



# ATIVACÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO CELULAR JAK/STAT3 COMO REPOSTA AGUDA AO STATUS EPILEPTICUS INDUZIDO POR ÁCIDO CAÍNICO



Kellen M. Siqueira; Cesar Sartori; André Vieira; Alexandre Rezende; Gustavo Facchini; Raffaella Ignarro; Priscila Ferreira; Carlos Assis; Janice Nascimento; Karina Furukawa; Francesco Langone  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA - INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Agência financiadora: PIBIC/CNPq

Palavras chave: Epilepsia; CNTF; Ácido Caínico

[k044469@dac.unicamp.br](mailto:k044469@dac.unicamp.br)

## 1. Introdução

A epilepsia de Lobo Temporal (ELT) é a síndrome epiléptica parcial mais frequente entre pacientes adultos sendo caracterizada por crises parciais complexas (CPC) recorrentes que se originam no hipocampo ou em estruturas adjacentes no lobo temporal mesial.

Os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações neuropatológicas induzidas pelas crises ainda são pouco conhecidos, mas acredita-se que citocinas, como o fator neurotrófico ciliar (CNTF), possam estar envolvidas. No entanto, há poucos estudos que investiguem a ativação da cascata de sinalização desencadeada pelo CNTF após a ocorrência de *status epilepticus*.

Neste projeto foi avaliada a expressão de CNTF e a fosforilação da STAT3 (pSTAT3), componente da cascata de sinalização do CNTF, no hipocampo de camundongos após indução de *status epilepticus* (SE) por administração de ácido caínico.

## 2. Materiais e Métodos

### 1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos com idade de 8 a 10 semanas pesando entre 20 e 30 gramas, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP). A utilização dos animais neste estudo foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA/ IB-UNICAMP; 1136-1).

### 2 Indução do status epilepticus

O *status epilepticus* foi induzido por uma única dose de 30 mg/kg (s.c.) de ácido caínico (Sigma). Após a administração da droga os animais foram monitorados por 4 horas empregando-se a escala proposta por Racine. Somente os animais que atingiram o estágio 5 (rearing seguido de queda) foram incluídos no presente estudo. Como controle foi usado um grupo de animais que recebeu apenas solução salina e que foram mantidos sob as mesmas condições dos animais que receberam ácido caínico.

### 3 Avaliação semi-quantitativa de pSTAT3, CNTF e CNTFR $\alpha$

Os animais incluídos no estudo foram sacrificados por decapitação, 24 horas ou 5 dias após a administração do ácido caínico ou solução salina. A seguir os hipocampus foram dissecados. As proteínas dos hipocampus foram extraídas e a expressão das proteínas de interesse foi analisada por Western blotting usando os anticorpos anti-fosfo-STAT3 (Tyr705, Cell Signaling; 1:1000), anti-CNTF (sc-9993, Santa Cruz), anti-STAT3 (sc-483, Santa Cruz) e, como controle interno, anti- $\alpha$ -tubulina (T6199, Sigma).

### 3.4 Análise estatística

Os valores de densidade óptica relativa das bandas imunorreativas obtidas com Western Blot foram submetidos a análise de ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls para um nível de significância  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

As medidas de densitometria das bandas correspondentes à p-STAT3, STAT3 total e CNTF encontram-se nas figuras 1, 2 e 3. O resultado da análise estatística usando o teste t de student não pareado para avaliar as diferenças na expressão das proteínas STAT3 total e CNTF estão nas Tabelas 1 e 2. Como a pSTAT3 apresentou níveis detectáveis apenas no grupo de animais cujo hipocampo foi coletado 24 horas após administração de ácido caínico, o teste estatístico não foi realizado.

A tabela 2 demonstra um aumento significativo da expressão de STAT3 total nos animais experimentais que foram sacrificados 24 horas ou 5 dias após a administração de ácido caínico quando comparados com seus respectivos controles. Esse aumento de expressão não foi acompanhado pelo CNTF, o que sugere que a liberação de CNTF e não sua produção é responsável pela ativação de sua cascata de sinalização.

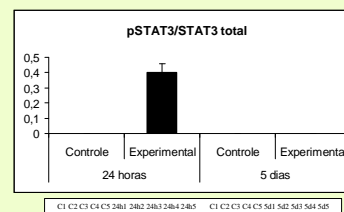


Figura 1. Expressão de pSTAT3 corrigido pela expressão de STAT3 total para os animais que tiveram o hipocampo coletado 24 horas ou 5 dias após a administração de ácido caínico (experimentais) ou de solução salina (controles).

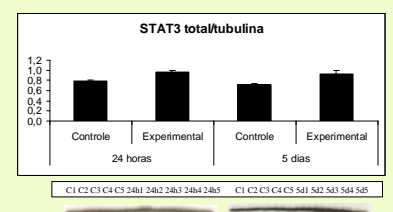


Figura 2. Expressão de STAT3 corrigido pela expressão de Tubulina para os animais que tiveram o hipocampo coletado 24 horas ou 5 dias após a administração de ácido caínico (experimentais) ou de solução salina (controles).

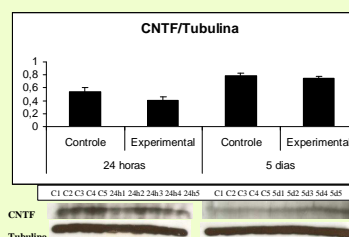


Figura 3. Expressão de CNTF corrigido pela expressão de Tubulina para os animais que tiveram o hipocampo coletado 24 horas ou 5 dias após a administração de ácido caínico (experimentais) ou de solução salina (controles).

Tabela 1. Teste t para STAT3 total corrigido por  $\alpha$ -tubulina.

	Teste t para STAT3/ $\alpha$ -Tubulina
24 horas (controle X status epilepticus)	$p = 0,0036$
5 dias (controle X status epilepticus)	$p = 0,0380$
24 horas X 5 dias (status epilepticus)	$p = 0,2832$

Tabela 2. Teste t para CNTF corrigido por  $\alpha$ -tubulina.

	Teste t para CNTF/ $\alpha$ -Tubulina
24 horas (controle X status epilepticus)	$p = 0,249094$
5 dias (controle X status epilepticus)	$p = 0,826600$
24 horas X 5 dias (status epilepticus)	$p = 0,132585$

## 4. Conclusões

Os dados obtidos demonstram a ativação da via de sinalização celular JAK/STAT3 como resposta aguda ao SE e um aumento de STAT3 total como uma resposta sustentada às lesões. Os resultados sugerem, também, que a liberação de CNTF seja responsável pela ativação da p-STAT3, reforçando assim seu papel neuroprotetor agudo.

## 5. Agradecimentos

