

## Prêmio Cesare Lombroso \*

# Expressão de Proteínas de Choque Térmico na Epilepsia do Lobo Temporal Mesial

Ludmyla Kandratavicius, Jaime Eduardo Cecílio Hallak, João Pereira Leite

Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

### RESUMO

**Objetivos:** Em modelos animais de epilepsia, heat shock protein 70 (HSP70) tem sua expressão proporcional à intensidade de crises. A HSP90, dentre diversas ações, regula a sintase neuronal do óxido nítrico e proteínas do citoesqueleto. Devido ao provável papel protetor de HSP70 e à relação de HSP90 com proteínas envolvidas na epileptogênese, decidimos investigar a expressão imunohistoquímica destas proteínas na epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM). **Métodos:** Hipocampos de pacientes ELTM fármaco-resistentes foram obtidos durante o procedimento cirúrgico e hipocampos controle foram obtidos de necrópsias. Os espécimes obtidos foram tratados igualmente e submetidos a imunohistoquímica. Medidas de imunoreatividade positiva foram obtidas com o software ImageJ. **Resultados:** Nossas medidas mostraram menor expressão de HSP70 e HSP90 no hipocampo de pacientes epiléticos do que nos controles em praticamente todas as regiões do hipocampo. Para HSP70 as diferenças significativas foram encontradas na região subicular e para HSP90 em todas, exceto *fascia dentata* e subículo. **Conclusão:** Diferente dos achados em modelos animais, nossos resultados indicam que crises crônicas nos pacientes ELTM não são estímulo suficiente para ativação exacerbada de HSP70 e HSP90. Condições inerentes à ELTM podem ser determinantes desta menor expressão. Ainda, nossos achados sugerem que a baixa expressão de HSPs pode estar relacionada a manutenção das crises.

**Unitermos:** epilepsia do lobo temporal, heat shock protein 70, heat shock protein 90.

### ABSTRACT

#### *Heat shock protein expression in mesial temporal lobe epilepsy*

**Objective:** In animal models of epilepsy, heat shock protein 70 (HSP70) has its expression proportional to seizure severity. Among several functions on biological systems, HSP90 regulates nitric oxide synthase and cytoskeletal proteins. Due to the plausible protective role of HSP70 and the relationship of HSP90 with proteins involved in epileptogenesis, we looked at HSP70 and 90 immunohistochemical expression in temporal lobe epilepsy (TLE). **Methods:** Hippocampi were obtained from medically intractable TLE patients and control hippocampi were from necropsy cases. Specimens were equally treated and submitted to immunohistochemistry to HSP70 and HSP90. Positive immunoreactivity was estimated using the software ImageJ. **Results:** Our results showed significant lower expression of HSP70 and HSP90 in epileptic patients when compared to controls in almost all hippocampal regions. To HSP70 subicular region exhibited significant difference and to HSP90 all regions, except *fascia dentata* and subiculum. **Conclusion:** Unlike the reports in animal models the present results indicate that chronic seizures in TLE patients are not sufficient to induce HSP70 and HSP90 activation. Typical attributes inherent to TLE condition may be determinants of low HSP expression. In Addition, our results suggest that low expression of HSPs in epileptic groups may be related to seizure maintenance.

**Key words:** temporal lobe epilepsy, heat shock protein 70, heat shock protein 90.

\* Prêmio concedido durante o XXXI Congresso Brasileiro de Epilepsia da LBE.  
Received June 26, 2006; accepted July 07, 2006.

## INTRODUÇÃO

A proteína de choque térmico 70 (do Inglês, heat shock protein – HSP70) é a principal representante entre as proteínas induzíveis por *stress*<sup>(4)</sup>, como o que ocorre nas crises epiléticas. Estudos com modelos animais de epilepsia relatam que o aumento de expressão de HSP70 é proporcional à gravidade das crises<sup>(2)</sup>. Os mecanismos neuroprotetores da HSP70 ainda não estão elucidados, mas sua expressão elevada sugere um papel protetor, levando a atenuação do influxo de cálcio intracelular e diminuição da morte celular no hipocampo após crises induzidas<sup>(7)</sup>.

A proteína de choque térmico 90 (HSP90) tem sido muito pouco estudada na epilepsia. Suas funções vão além das de uma chaperona simples: é ligante de cálcio, calmodulina, ATP e tem atividade peptidase e quinase. Interage e regula inúmeras proteínas de grande interesse em várias patologias como sintase do óxido nítrico, receptores esteróides, caseína, proteasoma, Tau, actina, tubulina e filamentos intermediários<sup>(1)</sup>.

