

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

INTERAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM FIBRILAS β AMILOIDES: POSSÍVEL
PAPEL DESAGREGANTE DA S100B *IN VITRO*

BÁRBARA CAROLINA FEDERHEN

Porto Alegre

2022

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

INTERAÇÃO DA PROTEÍNA S100B COM FIBRILAS β AMILOIDES: POSSÍVEL
PAPEL DESAGREGANTE DA S100B *IN VITRO*

BÁRBARA CAROLINA FEDERHEN

Orientador Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus colegas de laboratório, em especial, à Krista e Letícia por me auxiliarem na condução de todas as etapas deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Carlos Alberto, por ter me proporcionado toda a estrutura do laboratório para a execução desta pesquisa.

Aos meus familiares e namorado, por me apoiarem nesta etapa tão importante.

SUMÁRIO

PARTE I.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
1. Demência.....	9
1.1 Doença de Alzheimer.....	11
2. Amiloidose.....	11
2.1 Envolvimento do peptídeo β -amilóide na Doença de Alzheimer.....	11
2.2 Ensaio da Tioflavina (ThT) para detecção de fibrilas amiloides.....	13
3. Astrócitos.....	14
3.1 S100B.....	15
3.2 Interação da S100B com o peptídeo β -amilóide.....	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
PARTE II.....	18
PARTE III.....	41
DISCUSSÃO.....	42
1. Resumo dos resultados.....	42
1.1 Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 12 horas de fibrilas de β amilóide com diferentes concentrações de S100B.....	42
1.2 Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 24 horas de fibrilas de β amilóide com diferentes concentrações de S100B.....	42
1.3 Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 48 horas de fibrilas de β amilóide com diferentes concentrações de S100B.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	48
REFERÊNCIAS.....	50

PARTE I

RESUMO

A doença de Alzheimer é o tipo de demência com a maior prevalência na população idosa, afetando drasticamente a memória e a autonomia dos indivíduos acometidos. Patológica e bioquimicamente, a doença é identificada através da presença de emaranhados neurofibrilares e o depósito extracelular de placas insolúveis, compostas por fibrilas provenientes da polimerização do peptídeo β amiloide. Muitos marcadores astrogliais estão alterados na doença e podem contribuir no metabolismo β amiloide. Dados sugerem a interação da S100B, uma proteína produzida e secretada por astrócitos, com o peptídeo β amiloide. A fim de estudar essa possível interação entre ambos, conduzimos experimentos a fim de avaliar se a S100B teria a capacidade de desagregar/despolimerizar as fibrilas β amiloide previamente formadas *in vitro*, visto que se observa a proteína co-localizada com as placas amiloides. Avaliamos concentrações baixas, na ordem de nM, e concentrações elevadas, na ordem de μ M, de S100B a fim de identificar se o papel trófico e tóxico atribuídos a essas ordens de concentrações poderia estar relacionado a capacidade da mesma de desagregar/despolimerizar as fibrilas presentes. Como resultado, identificamos que essa característica é dependente, além da concentração de S100B, do tempo de incubação com as fibrilas, sendo que a concentração de 5 nM de S100B demonstrou manter essa propriedade por mais tempo inalterada.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most prevalent type of dementia in the elderly population, drastically affecting memory and the autonomy of those individuals. Morphopathologically and biochemically, the disease is identified through the presence of neurofibrillary tangles and the extracellular deposition of fibrillary plaques, composed of fibrils resulting from the polymerization of the β amyloid peptide. Another marker used for the investigation of the disease is S100B protein, mostly from astrocytic origin and found elevated progressively in the disease course. Evidence suggests the interaction between S100B and β amyloid peptide. In order to evaluate this possible interaction, experiments were carried out to assess whether S100B would have the ability to disaggregate/depolymerize pre-formed amyloid β fibrils, once S100B protein is shown co-localized with senile plaques in studies *in vivo* and post mortem. Hence, we evaluate from a low range concentration to a higher order (throphic: nM; toxic: μ m) values corresponding to a disaggregator/ depolymerizer role. As result, we identified that this feature is dependent on S100B concentration and incubation time with ab fibrils, in which the concentration of 5 nM of S100B exerted this property for a longer time.

LISTA DE ABREVIATURAS

β A, Peptídeo β -amilóide

BHE, Barreira hematoencefálica

DA, Doença de Alzheimer

GFAP, Proteína Glial Fibrilar Ácida

MET, Microscopia eletrônica de transmissão

RAGE, Receptor de ligação de produtos de glicação avançada

SNC, Sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

1. Demência

Demência, uma das condições de saúde mais onerosas, pode ser conceituada como deficiência cognitiva ou declínio cognitivo que compromete a independência de um indivíduo (1) acompanhada de distúrbios no humor, comportamento e personalidade (2). Tais sintomas são consequência de uma disfunção crônica e/ou progressiva das funções corticais e subcorticais (2). Estima-se que a cada 4 segundos um novo caso de demência é diagnosticado, resultando em aproximadamente 7,7 milhões de casos por ano no mundo (3).

A demência é um dos achados clínicos de diversas doenças neurodegenerativas (4), sendo a doença de Alzheimer (DA) a condição na qual a demência mais frequentemente se manifesta, correspondendo a cerca de 50-70% dos casos (5). Além da DA, outras doenças neurodegenerativas também são caracterizadas por declínio cognitivo, sendo a demência frontotemporal o segundo maior diagnóstico (6).

Devido ao caráter incapacitante das demências, a projeção de custos para o ano de 2050 relacionados à terapia medicamentosa e ao manejo dos pacientes acometidos corresponde a cerca de 1,1 trilhão de dólares (7). Tal projeção demonstra a urgência na compreensão da fisiopatologia da doença a fim de contribuir para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, acarretando em um aumento da qualidade de vida dos pacientes acometidos e contribuindo na diminuição dos custos envolvidos no cuidado dos acometidos.

1.1 Doença de Alzheimer

A DA, forma mais comum de manifestação das demências, pode ser classificada genericamente em dois tipos. A DA pode ser familiar (tipo I), na qual se identificam mutações em genes específicos como, por exemplo, no gene responsável pela tradução da proteína precursora amiloide (APP) e no gene que

traduz a proteína presenilina (PSEN1/2), sendo uma doença de instalação precoce (8) (9). Também pode ser classificada como esporádica (tipo II), sendo uma doença de instalação tardia e na qual se observa a influência de múltiplos fatores relacionados ao estilo de vida como, por exemplo sedentarismo, utilização excessiva de álcool, tabagismo, além de distúrbios metabólicos como hipercolesterolemia, alelo ϵ da apolipoproteína E, obesidade e diabetes mellitus (9) (10).

Fatores genéticos vêm sendo relacionados com o desenvolvimento da DA, principalmente alterações em alguns genes que codificam proteínas chaves no metabolismo do peptídeo β amiloide, sendo os mais consistentes marcadores da doença o gene codificador da APP e da PSEN1 e PSEN2. Fatores ambientais acrescidos de alterações nesses genes parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da DA, caracterizando a doença como multifatorial e, cujas manifestações em pacientes, possuem diferentes graus de severidade (11). Outra alteração genética importante para o desenvolvimento da DA são as mutações no gene codificador do receptor de disparo presente em células mielóides (TREM2), achado que acarreta em um maior risco para desenvolvimento da patologia (12).

Patofisiologicamente, a doença é marcada por uma extensa perda neuronal e reatividade glial intensa (13) (14), possuindo como marcas fisiopatológicas os emaranhados neurofibrilares intraneuronais, formados a partir da hiperfosforilação da proteína tau, relacionada com a estabilização dos microtúbulos (15) e as placas senis, formadas a partir do depósito do peptídeo β amiloide insolúvel no meio extracelular (16).

A teoria da cascata amiloide postula que, as placas compostas pelas unidades monoméricas e oligoméricas de β amiloide polimerizados são unidades tóxicas, sendo a sua deposição a primeira manifestação da doença, antes mesmo do início dos primeiros sintomas (17). As fibrilas depositadas na forma de placas amiloides desencadeiam uma cascata neurodegenerativa. Uma das alterações bioquímicas é a hiperfosforilação da proteína tau, responsável pela estabilização dos microtúbulos, alastrando essa cadeia de hiperfosforilação

para neurônios vizinhos através dos microtúbulos, o que acaba levando a morte neuronal (18). Apesar da teoria abordar com maior afinco a hipótese da toxicidade do β amiloide ser devido a formação das placas em si, a neurotoxicidade dos monômeros, oligômeros e fibrilas é discutida como potencialmente mais relevante na instalação da doença, sendo a placa um reservatório dessas unidades de menor tamanho molecular (19).

2. Amiloidose

Amiloidose é o termo utilizado para designar uma série de patologias de ocorrência rara, cuja característica em comum é o dobramento incorreto de proteínas levando a formação de agregados instáveis, predominantemente formados por estruturas secundárias do tipo β folha (20). A origem do termo provém da capacidade desses agregados amiloidogênicos corarem-se com uma solução de iodo, tipicamente utilizada para coloração de soluções contendo amido (21). Nos diferentes órgãos em que podem ser formados, os agregados acabam por se depositar afetando diretamente a estrutura do tecido, bem como a sua funcionalidade (22).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a formação desses agregados e consequente depósito em diferentes tecidos ainda não é completamente elucidada. Acredita-se que um determinado estímulo, ainda desconhecido e de natureza específica para cada tipo de amiloidose, esteja envolvido na alteração da estrutura primária dessas proteínas, desestabilizando-as ou ainda alterando a concentração na qual se encontram. Essa proteína de origem instável, pode ser de natureza hereditária ou adquirida (22).

São descritas e caracterizadas cerca de 20 diferentes proteínas que estão relacionadas com a formação de fibrilas amiloides *in vivo* e, em comum, todas apresentam um estrutura β central (23).

2.1 Envolvimento do peptídeo β -amilóide na Doença de Alzheimer

As placas senis, clássicos biomarcadores da DA, são constituídas majoritariamente pelo acúmulo do peptídeo β amiloide na sua forma monomérica, oligomérica e fibrilar (24). O β A, por sua vez, provém da clivagem errônea da proteína neuronal transmembrana precursora amiloide (APP), gerando um fragmento monomérico insolúvel. Essa clivagem se dá através da ação consecutiva das enzimas β e γ secretase, liberando para o meio extracelular o peptídeo β amiloide que se polimeriza com outras unidades monoméricas resultando na formação de produtos insolúveis que culminam na formação da placa em si (25).

