

# **Título:** Análise da Expressão da Proteína Delta Fos B em Ratos Após Lesão Colinérgica e Indução de Status Epilepticus pelo Modelo da Pilocarpina

**Autores:** Tzirnazoglou, U.F.; Avedissian, M.; Longo, B.M.; Mello, L.E.A.M

**Bolsista:** Uyanara de Freitas Tzirnazoglou

**Orientador:** Luiz Eugênio A. M. de Mello - Unifesp - Fisiologia / Neurofisiologia e Fisiologia Endócrina

## **Resumo:**

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** Trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstram que a IgG192-saporina parece eliminar quase completamente as crises as crises epilépticas crônicas, criando uma situação em que o status epilepticus(SE) não desencadeia epileptogênese.

Esta imunotoxina é um anticorpo monoclonal que tem afinidade pelo receptor NGF e está acoplada a uma citotoxina, a saporina, que inativa seletivamente ribossomos de neurônios colinérgicos levando-os a morte.

No modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, o animal recebe a droga e após cerca de 30 minutos chega ao SE. Em decorrência deste evento ocorrem fenômenos como morte neuronal, neurogênese, reorganização dos axônios (brotamento de fibras musgosas) e várias alterações tanto funcionais como adaptativas. Não é claro, no entanto, o quanto cada uma contribui para o surgimento de crises crônicas (crises espontâneas recorrentes) e para a epileptogênese. Recentemente foram descritas novas proteínas da família Fos que se expressam cronicamente, sendo estas isoformas de Delta Fos B. As proteínas do tipo Fos e Jun formam o fator de transcrição AP-1, que se liga aos sítios de DNA regulando assim expressão de determinados genes. O complexo AP-1 expresso cronicamente parece estar envolvido em vários fenômenos de longa duração como, dependência de drogas e crises epilépticas crônicas. Assim sendo, temos que tal complexo participa de maneira relevante de mecanismos de adaptação e plasticidade do cérebro. Nossa hipótese é que os animais pré-tratados com a IgG192-saporina não desenvolvem epilepsia crônica mesmo após SE em decorrência de alterações na expressão de Delta Fos B.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratos machos Wistar (180-200g) foram anestesiados com equitensina (4mL/kg) e submetidos a cirurgia estereotáxica para injeção intracerebroventricular (i.c.v.) (AP=-0,8 ML=+1,5 DV=-2,7) de 5 µL (1µg/µL) de IgG192-saporina (neurotoxina que lesa seletivamente neurônios colinérgicos), para grupos experimentais, e mesma quantidade de salina estéril, para grupos controle. Decorridos 15 dias da cirurgia, os ratos foram injetados com salina estéril ou pilocarpina (320 mg/kg, i.p.). Com 30 minutos de antecedência foi injetado metilescopolamina (1 mg/kg, i.p.), para minimizar os efeitos periféricos da pilocarpina. Após entrarem em SE e assim permanecerem por 90 minutos, foi injetado tiopental sódico (25 mg/kg). Durante a recuperação, os animais foram tratados com frutas, sendo feita reposição hidroeletrólítica nos primeiros dias após o SE.

Passados 30 dias os ratos foram sacrificados, perfundidos via transcardíaca com salina a 0,9% e depois com paraformaldeído 4% em PBS (pH 6,8) a 4°C.

No final do experimento os quatro grupos -IgG e pilocarpina, IgG e salina, Salina e pilocarpina, Salina e salina - foram processados imunocitoquimicamente para Delta Fos B. Para tanto os cérebros foram retirados e deixados em solução de sacarose 30%(pernoite). Posteriormente, foram cortados e processados para imunohistoquímica com anticorpo policlonal primário feito em cabra AntiFosB (Santa Cruz Biotechnology) na titulação de 1/150, anticorpo secundário anti IgG de cabra biotinizado e revelados com avidina/biotina/DAB (Vector Lab). Os cortes foram feitos e montados em lâminas e posteriormente observados ao microscópio. A análise do material foi feita nos principais núcleos do sistema límbico e em estruturas relevantes a expressão das crises epilépticas.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Conforme previsto os animais injetados com IgG-pilocarpina tiveram maior facilidade em desenvolver SE, traduzida por uma menor latência entre a administração da pilocarpina e o surgimento das crises epilépticas duradouras que caracterizam o SE. Nesta fase do projeto, foram utilizados mais 15 animais, pertencentes a diferentes grupos experimentais. Deste total 8 animais foram incluídos nas análises, enquanto 7 animais não sobreviveram ou não apresentaram SE após a administração de pilocarpina. Outros 10 animais neste momento estão em fase intermediária do processo (período pós-cirurgia estereotáxica). Temos então um total de 33 animais, dos quais foram analisados 16 até o momento.

Em análise estatística detalhada podemos afirmar que obtivemos uma marcação bastante específica para a camada granular da região do giro denteado nos grupos IgG-pilo e Salina-pilo (estatisticamente significante  $P<0,0001$ ). Estes resultados indicam que a marcação obtida está presente em maior intensidade nos grupos que receberam pilocarpina devendo a expressão da proteína delta Fos B ser causado pelo SE e não pelas crises recorrentes uma vez que os resultados entre os grupos IgG-pilo e Salina-pilo não apresentam diferenças entre si. Estes resultados concordam com dados anteriores mostrando a expressão da proteína DeltaFosB após SE em fases correspondentes ao período crônico após indução da epilepsia.

Para o próximo período: temos a intenção de completar os grupos experimentais, realizar a análise de outros animais que passaram pelo experimento e também fazer a histoquímica necessária para confirmar a lesão feita pela citotoxina e coloração por cresil violeta para identificação anatômica das áreas encefálicas.

**Participantes:** Uyanara de Freitas Tzirnazoglou, Marcelo Avedissian, Beatriz M. Longo, Luiz Eugênio Araújo de Moraes Mello

