhang e cols, 1994). De fato, sabe-se que este tecido expressa e secreta uma variedade de polipeptídeos, chamados de adipocinas, que agem tanto localmente como ao nível sistêmico (Kershaw e Flier, 2004). A S100B tem características suficientes para ser considerada uma adipocina. Nosso resultado reforça a idéia sobre as fontes extracerebrais contribuindo para os níveis séricos de S100B, particularmente os adipócitos.

Nesta tese estudamos o papel da proteína S100B na síndrome de Down, bem como seu papel como marcador de injúria do sistema nervoso, em pacientes com defeito de tubo neural e adicionalmente, procuramos demonstrar a presença de fontes extracerebrais de S100B. Observamos um aumento da proteína S100B em líquido amniótico de gestações com fetos com síndrome de Down, e mostramos que este aumento está associado com a idade gestacional; e no soro de pacientes com síndrome de Down determinamos o perfil ontogenético desta proteína. O estudo da S100B como marcador de injúria em pacientes com defeito de tubo neural não revelou diferenças em relação aos indivíduos normais, e estes pacientes não apresentam variação dos níveis da proteína dependente da idade, como acontece nos indivíduos controle. Também investigamos o tecido adiposo como provável fonte



extracerebral de S100B, correlacionando os níveis séricos com aqueles encontrados em LCR de ratos submetidos a jejum.

## **8.CONCLUSÕES**

Os resultados apresentados permitem concluir que:

**1-** Os níveis de S100B em líquido amniótico podem ser um marcador para síndrome de Down;

**2-** Existe uma forte associação entre a concentração de S100B e a idade gestacional nos casos de síndrome de Down;

**3-** A superóxido dismutase em líquido amniótico também pode ser um bom marcador para síndrome de Down e não encontramos associação da atividade da SOD com a idade gestacional;

**4-** Os pacientes com síndrome de Down apresentam níveis elevados de S100B no soro; e este aumento apresenta um perfil ontogenético;

**5-** Os pacientes com defeito do tubo neural apresentam níveis séricos de S100B semelhantes aos dos indivíduos normais; mas quando comparamos estes pacientes e indivíduos normais com mais de 4 anos, os níveis de S100B são maiores nos pacientes com defeito do tubo neural;

**6-** Ratos submetidos a jejum de 48 horas apresentam níveis séricos de S100B superiores aos animais controle; este aumento não é observado no líquido cefalorraquidiano;

**7-** Adipócitos dissociados, após 1 hora de incubação, apresentam níveis aumentados de S100B, e este aumento é ainda maior na presença de adrenalina.

## **9.ANEXO**

## **Informações Adicionais**

Consideramos importante apresentar algumas informações que não constam nos manuscritos dos artigos, todos eles preparados de acordo com as regras dos periódicos especializados.

O material biológico dos pacientes que foram estudados nesta tese era anônimo, e foram gentilmente cedidos para este estudo. Esta é uma prática corrente neste tipo de estudo.

O material biológico dos pacientes do manuscrito I foi enviado de Portugal, pela Prof Maria da Purificação Tavares. Naquele país existe uma excelente rede de triagem pré-natal para doenças genéticas, onde as pacientes realizam o teste triplo em soro materno e aquelas que apresentam risco aumentado realizam posteriormente exame de amniocentese.

O material biológico dos pacientes do manuscrito II foi gentilmente cedido pela Dra Cristina Helena Ferreira, do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Estes pacientes fizeram parte de um estudo sobre a eficácia da vacina para a hepatite C.

O material dos pacientes do manuscrito III fez parte da tese de doutorado da Dra. Têmis Felix, que estudou o metabolismo da homocisteína nos pacientes com defeito do tubo neural.

Todos os pacientes (ou seu responsáveis) destes estudos assinaram consentimento informado e passaram por uma avaliação clínica.

Todos os pesquisadores acima citados realizam trabalhos em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof Roberto Giugliani.

## **10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdesselan, O.B.; Vally, J.; Adem, C.; Foglietti, M.; Beaudeau, J-L. (2003) Reference values for serum S100B protein depend on the race of individuals. *Clin Chem* 49:836-837.

