

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

THIAGO ISABEL TEIXEIRA GONÇALVES

**Dosagem de S100B e Enolase Neuronal como Marcadores de Lesão
Cerebral: uma revisão**

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

THIAGO ISABEL TEIXEIRA GONÇALVES

**Dosagem de S100B e Enolase Neuronal como Marcadores de Lesão
Cerebral: uma revisão**

Monografia apresentada à Diretoria de Pós-graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense- UNESC, para a obtenção do título de especialista em Análises Clínicas.

Orientador: Profa. Dra. Carina Rodrigues Boeck

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011

Dedico este trabalho a toda minha família e amigos, mas principalmente, à Eloise Clemes Alves, que durante todo o tempo esteve ao meu lado e que com carinho, incentivo e confiança, apostou no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu sucesso.

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças nos momentos mais difíceis dessa minha trajetória, e que me deu vários momentos de felicidades, vitórias e realizações.

À Eloise Cledes Alves, que esteve presente durante toda minha trajetória, oferecendo-me carinho, amizade, companheirismo e amor.

Aos meus irmãos e meus pais, que longe ou perto, estão sempre torcendo pelo meu sucesso.

A todos os professores da Pós-Graduação Especialização em Análises Clínicas, que contribuíram muito para meu aprendizado durante o curso.

À minha orientadora Carina Rodrigues Boeck, que muito me ajudou no desenvolvimento deste trabalho, me transmitindo conhecimento e estando sempre acessível aos meus questionamentos, incentivando-me na conclusão deste trabalho.

À todos os meus colegas e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Muito obrigado a todos!!!

**“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender.
Não chegar a tentar é sofrer a inestimável
perda do que poderia ter sido.”**

(Geraldo Eustáquio)

RESUMO

Um biomarcador compreende uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patológicos, ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Marcadores periféricos de danos a órgãos como rins ou fígado têm sido amplamente utilizados com sucesso pela medicina. Entretanto, no que diz respeito ao cérebro, algumas particularidades impõem consideráveis dificuldades na identificação e dosagem sérica de marcadores bioquímicos de lesão cerebral. A S100B e a NSE são as proteínas consideradas mais importantes utilizadas como marcadores de dano cerebral. A S100B é uma pequena proteína citosólica dimérica, do tipo ligadora de cálcio, com alta especificidade para o tecido cerebral, sendo encontrada principalmente nas células da glia, astrócitos e células de Schwann, e em algumas populações de neurônios. A NSE é uma enzima glicolítica que é encontrada no citoplasma de neurônios e em células com diferenciação neuroendócrina. O presente estudo tem como principal objetivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre as principais proteínas utilizadas como marcadores de lesão cerebral, a S100B e a NSE, abordando características específicas sobre as mesmas, e alguns métodos utilizados para sua detecção. Para realização da revisão, foi feita pesquisa sobre esses marcadores em bases de dados como MEDLINE, PUBMED, SCIELO e LILACS. A revisão mostrou que a S100B e a NSE são ótimos marcadores de lesão cerebral, sendo muito utilizados atualmente. As vantagens da utilização da S100B como marcadora de lesão cerebral é que ela pode ser medida em sangue arterial ou venoso, não é afetada por hemólise, mantêm-se estável por horas sem necessidade de centrifugação e congelamento imediatos da amostra, e é altamente sensível para lesão cerebral. Entretanto, as desvantagens é que ela não é específica para lesão cerebral, e sua meia vida é curta. Do mesmo modo, as vantagens da utilização da NSE como marcadora de lesão cerebral é que ela é o único marcador que avalia diretamente dano funcional aos neurônios, sendo altamente específica para este tipo de lesão, e sua variabilidade relacionada a sexo e idade é baixa. A desvantagem consiste no fato de ela estar presente em altas concentrações nos eritrócitos e plaquetas, sendo que hemólise e lise plaquetária podem prejudicar sua dosagem. A partir da revisão realizada, pôde ser observado que tanto a S100B quanto a NSE, são importantes marcadores de lesão cerebral, sendo a dosagem periférica de ambas de grande relevância clínica para a identificação de danos às células neuronais. Além disso, foi observado que há hoje no mercado a disponibilidade de testes bastante sensíveis e específicos para a dosagem destas proteínas. Porém, há a necessidade de uma maior padronização dos métodos de dosagem das mesmas.

Palavras-chave: S100B; NSE; biomarcadores; lesão cerebral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática dos efeitos regulatórios intracelulares da S100B.....	18
Figura 2: Representação esquemática dos efeitos regulatórios extracelulares da S100B nos neurônios, microglia, e astrócitos.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC – Acidente Vascular Cerebral

ELISA – *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* = Ensaio de Imunoabsorção
Ligado a Enzima

HPR – *Horseradish peroxidase* = peroxidase de raiz forte

NSE – Enolase Neurônio Específica

SNC – Sistema Nervoso Central

TCE – Traumatismo Crânio-encefálico

TMB – Tetrametilbenzina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 METODOLOGIA	12
4 BIOMARCADORES	13
5 AS PROTEÍNAS S100	14
5.1 As Proteínas S100B	16
5.1.1 A S100B Intracelular e Extracelular	17
5.1.2 A S100B como Marcador de Lesão Cerebral	19
6 A ENOLASE NEURÔNIO ESPECÍFICA (NSE)	22
6.1 A NSE como Marcador de Lesão Cerebral	23
7 MÉTODOS DE DOSAGEM DA S100B	24
8 MÉTODOS DE DOSAGEM DA NSE	28
9 DISCUSSÃO	29
10 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Um biomarcador é descrito como uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patológicos, ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (ZOETHOUT *et al.*, 2009).

De acordo com Benozzi & Coniglio (2010), do ponto de vista bioquímico, biomarcadores são moléculas sistêmicas, que podem ser proteínas, enzimas ou produtos metabólicos, que podem ser determinados em laboratório para avaliar determinados processos biológicos ou determinada patologia.

Um bom biomarcador de lesão cerebral deve ser sensível e ter alta especificidade para tecido cerebral. Deve ser medido no soro, pois líquido céfalo-raquidiano nem sempre é disponível. E deve ter pouca variabilidade relacionada a sexo e idade (OLIVEIRA, IKUTA, RAGNER, 2008).

Nos últimos anos, o dano neuronal tem sido estudado examinando-se alterações nos astrócitos e células da glia no Sistema Nervoso Central (SNC). Os biomarcadores cerebrais utilizados são: lactato, adenilato quinase, creatina quinase, S100B e Enolase Neurônio Específica (NSE). Estas duas últimas proteínas são consideradas os mais importantes marcadores de danos às células gliais e neuronais, respectivamente (KESSLER *et al.*, 2007).

A S100B é uma pequena proteína citosólica dimérica, do tipo ligadora de cálcio. Ela tem peso aproximado de 21kDa e existe em várias formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β (CIRILLO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, IKUTA, RAGNER, 2008). A forma β é chamada de S100B e é encontrada principalmente nos astrócitos do SNC em condições fisiológicas ou patológicas (TSOPORIS, MOHAMMADZADEH, PARKER, 2010).

A NSE é uma enzima glicolítica de aproximadamente 78kDa, encontrada predominantemente no citoplasma dos neurônios e em células neuroendócrinas. Esta enzima é funcionalmente ativa como um heterodímero formado por subunidades α , β e γ (HERRMANN *et al.*, 2001).

Atualmente, vários estudos demonstram que S100B e NSE são considerados os marcadores mais promissores de lesão cerebral (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008; SHINOZAKI *et al.*, 2009).

Marcadores periféricos de dano ou disfunção de órgãos como rins,

próstata, fígado e coração, têm sido ao longo dos anos amplamente utilizados com muito sucesso na prática médica. Entretanto, no que diz respeito ao cérebro, fatores como a sua complexidade de funções, compartimentalização e distribuições celulares, bem como a influência da barreira hematoencefálica, impõem consideráveis dificuldades na interpretação dos níveis de marcadores de dano cerebral no líquido céfalo-raquidiano e no sangue (PORTELA *et al.*, 2002). Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo uma revisão sobre as proteínas S100B e NSE, que são os principais biomarcadores de lesão cerebral atualmente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as principais características clínicas de dois biomarcadores de lesão cerebral mais utilizados atualmente: as proteínas S100B e NSE, através de uma revisão bibliográfica.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar aspectos gerais como funções, concentração fisiológica, e localização da proteína S100B no organismo.

- Verificar aspectos gerais como funções, concentração fisiológica, e localização da enzima NSE no organismo.

- Verificar os principais métodos de dosagem periférica da S100B e da NSE na prática clínica.

3 METODOLOGIA

Esta revisão tem como objetivo contextualizar a utilização das proteínas S100B e NSE como marcadores de lesão cerebral, baseando-se em revisões de literaturas publicadas nos sistemas MEDLINE, PUBMED, SCIELO e LILACS. O período de publicação não foi delimitado. Os seguintes descritores foram utilizados: S100B; Enolase Neurônio Específica; *neuron-specific enolase*; NSE; Biomarcadores; *biomarker*, *cerebral damage*.

4 BIOMARCADORES

O termo biomarcador foi introduzido em 1989, mas apenas em 2001, o Instituto Nacional de Saúde padronizou a definição de biomarcadores como uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patológicos, ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (BENOZZI & CONIGLIO, 2010; ZOETHOUT *et al*, 2009).

De acordo com Amorim (2003), biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluídos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição, ou da lesão, e o risco à saúde.

Do ponto de vista bioquímico, biomarcadores são moléculas sistêmicas que se pode determinar em laboratório, como proteínas, enzimas e outros produtos metabólicos que representam, direta ou indiretamente, um ou mais processos biológicos ou patológicos ativos de um sistema definido ou um estado de enfermidade (BENOZZI & CONIGLIO, 2010).

É importante levar em consideração vários princípios gerais ao avaliar como as medições de biomarcadores podem colaborar com os progressos da ciência, como criar estratégias para avaliar riscos, e ajudar na atenção médica. O primeiro passo para avaliar um biomarcador é saber se sua concentração é diferente em pessoas afetadas por determinada enfermidade, com relação às pessoas que não possuem esta enfermidade (MYERS, 2010).

O processo de seleção e validação dos biomarcadores requer cuidado em relação à especificidade e sensibilidade, assim como a medida da lesão ocorrida (AMORIM, 2003).

Segundo Benozzi & Coniglio (2010), um fato importante é que para entender a diferença entre biomarcadores e fator de risco deve ser considerado que este último deve estar associado com a doença e participar da causa que conduz a mesma, e o biomarcador é estatisticamente associado com a doença mas não se conhece sua relação com a causa.

De acordo com Amorim (2003), para que uma substância química, seu metabólito ou uma alteração biológica sejam validados e/ou propostos como biomarcadores é desejável que o mesmo apresente as seguintes características:

→ A quantificação do indicador deve:

- refletir a interação (qualitativa ou quantitativa) do sistema biológico com a lesão;

- ter conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade para a interação;

- ser reproduzível qualitativamente e quantitativamente;

→ Estar contido em um meio biológico acessível de análise, considerando a necessidade de manutenção da integridade da amostra entre a coleta e o procedimento analítico, e de preferência não ser invasivo.

→ A medição analítica tem que apresentar exatidão e precisão adequados.

→ Conhecer os valores normais do indicador em populações não expostas a determinada lesão, assim como as variações intra e interindividuais.

5 AS PROTEÍNAS S100

A família S100 existe na forma homo ou heterodiméricas constituindo duas subunidades, A1 e B. S100B é predominantemente encontrada no cérebro, células gliais, e células de schwann; S100A1B nas células gliais, mas não nas células de Schwann; S100A é encontrada nos músculos, coração e rins (ETTINGER *et al.*, 1999).

A família S100 foi, originalmente, caracterizada como um grupo de pequenas proteínas citosólicas diméricas do tipo ligadora de cálcio. Esta família de proteínas tem peso aproximado de 21kDa, existe em várias formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β , e estão em abundância em tecido nervoso (OLIVEIRA; IKUTA; RAGNER, 2008). Cada membro desta família tem um padrão único de expressão e, aproximadamente 50% delas, possuem a mesma sequência de aminoácidos. As propriedades físicas e estruturais da família S100 sugerem que sejam ativadoras, ao contrário de outras ligantes de cálcio (Ca^{2+}) que atuam como tampões. A afinidade pelo cálcio é, entretanto, um importante parâmetro, no qual pode ser influenciado através da ligação com o zinco (Zn^{2+}), aumentando a

afinidade, ou o potássio (K^+), diminuindo-a. Entre elas estão a S100A6, S100B e a calgranulin C, nas quais mais se observou tal atividade (MARTINS, 2005).

Várias evidências indicam que os membros da família de proteínas S100 desempenham papéis reguladores dentro das células e exercem efeitos reguladores nas células-alvo, uma vez liberadas no espaço extracelular (DONATO, 2003).

A maioria das proteínas S100 são conhecidas por formar um homodímero, ou um heterodímero com outros membros S100 (ETTINGER *et al.*, 1999), e interagir com uma ampla gama de proteínas envolvidas principalmente no citoesqueleto e proliferação celular. Muitas proteínas S100 têm fortes implicações médicas, por exemplo, resposta inflamatória, artrite reumatóide, câncer e condições neurológicas (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011).

O nome S100 refere-se ao fato de que estas proteínas são solúveis em solução 100% saturada de sulfato de amônio (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

Atualmente, está descrito que S100 é uma família multigênica de proteínas ligantes de cálcio com 25 membros já discriminados, exclusivamente expressos em vertebrados, que estão implicados nas mais variadas funções, tanto intracelulares como extracelulares (MARTINS, 2005; SORCI *et al.*, 2010b). A ligação do íon Ca^{2+} a estas proteínas provoca mudanças conformacionais e levam à exposição de resíduos hidrofóbicos, que parecem ser o sítio de ligação das proteínas efetoras. Esta interação resulta na alteração da atividade da proteína efetora e, posteriormente, numa resposta celular (PORTELA, 2002).

Com exceção da S100G que é monomérica, todas as outras proteínas da família S100 existem dentro das células como dímeros (principalmente homodímeros e heterodímeros) (SORCI *et al.*, 2010a).

De acordo com Donato (2003), intracelularmente as proteínas S100 têm sido implicados na regulação de fosforilação de proteínas, na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, na homeostase de Ca^{2+} , na atividade enzimática, nos fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, e na resposta inflamatória.

5.1 As Proteínas S100B

A S100B é uma pequena proteína citosólica dimérica, do tipo ligadora de cálcio (CHAVES *et al.*, 2010; KÖVESDI *et al.*, 2009). Ela tem peso aproximado de 21 kDa e existe em várias formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008). A forma β , que é chamada de S100B, é altamente específica para o tecido do SNC, encontrada nas células da glia, astrócito e células de Schwann, e algumas populações de neurônios (MARTINS, 2005; PORTELA, 2002; S100B PROTEIN, 2009). Contudo, também pode ser encontrada em células de melanoma maligno e em outros tecidos, como o adiposo (OLIVEIRA, IKUTA, RAGNER, 2008; S100B PROTEIN, 2009).

A S100B também é expressa em células fora do cérebro, como melanócitos, adipócitos, condrócitos, células de Schwann, células gliais do aparelho gastrointestinal, células dendríticas e células do músculo esquelético. Cardiomiócitos não expressam S100B, mas no infarto sob a ação de catecolaminas a S100B é expressa por estas células (HERRMANN *et al.*, 2001).

A proteína S100B foi o primeiro membro da família de proteínas S100 a ser identificado, e representa 0,2% do total das proteínas solúveis do cérebro (ETTINGER *et al.*, 1999; SORCI *et al.*, 2010a). S100B é encontrada exclusivamente em vertebrados e tem atividades de regulação tanto como uma proteína intracelular quanto extracelular. Nas células, S100B está envolvida na transdução de sinal, pois inibe a fosforilação de proteínas, regula a atividade das enzimas e está envolvida na homeostase de Ca^{2+} . Além disso, S100B interage com proteínas do citoesqueleto e está envolvida na regulação da morfologia celular (DONATO & HEIZMANN, 2010; THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011).

De acordo com Lima & Colaboradores (2005), S100B é produzido e liberado predominantemente pelos astrócitos em condições patológicas e fisiológicas. Dependendo de sua concentração extracelular, S100B pode desempenhar um papel trófico ou tóxico em neurônios e células gliais. Um aumento nos níveis de S100B no líquido céfalo-raquidiano e no soro está relacionado com gliose reativa (produção de uma rede fibrosa densa de neurógliia; inclui astrocitose, que é uma proliferação de astrócitos na área de uma lesão degenerativa) e morte astrocitária. Portanto, S100B tem sido usado como um marcador de danos das

células gliais e em vários distúrbios neurológicos como a lesão cerebral traumática, acidente vascular cerebral, parada cardíaca, cirurgia cardíaca e doenças infecciosas.

5.1.1 A S100B Intracelular e Extracelular

A S100B é encontrada em vertebrados e tem atividades de regulação tanto como uma proteína intracelular quanto extracelular (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011).

No meio intracelular, a S100B está envolvida na transdução de sinal, pois inibe a fosforilação de proteínas, regula a atividade das enzimas e está envolvida na homeostase do Ca^{2+} (CIRILLO *et al.*, 2010; THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011). A S100B também está associada ao metabolismo energético; na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, e na proliferação e diferenciação celular (Figura 1) (DONATO, 2003; DONATO & HEIZMANN, 2010; SORCI *et al.*, 2010b), no entanto, há poucas informações sobre os mecanismos moleculares (SORCI *et al.*, 2010b).

A grande variedade das atividades celulares regulada pela S100B pode ser explicada pela abundância da proteína S100B, que é expressa e localizada no citoplasma das células. Assim, a causa da maior expressão da S100B nas células melanomas está relacionada com a progressão do tumor, uma vez que a S100B não apenas interage com o supressor de tumor, p53, bloqueando sua fosforilação, mas também regulando sua expressão (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011; SORCI *et al.*, 2010a). Além disso, Sorci & Colaboradores (2010a), demonstraram que o bloqueio farmacológico da atividade da S100B pela pentamidine, uma droga que interrompe a interação S100B-p53, resulta numa significativa inibição do crescimento do tumor.

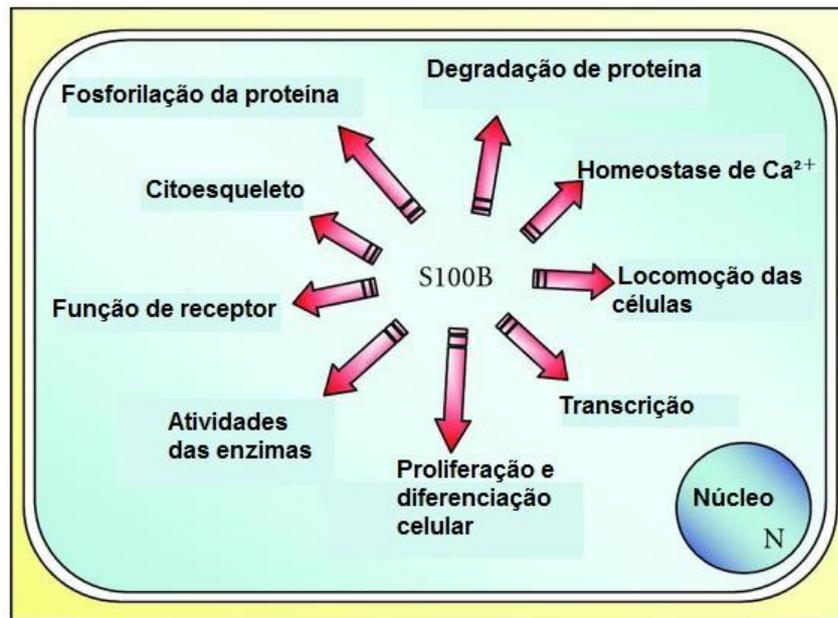


Figura 1 - Representação esquemática dos efeitos regulatórios intracelulares da S100B.

Adaptado de Donato & Heizzman, 2010.

Extracelularmente, S100B está presente em, por exemplo, soro e líquido espinhal. A S100B extracelular exerce um duplo efeito sobre os neurônios dependendo de sua concentração, ou seja, exerce um efeito pró-sobrevivência nos neurônios com estimulação nos neuritos em baixas concentrações, e um efeito tóxico em altas concentrações causando morte neuronal por apoptose (DONATO, 2003). A S100B extracelular desempenha uma função na neuroinflamação. De fato, S100B tem mostrado ativação da microglia, dos macrófagos residentes no cérebro, ainda que em altas concentrações (CIRILLO *et al.*, 2010; SORCI *et al.*, 2010b).

De acordo com Donato e Heizmann (2010), e com Sorci & colaboradores (2010b), os astrócitos secretam a S100B, e sua secreção pode ser estimulada ou reduzida por um número de fatores ou condições. Os efeitos pró-sobrevivência ou pró-morte da S100B requerem a interação com a estimulação da proteína RAGE. A RAGE é um receptor multiligante de uma superfamília de imunoglobulinas envolvidas com a resposta imune inata; entretanto, RAGE também desempenha uma função importante no desenvolvimento do tecido (Figura 2). Além disso, baixo nível de S100B protege células neuronais da toxicidade de agonistas B-amiloide via engajamento de RAGE. Entretanto, alta na concentração de S100B causa excessiva

estimulação de RAGE nas células neuronais resultando na superprodução de espécies reativas de oxigênio, causando apoptose.

A S100B parece tanto estimular proliferação de mioblastos como inibir a diferenciação dessas células. Sob certas condições, por exemplo, após cirurgia cardíaca, parada cardíaca, acidente vascular cerebral, ou dano cerebral, os níveis de S100B no líquido extracelular aumenta para níveis tóxicos. Parece que nesta situação, a interação com RAGE causa os efeitos tóxicos do S100B (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011).

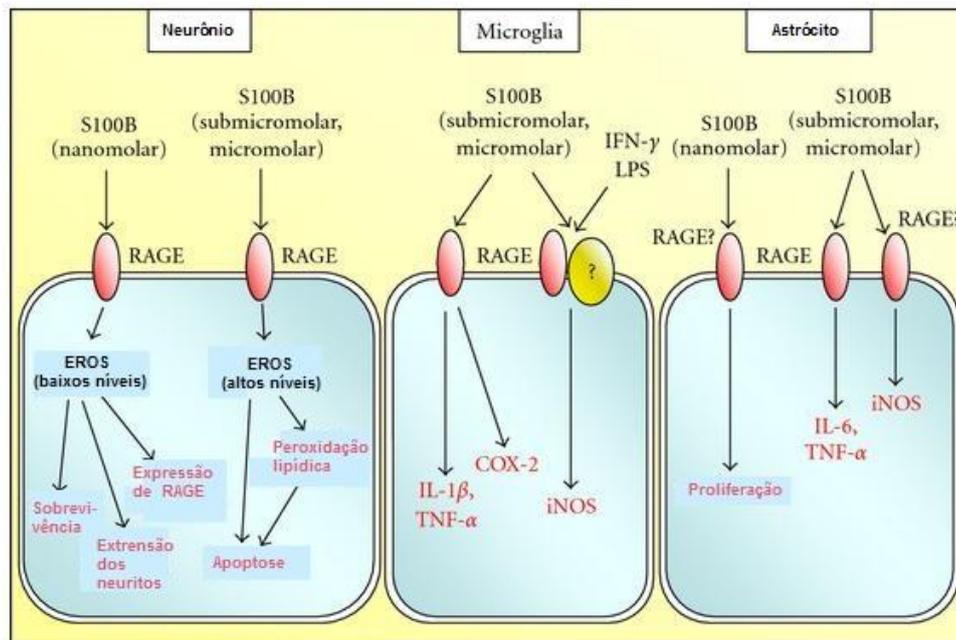


Figura 2 - Representação esquemática dos efeitos regulatórios extracelulares da S100B nos neurônios, microglia, e astrócitos.

Adaptado de Donato & Heizzman, 2010.

5.1.2 A S100B como Marcador de Lesão Cerebral

Lesão cerebral é um termo amplo que descreve uma variedade de insultos que ocorrem no cérebro. Causas comuns de lesão cerebral incluem trauma, acidente vascular cerebral, tumores cerebrais, infecções, envenenamento, hipóxia, isquemia e abuso de drogas (HERRMANN *et al.*, 2001).

Para pessoas normais os níveis da proteína S100B no sangue são muito baixos. A S100B é um marcador altamente sensível e específico para a disfunção do SNC, e concentrações elevadas de S100B no soro têm sido relatados após traumatismo crânio-encefálico e AVC (ETTINGER *et al.*, 1999). Seu mecanismo de liberação é incerto, mas é provavelmente devido à liberação pelas células danificadas e/ou pela secreção devido à ativação de células gliais (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011).

De acordo com Einav & colaboradores (2008), altas concentrações séricas de S100B têm sido relacionadas com evidência clínica de danos no SNC nos três modelos aceitos de lesão cerebral em humanos: trauma, isquemia e hipóxia. Concentrações significativamente mais elevadas de S100B têm sido demonstrada em morte encefálica e, em não sobreviventes de parada cardiorespiratória, quando comparados aos sobreviventes.

Níveis elevados de S100B tem sido relatados após trauma crânio-encefálico, acidente vascular encefálico, hemorragia subaracnóide e no pós-operatório de cirurgia cardíaca, quando evolui com complicações neurológicas. A S100B também se mostrou elevada em pacientes com choque hemorrágico, estando relacionada com a gravidade do choque e hipoperfusão. Os mecanismos básicos que levam ao aumento sérico da S100B no trauma crânio-encefálico permanecem desconhecidos. Não está claro se a liberação da proteína depende de dano celular irreversível ou se pode ocorrer após lesão menos severa (LIMA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

Embora o papel fisiológico da proteína S100B ainda não seja totalmente conhecido, está bem descrito que seus níveis no sangue e no líquido céfalo-raquidiano estão aumentados em vários distúrbios agudos e crônicos envolvendo o SNC (MARTINS, 2005). Tem sido demonstrado que a quantificação dos níveis da proteína S100B em líquido céfalo-raquidiano e sangue se correlaciona com a intensidade e a extensão das injúrias ao SNC, o que permite sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano ou disfunção cerebral. Os níveis periféricos no líquido céfalo-raquidiano e no sangue podem refletir a reatividade glial à injúria cerebral, bem como alterações na barreira hematoencefálica (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; PORTELA, 2002).

As alterações séricas nos níveis da proteína estão mais comumente relacionadas com diversos fatores que afetem sua síntese, distribuição, e

metabolismo no SNC, incluindo dano astrocítico agudo e gliose reativa, bem como podem refletir alterações na barreira hematoencefálica (CHAVES *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2006). Sabe-se que há uma relação diretamente proporcional entre os níveis de S100B em líquido céfalo-raquidiano e sangue e a intensidade e extensão da injúria cerebral, permitindo, então, utilizar esta proteína como marcador bioquímico de dano, ou disfunção, cerebral (MARTINS, 2005).

O pico máximo de concentração da proteína ocorre 20 minutos após o dano cerebral, sendo ela metabolizada no rim e excretada na urina (meia-vida aproximada entre 30 e 113 minutos). A proteína pode ser medida em sangue arterial ou venoso, não é afetada por hemólise, e se mantém estável por horas, sem necessidade de centrifugação e congelamento imediatos da amostra. Níveis elevados de S100B após traumatismo crânio-encefálico também podem ser medidos no líquido céfalo-raquidiano (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

S100B não é específico para lesão cerebral. Um aumento de suas concentrações séricas é encontrado em pacientes com melanoma, lesões renal e hepática, inflamação e infecção (S100B PROTEIN, 2009). A proteína S100B também pode ser um marcador para a doença de Alzheimer, síndrome de Down, demência, epilepsia e tumor cerebral. Recentemente, níveis elevados de S100B têm sido descritos após operações cardíacas complexas, complicadas ou não, por uma lesão neurológica (ETTINGER *et al.*, 1999). O aumento da quantidade de S100B também é detectada em tumores, por exemplo, em melanoma maligno, e a concentração de S100B se correlaciona com a gravidade da doença (THULIN, KESVATERA, LINSE, 2011).

Há evidências experimentais de que a secreção de S100B pelos astrócitos possa ser um processo ativo. Como a S100B tem meia-vida de aproximadamente 2 horas, seus valores aumentados devido ao dano cerebral primário devem retornar aos níveis basais dentro de 12 a 24 horas. Portanto, o acompanhamento diário da dosagem de S100B tem grande relevância clínica, pois níveis de S100B em elevação ou persistentemente altos sinalizam dano cerebral secundário (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

Devido à meia-vida curta de S100B no soro, o conhecimento do tempo da lesão é importante para a interpretação precisa do resultado (S100B PROTEIN, 2009)

A variabilidade da medida de S100B relacionada a sexo e idade não é significativa (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008). Em recém-nascidos, a concentração normal é elevada, e há estudos abordando ajuste de concentração em faixas etárias. A maioria dos estudos incluiu apenas pacientes com 18 anos de idade ou mais (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

6 A ENOLASE NEURÔNIO ESPECÍFICA (NSE)

A NSE é uma enzima glicolítica que é encontrada no citoplasma de neurônios e em células com diferenciação neuroendócrinas, bem como em tumores originados a partir delas, bem como melanomas (HERRMANN *et al.*, 2001; KESSLER *et al.*, 2007; KÖVESDI *et al.*, 2009). A proteína possui uma forma dimérica composta por duas subunidades γ que converte 2-fosfo-D-glicerato em fosfoenolpiruvato (LIMA *et al.*, 2006; RECH *et al.*, 2006). É funcionalmente ativa como um heterodímero formado por subunidade α , β e γ . As isoenzimas enolases neurais específicas estão presentes quase que exclusivamente no citoplasma dos neurônios (isoenzima γ - γ) e células neuroendócrinas (isoenzima α - γ) (CHAVES *et al.*, 2010; OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

A NSE é uma proteína que é funcionalmente ativa como um heterodímero formado a partir de uma combinação de três subunidades: α , β e γ . As isoenzimas γ - γ e α - γ são referidas como NSE, pois inicialmente pensava-se que estas isoenzimas eram exclusivamente encontradas em neurônios. No entanto, foi posteriormente demonstrado que as células neuroendócrinas e várias células não-neurais e não-neuroendócrinas também continham NSE. Em contraste com os neurônios que expressam a isoenzima γ - γ , células não-neuronais contêm predominantemente a isoenzima α - γ (LIMA *et al.*, 2006).

Fisiologicamente, a NSE não é secretada, sendo que o aumento de seus níveis no soro e no líquido céfalo-raquidiano podem sinalizar danos estruturais para as células neuronais, como tem sido relatado em pessoas com trauma no cérebro, sendo considerada uma proteína marcadora de morte neuronal (KESSLER *et al.*, 2007; KÖVESDI *et al.*, 2009; PORTELA, 2002).

As concentrações encefálicas de NSE variam de 0,4% a 2,2% e podem representar até 4% do total de proteínas solúveis em alguns neurônios. Em cérebros adultos, altas concentrações de NSE são encontradas na substância cinzenta, ao passo que são baixas as concentrações na substância branca (RECH, VIEIRA, BRAUNER, 2006; LIMA *et al.*, 2004). A NSE também está presente em hemácias e mesmo mínima hemólise pode aumentar a NSE sérica (OLIVEIRA, IKUTA, RAGNER, 2008).

Segundo Lima & colaboradores (2004), a presença da NSE nos glóbulos vermelhos é clinicamente relevante, pois mesmo uma pequena quantidade de hemólise em torno de 2% pode aumentar cinco vezes os níveis de NSE no soro.

A massa molecular da NSE é de 78kDa e sua meia-vida biológica é provavelmente superior a 20 horas (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008; RECH *et al.*, 2006). Além de ser expressa seletivamente em neurônios, NSE tem uma alta estabilidade nos fluídos biológicos e, como são proteínas citoplasmáticas solúveis, pode facilmente ser difusa para o meio extracelular e líquido cefalorraquidiano quando ocorre algum ferimento às membranas neuronais. Assim, medidas de NSE pode ser um marcador atraente de dano neuronal (LIMA *et al.*, 2006; RECH, VIEIRA, BRAUNER, 2006).

6.1 A Enolase Neurônio Específica (NSE) como Marcador de Lesão Cerebral

Juntamente com a S100B, a NSE é considerada um dos marcadores mais promissores de dano cerebral (HERRMANN *et al.*, 2001; OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008; BÖHMER *et al.*, 2011).

A NSE é o único marcador que avalia diretamente dano funcional aos neurônios. Ela é liberada passivamente por destruição celular e suas concentrações aumentadas, após dano neural, podem ser mensuradas em sangue periférico ou líquido céfalo-raquidiano. A especificidade da NSE é alta e a variabilidade relacionada a sexo e idade é baixa. Um dos principais problemas associados com seu uso como marcador de dano cerebral é a hemólise. Os eritrócitos contêm grande quantidade de NSE e a hemólise pode, portanto, causar um marcado aumento de NSE no sangue (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

Os níveis de NSE aumentados foram encontrados no sangue e no líquido céfalo-raquidiano de pacientes com AVC, hemorragia intracerebral e após ressucitação cardio-pulmonar (RECH, VIEIRA, BRAUNER, 2006). A NSE também aumenta e se associa com lesão cerebral em pacientes com sepse grave e choque séptico. Células tumorais nos APUDomas, neuroblastomas e carcinomas de pequenas células pulmonares são capazes de produzir NSE e elevar os níveis séricos desta proteína. Por essa razão, a dosagem sérica de NSE tem sido estabelecida como um marcador sérico diagnóstico e prognóstico no manejo clínico dessas neoplasias (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

As concentrações séricas elevadas de NSE são encontradas no traumatismo crânio-encefálico, se correlacionando com a gravidade da lesão (BÖHMER *et al.*, 2011). No traumatismo crânio-encefálico grave, a NSE sérica correlaciona-se com desfecho clínico. Normalmente, ela aumenta nas primeiras 12 horas após o trauma e então diminui nas próximas horas e dias. Aumentos secundários podem ocorrer em pacientes que evoluem com desfecho fatal (OLIVEIRA, IKUTA, REGNER, 2008).

Um estudo demonstrou recentemente, que os níveis de NSE aumentam durante as primeiras 48 horas na maioria dos pacientes com parada cardiorrespiratória, mas diminuem a valores muito baixos logo a seguir nos sobreviventes, o que não acontece nos não sobreviventes, que vão apresentar pico nas 96 horas. Isso parece ser o resultado de uma lesão encefálica mais extensa e persistente nos não sobreviventes (RECH, VIEIRA, BRAUNER, 2006).

Sua maior restrição como marcador de dano cerebral está no fato de estar presente em altas concentrações nos eritrócitos e plaquetas, e, portanto, a hemólise e lise plaquetária podem prejudicar a análise e interpretação dos resultados (PORTELA, 2002).

7 MÉTODOS DE DOSAGEM DA PROTEÍNA S100B

O valor de S100B como um indicador de lesão neurológica na prática clínica é de uso limitado pelos seguintes fatores: custo relativamente alto e tempo longo do ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)

(atualmente considerado o melhor método de análise); pela pouca comprovação dos níveis de referência; pela falta de padronização dos testes de dosagem da S100B no soro; e pela escassez de dados sobre a relação entre os métodos de medição. A maioria dos estudos que demonstraram o valor potencial de diagnóstico da S100B sérica em doenças neurológicas utilizou um método ELISA. Recentemente tornou-se disponível no mercado um kit para a quantificação rápida dos níveis de S100B no soro humano (Roche Pharmaceuticals, Elecsys) (EINAV *et al.*, 2008).

EINAV & Colaboradores (2008) descrevem em seu estudo um comparativo entre os métodos de dosagem da proteína S100B usando os seguintes testes: ELISA e Elecsys®.

Para estes testes as amostras de sangue foram permitidas coagular por 30 minutos a temperatura ambiente e depois centrifugadas por 15 minutos. As amostras de soro foram armazenadas a temperatura de -70°C por mais ou menos 3 meses para posterior análise. As amostras de soro foram descongeladas a temperatura ambiente, divididas em 2 alíquotas e analisadas em paralelo pelo ELISA e pelo Elecsys®. Soro diluído foi usado para os valores mais elevados em ambos os testes.

ELISA: Os testes foram realizados usando o Sangtec ELISA 100 para dosagem quantitativa da proteína S100B no soro humano. Cada amostra foi incubada em conjunto com um marcador apropriado. Para realização do teste foi utilizado um tampão e a tetrametilbenzina (TMB) foi adicionada como um substrato. Após a incubação mais uma substância TMB foi adicionada. Um espectrofotômetro realizou a leitura da absorbância de luz a 450nm. A faixa de cálculo é exata para a concentração de 5µg/L.

Elecsys®: Os testes foram realizados usando o kit reagente Roche Elecsys® S100 (teste com duração de 18 minutos, faixa de medição 0,005-39µg/L, reatividade cruzada com S100α < 1%). Menos de 24 horas antes do teste foi feita a calibração do teste com os reagentes do kit e os valores dos controles foram determinados dentro dos limites requeridos pela calibração (0,206µg/L e 2,54µg/L). O teste do kit é baseado no princípio do “sanduíche”; a 1ª incubação foi realizada com um anticorpo monoclonal biotilado S100-específico marcado com um complexo de rutênio reagindo para formar um complexo “sanduíche”. A 2ª incubação: Após adição de micropartículas revestidas com estreptovidina o complexo torna-se ligado a fase sólida pela interação da biotina com a streptovidina.

A mistura da reação é aspirada nas células de medição onde as micropartículas são magneticamente capturadas na superfície do eletrodo. As substâncias não ligadas são então removidas. A aplicação de uma voltagem ao eletrodo induz emissão de quimioluminescência que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados por meio de uma curva de calibração que é o instrumento especificamente gerado por 2 pontos de calibração e uma curva principal de um reagente código de barras.

Einav & Colaboradores (2008) concluíram em seu trabalho que embora exista uma relação linear entre as concentrações séricas de S100B pelo ELISA e por um kit comercialmente disponível, as medições por ELISA tendiam a ser maior do que as medidas pelo kit comercial, particularmente em concentrações acima de 0,7µg/L, que são sugestivos de lesão cerebral. Sugeriram então que uma padronização internacional entre os métodos de dosagem de S100B é necessária para a avaliação eficaz da validade preditiva da S100B na prática clínica.

Portela (2002) usou em seu trabalho para a dosagem da proteína S100B o ensaio luminométrico monoclonal (LIA-mat Sangtec 100; SangTec Medical). Para este teste todas as amostras de sangue foram coletadas sem anticoagulante por punção venosa. O soro foi obtido por centrifugação, e logo depois, foi congelado a -70°C até análise. A S100B sérica foi medida usando o ensaio referido acima, em um luminômetro.

O ensaio é uma reação que consiste de um “duplo sanduíche” de anticorpos. Amostras de soro e calibradores (100µL de cada) são diluídos com 100µL de soro bovino em tubos de ensaio. Estes tubos são revestidos com anticorpo anti-S100B (três anticorpos monoclonais: SMST12, SMSK 25, e SMSK 28). Após incubação por 1 hora, os tubos são lavados três vezes com tampão de lavagem, e 200µL de um anticorpo marcado com o marcador isoluminol é adicionado em cada tubo. Depois de um adicional de 2 horas de incubação, durante o qual este anticorpo ligado ao imobilizado S100B, o marcador não ligado é lavado e o anticorpo residual é medido em um luminômetro. A concentração da proteína S100B é calculada por comparação com a curva de calibração com base no total de luminescência para cada calibrador indicado. O limite de detecção do ensaio é de 0,02µg/L, como fornecido pelo fornecedor do ensaio SangTec 100 LIA-mat.

De acordo com Ettinger & Colaboradores (1999), o ensaio SangTec 100 LIA-mat é um sensível teste imunoluminométrico para dosar S100B no soro com alta

sensibilidade ($<0,02$ ng/mL). Entretanto, estes testes para dosagem de S100B demoram aproximadamente 3 a 4 horas para serem executados e exigem um luminômetro ou um contador de cintilação para quantificação. Para muitas aplicações, como o monitoramento dos níveis de S100B durante uma cirurgia cardíaca, ou avaliar a gravidade de um trauma crânio-encefálico, AVC, ou consequências de uma parada cardíaca, há a necessidade de um teste rápido, simples, que pode fornecer resultados em menos de 20 minutos em um formato simples de ensaio. No estudo citado, é descrito um rápido, simples e sensível teste, o Imunoensaio Optico (OIA, BioStar, Inc, Boulder, CO), para a identificação de níveis elevados de sangue nos pacientes. Este teste é potencialmente útil para avaliação de pacientes com suspeita de lesão cerebral decorrente de isquemia cerebral devido a um AVC, trauma crânio-encefálico ou complicações cirúrgicas.

O teste de Imunoensaio Optico combina anticorpos monoclonais específicos para S100B com uma fina tecnologia de filme OIA. As superfícies do OIA foram revestidas com dois anticorpos anti S100B, SMSK 25 e SMSK 28, e o anticorpo SMST 12 foi conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente. Para determinar o limite de detecção de S100B em sangue total, amostras de sangue de diferentes indivíduos saudáveis foram incrementadas com S100A1B bovino. O formato de ensaio simultâneo combina a exposição da amostra ao anticorpo na superfície e para o conjugado HRP em solução. Cem microlitros da amostra foi diluída em metanol e incubadas por 3 minutos. Uma gota de conjugado (35 μ L) foi adicionada a amostra diluída, e 1 gota (35 μ L) de substrato TMB foi adicionada e incubada por 5 minutos. A superfície foi lavada, apagada, e os resultados foram lidos visualmente e por elipsometria (técnica que se usa para determinar as propriedades de um material a partir das características da luz refletida por sua superfície). Todo o procedimento foi completado em 18 minutos. A quantidade da S100B em amostras clínicas foi estimada visualmente pela OIA, em comparação com uma curva padrão, e medidas quantitativamente usando a comparação com a elipsometria. A curva padrão foi calculada adicionando S100A1B bovina ao soro de indivíduos saudáveis, e o teste OIA foi realizado como descrito acima. Para estimar a quantidade de S100B nas amostras clínicas, os resultados da OIA foram comparados visualmente com os resultados da curva padrão. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e o teste foi realizado utilizando sangue heparinizado.

8 MÉTODOS DE DOSAGEM DA ENOLASE NEURÔNIO CEREBRAL (NSE)

Fanego & Colaboradores (2009) em seu estudo analisaram a quantidade de NSE em recém nascidos. Para este teste foram coletadas amostras de soro no momento do nascimento e nas 72 horas seguintes. As amostras permaneceram congeladas em alíquotas a -30°C até o momento de sua utilização. A determinação dos níveis da NSE foi realizada por um método imunoenzimático tipo ELISA, NSE EIA DRG Diagnosticis GmbH (Alemanha).

O método é um ensaio imunoenzimático de fase sólida, não competitivo, que utiliza como base a reação de dois anticorpos monoclonais derivados de camundongos contra dois determinantes antigênicos separados da molécula da Enolase. O anticorpo monoclonal utilizado se une com a subunidade γ da enzima, e desta forma é capaz de se detectar as isoformas $\gamma\gamma$ e $\gamma\alpha$. Os controles e as amostras de soro dos pacientes foram incubadas junto com um anticorpo Mab E21 anti-NSE biotilado e com peroxidase marcada com o anticorpo monoclonal MabE17 anti-NSE nas tiras de microplacas revestidas com estreptavidina. Depois de lavado, se adicionou o substrato cromógeno (peróxido de hidrogênio com TMB) a cada poço da placa de ELISA e foi produzida uma reação enzimática correspondente. Desenvolve-se uma coloração azul e sua intensidade depende da quantidade de NSE presente na amostra.

A placa de microtitulação é lida em espectrofotômetro a 620nm. A curva padrão é construída para cada execução, medindo-se a absorbância contra os valores de concentração de cada padrão. Foram obtidos os resultados e lidos a partir de correspondências com a curva padrão.

Em estudo de Herrmann & Colaboradores (2001), para a dosagem da NSE, o sangue foi permitido coagular e depois centrifugado por 10 minutos para obtenção do soro. Após 30 minutos da coleta o soro foi congelado a -78°C e armazenado para posterior análise. A análise da NSE também foi baseada em anticorpos monoclonais que se ligam a subunidade γ da enzima. A sensibilidade do ensaio é relatada ser abaixo de $1,0 \mu\text{g/L}$.

9 DISCUSSÃO

Marcadores periféricos de dano ou disfunção de órgãos como rins, próstata, fígado e coração, têm sido ao longo dos anos amplamente utilizados com muito sucesso na prática médica. Entretanto, no que diz respeito ao cérebro, fatores como a sua complexidade de funções, compartimentalização e distribuições celulares, bem como a influência da barreira hematoencefálica, impõem consideráveis dificuldades na interpretação dos níveis de marcadores de dano cerebral no líquido céfalo-raquidiano e no sangue. (PORTELA *et al.*, 2002).

A partir da revisão bibliográfica apresentada no presente estudo, verifica-se que a enzima NSE e a proteína S100B são marcadores de lesão cerebral muito utilizados na atualidade, pois vários estudos demonstram que essas proteínas são consideradas promissoras marcadoras de lesão cerebral.

A S100B se mostrou altamente sensível para detectar lesão cerebral, sendo hoje muito utilizada na prática médica. De acordo com Einav & Colaboradores (2008), altas concentrações séricas de S100B têm sido relacionadas com evidência clínica de danos no SNC nos três modelos aceitos de lesão cerebral em humanos: trauma, isquemia e hipóxia. Entretanto, a presente revisão demonstrou que ela não é específica para este tipo de lesão, sendo que seus níveis elevados são encontrados em alguns outros casos, tais como: melanoma, lesões renal e hepática, inflamação e infecção (KÖVESDI *et al.*, 2009). Além disso, outro importante fator da utilização da proteína S100B como marcadora de lesão cerebral, é que sua meia-vida é pequena, sendo necessário que a coleta da amostra (sangue ou líquido céfalo-raquidiano) seja feita logo após a lesão cerebral. Segundo Oliveira & Colaboradores (2008), como a S100B tem meia-vida de aproximadamente 2 horas, seus valores aumentados devido ao dano cerebral primário devem retornar aos níveis basais dentro de 12 a 24 horas. Portanto, o acompanhamento diário da dosagem de S100B tem grande relevância clínica, pois níveis de S100B em elevação ou persistentemente altos sinalizam dano cerebral secundário.

Contudo, apesar da proteína S100B ter demonstrado ser um marcador inespecífico para se evidenciar dano ou disfunção no SNC, medidas dos níveis da proteína S100B tem grande sensibilidade para detectar uma resposta cerebral inespecífica. Outra característica importante é que a proteína pode ser medida em

sangue arterial ou venoso, não é afetada por hemólise, e mantém-se estável por horas, sem necessidade de centrifugação e congelamento imediatos da amostra.

Do mesmo modo, a dosagem da enzima NSE vem sendo amplamente utilizada na prática médica para determinar lesão cerebral, sendo esta altamente específica para este tipo de lesão. De acordo com Oliveira & Colaboradores (2008), a NSE é o único marcador que avalia diretamente dano funcional aos neurônios. Entretanto, sua maior restrição como marcadora de lesão cerebral é que ela está presente em altas concentrações em hemácias e plaquetas, podendo prejudicar a análise e interpretação dos resultados (PORTELA, 2002).

Para ambos marcadores de lesão cerebral, não há variabilidade relacionada a sexo e idade, e seus níveis séricos estão diretamente relacionados a extensão da lesão, o que reforça a grande importância de suas dosagens para a prática médica.

10 CONCLUSÃO

A partir da revisão bibliográfica realizada, pôde-se observar que apesar de algumas restrições quanto a utilização da S100B e da NSE, estas proteínas são os marcadores de lesão cerebral mais promissores da atualidade.

O estudo demonstrou também que há hoje no mercado a disponibilidade de testes bastante sensíveis e específicos para a dosagem sérica dessas proteínas, porém com algumas limitações, tais como: custo, padronização da técnica, padronização de valores de referência, ou tempo elevado para realização.

Assim, embora a S100B e a NSE se mostrarem ótimos marcadores de lesão cerebral, há a necessidade de estudos adicionais para a identificação de outros marcadores de lesão cerebral altamente específicos e sem restrições de uso para este fim. Ou, a investigação de métodos que resultem em dados mais seguros a partir da dosagem de S100B ou NSE. Além disso, há a necessidade de uma padronização internacional entre os métodos de dosagem destas proteínas para suas validades preditivas na prática clínica.

REFERÊNCIAS

AMORIN, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. Minas Gerais, Brasil, v. 6, n. 2, p. 158-170, 2003.

BENOZZI, S.; CONIGLIO, R. I. Ateroclerosis: biomarcadores plasmáticos emergentes. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**. Rio Negro, Argentina, v. 44, n. 3, p. 317-328, 2010.

BÖHMER, A. E.; OSES, J. P.; SCHMIDT, A. P.; PERÓN, C. S.; KREBS, C. L.; OPPITZ, P. P.; D'AVILA, T. T.; SOUZA, D. O.; PORTELA, L. V.; STEFANI, M. A. Neuron-Specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictor in patients with severe traumatic brain injury. **Neurosurgery**. Porto Alegre, RS, BRASIL, v. 68, n. 6, p. 1624-1630, 2011.

CHAVES, M. L.; CAMOZZATO, A. L.; FERREIRA, E. D.; PIAZENSKI, I.; KOCHHANN, R.; DALL'IGNA, O.; MAZZINI, G. S.; SOUZA, D. O.; PORTELA, L. V. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. **Journal of Neuroinflammation**. Porto Alegre, RS, Brasil, v. 7, n. 6, p. 1-7, 2010.

CIRILLO, C.; SARNELLI, G.; ESPOSITO, G.; TURCO, F.; STEARDO, L.; CUOMO, R. S100B protein in the gut: The evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. **World Journal of Gastroenterology**. Naples, Italy, v. 17, n. 10, p. 1261-1266, 2010.

DONATO, R. Intracellular and Extracellular Roles of S100 Proteins. **Microscopy Research and Technique**. Perugia, Italy, v. 60, p. 540-551, 2003.

DONATO, R.; HEIZMANN, C. W. S100B protein in the nervous system and cardiovascular apparatus in normal and pathological conditions. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**. Perugia, Italy, p. 1-2, 2010.

EINAV, S.; ITSHAYEK, E.; KARK, J. D.; OVADIA, H.; WEINIGER, C. F.; SHOSHAN, Y. Serum S100B levels after meningioma surgery: A comparison of two laboratory assays. **BioMed Central Clinical Pathology**. Jerusalém, Israel, v. 8, n. 9, p. 1-7, 2008.

ETTINGER, A.; LAUMARK, A. B.; OSTROFF, R. M.; BRUNDELL, J.; BAUMGARTNER, W. A.; RAZUMOVSKY, A. Y. A new optical immunoassay for detection of S-100B protein in whole blood. **The Annals of Thoracic Surgery**. Bromma, Sweden, n. 68, p. 2196-2201, 1999.

FANEGO, R. B.; CONTRERAS, A. D.; GARCÍA, E. N.; DOCAL, B. P.; PORTAL, L. P.; HERNÁNDEZ, A. G. Enolasa específica de neurona em dos recién nacidos com depresión ligera al nacer. **Revista Cubana de Pediatría**. La Habana, Cuba, v. 81, n. 1, p. 1-9, 2009.

FIGUEIREDO, L. F. P.; BIBERTHALER, P.; FILHO, C. S.; HAUSER, C.; MUTSCHLER, W.; JOCHUM, M. Measurement of S-100B for risk classification of victims sustaining minor head injury – first pilot study in Brazil. **Clinics**. São Paulo, Brasil, v. 61, n. 1, p. 41-46, 2006.

HERRMANN, M.; CURIO, N.; JOST, S.; GRUBICH, C.; ELBERT, A. D.; FORK, M. L.; SYNOWITZ, H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic injury. *Neurol. Neurosurgery Psychiatry*. Magdeburg, Germany, v. 70, p. 95-100, 2001.

KESSLER, F. H. P.; WOODY, G.; PORTELA, L. V. C.; TORT, A. B. L.; BONI, R.; PEUKER, A. C. W. B.; GENRO, V.; DIEMEN, L. V.; SOUZA, D. O. G.; PECHANSKY, F. Brain injury markers (S-100B and NSE) in chronic cocaine dependents. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Porto Alegre, v. 29, n. 2, p. 134-139, 2007.

KÖVESDI, E.; LÜCKL, J.; BUKOVICS, P.; FARKAS, O.; PÁL, J.; CZEITER, E.; SZELLÁR, D.; DÓCZI, T.; KOMOLY, S.; BÜKI, A. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. **Acta neurochirurgica**. Pécs, Hungary, n. 152, p. 1-17, 2009.

LIMA, J. E.; WALZ, R.; TORT, A.; SOUZA, D.; PORTELA, L.; BIANCHIN, M. M.; TAKAYANAGUI, O. M.; LEITE, J. P. Serum and cerebrospinal fluid S-100B concentrations in patients with neurocysticercosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, SP, Brasil, v. 39, n. 1, p. 129-135, 2006.

MARTINS, R. O. **Relação da proteína S-100B com a hipóxia neonatal**. 2005. 80f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

MYERS, G. L. Biomarcadores emergentes para la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular y del accident cerebrovascular. **Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana**. Washington, v. 44, n. 1, p. 75-100, 2010.

OLIVEIRA, C. O.; IKUTA, N.; REGNER, A. Biomarcadores prognósticos no traumatismo crânio-encefálico grave. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. Canoas, RS, Brasil, v. 20, n. 4, p. 134-139, 2008.

PORTELA, L. V. C. **A Proteína S-100B como marcador periférico de dano ao sistema nervoso central e atividades de nucleotidasas em LCR de ratos**. 2002. 67f. Tese (para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

PORTELA, L. V. C.; TORT, A. B. L.; SCHAFF, D. V.; RIBEIRO, L.; NORA, D. B.; WALZ, R.; ROTTA, L. N.; SILVA, C. T.; BUSNELLO, J. V.; KAPCZINSKI, F.; GONÇALVES, C. A.; SOUZA, D. O. The serum S-100B concentration is age dependent. **Clinical Chemistry**. Porto Alegre, RS, Brasil, v. 48, n. 6, p. 950-952, 2002.

RECH, T. H.; VIEIRA, S. R. R.; BRAUNER, J. S. Valor da enolase específica do neurônio como indicador de prognóstico pós-parada cardiorrespiratória. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. Porto Alegre, RS, Brasil, v. 18, n. 4, p. 396-401, 2006.

RECH, T. H.; VIEIRA, S. R. R.; NAGEL, F.; BRAUNER, J. S.; SCALCO, R. Serum neuron-specific enolase as early predictor of outcome after in hospital cardiac arrest: a cohort study. **Critical Care**. Porto Alegre, RS, Brasil, v. 10, n. 133, p.1-6, 2006.

S-100B PROTEIN, serum: for management of patients with acquired brain injury. Salf Lake City, 2009. Disponível em :<http://www.aruplab.com/Testing-Information/technicalbulletins.jsp#S>. Acessado em: 25 de Julho de 2011.

SHINOZAKI, K.; ODA, S.; SADAHIRO, T.; NAKAMURA, M.; HIRAYAMA, Y.; ABE, R.; TATEISHI, Y.; HATTORI, N.; SHIMADA, T.; HIRASAWA, H. S-100B and neuron-specific enolase as predictors of neurological outcome in patients after cardiac arrest and return of spontaneous circulation: a systematic review. **Critical Care**. Chiba City, Japan, v. 13, n. 121, p. 1-12, 2009.

SORCI, G.; BIANCHI, R.; RIUZZI, F.; TUBARO, C.; ARCURI, C.; GIANBANCO, I.; DONATO, R. S100B protein, a damage associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**. Perugia, Italy, v. 10, p.1-13, 2010a.

SORCI, G.; RIUZZI, F.; ARCURI, C.; BIANCHI, R.; BROZZI, F.; TUBARO, C.; GIAMBANCO, I.; DONATO, R. The many faces of S100B protein: When an extracellular factor inactivates its own receptor and activates another one. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**. Orlandini, Florence, v. 115, n. 1/2, p. 147-151, 2010b.

THULIN, E.; KESVATERA, T.; LINSE, S. Molecular determinants of S100B oligomer formation. **Plos One**. Lund, Sweden, v. 6, n. 3, 2011.

TSOPORIS, J. N.; MOHAMMADZADEH, F.; PARKER, T. G. Intracellular and extracellular effects of S100B in the cardiovascular response to disease. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**. Toronto, Canadá, 2010.

ZOETHOUT, R. W. M.; DELGADO, W. L.; IPPEL, A. E.; DAHAN, A.; GERVEN, J. M. A. Functional biomarkers for the acute effects of alcohol on the central nervous system in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**. Leiden, Netherlands, v. 71, n. 3, p. 331-350, 2009.