Há poucos estudos investigando o papel de HSP70 nas epilepsias e praticamente nenhuma informação até o presente momento em relação a HSP90. Devido à provável proteção mediada por HSP70 e ao papel desempenhado por HSP90 na interação com proteínas fatores-chave na epileptogênese, buscamos investigar a expressão imunohistoquímica delas na epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM).

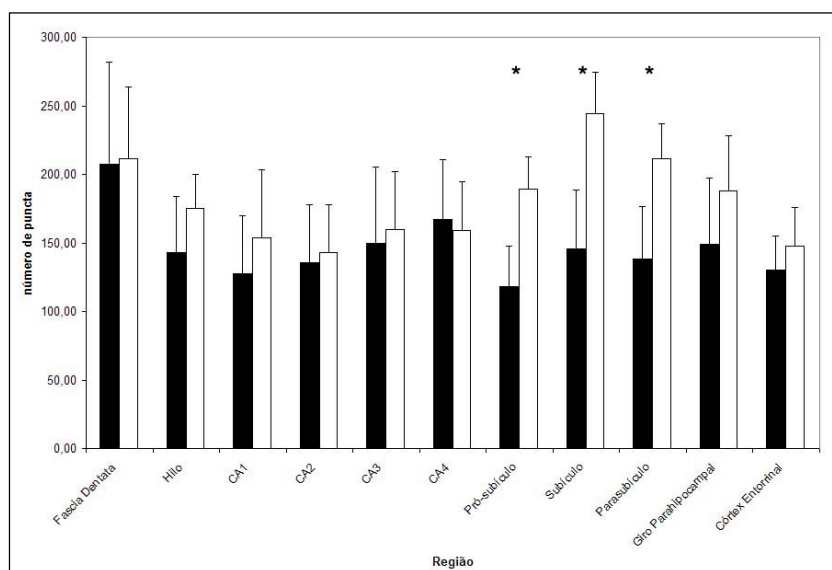
## PACIENTES E MÉTODOS

Dezesseis hipocampos foram obtidos em cirurgia de pacientes com ELTM farmacorresistente, todos avaliados e operados no CIREP-FMRP. Hipocampos controle (n = 6) foram obtidos através de necropsia, de sujeitos sem histó-

ria prévia de doenças neurológicas. Em todos os casos de necropsia, o tempo *post-mortem* não excedeu a 4 horas. As peças cirúrgicas foram então igualmente tratadas, fixadas em formalina 10% (v/v), desidratadas e incluídas em parafina. Secções de 10  $\mu$ m de tecido hipocampal foram submetidas à imunohistoquímica para HSP70 e HSP90. Em resumo, as secções foram desparafinizadas, submetidas a bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 4,5% (v/v) e recuperação antigênica em tampão 50 mM Tris-HCl pH 9,6. Os anticorpos, ambos da Stressgene, foram diluídos em tampão contendo 5% (p/v) leite desnatado e 3% (v/v) soro de cabra não-imune (Vector). As diluições foram de 1:300 (HSP70 – SPA-812) e 1:30 (HSP90 – SPA-830), com incubação *overnight*. Na revelação utilizamos diaminobenzidina como cromógeno. Secções nas quais foi omitido o anticorpo primário tiveram completa ausência de marcação. As regiões do hipocampo foram definidas de acordo com a classificação de Lorente de Nó e incluíram: *fascia dentata*, hilo, CA4, CA3, CA2, CA1, prosúbulo, subículo, giro parahipocampal e córtex entorrinal. As secções foram analisadas em microscópio óptico e a imagem digitalizada. A quantidade de marcação positiva (*puncta*) foi estimada com o software ImageJ. A análise estatística utilizada foi o Teste T para amostras independentes do programa SPSS.

## RESULTADOS

O teste T de nossos resultados mostrou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Mas ao contrário do que ocorre nos modelos animais em relação a HSP70, obtivemos diminuição significativa na expressão de HSP70 e HSP90 nos pacientes epiléticos em relação aos controles em praticamente todas as regiões do hipocampo. Os valores de *puncta* obtidos podem ser observados a seguir.