Abraha H.D., Noble P.L., Nicolaidis K.H., Sherwood R.A.(1999) Maternal serum S100 protein in normal and Down syndrome pregnancies. *Prenatal Diagnosis* 19:334-336.

Allore, R.J.; Friend, W.C.; O'Hanlon, D.; Neilson, K.M.; Baumal, R.; Dunn, R.J.; Marks, A. (1990) Cloning and expression of the human S100B gene. *J Biol Chem* 265:15537-43.

Anderson, R.; Hansson, L-O.; Nilsson, O.; Liska, J.; Settergren, G.; Vaage, J. (2001) Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources. *Ann Thorac Surg* 71:1512-7.

Anneren, G.; Esscher, T.; Larsson, L.; Olsen, L.; Pailman, S.(1988) S100 protein and neuron-specific enolase in amniotic fluid as markers of abdominal wall and neural tube defects in the fetus. *Prenat Diag* 8:323-328.

Antonarakis, S. (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 324:872-876.

Atanassova, P. (2001) Immunohistochemical expression of S100 protein in human embryonal fat cells. *Cell Tissues Organs*169:355-360.

Baeteman, M.A.; Mattei, M.G.; Baret, A.; Gamberre, M.; Mattei, J.F. (1985) Immunoreactive SOD-1 in amniotic fluid, amniotic cells and fibroblasts from trisomy 21 fetus. *Acta Paediatr Scand* 74:697-700.

Bianchi, R.; Garbuglia, M.; Verzini, M.; Giambanco, I.; Ivanenkov, V.V.; Dimilch, R.V.W.; Jamieson, G.A.; Donato, R. (1996) S100 ( $\alpha$  and  $\beta$ ) binding peptide (TRTK-12) blocks S100/GFAP interaction: identification of putative S100 target epitope within the head domain of GFAP. *Bioch Biophys Acta* 1313:258-267.

Botto, L.; Moore, C.; Khoury, M.J.; Erickson, J.D. (1999) Medical Progress: neural tube-defects. *N Engl J Med* 341:1509-1519.

Boyes, B.E.; Kim, S.U.; Lee, V.; Sung, S.C. (1986) Immunohistochemical colocalization of S-100b and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. *Neuroscience* 17:857-865.

Cicarelli, R.; Di Iorio, P.; Bruno, V.; Bataglia, G.; D'alimonte, I.; D'onofrio, M.; Nicoletti, F.; Caciagli, F. (1999) Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100B protein from cultured astrocytes. *Glia* 27:275-281.

Cinti, S.; Cigolini, M.; Zingaretti, M.C. (1989) S100 protein in white preadipocytes: an immunoelectronmicroscopic study. *The Anatom Rec* 224:466-472.

Chugani H.T. (1998) A critical period of brain development. Studies of cerebral glucose utilization with PET. *Prev Med* 27:184-188.

Cocchia, D. e Michetti, F. (1981) S100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunohistochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 215:103-12.

Cork, L.C. (1990) Neuropathology of Down syndrome and Alzheimer disease. *Am J Med Genet* 7:280-6.

Cuckle, H. e Arbusova, S. (2000) Maternal blood superoxide dismutase in Down syndrome. *Prenat Diagn* 353-357.

Dietrich, M.O.; Tort, A.B.; Farina, M.; Gonçalves, C.A.; Souza, D.O.; Portela, L.V. (2003) Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can J Appl Physiol* 28:710-6.

Donato, Rosario. (1986) S100 proteins. *Cell Calcium* 7:123-45.

Donato, Rosario. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Internat J Biochem Cell Biol* 33:637-668.

Donato, Rosario. (2003) Intracellular and Extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Techn* 60:540-551.

Engidawork, E. e Lubec, G. (2001) Protein expression in Down syndrome brain. *Amino Acids* 21:331-361.

Engidawork E., Gulesserian T., Fountoulakis M., Lubec G. (2003) Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. *Neurosc* 122:145-154.

Epstein, J. (2001) Down syndrome. In: *The Metabolic and Molecular bases of Inherited Disease*. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S. and Valle, D. Eds. 7<sup>a</sup> ed, vol I, pp 1223-1256. McGraw-Hill, Inc, New York.

Fraser, J. E Mitchell, A. (1876) Kalmun idiocy: report of a case with autopsy with notes on 62 cases. *J Ment Sci* 22:161.

Friend, W.C.; Clapoff, S.; Landry, C.; Becker, L.E.; O'Hanlon, D.; Allore, R.J.; Brown, I.R.; Marks, A.; Roder, J.; Dinn, R.J. (1992) Cell specific expression in transgenic mouse brain is dependent on gene dosage. *J Neurosc* 12:4337-4346.



Gazzolo, D.; Vinesi P.; Geloso, M.C.; Marcelletti, C.; Iorio, F.S.; Cipriani, A.; Marianeschi, S.M.; Michetti, F. (1988) S100 blood concentrations in children subjected to cardiopulmonary by-pass. Clin Chem 44: 1058-1060.

Gazzolo, D.; Vinesi, P.; Marinoni, E.; Di Iorio, R.; Marras, M.; Lituania, M.; Bruschetti, M.; Michetti, F. (2000) S100B protein concentrations in cord blood: correlations with gestational age in term and preterm deliveries. ClinChem 46: 998-1000.

Gazzolo D., Bruschetti M., Lituania M., Serra G., Bonacci W., Michetti F. (2001a) Increased urinary S100B protein as an early indicator of intravascular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. Clin Chem 47 (10):1836-1838.

Gazzolo D., Bruschetti M., Corvino V., Oliva R., Sarli R., Lituânia M., Bruschetti P., Michetti F. (2001b) S100B protein concentrations in amniotic fluid correlate with gestational age and with cerebral ultrasound scanning results in healthy fetuses. Clin Chem 47 (5):954-956.

Gazzolo, D.; Bruschetti, M.; Iorio, F.S.; Marioni, E.; Lituânia, M.; Marras, M.; Sarli, R.; Bruschetti, P.L.; Michetti, F. (2002) Maternal nitric oxide supplementation decreases cord blood in intrauterine growth retards fetuses. ClinChem 48: 647-649.

Gazzolo, D.; Bruschetti, M.; Corvino, V.; Lituania, M.; Sarli, R.; Bruschetti, P.; Michetti, F. (2003a) Pediatric concentration of S100B protein in blood:age and sex related changes. Clin Chem 49:967-970.

Gazzolo, D.; Monego, G.; Corvino, V.; Bruschetti, M.; Bruschetti, P.; Zelano, G.; Michetti, F.(2003b) Human milk contains S100B protein. Biochim Biophys Acta 1619:209-212.

Gazzolo, D.; Grutzfeld, D.; Michetti, F.; Toesca, A.; Lituania, M.; Bruschetti, M.; Dobrzanska, A.; Bruschetti, P. (2004a) Increased S100B in cerebrospinal fluid of infants with bacterial meningitis:relationship to brain damage and routine cerebrospinal fluid findings. Clin Chem 50:941-944.

Gazzolo, D.; Bruschetti, M.; Lituânia, M., Serra, G.; Santini, P.; Michetti, F (2004b) Levels of S100B are higher in mature human milk than in colostrum and milk-formulae milks. Clin Nutrit 23: 23-26.

Gerlai, R.; Friend, W.; Becker, L.; O'Hanlon, D.; Marks, A.; Roder, J. (1993) female transgenic mice carrying multiple copies of the human gene S100B are hyperactive. Behav Brain Res 55:51-59.

Gerlai, R.; Marks, A.; Roder, J. (1994) T-maze spontaneous alteration rate is decreased in S100B transgenic mice. Behav Neurosc 108:100-106.

Gerlai, R.; Wojtowicz, J.M.; Marks, A.; Roder, J. (1995) Overexpression of calcium-binding protein, S100B, in astrocytes alter synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem* 2:26-39.

Glianem, G.; Loir, B.; Morandini, R.; Sales, F.; Lienard, D.; Eggermont, A.; Lejeune, F. (2001) On the release and half-life of S100 protein in the peripheral blood of melanoma patients. *Int J Cancer* 9:586-590.

Gonçalves, D.; Karl, J.; leite, M.; Rotta, L.; Salbego, C.; Rocha, E.; Wofchuck, S.; Gonçalves, C.A. (2002) High glutamate decreases S100B secretion stimulated by serum deprivation in astrocytes. *Neuroreport* 13:1533-5.

Gonzalez-Martinez, T.; Perez-Pinera, P.; Diaz-Seal, B.; Vega, J.A. (2003) S-100 proteins in the human peripheral nervous system. *Microsc Res Tech* 60:633-638.

Grabe, H.J.; Ahrens, N.; Rose, H.J.; Kessler, C.; Freyberger, H.J. (2001) Neurotrophic factor S100 beta in major depression. *Neuropsychobiol* 44:88-90.

Griffin, W.S.T.; Stanley, L.C.; Ling, C.; White, L.; McLeod, V.; Perrot, L.J.; White, C.L.; Araoz, C. (1989) Brain interleukin 1 and S100:immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 86:7611-7615.

Griffin, W.S.T.; Yeralan, O.; Sheng, J.G.; Boop, F.A.; Mrak, R.E.; Rovnaghi, C.R.; Burnett, B.A.; Van Eldik, L.J. (1995) Overexpression of the neurotrophic cytokine S100B in human temporal epilepsy. *J Neurochem* 65:228.

Griffin, W.S.T.; Sheng, J.G.; Mckenzie, J.E.; Royston, M.C.; Gentleman, S.M.; Brumback, R.A.; Cork, L.C.; Del Bigio, M.R.; Roberts, G.W.; Mrak, R.E. (1998) Life-long overexpression of S100B in Down's syndrome: implications for Alzheimer pathologies. *Neurobiol of Aging* 19:401-405.

Haimoto, H.; Kato, K.; Suzuki, F.; Nagura, H. (1985) The ultrastructural changes of S100 protein localization during lipolysis in adipocytes. *Am J Pathol* 121:185-191.

Haimoto, H.; Hosoda, S.; Kato, K. (1987) Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest* 57:489-98.

Harpio, R. e Einarsson, R. (2004) S100 proteins as cancer biomarkers with focus on S100B in malignant melanoma. *Clin Biochem* 37:512-8.

Hasselblatt, M.; Mooren, F.C.; von Ahsen, N.; Keyvani, K.; Fromme, A.; Schwartz-Eicker, K.; Senne,r V.; Paulus, W. (2004) Serum S100beta

increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurol* 62: 1634-6.

Hassold, T. e Jacobs, P. (1984) Trisomy in man. *Ann Rev Genet* 18:69-97.

Hassold, T. e Chiu D. (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 70:11-7.

Hassold, T. e Sherman, S. (2000) Down syndrome:genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet* 57:95-100.

Hattori, M.; Fujiyama, A.; Taylor, T.D.; e colaboradores. (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405:311-19.

Head, E. e Lott, I.T. (2004) Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr Opin Neurol* 17:95-100.

Heizmann, C.W.; Fritz, G.; Schafer, B.W. (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front in Biosc* 7, d1356-1368.

Heizmann, C.W.; Schaffer, B.W.; Fritz, G. (2003) The family of S100 cell signaling proteins. *Handbook of Cellular Signaling* (R.A. Bradshaw and E.Dennis eds) Vol 2, pp 87-93.

Hobbs, C.A.; Sherman, L.; Yi, P.; Hopkins, S.E.; Torfs, C.; Hine, R.; Pogribna, M.; Rozen, R.; James, S.J. (2000) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 67:623-630.

Hu, J.; Van Eldik, L.J. (1996) S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via nitric oxide-dependent pathway. *Biochem Biophys Acta* 57:239-45.

Ikonomidou, C.; Bittigau, P.; Koch, C.; Genz, K.; Hoerster, F.; Felderhoff-Mueser, U.; Tenkova, T.; Dikranian, K.; Olney, J.W. (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 62:401-5.

Ivanenkov, V.V.; Jamieson, G.A.; Grienten, E.; Dimlich, R.W. (1995) Characterization of S100b binding epitopes: identification of a novel target, the action capping protein, Cap Z. *J Biol Chem* 270:14651-14658.

Jensen, R.; Marshak, D.; Anderson, C.; Lukas, T.J.; Watterson, D.M. (1985) Characterization of human brain S100 protein fraction: amino acid sequence of S100B. *J Neurochem* 45, 700-705.

Jonsson, H.; Johnsson, P.; Alling, C.; Westaby, S.; Blomquist, S. (1999) S100beta after coronary artery surgery: release pattern, source of

contaminations, and relation to neuropsychological outcome. *Annals Thorac Surg* 68:2202-2208.

Jonsson, H.; Johnsson, P.; Hoglund, P.; Alling, C.; Blomquist, S. (2000) Elimination of S100B and renal function after cardiac surgery. *J Cardioth Vasc Anesth* 14:698-701.

Jonsson, H. (2003) S100B and cardiac surgery: possibilities and limitations. *Restor Neurol and Neurosc* 21:151-157.

Kanner, A.A.; Marchi, N.; Fazio, V.; Mayberg, M.R.; Koltz, M.T.; Siomin, V.; Stevens, G.H.J.; Masaryk, T.; Ayumar, B.; Vogelbaum, M.A.; Barnett, G.H.; Janigro, D. (2003) Serum S100B. A noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. *Cancer* 97:2806-13.

Karl, J.; Gottfried, C.; Tramontina, F.; Dunkley, P.; Rodnight, R.; Gonçalves, C.A. (2000) GFAP phosphorylation studied in digitonin-permeabilizes astrocytes: standardization of conditions. *Brain Res* 853:32-40.

Kato, K.; Suzuki, F.; Nakajima, T. (1983) S100 protein in adipose tissue . *Int J Biochem* 5:609-613.

Kato, K.; Suzuki, F.; Kurobe, N.; Okajima, K.; Ogasawara, N.; nagaya, M.; Yamanaka, T. (1990) Enhancement of S100B protein in blood of patients with Down syndrome. *J Mol Neurosc* 2:109-13.

Kleine, T.O.; Benes, L.; Zofel, P. (2003) Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Res Bull* 61:265-279.

Kershaw, E.E. e Flier, J.S. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metabol* 89:2548-2556.

de Kruijk, J.R.; Leffers, P.; Menheere, P.P.C.A.; Meerhoff, S.; Twijnstra, A. (2001) S100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients. *Acta Neurol Scand* 103:175-179.

Lamers, K.J.B.; Vos, P.; Verbeek, M.M.; Rosmalen, F.; van Geel, W.J.A.; van Engelen, B.G.M. (2003) Protein S100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res Bull* 61:261-264.

Lara, D.R.; Gama, C.S.; Belmonte-de-Abreu, P.; Portela, L.V.; Gonçalves, C.A.; Fonseca, M.; Hauck, S.; Souza, D.O. (2001) Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 35:11-4.

Leal, R.B.; Frizzo, J.K.; Tramontina, F.; Fiew-makaroff, S.; Bobrovskaya, L.; Dunkley, P.R.; Gonçalves, C.A. (2004) S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport* 15:317-20.

Mann, D.M.A. (1988) The pathological association between Down syndrome and Alzheimer disease. *Mech Aging Dev* 43:99-136.

Marchi, N.; Cavalier, M.; Fabio, V.; Buda, S.; Hellene, K.; Janeiro, D. (2004) Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta* 342 :1-12.

Margis, R.; Zanatto, V.; Tramontina, F.; Vinade, E.; Lullier, F.; Portela, L.V.; Souza, D.O.; Dalmaz, C.; Kapzinski, F.; Gonçalves, C.A. (2005) Changes in S100B cerebrospinal fluid of rats subjected to predator stress. *Brain Res*, in press

Marinoni, E.; Di Iorio, R.; Gazzolo, D.; Lucchini, C.; Michetti, F.; Corvino, V.; Cosmi, E. (2002) Ontogenetic localization and distribution of S100B protein in human placental tissues. *Obst & Gynecol* 99: 1093-1099.

Marks, A.; O'Hanlon, D.; Lei, M.; Percy, M.E.; Becker, L.E. (1996) Accumulation of S100B mRNA and protein in cerebellum during infancy in Down syndrome and control subjects. *Mol Brain Res* 36: 343-348.

Merrick, J. (2000) Incidence and mortality of Down syndrome. *Israel Med Ass J* 2:25-26.

Michetti, F.; Massaro, A.; Murazio, M. (1979) The nervous system-specific S100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 11:171-5.

Michetti, F., Dell'anna, E., Tiberio, G., Cocchia, D.(1983) Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res* 262:352-356.

Michetti F. e Gazzolo D. (2003) S100B testing in pregnancy. *Clin Chim Acta* 335:1-7.

Millward, T.A.; Heizmann, C.W.; Schafer, B.W.; Hemmings, B.A. (1998) Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. *EMBO J* 17:5913-5922.

Mito, T. e Becker, L.E. (1993) Developmental changes of S100 protein and glial fibrillary acidic protein in the brain in Down syndrome. *Exper Neurol* 120:170-176.

Moller, M.; Ingrid, A.; Bock, E. (1978) Immunohistochemical demonstration of S100 protein and GFA protein in interstitial cells of rat pineal gland. *Brain Res* 140:1-13.

de la Monte S.M. (1999) Molecular abnormalities of the brain in DS. Relevance to Alzheimer neurodegeneration. *J Neurol Transm* 57:1-9.

Moore, B.W. (1965) A soluble protein characteristic of nervous system. *Biochem Biophys Res Comm* 19:739-744.

Mooren, F.C. e Kinne, R.K.H. (1998) Cellular calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1406:127-151.

Mrak R.E. & Griffin W.S.T. (2001) The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 22:915-922.

Nakajima, T.; Yamaguchi, H.; Takahashi, K. (1980) S100 protein in folliculoestellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 191:523-531.

Nooijen, P.T.; Schoonderwaldt, H.C.; Wevers, R.A.; Hommes, O.R.; lamers, K.J. (1997) Neuron-specific enolase, S-100 protein, myelin basic protein and lactate in CSF in dementia. *Dement Geriatr Cog Disord* 8:169-73.

Noor, R.; Mittal, S.; Iqbal, J. (2002) Superoxide desmutase – application and relevance to human diseases. *Med Sci Monit* 8:RA210-5.

Ognibene, A.; Ciuti, R.; Tozzi, P.; Messeri, G. (1999) Maternal serum superoxide desmutase (SOD): a possible marker for screening Down syndrome affected pregnancies. *Prenat Diag* 19:1058-1060.

Olsen, C.L. e Cross, P.K. (1997) Trends in the use of prenatal diagnosis in New York State and the impact of biochemical screening on the detection of Down syndrome. *Prenat Diagn* 17:1113-24.

Park, E.S.; Park, C.; Choi, K.S.; Choi, I-H.; Shin, J-S. (2003) Over-expression of S100B protein in children with cerebral palsy or delayed development. *Brain & Develop*, 26:190-196.

Percy, M.E.; Dalton, A.J.; Markovic, V.D.; Mclachlan, D.R.; Hummel, J.T.; Rusk, A.C.; Andrews, D.F. (1990) red cell superoxide desmutase, glutathione peroxidase and catalase in Down syndrome patients with and without manifestations of Alzheimer disase. *Am J Genet* 35:459-67.

Persson, L.; Hardemark, H.G.; Gustafsson, J.; Runstrom, G.; Mendelhartvig, I.; Esscher, T.; Pahlman,S. (1987) S100 protein and neurospecific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke* 18:911-8.

Peskind, E.; Griffin, W.S.; Akama, K.T.; Raskind, M.A.; Van Eldik, L.J. (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer disease. *Neurochem Int* 39:409-413.

Petzold, A.; Keier, G.; Smith, M.; Lim, D.; Thompson, E.J. (2003) Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: release and wash-out pattern. *Brain Res Bull* 61:281-285.

Pinto, S.S.; Gottfried, C.; Mendez, A.; Gonçalves, D.; Karl, J.; Gonçalves, C.A.; Wofchuk, S.; Rodnight, R. (2000) Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Letters* 486:203-207.

Poletaev, A. (1996) Elevated serum immunoreactivity to S100 protein in healthy mother and their sick children: possible significance in inborn psychoneuropathology. *Dev Brain Dysfunct* 9:17-21.

Portela, L.C.; Tort, A.B.L.; Neto, E.C.; Kessler, R.G.; Penchaszadeh, V.; Souza, D.O.; Gonçalves, C.A.; Giugliani, R. (2000) High immunocontent of S100B protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultras Obst Gynecol* 16:590-593.

Portela, L.; Tort, A.B.L.; Schaf, D.V.; Ribeiro, L.; Nora, D.; Walz, R.; Totta, L.; Silva, C.T.; Busnello, J.V.; Kapczinski, F.; Gonçalves, C.A.; Souza, D. (2002) The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 48: 950-952.

Rambotti, M.G.; Giambanco, I.; Spreca, A.; Donato, R. (1999) S100B and S100A1 proteins in bovine retina: their calcium-dependent stimulation of a membrane-bound guanylate cyclase activity as investigated by ultracytochemistry. *Neurosci* 92:1089-1101.

Roizen, N.J. (2001) Down syndrome: progress in research. *Mental Retard Devel Dis Res Rev* 7:38-44.

Roizen, N.J. e Patterson, D. (2003) Down's syndrome. *Lancet* 361:1281-89.

Rothermundt, M.; Peters, M.; Prehn, J.H.M.; Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Techn* 60:614-632.

Royston, M.C.; McKenzie J.E.; Gentleman, S.M.; Sheng, J.G.; Mann, D.M.A.; Griffin, W.S.T.; Mrak, R.E. (1999) Overexpression of S100B in Down's syndrome: correlation with patient age and with  $\beta$ -amiloid deposition. *Neurophatol Appl Neurol* 25:387-393.

Sarkar, S.; Chang, H.C.; Porreco, R.P.; Jones, O.W. (1980) neural origin of cells in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 136:67-72.

Scaccianoce S., Bianco P.D., Panniteri G., Passarelli F. (2004) Relationship between stress and circulating levels of S100B protein. *Brain Res* 1004:208-211.

Schmidt, A.M.; Yan, S.D.; Yan, S.F.; Stern, D.M. (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochem Biophys Acta* 1498:99-111.

Schupf, N. (2002) Genetic and host factors for dementia in Dow's syndrome. *Brit J Psych* 180:405-410.

Scotto, C.; Deloume, J.C.; Rpusseau, C.; Chambaz, E.; Baudier, J. (1998) calcium and S100 regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:4272-4281.

Sheng J.G., Mrak R.E., bales K.R., Cordell B., Paul S.M., Jones R.A., Woodward S., Zhou X.Q., McGinness J.M., Griffin W.S. (2000) Overexpression of the neuritotrophic cytokine S100beta precedes the appearance of neuritic beta-amyloid plaques in APPV717F mice. *J Neurochem* 74:295-301.

Sindic, C.J.; Freund, M.; Van Regemorter, N.; Verellen-Dumoulin, C.; Masson, P.L. (1984) S100 protein in amniotic fluid of anencephalic fetuses. *Prenat Diagn* 4:297-302.

Smithells, R.W.; Sheppard, S.; Schorah, C.J. (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 51:944.

Smithells, R.W.; Sheppard, S.; Schorah, C.J.; Seller, M.J.; Nevin, N.C.; Read, A.P.; Fielding, D.W. (1980) Possible prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1:339-340.

Snyder-Ramos, S.A.; Gruhlke, T.; Bauer, H.; Bauer, M.; Luntz, A.P.; Motsch, J.; martin, E.; Vahl, C.F.; Missler, U.; Wiesmann, M.; Bottiger, B.W. (2004) Cerebral and extracerebral release of protein S100B in cardiac surgical patients. *Anaesthesia* 59:344-49.

Sorci, A.; Agnaletti, A.L.; Bianchi, R.; Donato, R. (1998) Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochem Biophys Acta* 1448:277-289.

Stefansson, K.; Wollmann, R.L.; Moore, B.W.; Arnason, B.G.W. (1982) S100 protein in human chondrocytes. *Nature* 295:63-64.

Sussmuth, S.D.; Tumani, H.; Ecker, D.; Ludolph, A.C. (2003) Amyotrophic lateral sclerosis:disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum. *Neurosc Lett* 353:57-60.

Suzuki F., Nakajima T., Kato K. (1982) Peripheral distribution of neurons system-specific S100 protein in rat. *J Biochem* 92, 835-838.

Suzuki, F.; Kato, K.; Nakajima, T. (1984) Hormonal regulation of adipose S-100 protein release. *J Neurochem* 43:1336-1341.



Suzuki, F. e Kato, K. (1986) Induction of adipose S100 protein release by free fatty acids in adipocytes. *Biochim et Biophys Acta* 889:84-90.

Tiu, S.C.; Chan, W.Y.; Heizmann, C.W.; Schafer, B.W.; Shu, S.Y.; Yew, D.T. (2000) Differential expression of S100B and S100A6 in the human fetal and aged cerebral cortex. *Dev Brain Res* 119:159-168.

Tramontina, F.; Conte, S.; Gonçalves, D.; Gottfried, C.; Portela, L.V.; Vinade, L.; Salbego, C.; Gonçalves, C.A. (2002) Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocytes culture in rats. *Cell Mol Neurobiol* 22:373-8

Turrens J.F. (2001) Increased superoxide dismutase and Down syndrome. *Med Hypoth* 56:617-619.

Van Allen, M.I.; Kalonsek, D.K.; Chernoff, G.F.; Juriloff, D.; Harris, M.; McGillivray, B.C.; Yong, S.L.; Langlois, S.; McLeod, P.M.; Chitayat, D. (1993) Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. *Am J Med Genet* 47:723-43.

Van Eldik, L.J. e Wainwright, M.S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor neurol Neurosci* 21:97-108.

Van Passel, R.; Schlooz, W.A,J,M.; Lamers, K.J.B.; Lemmens, W.A.J.G.; Rotteveel, J.J. (2001) S100B protein, glia and Gilles de la Tourette syndrome. *Eur J Paed Neurol* 5:15-9.

Vanstapel, M.J.; Gatter, K.C.; de Wolf-Peeters, C.; Mason, D.Y.; Desmet, V.D. (1986) New sites of human S100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 85:160-8.

Verity, C.; Firth, H.; French-Constant, C. (2003) Congenital abnormalities of the central nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:i3-i8.

Zhang, Y.; Proença, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

Zimmer, D.B.; Coenwall, E.H.; Landar, A.; Song, W. (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37(4): 417-429.

Zimmer, D.B.; Sadosky, P.W.; Weber, D.J. (2003) Molecular mechanisms of S100 target proteins interactions. *Microsc Res Tech* 60:552-559.

Zimmer, D.B.; Song, W.; Zimmer, W.E. (1991) Isolation of rat S100 $\alpha$  cDNA and distribution of its mRNA in rat tissues. *Brain Res Bull* 27:157-162.

Zimmer, D.B. e Van Eldik, L.J. (1987) Tissue distribution of rat S100 alpha and S100 beta and s100-binding proteins. *Am J Physiol* 252:c285-9.

Wald, N.J. e Hackshaw, A.K. (2000) Advances in antenatal screening for Down syndrome. *Baill Best Prac Res Clin Obst Gynecol* 14:563-80.

Walz, R.; Portela, L.V.; Tort, A.B.; Neto, E.C.; Fernandes, L.N.; Gonçalves, C.A.; Souza, D.O. (2000) Serum S100B levels in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurol* 554:2021-2.

Whitaker-Azmitia, P.M.; Murphy, R.; Azmitia, E.C. (1990) Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1a</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528:155-158.

Whitaker-Azmitia, P.; Wingate, M.; Borella, A.; Gerlai, R.; Roder, J.; Azmitia E. (1997) Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S100B show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer and Down syndrome. *Brain Res* 57:1-19.

Wiesmann, M.; Missler, U.; Gottmann, D.; Gehring, S. (1998) Plasma S100B protein concentration in healthy adults is age- and -sex independent. *Clin Chem* 44: 1056-57.

Wisniewski, K.E.; Wisniewski, H.M.; Wen, G.Y. (1985) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer disease in Down syndrome. *Ann Neurol* 17:278-282.

Yang, Q.; Rasmussen, S.A.; Friedman, J.M. (2002) Mortality associated with Down syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population based study. *Lancet* 359:1019-25.