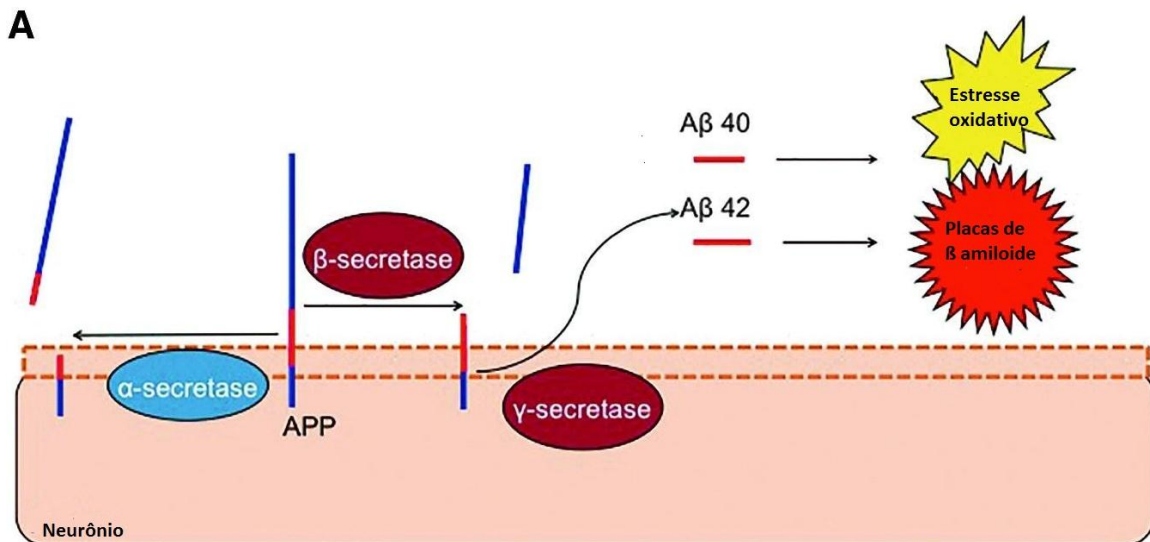


Figura 1: Mecanismo de formação do peptídeo β -amiloide. Adaptação de Bonet-Costa (26).

A perda de memória e disfunção cognitiva associada a doença é relacionada à deposição dessas placas insolúveis no espaço extracelular, causando uma ruptura na transmissão de sinais entre neurônios saudáveis (27). Desta forma, progressivamente, ocorre uma perda de funções cerebrais e um dano ao sistema nervoso central (SNC). Além da interrupção da transmissão sináptica, a placa exerce um papel crucial no processo de neuroinflamação, acarretando na sobreposição de mais um dano nas células adjacentes (28).

2.2 Ensaio da Tioflavina (ThT) para detecção de fibrilas amiloides

Atualmente, a técnica mais empregada para a identificação, quantificação e monitorização da cinética das fibrilas amiloides *in vitro* é o ensaio que se utiliza da característica fluorescente intrínseca da ThT. A técnica se baseia na capacidade da molécula de emitir fluorescência fortemente quando em contato com agregados ricos em folhas β . Os comprimentos de onda de excitação e emissão são, respectivamente, 440 nm e 490 nm. Por outro lado, quando em solução aquosa, a molécula demonstra uma fraca fluorescência. Desta maneira, baseando-se na diferença de fluorescência detectada quando a molécula está adicionada a amostras ricas em folhas β , é possível identificar e quantificar o teor de fibrilas presentes nas amostras (30).

O mecanismo pelo qual a ThT interage com as fibrilas e altera a intensidade de fluorescência emitida ainda não é totalmente compreendido. Entretanto, as hipóteses mais bem aceitas discutem que a provável interação entre a molécula e as fibrilas se dá através da intercalação das moléculas de ThT dentro de sulcos entre as cadeias laterais das fibrilas amiloides (30). Desta forma, o grande aumento na fluorescência de ThT resulta da imobilização seletiva de um subconjunto de conformémeros de ThT (31).

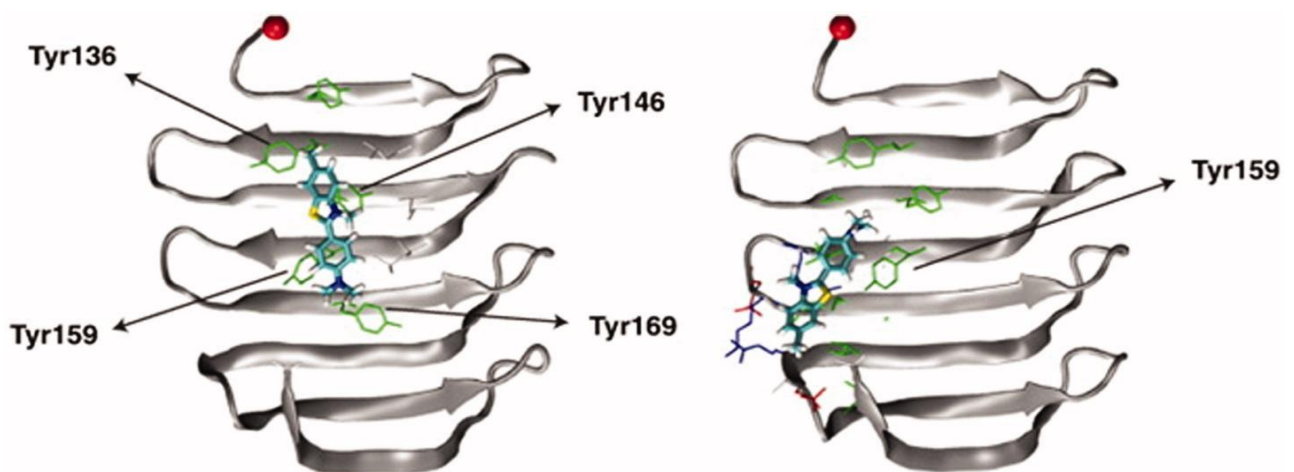


Figura 2: Representação da interação da ThT com fibrilas contendo β folha, adaptação de Gade Malmos (29).

3. Astrócitos

Os astrócitos são o tipo celular de maior abundância no SNC, assumindo diversas morfologias e sendo responsáveis por uma vasta e complexa série de funções para manutenção da homeostase cerebral (32). Dentre essas funções, podemos citar o envolvimento dos astrócitos na migração e desenvolvimento axonal de certos tipos de neuroblastos durante o desenvolvimento (33); regulação do fluxo sanguíneo cerebral, através da interação direta do astrócito com os vasos sanguíneos (34); homeostase de íons, pH, neurotransmissores e fluídos no espaço intersticial sináptico (35), (36); atuação na transmissão sináptica, lançando para o meio sináptico moléculas ativas como, por exemplo, glutamato, purinas, GABA, caracterizando a sinapse tripartida (37), (38), (39); metabolismo energético da glicose, provendo substratos energéticos para os neurônios e atuando como repositórios de grânulos de glicogênio (40) e por fim, atuação do astrócito na formação e manutenção da barreira hematoencefálica (BHE), auxiliando que determinadas moléculas acessem o parênquima cerebral, baseado na sua polaridade e tamanho (41).

A morfologia dos astrócitos e sua localização permitem classificá-los primariamente em duas categorias: protoplasmáticos, encontrados na substância cinzenta e que possuem numerosas ramificações e os fibrosos, encontrados na substância branca e que apresentam-se como longas fibras (37). Histologicamente, esse tipo celular pode ser identificado através da marcação de uma proteína de citoesqueleto, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que, juntamente com a proteína vimentina, age como principal componente do citoesqueleto astrocitário. Além das proteínas que compõem o citoesqueleto astrocitário, a S100B – proteína expressa e secretada por astrócitos – também é utilizada como marcador desse tipo celular (42).

3.1 S100B

O termo S100B refere-se a uma proteína cuja principal característica físico-química é sua capacidade de ser 100% solúvel em uma solução saturada de sulfato de amônio em pH neutro (43). A sua estrutura quaternária é constituída de um homodímero cujos monômeros possuem cerca de 9-14 kDa de peso molecular, sendo cada monômero estruturalmente constituído de um domínio alfa helix-loop-helix (domínio *EF-hand*) com um sítio de ligação ao íon cálcio (44). A sua distribuição celular tem sido cada vez mais investigada, sendo uma proteína expressa e secretada majoritariamente por astrócitos (45).

Esta proteína está envolvida na formação do citoesqueleto e proliferação celular, além de exercer funções parácrinas e autócrinas, tanto intra como extracelularmente (45). Dentre essas funções, podemos elencar a regulação da fosforilação proteica, dinâmica do citoesqueleto, homeostase do íon cálcio, atividade enzimática de determinadas enzimas, fatores de crescimento celular, diferenciação celular, além da participação na modulação da resposta inflamatória (46).

Apesar do mecanismo não ser completamente elucidado, sabe-se que a S100B é secretada para o meio extracelular e a mesma exerce funções aos diversos tipos presentes nesse ambiente (47). Em relação aos neurônios, classifica-se a ação da S100B como tóxica ou trófica dependendo da concentração da mesma no meio extracelular. Para concentrações elevadas, na ordem de μM atribui-se a S100B uma ação tóxica, ao passo que concentrações mais baixas, na ordem de nM, atribui-se a proteína uma ação trófica (48).

3.2 Interação da S100B com o peptídeo β -amilóide

Em análises do tecido cerebral *post-mortem* de pacientes acometidos pela DA, evidencia-se um aumento no conteúdo da proteína S100B (49). O seu aumento é, na maior parte da literatura disponível, explicado e associado à atividade pró-inflamatória da proteína através da ativação do receptor de ligação

de produtos de glicação avançada (RAGE). Alguns autores e estudos sugerem que a S100B atua como uma alarmina ou padrão molecular associado ao dano que, por sua vez, trata-se de uma sequência molecular endógena liberada por células danificadas ou mortas, a fim de sinalizar um dano tecidual e/ou celular. Essa sinalização ativa a resposta imunológica inata e, apesar dos efeitos deletérios da S100B como alarmina, a ação da mesma também está associada a efeitos benéficos (50).

Estudos recentes vêm sugerindo que a S100B encontra-se elevada no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes acometidos pela DA já em estados iniciais (51) (52), e interage fisicamente com o peptídeo β amiloide a fim de impedir a sua agregação e toxicidade induzida pela formação de estruturas oligoméricas (53). Quanto a esse comportamento da proteína discute-se a possível classificação da mesma como uma proteína com propriedades do tipo chaperona, comportamento este que pode ser, em determinadas situações, considerado benéfico à manutenção da homeostase celular. A principal função de uma chaperona é, além da identificação de proteínas com suas conformações terciárias errôneas, o auxílio no correto dobramento de proteínas, impedindo que as mesmas assumam conformações espaciais incorretas.

Além da interação física da proteína com o peptídeo β amiloide, a S100B demonstra possuir outras características que conferem neuroproteção como a quelação e tamponamento de metais, contribuindo para a prevenção da formação de estruturas oligoméricas e conseqüentemente agregação (54).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da proteína S100B na despolimerização de agregados de peptídeo β amiloide previamente formados *in vitro*.

Objetivos específicos

Submeter os agregados de peptídeo β amiloide pré formados a diferentes concentrações da proteína S100B (5 nM, 50 nM, 500 nM e 5 μ M) e avaliar seus possíveis impactos na despolimerização dos agregados.

Avaliar a despolimerização após 12, 24 e 48 horas de contato da S100B com os agregados.

PARTE II

Manuscrito com intenção de submissão ao periódico Medical Hypotheses

***In vitro* S100B-induced β -amyloid disaggregation: possible physiological meanings for Alzheimer's disease**

Bárbara C. Federhen^a, Krista M. Wartchow^a, Nicholas G. Selistre^a, Francieli Rohden, Carlos-Alberto Gonçalves^a, Letícia Rodrigues^{a*}

^aFederal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate Program, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author:

Dr Letícia Rodrigues

Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate Program.

Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

90035003, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: letigues@gmail.com

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent type of neurological disorder in the elderly population. The main disease's pathophysiological marker is the amyloid plaque, characterized by the deposition of fibrils formed by polymerization of amyloid- β peptide. Another important biomarker of the disease is the S100B protein, an astrocyte marker that appears to interact with the amyloid- β peptides and fibrils. This interaction between amyloid- β and S100B protein is supported in the literature by experiments that demonstrate the protein's ability to interfere with amyloid- β peptide aggregation and fibril formation. In this work, it is hypothesized that the S100B protein has the ability to disaggregate the amyloid- β fibrils formed *in vitro*, reinforcing the chaperone behavior and being able to identify misfolded forms – the amyloid- β fibrils – and to disaggregate them. This hypothesis is supported by *in vitro* experiments conducted by our group showing that the S100B protein in low concentrations (nM) in the presence of amyloid- β fibrils has the capacity to depolymerize these amyloid- β fibrils previously formed. We conducted our experiments with amyloid- β fibrils at 5 μ M and used different concentrations of S100B – 5 nM, 50 nM, 500 nM and 5 μ M – at different times – 12 hours, 24 hours and 48 hours of amyloid- β incubation with each S100B concentration. In 12 hours, all the S100B concentrations tested were able to decrease the amount of fibrils detected, being the 5 nM S100B concentration the only one who has this ability preserved in 24 and 48 hours. The 500 nM and 5 μ M S100B concentrations seem to increase the amount of fibrils detected in 24 hours, being this capacity lost in 48 hours. Differently from the mechanism proposed in the literature, we identified that, beyond the S100B ability to interfere with the beginning of aggregation, the protein can identify the fibrils already formed and degrade and/or depolymerize them. If this interesting S100B behavior actually occurs in *in vivo* experiments, the intriguing question to be answered is: how chaperone-like S100B behavior could be involved with AD progression?

Introduction

With life expectancy on the rise, Alzheimer's disease (AD) has become the most frequent form of dementia in the aging population – estimated 60% - 80% of dementia cases [1] – and which, until now is a comorbidity without a cure. Patients affected by AD suffer from a progressive and irreversible deterioration of cognitive functions such as language, personality and memory, resulting in impaired social coexistence and impaired individual autonomy [2].

Physiopathologically, the changes observed in an autopsy of a *post-mortem* brain are neuronal loss – specifically in areas involved in memory and learning, neurofibrillary tangles composed by truncated and/or hyperphosphorylated tau protein and extracellular senile plaques, which are formed mainly by the polymerization of the amyloid- β peptide, specifically the 42 amino-acid isoform [3] [4]. The amyloid cascade hypothesis postulate that the accumulation of amyloid- β peptide in the brain is responsible for the pathophysiology of AD [5], and the plaque works as a trigger promoting neurofibrillary tangles formation, leading to cell dysfunction and death [5] [6]. Amyloid- β peptide formation in pathological conditions occurs through the sequential cleavage of the amyloid precursor protein present in the cell membrane, by enzymes called β and γ secretases [7]. This inadequate cleavage generates fragments that have 38 to 43 amino-acid residues, being the fragment formed by 42 amino acid residues considered to have the greatest amyloidoigenic potential, forming the amyloid- β fibrils that are deposited in the extracellular matrix in the form of senile plaque [8].

Astrocytes are the most abundant cells in the central nervous system (CNS), with about 1.4 astrocytes for each neuron in the human cortex [9]. In AD is observed an intense astroglial reactivity, characterized by a hypertrophy of the cell body of astrocytes, being these localized around and between senile plaques and whose main markers are glial fibrillar acidic protein (GFAP) and the S100B protein [10]. In these neuropathological conditions, these cells assume a toxic

behavior, secreting into the extracellular environment molecules considered as pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species [11].

S100B is a protein belonging to the S100 protein class that has two *EF-hand* binding sites with Ca^{2+} , having two helix-turn-helix motifs connected by a central region [12]. In the CNS this protein is produced and secreted by astrocytes, and its presence in the extracellular environment it is able to modulate the activity of several cell types such as neurons [13], microglia [14], vascular endothelial cells [15] and even the astrocytes themselves in an autocrine way [16] [17]. It is being extensively discussed in the literature if the effects resulting from the S100B signaling can be trophic or toxic depending on the concentration in which it is found in the extracellular environment [18]. Experiments using neuronal cell culture indicate that in low concentrations S100B acts as a trophic factor, promoting the extension of neurites and cell survival. In contrast, high concentrations could be toxic to the cellular environment, leading to the production of free radicals and consequent cell death [18].

The hypothesis

The increased expression of S100B in AD patients [19] that co-localizes with senile plaques suggests that the protein interacts with the amyloid- β fibrillar aggregates. It has been already demonstrated that S100B can interact with amyloid- β monomers, preventing primary and secondary nucleation, acting in a very significant way preventing β aggregation [20] [21]. However, here we hypothesize that S100B protein acts depolymerizing the amyloid- β fibrillar aggregates that are localized in the senile plaque, releasing amyloid- β fragments or even amyloid- β monomers and/or oligomers themselves to the extracellular compartment. We also hypothesize that S100B behavior depends on its concentration in the extracellular compartment, which could help to explain and understand the previous findings showing the dual S100B behavior (trophic or toxic) being related to its concentration (micro or nanomolar). Therefore, the

chaperone-like behavior may happen as a consequence of the amount of S100B present in the compartment.

Evaluation of the hypothesis and empirical data

Previous studies demonstrate that elevated levels of the S100B protein content are found in patients with different neurological disorders such as, in the serum of schizophrenic patients [22] and in the CSF of patients in the early stages of AD [19]. Since astrocytes are the origin of S100B production and secretion in CNS, it is believed that these cells may play an important role in the face of these pathologies and also other neurodegenerative diseases. However, the role that astrocytes play in pathological conditions, especially in AD, and the significance of the high levels of S100B in the CSF [19] and serum [23] of these patients is still not fully understood.

Trying to understand the nature of the interaction between S100B protein and amyloid- β , we conducted *in vitro* experiments that consisted of adding different concentrations of S100B protein to an amount of 5 μ M of already formed amyloid- β fibrils. We expected to see whether S100B could interact with the fibrils and if this interaction could be modulated by its concentration.

After 12 hours incubation of amyloid- β fibrils, as seen by transmission electronic microscopy (TEM) images (Figure 1), with different S100B concentrations (5 nM, 50 nM, 500 nM and 5 μ M), it was observed that 5 nM ($p = 0.0230$, $n = 4-5$), 50 nM ($p = 0.0485$, $n = 3-5$), 500 nM ($p = 0.0274$, $n = 4-5$) and 5 μ M ($p = 0.0200$, $n = 3-5$) S100B protein concentrations were able to decrease the fluorescence intensity detected by the Thioflavin T (ThT), which, in turn, is proportional to the amount of fibrils presence (Figure 2). In this way, we demonstrated that after 12 hours incubation, the different options of S100B concentration are able to disaggregate and/or depolymerize the amyloid- β fibrils.

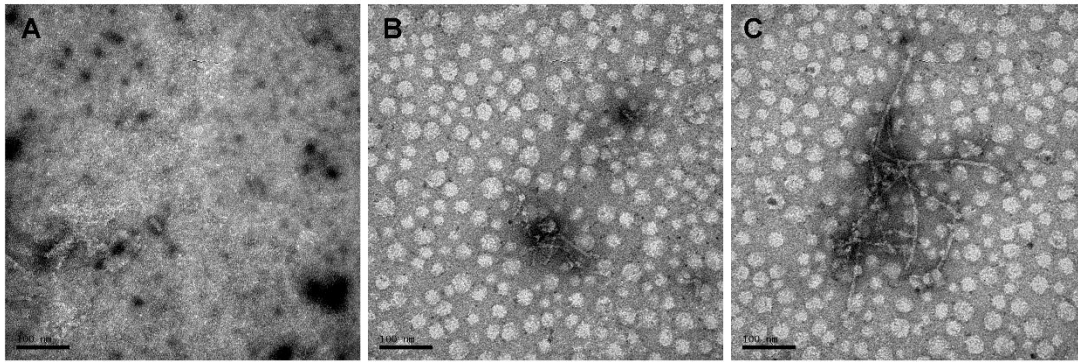


Figure 1. Amyloid- β fibrils obtained after aggregation. Representative image of Amyloid- β fibrils obtained by TEM in the beginning of polymerization (B) and after 48 hours of aggregation (C) in acidic pH. Aggregation in neutral pH did not result in fibril formation (A). Scale bar = 10 nM, 10.000x magnification.

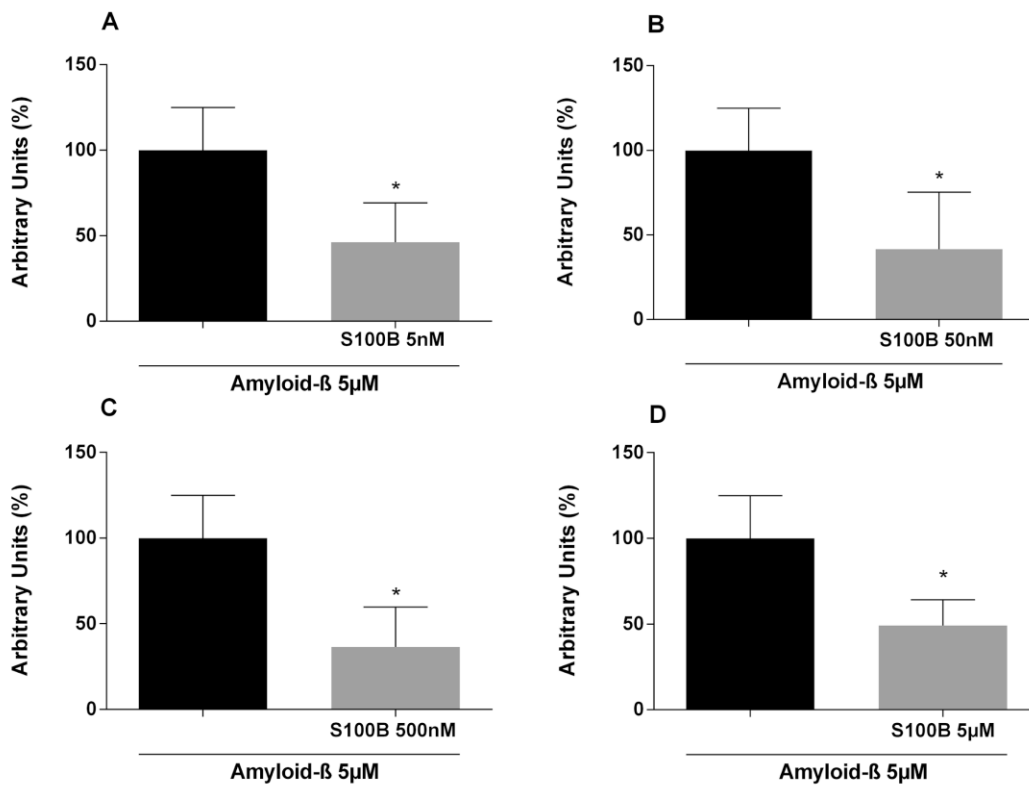


Figure 2. Incubation for 12 hours of Amyloid- β fibrils in the presence of different concentrations of S100B. Disaggregation of amyloid- β fibrils (formed

at acidic pH) after incubation with all different concentrations of S100B for 12 hours at physiological pH. In the presence of 5 nM (A), 50 nM (B), 500 nM (C) and 5 μ M (D) of S100B. * indicate statistical difference by the Student's t-test, with data expressed as mean \pm standard error, assuming $p < 0.05$.

After 24 hours of incubation of fibrillar aggregates with different concentrations of S100B, it was observed that S100B at a concentration of 5nM preserves the ability to possibly disaggregate the fibrillar assemblies in the incubation solution ($p = 0.0059$, $n = 4 - 5$). The fluorescence intensity generated after incubation of the aggregates with S100B at a concentration of 50 nM was not different statistically from that generated by amyloid- β aggregates in the absence of the protein, indicating that in this concentration and incubation time, there is no difference between both groups ($p = 0.5790$, $n = 4-5$). However, the fluorescence intensity generated with S100B at concentrations of 500 nM and 5 μ M is statistically higher than that generated by isolated amyloid- β aggregates (500 nM: $p=0.0209$, $n =4-5$; 5 μ M: $p=0.0404$, $n =4-5$) (Figure 3), demonstrating that in these conditions, there was an increase in the formation of aggregates.

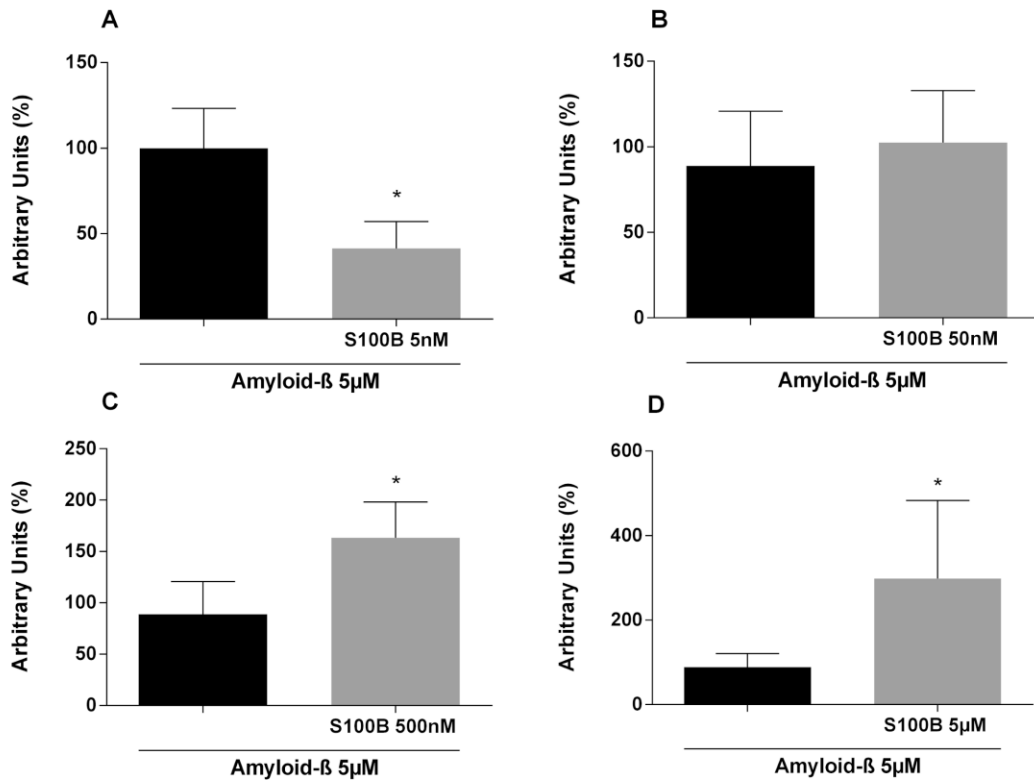


Figure 3. Incubation for 24 h of amyloid- β fibrils in the presence of different concentrations of S100B. Disaggregation of amyloid- β fibrils (formed at acidic pH) after incubation with different concentrations of S100B for 24 hours at physiological pH. In the presence of 5 nM (A), 50 nM (B), 500 nM (C) and 5 μ M (D) of S100B.* indicate statistical difference by student's t-test, with data expressed as mean \pm standard error, assuming $p < 0.05$.

S100B at a concentration of 5 nM, after 48 hours of incubation with fibrils, still preserves the ability to disaggregate them ($p=0.0169$, $n=5$). Likewise, at a concentration of 50 nM, the S100B preserves the behavior found in 24 hours ($p=0.6130$, $n=5$), without changing the aggregation. While, after 48 hours of incubation with S100B at concentrations of 500 nM and 5 μ M there was no change in aggregation (Figure 4) (500 nM: $p=0.4647$, $n = 4-5$; 5 μ M: $p=0.2169$, $n = 4-5$).

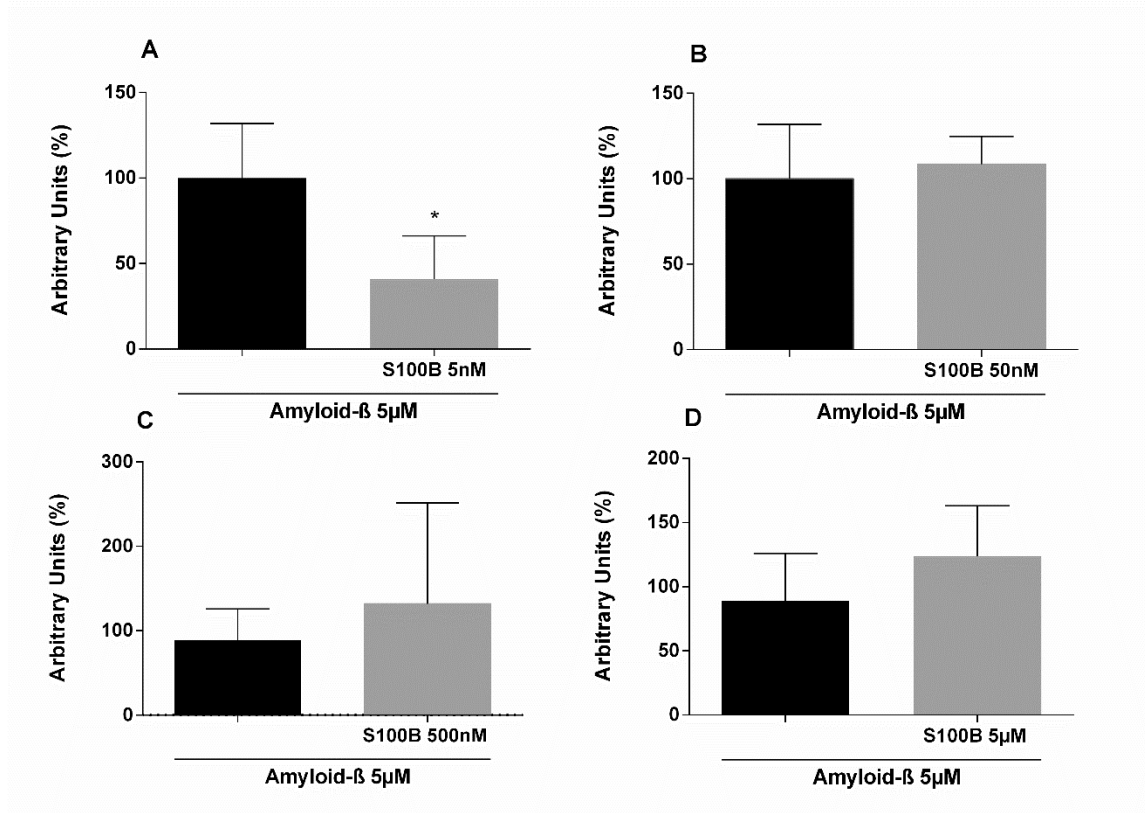


Figure 4. Incubation for 48h of amyloid-β fibrils in the presence of different concentrations of S100B. Disaggregation of amyloid β fibrils (formed at acidic pH) after incubation with different concentrations of S100B for 48 hours in physiological pH. In the presence of 5nM (A), 50nM (B), 500nM (C) and 5µM (D) of S100B.* indicate statistical difference by student's t-test, with data expressed as mean ± standard error, assuming p<0.05.

Consequences of the hypothesis and discussion

Considering all the evidences in literature showing S100B alterations in AD [24] [25] [26], it has become increasingly necessary to understand the nature of the interaction of S100B with amyloid-β fibrillar aggregates and senile plaques to be possible, in the future, to clearly elucidate the mechanism of the disease's onset and, thus to establish therapeutic targets that can assist in the treatment of AD.

To clearly characterize S100B as a chaperone, we aimed to understand the possible interaction between S100B and fibrillar amyloid- β , in order to verify if the protein had the ability to disaggregate misfolded structures such as amyloid- β fibrils. To conduct our experiments, we used S100B concentrations that have antagonistic effects (trophic or toxic) according to the classic literature, to, in this way, verify if the S100B concentration could influence in its possible chaperone property and if these antagonistic effects of different S100B concentrations could be somehow related to its chaperone behavior.

Is already available in the literature experimental [21] e computacional [27] data demonstrating that S100B acts as a chaperone, affecting amyloid aggregation pathways [21] but is still unclear if this property remains unchanged towards fibrillar aggregates. Trying to understand the nature of S100B chaperone property is extremely necessary to elucidate how could S100B contribute to the disease progression or decline and even if targeting the protein and its clients could be a promisor therapeutic strategy.

In our experiment, we aggregate amyloid- β monomers to obtain amyloid- β fibrils as we can visualize by our TEM images. The protocol used by our group was able to generate amyloid- β fibrils used to evaluate the possible S100B chaperone-like behavior. Twelve hours after incubation of different S100B concentrations (5 nM, 50 nM, 500 nM and 5 μ M) with amyloid- β fibrils, different S100B concentrations analyzed were able to dramatically disaggregate and/or depolymerize the aggregates, decreasing the detected amount of fluorescence by ThT assay. The lower concentration of S100B analyzed against the amyloid- β aggregates - 5nM -, seems to preserve the ability to disaggregate the amyloid- β fibrils in the three different times (12, 24 and 48 hours after incubation).

Previous experiments using neuronal culture attributed to S100B in low concentrations, in the nM range, as a trophic effect [18]. However, while the S100B 5 nM disaggregates amyloid- β fibrils, it is believed that the product of their disintegration could be the oligomers and monomers. The most supported hypothesis in the current literature is that the oligomeric amyloid- β forms are the most toxic and related to the cellular signals that trigger the progression of AD

[28]. In this way, one could consider contradictory that the lower concentration, 5 nM, whose classical literature attributes a trophic action, is the responsible for a greater disaggregation of fibrillar amyloid- β aggregates throwing oligomeric and/or monomeric forms into the environment.

It is important to consider that this behavior of the S100B at low concentrations was only visualized *in vitro* and we supposed that products of disaggregation of amyloid- β fibrils could be oligomers and/or monomers. But there is a possibility of the disaggregation to generate a different fragment with unknown structure.

Identifying which structure is generated after disaggregation (by spectrometric analysis) can help to elucidate how S100B recognize its clients and which are the chemical groups needed to establish stable chemical interactions responsible for the recognition site. Also, it is very important to study the nature and structure of the depolymerization products to investigate possible pathways and biochemical mechanisms activated when they are released to the biological environment and to conduct *in vivo* experiments to observe if this behavior remains unchanged. The next step could be trying to elucidate if the fragments forms are actually being formed (trying to detect them by a specific assay) and if they are being released into the extracellular medium or if there is a possibility of a debugging system.

The higher concentration of S100B incubated with the amyloid- β fibrils resulted in a higher fluorescence intensity detected by ThT after 24 hours of incubation was detected, corresponding to a greater amount of aggregates. It is also known that the increase in extracellular S100B, the same being detected in the CSF or in the serum, is negatively correlated with a normal brain volume and is associated with cognitive deficits [29].

There is still a need for a deeper investigation of how S100B protein acts in this condition, whether if it could stimulates the formation of amyloid- β fibrils (through oligomers and unpolymerized monomers) or if the same, in front of this environment, has the ability to aggregate forming a structure whose signaling and functionality is still completely unknown. Some data in the literature support

that S100 protein family, S100B included, has β -aggregation and disorder-propensity compromising the tertiary and quaternary structure and bringing to a loss of protective function [30]. Its also known that ThT has no specificity for amyloid- β sheet and the assay could be detecting β -sheet formed by S100B or a nonspecific structure capable to interact with ThT molecule. More experimental data is needed to understand if in vivo S100B keeps this property and contribute to amyloid- β polymerization or if the S100B itself aggregates and how this behavior and these structures can contribute to AD progression.

It is worth mentioning that, after 48 hours S100B at concentrations of 500 nM and 5 μ M showed no statistical difference in the ThT fluorescence intensity comparing to the amyloid- β fibrils with no S100B , whereas, in 24 hours it has been shown to stimulate their formation. This inconsistency leads us to question whether the protein is, in some way being degraded and/or losing its functionality. How this finding was observed in the higher concentrations, it is important to mention that a bigger number of particles and molecules leads to a greater number of unspecific collisions and, consequently, greater chances of molecules degradation. Again, further studies should be conducted in order to assess whether this is a random behavior or if it is related to loss of functionality by compromising the protein special structure or a degradation accelerated by collisions.

Previous findings showing that the S100B has the ability to binding other proteins and to prevent its malformation are available in the literature. However, this property is well elucidated by the interaction between S100B and intracellular proteins, such as glial fibrillary acid protein (GFAP), showing that S100B is capable to prevent GFAP polymerization [31] [32] and is involved in the cytoskeleton remodeling in astrocyte [33]. It is also documented the S100B ability to regulate the dynamics of microtubules proteins and intermediate filaments units, by promoting the disassembly of these components in the presence of micromolar Ca^{2+} concentrations [34]. More specifically, a S100B chaperone-like behavior is more discussed between S100B and p53, being the S100B binding domains capable to overlap with tetrameric p53 domain and

phosphorylation sites, in response to cellular stress and to facilitate proper folding and nuclear translocation [35].

However, there is little data available demonstrating that this property to binding to other proteins and preventing its malformation remains intact in the extracellular environment. Some extracellular S100B targets are well elucidated, as the receptor for advanced glycation end products (RAGE). The binding of S100B to RAGE results in an intracellular signal transduction communicating neuronal survival, neurite extension, neuronal apoptosis and other effects [36]. This S100B target is suggested as an important player in several diseases such as Alzheimer's disease and other neuroinflammatory conditions [37]. Other RAGE ligand is amyloid- β itself, suggesting that S100B can be a competitor for the binding site of the receptor, activating other signaling cascades [38]. Although all these data about S100B targets, still there is no sufficient evidence regarding its role in the recognition of malformed structures and their role in their degradation and/or depolymerization.

This way, the aim of this work was to propose more evidence in the literature to corroborate with previous findings and reinforce this new functionality of the S100B, more specifically in the extracellular environment, in order to understand a little more about the participation of astrocytes in the pathophysiology of AD.

We bring with this study a new look to the chaperone-like S100B behavior: the protein not only prevents aggregation, but also can recognize misfolded structures such as amyloid- β fibrils and depolymerize them, releasing fragments that are still not fully elucidated. More experiments are needed to understand the implications of these findings in a biological system. Although the purpose of this work is not to answer the impact of this S100B property in a biological environment, looking at S100B in this perspective can show us new ways to study DA pathophysiology and possible new targets to stop the disease progression.

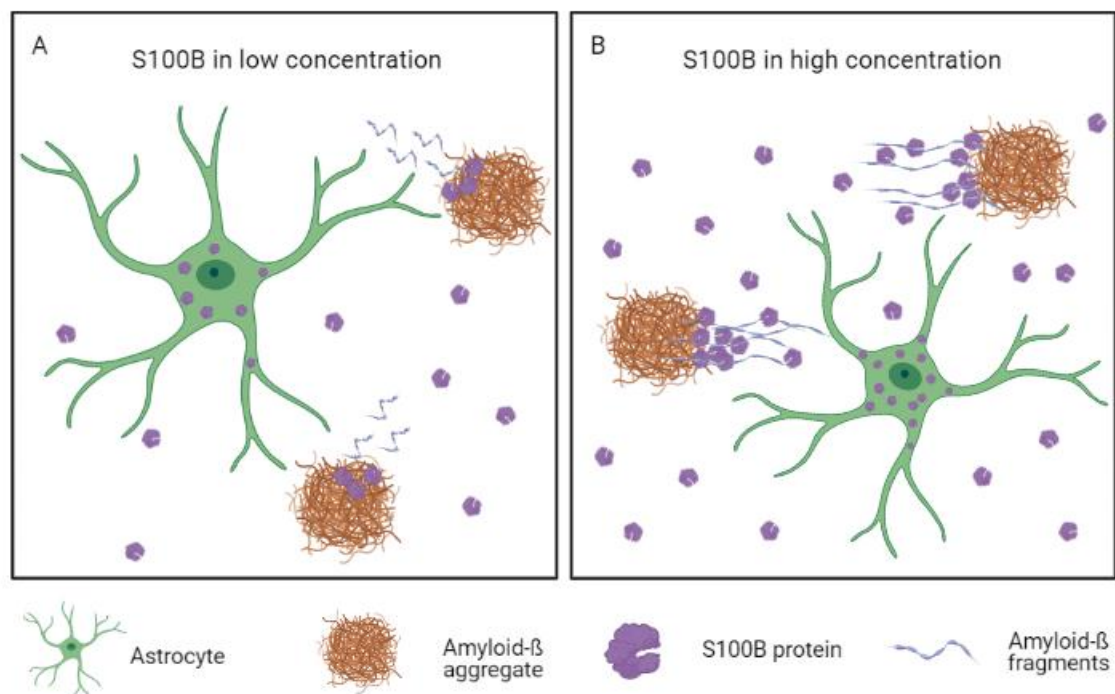


Figure 5. Schematic illustration of chaperone-like behavior. (A) In low concentrations, S100B may help to disaggregate the amyloid- β aggregate, releasing to extracellular environment amyloid- β fragments. (B) In high concentrations, S100B may contribute to amyloid- β aggregate by assisting in the amyloid- β fragments polymerization.

Materials and Methods

Reagents and proteins

All reagents were in excellent condition. Thioflavin T (ThT), amyloid- β and S100B were purchased commercially from the company Sigma-Aldrich (St. Lois, MO-USA).

Aggregation of amyloid- β peptide at acidic pH

The amyloid- β peptide was dissolved in hexafluoro-2-propanol (HFIP). Amyloid- β remained in HFIP for 60 minutes at room temperature in order to randomize amyloid- β monomers. After 60 minutes had elapsed, a sufficient volume of the HFIP solution containing the amyloid- β was aliquoted to form 22.15 μ M solutions

of the peptide. The HFIP was allowed to evaporate, forming a film of the amyloid- β peptide. To the formed amyloid- β film was added enough volume of a 10mM HCl solution to form the 22.15 μ M amyloid- β solution. This solution was incubated at 37°C for 24 hours, in order to form the fibrillar aggregates [39]. After this time of incubation, sufficient volume was removed to prepare aliquots containing 5 μ M of amyloid- β fibrils, whose pH was corrected by dilution with PBS, and again incubated at 37°C for another 48 hours. At 12, 24 and 48 hours after incubation, sample collections were performed to assess the formation of fibrillar aggregates.

Transmission electronic microscopy

A stock solution of uranyl acetate at a concentration of 2% was previously prepared. About 10 μ L of the samples were added to the grid and the excess liquid was removed with the aid of a filter paper. Afterwards, approximately the same volume of uranyl acetate was added to the grid to which the sample was previously added, removing excess liquid and allowing it to dry at room temperature for approximately 3 days [40].

Grids were analyzed using a transmission electron microscope. The scanning of the samples started at low magnification (10-12,000 x) to get an idea of the general composition of the samples. After identifying a structure of interest, in order to observe it in detail, the magnification was increased.

Incubation of amyloid- β fibrils with different concentrations of S100B

Sufficient volume of fibrillar aggregates previously formed in acid pH was aliquoted and diluted in PBS containing excess Ca^{2+} (0.2mM CaCl_2) resulting in a final concentration of 5 μ M of fibrillar aggregate. To these fibrillar aggregates, different concentrations of S100B were added with the final concentrations of the protein being 5nM, 50nM, 500nM and 5 μ M. These aliquots containing 5 μ M of fibrillar aggregate were incubated at 37°C for 48 hours. After incubation, collections were performed at times 12, 24 and 48 hours in order to assess the disaggregation of aggregates.

Evaluation of aggregate formation by the Thioflavin T assay

The purpose of the test is to measure the increase in the fluorescence of the ThT molecule when it binds to the formed fibrils. For this, the ThT was diluted in PBS in a concentration corresponding to 0.8mg/mL and subsequently filtered. This stock solution was stored away from light and is stable for up to one week.

On the day of use, the stock solution was diluted with PBS in order to obtain a solution for use in the concentration of 0.016mg/mL. The volume of the solution for use corresponding to 0.8mg of ThT was added to the aliquots containing the samples. The fluorescence intensity was measured by excitation with a wavelength of 440nm and absorption at a longer wavelength, 482nm. Ten readings were performed in a 60-second time interval, and, at the end an average of the fluorescence obtained in each reading [40]. Results were calculated and expressed as a percentage of the control.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge public funding agencies in Brazil: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN/CNPq).

Contribution statement

B.C.F., K.M.W., L.R., and C.A.G. designed the study. B.C.F, N.G.S. and J. B. performed laboratory experiments and collected data. B.C.F, K.M.W. and L.R. performed statistical analyses. B.C.F, K.M.W., L.R., and C.A.G. wrote the manuscript. All authors edited and approved the manuscript.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends n.d.:87.
- [2] Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am* 2019;103:263–93.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>.
- [3] Lashley T, Schott JM, Weston P, Murray CE, Wellington H, Keshavan A, et al. Molecular biomarkers of Alzheimer's disease: progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms* 2018;11. <https://doi.org/10.1242/dmm.031781>.
- [4] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006;368:387–403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7).
- [5] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992;256:184–5. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>.
- [6] Barage SH, Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 2015;52:1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>.
- [7] Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromol Med* 2010;12:1–12.
<https://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z>.
- [8] Sengupta U, Nilson AN, Kaye R. The Role of Amyloid- β Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* 2016;6:42–9.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>.
- [9] Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 2003;26:523–30. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>.
- [10] Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and Disease* 2019;10:664. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0720>.
- [11] Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007;28:138–45.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>.

- [12] Gifford JL, Walsh MP, Vogel HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal* 2007;405:199–221. <https://doi.org/10.1042/BJ20070255>.
- [13] Nishiyama H, Knöpfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *PNAS* 2002;99:4037–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.052020999>.
- [14] Zhou S, Zhu W, Zhang Y, Pan S, Bao J. S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemia. *Inflamm Res* 2018;67:937–49. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1187-y>.
- [15] Cao T, Zhang L, Yao L-L, Zheng F, Wang L, Yang J-Y, et al. S100B promotes injury-induced vascular remodeling through modulating smooth muscle phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2017;1863:2772–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.002>.
- [16] Villarreal A, Seoane R, González Torres A, Rosciszewski G, Angelo MF, Rossi A, et al. S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J Neurochem* 2014;131:190–205. <https://doi.org/10.1111/jnc.12790>.
- [17] Ponath G, Schettler C, Kaestner F, Voigt B, Wentker D, Arolt V, et al. Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. *Journal of Neuroimmunology* 2007;184:214–22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.12.011>.
- [18] Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:1008–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>.
- [19] Peskind ER, Griffin WST, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 2001;39:409–13. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00048-1).
- [20] Cristóvão JS, Figueira AJ, Carapeto AP, Rodrigues MS, Cardoso I, Gomes CM. The S100B Alarmin Is a Dual-Function Chaperone Suppressing Amyloid- β Oligomerization through Combined Zinc Chelation and Inhibition of Protein

Aggregation. *ACS Chem Neurosci* 2020;11:2753–60.

<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00392>.

- [21] Cristóvão JS, Morris VK, Cardoso I, Leal SS, Martínez J, Botelho HM, et al. The neuronal S100B protein is a calcium-tuned suppressor of amyloid- β aggregation. *Sci Adv* 2018;4:eaq1702. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aq1702>.
- [22] Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, et al. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry* 2001;6:445–9. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000889>.
- [23] Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation* 2010;7:6. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-6>.
- [24] Yardan T, Erenler AK, Baydin A, Aydin K, Cokluk C. Usefulness of S100B protein in neurological disorders. *J Pak Med Assoc* 2011;61:276–81.
- [25] Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein H-G. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:409–24. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.083>.
- [26] Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta* 1994;1223:398–403. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90101-5).
- [27] Rodrigues FEP, Figueira AJ, Gomes CM, Machuqueiro M. Computational Analysis of the Interactions between the S100B Extracellular Chaperone and Its Amyloid β Peptide Client. *Int J Mol Sci* 2021;22. <https://doi.org/10.3390/ijms22073629>.
- [28] Kaye R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis* 2013;33 Suppl 1:S67-78. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129001>.
- [29] Christl J, Verhülsdonk S, Pessanha F, Menge T, Seitz RJ, Kujovic M, et al. Association of Cerebrospinal Fluid S100B Protein with Core Biomarkers and Cognitive Deficits in Prodromal and Mild Alzheimer's Disease. *JAD* 2019:1–9. <https://doi.org/10.3233/JAD-190550>.

- [30] Carvalho SB, Botelho HM, Leal SS, Cardoso I, Fritz G, Gomes CM. Intrinsically Disordered and Aggregation Prone Regions Underlie β -Aggregation in S100 Proteins. *PLoS ONE* 2013;8:e76629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076629>.
- [31] Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S-100 protein, but not calmodulin, binds to the glial fibrillary acidic protein and inhibits its polymerization in a Ca^{2+} -dependent manner. *J Biol Chem* 1993;268:12669–74.
- [32] Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, et al. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res* 2004;29:735–40. <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000018844.51009.40>.
- [33] Frizzo JK, Tramontina AC, Tramontina F, Gottfried C, Leal RB, Donato R, et al. Involvement of the S100B in cAMP-Induced Cytoskeleton Remodeling in Astrocytes: A Study Using TRTK-12 in Digitonin-Permeabilized Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:833–40. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-6922-y>.
- [34] Garbuglia M, Verzini M, Sorci G, Bianchi R, Giambanco I, Agneletti AL, et al. The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1177–85. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1999001000001>.
- [35] Baudier J, Deloulme JC, Shaw GS. The Zn^{2+} and Ca^{2+} -binding S100B and S100A1 proteins: beyond the myths. *Biological Reviews* 2020;95:738–58. <https://doi.org/10.1111/brv.12585>.
- [36] Donato R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr Mol Med* 2007;7:711–24. <https://doi.org/10.2174/156652407783220688>.
- [37] Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Tumova S, Rauvala H. RAGE-mediated cell signaling. *Methods Mol Biol* 2013;963:239–63. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-230-8_15.
- [38] Gonzalez-Reyes RE, Rubiano MG. Astrocyte's RAGE: More Than Just a Question of Mood. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2018;18:39–48. <https://doi.org/10.2174/1871524916999160505105121>.

- [39] Kotler SA, Ramamoorthy A. Preparation of Stable Amyloid- β Oligomers Without Perturbative Methods. *Methods Mol Biol* 2018;1777:331–8. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7811-3_21.
- [40] Nilsson M. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004;34:151–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>.

PARTE III

DISCUSSÃO

1. Resumo dos resultados

1.1. Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 12 horas de fibrilas de β amiloide com diferentes concentrações de S100B:

Concentração de S100B	Deteção de fluorescência através do teste da tioflavina (ThT)
Todas (5 nM, 50 nM, 500 nM, 5 μ M)	Diminuída

Através do experimento conduzido, pôde-se evidenciar uma diminuição na deteção da intensidade de fluorescência emitida pela molécula de ThT. A fluorescência emitida pela molécula se dá, pois a mesma possui a capacidade de se intercalar entre folhas β , mudando sua conformação espacial o que atribui a ThT a característica fluorescente. A diminuição da intensidade de fluorescência, indiretamente, indica uma diminuição no conteúdo de folhas β presentes no tubo de ensaio.

As 4 concentrações analisadas, 5, 50, 500 nM e 5 μ M de S100B acarretaram em uma diminuição na intensidade de fluorescência após 12 horas de incubação com as fibrilas β amiloide previamente formadas. Esse resultado indica a possível desagregação e/ou despolimerização das fibrilas previamente formadas na presença da proteína S100B.

1.2. Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 24 horas de fibrilas de β amiloide com diferentes concentrações de S100B:

Concentração de S100B	Deteção de fluorescência através do teste da ThT
5 nM	Diminuída

50 nM	Sem diferença estatística
500 nM	Aumentada
5 μ M	Aumentada

A S100B na concentração de 5 nM aparenta preservar a capacidade em diminuir a intensidade de fluorescência emitida pela ThT no tempo de 24 horas, ao passo que, as demais concentrações perdem essa capacidade. Após transcorrido esse tempo de incubação, as concentrações de 500 nM e 5 μ M de S100B acarretam em uma maior detecção da fluorescência, indicando de uma forma indireta, o aumento no conteúdo de fibrilas presentes no tubo de ensaio.

Paralelamente, conduzimos um ensaio para avaliar a capacidade da S100B se agregar e formar β folhas, passíveis de identificação pelo teste da ThT. Utilizamos S100B nas concentrações de 10 nM e 10 μ M e detectamos uma formação de agregados em 120 horas de incubação para a concentração de 10 μ M, enquanto que para a concentração de 10 nM esses agregados foram detectados apenas após 168 horas de incubação, conforme figura 3. Desta forma, o aumento da detecção dos agregados nas condições em que a S100B estava presente nas concentrações de 500 nM e 5 μ M dificilmente será atribuída a uma polimerização da proteína.

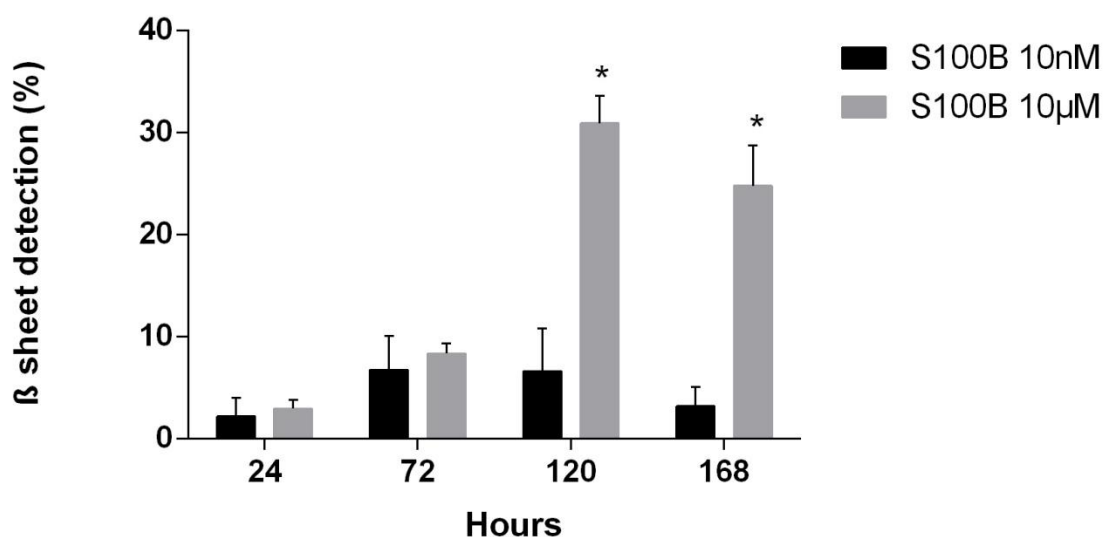


Figura 3: Detecção da agregação da S100B em diferentes concentrações (nM e µM) pela ThT em função do tempo.

1.3. Intensidade de fluorescência obtida após incubação por 48 horas de fibrilas de β amiloide com diferentes concentrações de S100B:

Concentração de S100B	Detecção de fluorescência através do teste da ThT
5 nM	Diminuída
50 nM	Sem diferença estatística
500 nM	Sem diferença estatística
5 µM	Sem diferença estatística

Após 48 horas de incubação, a concentração de 5 nM ainda mantém preservada essa função, enquanto que as demais concentrações não demonstraram diferença estatística quando comparadas ao basal. Essa perda de funcionalidade pode estar relacionada à degradação dos componentes, visto que os mesmos estão submetidos a um tempo de ensaio prolongado em um ambiente com temperatura elevada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como já evidenciado e discutido por outros autores, a S100B encontra-se presente em níveis alterados em determinadas condições neurodegenerativas como, por exemplo, a DA (55) (56). A presença da proteína nessas condições reforça a necessidade de compreender com maior clareza a função da mesma nesse ambiente patológico, a fim de elucidar lacunas no mecanismo de instalação da doença, bem como traçar novos alvos terapêuticos. Classicamente, a literatura atribui a S100B um comportamento dualístico baseado nas concentrações extracelulares da mesma. Em concentrações elevadas, na ordem de μM é atribuído a mesma um efeito tóxico, ao passo que em baixas concentrações, na ordem de nM , espera-se que a mesma exerça um efeito trófico (48). Entretanto, outras abordagens para explicar e melhor compreender o envolvimento da S100B na progressão da DA vem sendo exploradas, como a comportamento *chaperona-like* da proteína: sendo a mesma capaz de identificar estruturas compostas pelo peptídeo β -amiloide e degradando-as (53).

Para melhor compreender essa possível função de chaperona, conduzimos experimentos a fim de evidenciar a possível interação entre a proteína e estruturas fibrilares de β -amiloide, previamente formadas no nosso laboratório através de metodologia validada. Utilizamos concentrações de S100B escalonadas, desta forma foi possível submeter as fibrilas às concentrações ditas na literatura clássica como tóxicas e tróficas, bem como concentrações intermediárias, para, desta forma, identificar se as diferentes escalas de concentrações e suas respectivas ações poderiam estar relacionadas com o comportamento de chaperona. Desta forma, através de um olhar diferenciado para a possível ação da proteína nesse ambiente, buscamos novas formas de explicar e compreender essa diferença de ação dependente da concentração de S100B no meio extracelular.

As fibrilas obtidas para a condução do experimento foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme figura 4, e as

concentrações escalonadas de S100B foram de 5, 50, 500 nM e 5 µM. Após 12 horas de incubação das fibrilas com as diferentes concentrações de S100B, verificamos que em todas as situações houve uma diminuição drástica da intensidade de fluorescência detectada, indicando que houve uma redução no conteúdo de estruturas fibrilares presentes no meio. A menor concentração de S100B, 5 nM, preservou essa característica nos outros dois intervalos de tempo analisados: 24 e 48 horas após a incubação.

As maiores concentrações de S100B, cuja literatura atribui a um papel tóxico, resultaram em uma detecção aumentada da fluorescência emitida pela ThT após 24 horas de incubação. Indiretamente, é possível evidenciar que houve um aumento na formação de fibrilas. Entretanto, por se tratar de um ensaio inespecífico, não há como diferenciar se as fibrilas formadas são provenientes da agregação de monômeros e/ou oligômeros presentes no meio reacional ou se, estimulado pelo ambiente concentrado em moléculas, a própria S100B foi capaz de formar estruturas detectáveis pelo ensaio. Já há dados disponíveis que discutem a possibilidade da família de proteínas S100, incluindo a própria S100B, possuírem em sua estrutura regiões com propensão à agregação (57).

Após 48 horas de incubação, o comportamento anteriormente evidenciado de aumento da intensidade de fluorescência após incubação com as concentrações de 500nM e 5µM não se repetiu. Por se tratar de um ambiente rico em moléculas e, conseqüentemente, com maior número de colisões entre as mesmas, essa diferença estatística não encontrada poderia estar relacionada com a degradação da proteína e de todo o sistema em si. Uma maior investigação a respeito da estabilidade do experimento deverá, futuramente, ser elaborada, a fim de validar o tempo máximo para condução de estudos dessa natureza.

Dados evidenciando o papel da S100B na identificação de estruturas oligoméricas de β amiloide e interferindo em etapas de agregação do mesmo estão disponíveis e vem cada vez mais sendo explorados (58). Entretanto, ainda há pouco entendimento da ação *chaperona-like* da mesma frente a estruturas

fibrilares previamente formadas e a possível degradação das mesmas. Compreender esse mecanismo é de extrema importância, não apenas para elucidar a cascata de reações que culminam no depósito da placa amiloide em si, mas também a fim de disponibilizar novos alvos moleculares para que, futuramente, seja possível usar de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DA.

O ponto de vista levantado com esse estudo é de que, a atuação da S100B como chaperona vai além da prevenção de agregação; a proteína é capaz de reconhecer estruturas malformadas e contribuir com a sua degradação/despolimerização. Ainda é necessária uma maior investigação a respeito de como esse processo ocorre, se as estruturas fibrilas são degradadas em fragmentos desconhecidos ou se ocorre uma despolimerização dessas fibrilas e conseqüente lançamento de estruturas monoméricas e/ou oligoméricas para o meio extracelular.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Compreendemos que, por se tratar de um estudo *in vitro* utilizando-se de compostos isolados, diversos componentes presentes no ambiente biológico estão ausentes e, conseqüentemente, deve-se haver muita cautela ao translacionar as observações obtidas para um ambiente biológico complexo. Entendemos que, para maior compreensão do fenômeno, bem como suas implicações e mecanismos de instalação, é necessário conduzir experimentos semelhantes fazendo uso de diferentes modelos, seja cultura celular e, futuramente, simulação dessas condições *in vivo*. Esse comportamento pode ou não ser identificado em um organismo vivo e, caso o comportamento se repita, ainda é necessário maiores investigações a respeito do significado do mesmo. Além de que, as concentrações utilizadas dificilmente serão encontradas em organismos vivos, a não ser em microambientes. O presente trabalho visa reforçar uma nova função atribuída a proteína e discutir o impacto dessa mesma função na progressão e instalação da DA, levando em consideração que a elucidação de mais um mecanismo pode ser uma aliada no possível desenvolvimento de terapias.

Ainda, para ser possível reforçar com maior convicção que a diminuição da detecção de fibrilas é devido a ação da S100B, é importante conduzir o experimento sob as mesmas condições metodológicas com diferentes proteínas. Dessa forma, podemos inferir que a ação de despolimerização é, de fato, causado pela ação da S100B e não um efeito que ocorreria independentemente da proteína adicionada ao meio.

Ainda, também seria interessante adicionar metodologias capazes de identificar o produto da despolimerização das fibrilas β amiloides, sua sequência molecular e classificação química. Desta forma, a discussão a respeito do possível efeito de tais fragmentos em um ambiente biológico tornar-se-ia mais plausível. Afinal, dependendo da natureza química de tais fragmentos, pode-se identificar as possíveis reações entre os fragmentos supostamente gerados e demais macro e micromoléculas presentes no meio biológico. Além de identificar

a estrutura desses fragmentos, seria interessante monitorar se a perda da capacidade da S100B em concentrações superiores (500 nM e 5 μ M) em aumentar a detecção de fibrilas em 48 horas se dá em função de uma possível degradação proteica e degradação das fibrilas. Essa confirmação seria possível através da identificação da estrutura química dos compostos no meio reacional. Caso essa perda de função se desse devido a uma degradação, as condições reacionais deveriam ser reavaliadas, a fim de garantir o mesmo ambiente a todos os tubos contendo as diferentes concentrações de S100B.

Para melhor compreender e discutir essa funcionalidade da proteína são necessários muitos dados, inclusive simulações de bioinformática. O campo é muito vasto e pouco explorado, até então. Surge na academia uma necessidade de compreender mais afundo a química por traz da geração das fibrilas β amiloide e sua possível despolimerização, pois, desta forma, determinados comportamentos químicos podem ser, mais facilmente, presumidos.

REFERÊNCIAS

1. Sacuiu SF. Dementias. *Handb Clin Neurol*. 2016;138:123–51.
2. Ritchie K, Lovestone S. The dementias. *Lancet*. 30 de novembro de 2002;360(9347):1759–66.
3. Duthy B. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias. *Background Paper*. 2004;74.
4. Rademakers R, Rovelet-Lecrux A. Recent insights into the molecular genetics of dementia. *Trends Neurosci*. agosto de 2009;32(8):451–61.
5. Breteler MM, Claus JJ, van Duijn CM, Launer LJ, Hofman A. Epidemiology of Alzheimer's disease. *Epidemiol Rev*. 1992;14:59–82.
6. Graff-Radford NR, Woodruff BK. Frontotemporal Dementia. *Semin Neurol*. fevereiro de 2007;27(1):48–57.
7. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. março de 2021;17(3):327–406.
8. Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L. The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry*. julho de 2007;20(4):380–5.
9. Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*. 2019;57(2):87–105.
10. de la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs*. outubro de 2009;10(10):1049–60.
11. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 8 de dezembro de 2020;25(24):E5789.
12. Fenoglio C, Scarpini E, Serpente M, Galimberti D. Role of Genetics and Epigenetics in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia1. *J Alzheimers Dis*. 62(3):913–32.
13. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*. outubro de 1989;24(3):173–82.
14. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is

the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* outubro de 1991;30(4):572–80.

15. Iqbal K, Liu F, Gong C-X. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol.* janeiro de 2016;12(1):15–27.
16. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 16 de julho de 2020;15(1):40.
17. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 30 de agosto de 2012;367(9):795–804.
18. Pooler AM, Polydoro M, Wegmann S, Nicholls SB, Spires-Jones TL, Hyman BT. Propagation of tau pathology in Alzheimer's disease: identification of novel therapeutic targets. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(5):49.
19. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med.* julho de 2012;2(7):a006338.
20. Cibeira MT, Sanchorawala V, Seldin DC, Quillen K, Berk JL, Dember LM, et al. Outcome of AL amyloidosis after high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation: long-term results in a series of 421 patients. *Blood.* 20 de outubro de 2011;118(16):4346–52.
21. Sipe JD, Cohen AS. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol.* junho de 2000;130(2–3):88–98.
22. Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol.* janeiro de 1995;32(1):45–59.
23. Pepys MB. Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 28 de fevereiro de 2001;356(1406):203–11.
24. Gallardo G, Holtzman DM. Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1184:187–203.
25. Ashrafian H, Zadeh EH, Khan RH. Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *Int J Biol Macromol.* 15 de janeiro de 2021;167:382–94.
26. Bonet-Costa V, Pomatto LC-D, Davies KJA. The Proteasome and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Antioxidants & Redox Signaling.* 1º de dezembro de 2016;25(16):886–901.

27. Salehi A, Delcroix J-D, Swaab DF. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J Neural Transm (Vienna)*. março de 2004;111(3):323–45.
28. Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzer-Attas C, Sage D, Quartermain D, et al. An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J Neurosci*. 14 de julho de 2004;24(28):6277–82.
29. Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, Buchner J, Ramirez-Alvarado M, Naiki H, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid*. 2 de janeiro de 2017;24(1):1–16.
30. Hudson SA, Ecroyd H, Kee TW, Carver JA. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *The FEBS Journal*. 2009;276(20):5960–72.
31. Biancalana M, Koide S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim Biophys Acta*. julho de 2010;1804(7):1405–12.
32. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. janeiro de 2010;119(1):7–35.
33. Powell EM, Geller HM. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia*. março de 1999;26(1):73–83.
34. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci*. março de 2009;32(3):160–9.
35. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. março de 2006;7(3):194–206.
36. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 2004;129(4):877–96.
37. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. fevereiro de 2007;13(2):54–63.
38. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*. 1º de outubro de 2003;26(10):523–30.
39. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. agosto de 2009;32(8):421–31.

40. Deitmer JW, Theparambil SM, Ruminot I, Noor SI, Becker HM. Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13:1301.
41. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. janeiro de 2006;7(1):41–53.
42. Barcia C, Sanderson NSR, Barrett RJ, Wawrowsky K, Kroeger KM, Puntel M, et al. T Cells’ Immunological Synapses Induce Polarization of Brain Astrocytes In Vivo and In Vitro: A Novel Astrocyte Response Mechanism to Cellular Injury. *PLoS One*. 20 de agosto de 2008;3(8):e2977.
43. Michetti F, D’Ambrosi N, Toesca A, Puglisi MA, Serrano A, Marchese E, et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem*. janeiro de 2019;148(2):168–87.
44. Grzybowska EA. Calcium-Binding Proteins with Disordered Structure and Their Role in Secretion, Storage, and Cellular Signaling. *Biomolecules*. 19 de junho de 2018;8(2):E42.
45. Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol*. 15 de janeiro de 1976;165(2):197–207.
46. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 15 de abril de 2003;60(6):540–51.
47. Davey GE, Murmann P, Heizmann CW. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*. 17 de agosto de 2001;276(33):30819–26.
48. Donato R, Sorci G, RiuZZi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B’s double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta*. junho de 2009;1793(6):1008–22.
49. Van Eldik LJ, Griffin WS. S100 beta expression in Alzheimer’s disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta*. 29 de setembro de 1994;1223(3):398–403.
50. Bertheloot D, Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*. janeiro de 2017;14(1):43–64.
51. Peskind ER, Griffin WST, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer’s disease. *Neurochemistry International*. novembro de 2001;39(5–6):409–13.

52. Christl J, Verhülsdonk S, Pessanha F, Menge T, Seitz RJ, Kujovic M, et al. Association of Cerebrospinal Fluid S100B Protein with Core Biomarkers and Cognitive Deficits in Prodromal and Mild Alzheimer's Disease. *JAD*. 29 de outubro de 2019;1–9.
53. Cristóvão JS, Morris VK, Cardoso I, Leal SS, Martínez J, Botelho HM, et al. The neuronal S100B protein is a calcium-tuned suppressor of amyloid- β aggregation. *SCIENCE ADVANCES*. 2018;13.
54. Cristóvão JS, Figueira AJ, Carapeto AP, Rodrigues MS, Cardoso I, Gomes CM. The S100B Alarmin Is a Dual-Function Chaperone Suppressing Amyloid- β Oligomerization through Combined Zinc Chelation and Inhibition of Protein Aggregation. *ACS Chem Neurosci*. 2 de setembro de 2020;11(17):2753–60.
55. Steiner J, Bogerts B, Schroeter ML, Bernstein H-G. S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med*. março de 2011;49(3):409–24.
56. Yardan T, Erenler AK, Baydin A, Aydin K, Cokluk C. Usefulness of S100B protein in neurological disorders. *J Pak Med Assoc*. março de 2011;61(3):276–81.
57. Carvalho SB, Botelho HM, Leal SS, Cardoso I, Fritz G, Gomes CM. Intrinsically Disordered and Aggregation Prone Regions Underlie β -Aggregation in S100 Proteins. Gasset M, organizador. *PLoS ONE*. 1º de outubro de 2013;8(10):e76629.
58. Rodrigues FEP, Figueira AJ, Gomes CM, Machuqueiro M. Computational Analysis of the Interactions between the S100B Extracellular Chaperone and Its Amyloid β Peptide Client. *Int J Mol Sci*. 31 de março de 2021;22(7).