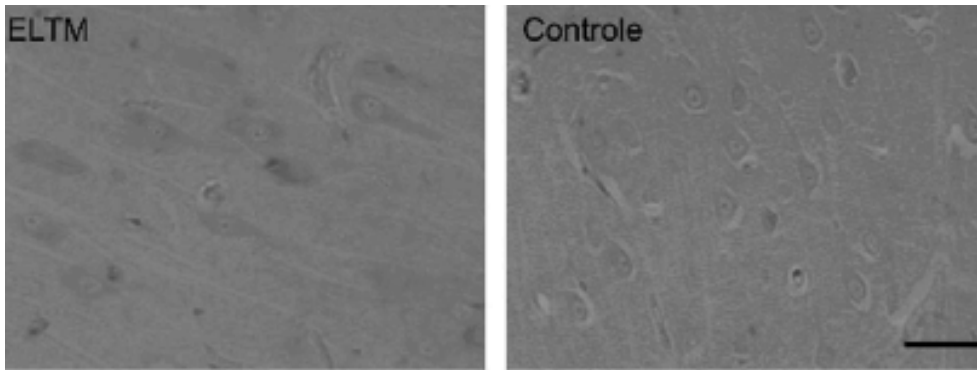
**Figura 1.** Densidade de *puncta* imunopositivos para HSP70 em diferentes subcampos da formação hipocampal.

Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre epiléticos e controle nas regiões do pró-subículo, subículo e parasubículo, indicadas com asteriscos. Demais regiões não apresentaram diferença estatística. Barra negra representa o grupo de pacientes ELTM e barra branca representa o grupo controle.

O padrão imunohistoquímico para HSP70 pode ser examinado na Figura 2. No grupo controle, as grandes células do subículo apresentam marcação homogênea no corpo celular, em contraste com o menor número destas marcadas no subículo dos pacientes epiléticos. Embora algumas células subiculares dos indivíduos epiléticos apareçam maiores e bem marcadas, inclusive na parte proximal do prolongamento axonal, podemos observar nestes mesmos pacientes vários traços não marcados, representativos de prolongamentos sem presença detectável de HSP70.

Em relação à expressão de HSP90 observaram-se diferenças entre o grupo epilético e controle em todo o Corno de Amon, setor de Sommer, além do parasubículo, giro parahipocampal e córtex (Figura 3).

Na Figura 4 mostramos o padrão de expressão de HSP90 no hilo. Novamente, o padrão de imunoreatividade nos pacientes epiléticos difere bastante do encontrado nos controle. No grupo controle a marcação tende a ser mais homogênea, e no grupo ELTM restrita a algumas células.



Pacientes epiléticos exibem menor marcação em número de células e em prolongamentos do que os pacientes controle. Barra de calibração no canto inferior direito representa 100 µm.

Figura 2. Imunomarcacão de HSP70 em subículo humano.

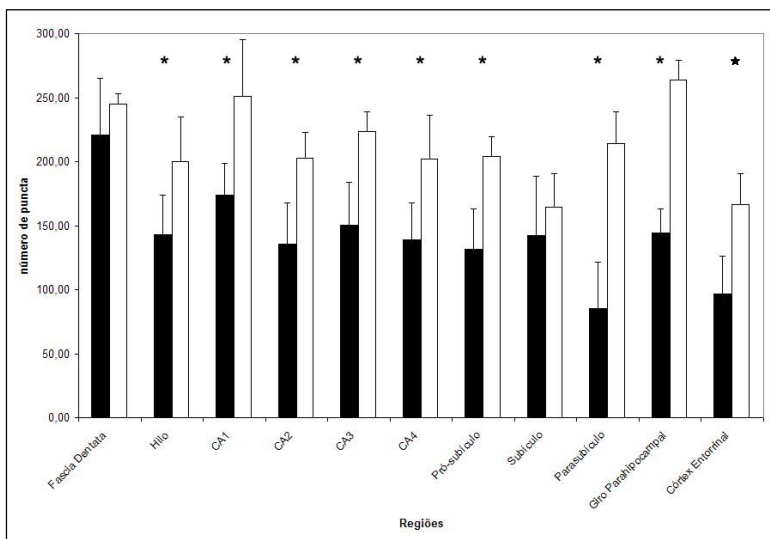
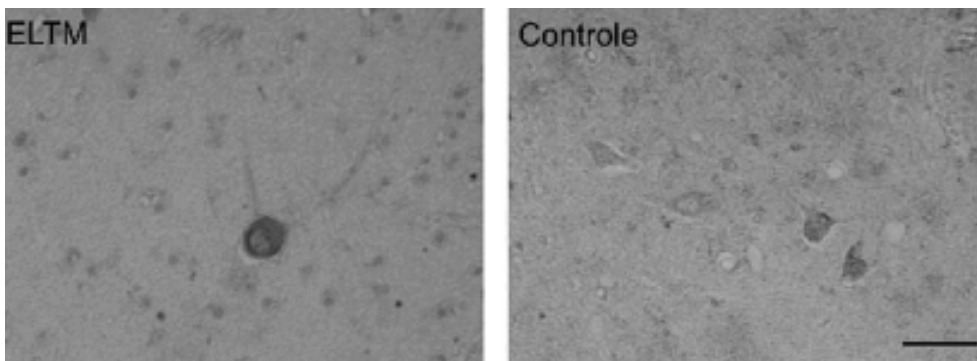


Figura 3. Densidade de puncta imunopositivos para HSP90 em diferentes subcampos da formação hipocámpal.

Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre epiléticos e controle nas regiões do hilo, CA1, CA2, CA3 e CA4, pré-subículo, parasubículo, giro parahipocámpal e córtex entorrinal, indicadas com asteriscos. Barra negra representa o grupo de pacientes ELTM e barra branca representa o grupo controle.



A principal diferença está na quantidade de neurônios e células gliais positivas para HSP90. Embora os pacientes epiléticos exibam algumas células polimórficas com maior imunoreatividade do que as dos controle, o número de puncta ainda assim é maior no grupo não epilético. Barra de calibração no canto inferior direito representa 100 µm.

Figura 4. Imunomarcacão de HSP90 no hilo humano.

## DISCUSSÃO

Reportamos aqui resultados sobre a relação de HSP70 e HSP90 em ELTM, dados ainda não encontrados na literatura. Os resultados indicam que a presença de crises epiléticas (crônicas) no grupo epilético não é condição de stress suficiente para a ativação de HSP70 e HSP90, contrastando com achados de aumento de expressão observada após crises agudas induzidas e animais de experimentação<sup>(2-3)</sup>. Os achados sugerem que a perda neuronal, gliose e reorganização de circuitos axonais, achados típicos do hipocampo de pacientes com ELTM, possam ser condições determinantes da baixa expressão de HSP. Além disso, por não termos registro de quando nossos pacientes sofreram sua última crise antes do momento da cirurgia, tal ocorrência pode ter sido um fator limitante na janela de detecção de um pico de expressão de HSPs, que em modelos animais é de entre 3 e 5 dias contando da crise ou *stress* precipitante<sup>(6)</sup>. Também podemos inferir que muitos dos neurônios com baixa expressão de HSPs estejam na verdade com danos irreversíveis, como os encontrados em casos de SUDEP (morte súbita e inesperada em epilepsia)<sup>(5)</sup>.

É importante ressaltar, no presente estudo, a limitação na interpretação dos dados obtidos do grupo controle. Procuramos definir um grupo controle o mais próximo possível das condições dos grupos de pacientes epiléticos, observando um limite de 4 horas entre o óbito e a necropsia, a fim de trabalharmos com um material bem conservado e passível de comparações. No entanto, fatores determinantes da morte nestes pacientes podem ser, em tese, responsáveis por alguma ativação na expressão de HSP. A ausência de problemas neurológicos no grupo

controle permite-nos sugerir que a expressão diminuída dessas HSPs nos epiléticos está relacionada a vias de manutenção de crises.

## AGRADECIMENTOS

Ao trabalho técnico no corte dos hipocampus feito por Renata Caldo-Scanduzzi. Ao apoio financeiro do CNPq, FAPESP e FAPESP (programa CInAPCe, processo # 05/56447-7).

## REFERÊNCIAS

1. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohazka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 1998; 79(2):129-68.
2. Gass P, Prior P, Kiessling M. Correlation between seizure intensity and stress protein expression after limbic epilepsy in the rat brain. *Neuroscience.* 1995;65(1):27-36.
3. Lee JY, Park J, Kim YH, Kim DH, Kim CG, Koh JY. Induction by synaptic zinc of heat shock protein-70 in hippocampus after kainate seizures. *Exp Neurol.* 2000;161(2):433-41.
4. Sharp FR, Massa SM, Swanson RA. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci.* 1999;22(3):97-9.
5. Thom M, Seetah S, Sisodiya S, Koepp M, Scaravilli F. Sudden and unexpected death in epilepsy (SUDEP): evidence of acute neuronal injury using HSP-70 and c-Jun immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;29(2):132-43.
6. Torregrossa G, Barbera MD, Orti M, Centeno JM, Salom JB, Justicia C, Planas AM, Alborch E. Temporo-spatial expression of HSP72 and c-Jun and DNA fragmentation in goat hippocampus after global cerebral ischaemia. *Hippocampus.* 2001;11:146-56.
7. Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, Liu J, Panter SS, Weinstein PR. Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures. *Neurosurgery.* 2003;53(5):1179-87.

### Endereço para correspondência:

Ludmyla Kandratavicius  
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Neurologia, 4º andar  
Av. Bandeirantes, 3900  
CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil