



Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR
GLIAL EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS
SUBMETIDOS A CHOQUE ELETROCONVULSIVO**

Autora: Keila Maria Mendes Ceresér

Orientador: Flávio Kapczinski

DOUTORADO

PORTO ALEGRE, 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR
GLIAL EM TECIDOS CEREBRAIS DE RATOS
SUBMETIDOS A CHOQUE ELETROCONVULSIVO**

Keila Maria Mendes Ceresér

**Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade
Federal do Rio Grande do
Sul, para obtenção do título
de Doutor em Ciências
Médicas.**

Doutorado

2005

Catálogo-na-Publicação

C414 Ceresér, Keila Maria Mendes

Avaliação dos níveis de proteína ácida fibrilar glial em tecidos cerebrais de ratos submetidos a choque eletroconvulsivo / Keila Maria Mendes Ceresér. – 2005. 79 f.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
Orientador: Dr. Flávio Kapczinski

1. Eletroconvulsoterapia 2. Proteína Ácida Fibrilar da Glia 3. Depressão I. Kapczinski, Flávio II. Título

NLM WM 412

(Bibliotecária responsável: Elise Maria Di Domenico Coser - CRB-10/1577)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Flávio Kapczinski, pela dedicação demonstrada na orientação deste trabalho em todas as etapas, bem como pela confiança, incentivo e amizade.

Ao Professor Carlos Alberto Gonçalves (CA), pela receptividade, informações e sugestões valiosas, além do estímulo para realizar este trabalho.

Ao Professor João de Quevedo e sua equipe, pelo auxílio especialmente na primeira etapa do trabalho.

À Professora Aida Santin, pela amizade e confiança.

Aos colegas, ex-professores e amigos da Faculdade de Farmácia desta Universidade, onde iniciei a minha formação em pesquisa, especialmente Ana Maria Bergold, Eduardo José Centeno de Castro, Léa Chiapini, Elfrides Schapoval Eloir Schenkel e Pedro Fröelich.

Aos amigos especiais Juliana Halbig e Jarbas Montanha, Marcello e Rita Mascarenhas, Mara Moreira, Vânia Moojen, Cláudia Loch, pela amizade e estímulo constantes.

À amiga e colega Fernanda Bley Bernardes, pelo auxílio nas dosagens e descrição da técnica.

À amiga e colega Ana Cristina Andreazza, pela avaliação estatística dos resultados.

Aos amigos do Laboratório de Psiquiatria Experimental desta Universidade; especialmente Adriane da Rosa, Alice Cacilhas, Benício Frey, Fernando Gazalle, Juliana Tramontina, Júlio Walz e Márcia Sant'ana, pela grande amizade, união e ajuda em todos os momentos.

Às bolsistas Sabrina Correa da Costa, Vanessa Zanatto, Fernanda Weyne e Mariana de Wallau, pelo apoio e disponibilidade.

Às colegas do Laboratório S-100B, da Bioquímica, especialmente Francine, Ana, Dani, Carmem, Pati, Lúcia e Mari.

Aos colegas Carmem Pilla, João Busnello, Luciana Ribeiro, Ricardo Silveira, Regina Margis, Clarissa Gama, pelos momentos compartilhados.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao FIPE pela concessão de verba para aquisição de reagentes.

À Coordenação e demais professores deste Curso de Pós-Graduação, pela oportunidade e apoio recebidos.

À minha família, especialmente a meus pais, pelo apoio e amor sempre recebidos.

A DEUS, CUJA COMPANHIA CONTÍNUA VIABILIZOU A EXECUÇÃO DESTE TRABALHO.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
REVISÃO DA LITERATURA.....	6
OBJETIVOS.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ARTIGO EM INGLÊS	26
ARTIGO TRADUZIDO	41
ANEXOS.....	60

INTRODUÇÃO

A eletroconvulsoterapia (ECT) é um procedimento caracterizado por uma convulsão cerebral generalizada, com duração entre 20-30 segundos, induzida por um estímulo elétrico, sob anestesia geral e relaxamento muscular (Madsen et al., 2000). As principais indicações para ECT incluem depressão maior, episódios maníacos e esquizofrenia, quando refratárias à terapia medicamentosa (Ellis & Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists, 2004). A frequência e o número de sessões dependem do estado do paciente, mas normalmente são realizadas três aplicações semanais, com duração de duas a quatro semanas (Flint & Gagnon, 2002). Pela sua eficácia em depressões mais severas, provavelmente a ECT parece reduzir o risco de suicídio, mas não há estudos avaliando o benefício a longo prazo (Reisner, 2003).

REVISÃO DA LITERATURA

A prática clínica da ECT desenvolveu-se a partir do trabalho de Ladislav von Meduna em 1935 (Ladislav von Meduna apud Busnello et al., 2004) a respeito dos benefícios da indução de convulsão pelo monobrometo de cânfora em pacientes esquizofrênicos. Seguindo essa indicação Cerletti e Bini, em 1938 (Cerletti e Bini apud Busnello et al., 2004), relataram que as convulsões poderiam ser induzidas por estímulo elétrico em seres humanos, com segurança. O uso de ECT difundiu-se rapidamente e em 1939 o neurologista Walter Freeman somou à ECT a administração de curare, com objetivo de reduzir as taxas de fraturas associadas a esta técnica, logo

sendo incorporado o uso de anestésicos gerais (Busnello et al., 2004). Na década de 40, Smith e colaboradores publicaram um trabalho onde havia sido observada melhora em pacientes maníacos que fizeram uso de ECT (Mukherjee et al., 1994). Nas décadas de 70 e 80, pelo avanço da psicofarmacologia, pelo surgimento do movimento antipsiquiátrico e pelo aumento de relatos de amnésia retrógrada e anterógrada associados à ECT, houve uma marcada diminuição do uso desta técnica (McCall, 2001). Entre os anos 90 até o momento atual, houve grandes avanços em relação ao modo de aplicação da ECT, sendo considerada uma técnica segura, principalmente para pacientes refratários à farmacoterapia e idosos (Ellis and Royal Australian & New Zealand College of Psychiatrists, 2004).

Apesar da ECT vir sendo usada como tratamento para transtornos mentais desde a década de 30, as opiniões acerca desta técnica são controversas (UK-ECT, 2003). Um problema freqüentemente associado à ECT é a perda transitória de memória (Rose et al., 2003). Janicak e colaboradores realizaram uma metanálise sobre a eficácia da ECT contra placebo e antidepressivos (tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase) e também comparando as formas unilateral (não-dominante) e bilateral, concluindo que a ECT é superior a estes antidepressivos no tratamento da depressão e que não há diferença significativa entre as técnicas unilateral e bilateral em relação à eficácia (Janicak et al, 1985). Porém, a ECT unilateral (não-dominante) causa menos distúrbios de memória em relação à técnica bilateral (Andrade et al., 2002). Uma revisão sobre ECT realizada por Devanand et al. (1994) não demonstrou evidências convincentes de lesões cerebrais. Reisner (2003) realizou uma revisão na literatura abordando a

eficácia e segurança da ECT, enfatizando a controvérsia se a ECT causa ou não dano cerebral. As evidências apontam para a não ocorrência de dano cerebral após ECT e que os problemas relacionados à memória são transitórios (Reisner, 2003).

O mecanismo de ação da ECT é ainda desconhecido; contudo há relatos de que esta técnica conduz a uma ampla liberação de neurotransmissores (NT), ocorrendo um aumento da concentração de monoaminas, entre outros NT; isso resulta em uma *down-regulation* de uma variedade de receptores, incluindo aqueles percebidos como reguladores positivos na depressão, por exemplo os receptores β da norepinefrina e receptor 5-HT_{1A} (Schloss & Henn, 2004). Existem também fortes efeitos sobre a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e de glutamato (Sanacora et al., 2003).

Ao lado de numerosas alterações nos receptores, observadas na ECT crônica, existem ainda alterações ao longo das rotas de transdução de sinais que também estão envolvidas na ação dos fármacos antidepressivos. Fatores de transcrição podem ser induzidos pela ECT e este parece ser o mecanismo-chave envolvendo a plasticidade neuronal (Schloss & Henn, 2004). O efeito antidepressivo da ECT pode depender, ao menos em parte, da estimulação da plasticidade celular e sináptica na formação do hipocampo. De acordo com esta idéia, foi observado, através da aplicação de choque eletroconvulsivo (ECS) em ratos, um aumento sustentado das moléculas de adesão das células neuronais (N-CAM), estando estas envolvidas na sinaptogênese. Estes resultados sugerem que novos circuitos neuronais podem também envolver um grande número de novos neurônios (Madsen et al., 2000). O ECS crônico, segundo trabalho

conduzido por Vaidya e colaboradores (1999), induziu ao surgimento de fibras muscoides no hipocampo; este achado não é observado com o uso de antidepressivos. O ECS, e por extensão a ECT, pode levar à maior formação de neurônios no hipocampo (Vaidya et al., 1999).

Zachrisson e colaboradores (2000) dosaram proteína τ (*Tau*), neurofilamento e S-100B no líquido de pacientes deprimidos que vinham sendo tratados com ECT e não observaram evidências de dano (Zachrisson et al., 2000). Em ratos, é observado que após ECS ocorre aumento de Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) e de S-100B no líquido cérebro-espinhal. Postula-se que a GFAP e a S-100B encontram-se aumentadas na gliose e que somente a GFAP é marcadora de degeneração glial; a hipótese do ECS (e por extensão da ECT) causar degeneração glial não está descartada, havendo necessidade de maiores estudos; porém o ECS protege os neurônios de danos relacionados ao estresse, possivelmente via regulação de fatores neurotróficos (Zachrisson et al., 2000).

Girardi e colaboradores (2004) induziram convulsões repetidas em ratos através da administração de ácido 3-mercaptopropiônico (MP), a fim de verificarem a resposta dos astrócitos no hipocampo e córtex cerebral. Ambas áreas mostraram hipertrofia dos astrócitos, com ampliação dos processos e aumento de tamanho. Hiperplasia dos astrócitos foi observada somente no córtex cerebral. Ocorreu aumento de GFAP nos astrócitos (nas duas regiões) após administração de MP. Há estudos que mostram aumento do RNAm para GFAP após convulsões agudas ou crônicas induzidas por

ECT; especula-se que haja difusão de alguma substância que também afeta a expressão gênica glial das estruturas vizinhas (Girardi et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado um aumento da neurogênese em hipocampo de ratos adultos em resposta ao ECS ou a antidepressivos. A neurogênese está bem estabelecida no hipocampo em espécies adultas, porém não é observada em outras regiões em condições normais, isto é, ausência de estimulação. Nos transtornos de humor estão envolvidas outras regiões cerebrais, além do hipocampo. Madsen e colaboradores (2005) verificaram o efeito do ECS crônico sobre a proliferação celular no córtex frontal e examinaram o fenótipo destas células. ECS aumenta o número de novas divisões celulares no córtex pré-frontal e estas novas células podem reverter a perda do número de células gliais, bem como seu volume reduzido, que têm sido descritos no córtex pré-frontal de pacientes deprimidos (Madsen et al., 2005).

Tsankova e colaboradores (2004) observaram que o ECS promove alterações específicas no hipocampo, altamente correlacionadas com alterações na expressão gênica (Tsankova, Kumar & Nestler, 2004). Também estudos recentes demonstraram que a plasticidade neural ao estresse e à depressão envolve alterações na sobrevivência celular e morfologia neuronal, havendo a possibilidade de que falhas na plasticidade neural possam contribuir para o desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos; a neurogênese é aumentada por condições que estimulam a atividade neuronal, sugerindo que este processo seja também regulado positivamente pela plasticidade neuronal (Duman et al., 2000).

Classicamente, as células gliais têm sido vistas como fornecedoras de suporte físico e trófico para os neurônios (Liedtke et al., 1996). Os filamentos intermediários formam um grupo de proteínas do citoesqueleto, que desempenham um papel na força mecânica e forma das células e seus processos, como: manutenção da barreira hematoencefálica, regulação de água, íons e metabolismo de aminoácidos e neurotransmissores, modulação de respostas imunes e inflamatórias, sinaptogênese e plasticidade sináptica (Stringer, 1996). A Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) é a proteína majoritária dos filamentos intermediários dos astrócitos (8-10 nm), apresentando 40-50 kDa, sendo um marcador específico para astrócitos (Eng, Ghirnikar & Lee, 2000); foi descrita primeiramente em 1971 por Eng e colaboradores.

A expressão da GFAP é essencial para a arquitetura da substância branca e para a integridade da barreira hematoencefálica; sua ausência leva à desmielinização no Sistema Nervoso Central (SNC) e aumenta com a idade em praticamente todos os mamíferos (Liedtke et al., 1996). Na neuropatologia clínica e experimental, anticorpos anti-GFAP são usados como marcadores específicos para células gliais e suas respostas reativas ao estresse e doenças, bem como para a discriminação de células ou neoplasmas gliais e não-gliais. Contudo, RNAm para GFAP e a proteína também têm sido detectados em células não pertencentes ao SNC, como glia entérica, células mioepiteliais, glândulas mamárias, epitélio das glândulas salivares, linfócitos humanos, fibroblastos e células Schwann (Hainfellner et al., 2001).

GFAP, como um membro da família das proteínas do citoesqueleto, é um importante modulador da motilidade e forma dos astrócitos, por prover a estabilidade estrutural aos processos astrocíticos. Esta proteína foi descoberta a partir de estudos de lipídios em cérebros com esclerose múltipla, caracterizada por gliose intensa e formação de uma escara composta por axônios sem adjacência cercados por astrócitos recheados com filamentos gliais (Eng, Ghirnikar & Lee, 2000). A gliose é um evento que ocorre no SNC posteriormente a um dano tecidual, sendo caracterizada pela presença de um grande número de astrócitos reativos (Norton et al., 1992). Após estresses (traumas, doenças, distúrbios genéticos, insultos químicos), no SNC de vertebrados superiores, os astrócitos começam a reagir, respondendo de uma maneira típica, denominada de astrogliose, caracterizada por uma síntese rápida de GFAP (Eng, Ghirnikar & Lee, 2000).

Um aumento significativo do número de células astrogliais positivas para GFAP pode ser detectado próximo à contusão cortical de uma a quatro semanas após estresse cerebral (Hausmann et al., 2000). Um aumento de GFAP pode ser devido à migração de astrócitos positivos para GFAP próximo à lesão ou à proliferação de uma nova população de astrócitos (Ajtai & Kálmán, 1998). Devido ao aumento de sua expressão durante danos ao SNC, GFAP pode ser um indicador de neurotoxicidade (Toimela & Tähti, 1995). A síntese de GFAP é aumentada quando os astrócitos são ativados em resposta a uma situação de estresse ou aumento anormal da atividade neuronal (Hansen et al., 1990).

Quatro entre oito espécies de proteínas com diferenças na expressão, específicas para certas doenças (depressão, esquizofrenia e distúrbio bipolar), foram identificadas como isoformas de GFAP, em estudos pós-morte em córtex cerebral humano, encontrando-se diminuídos os níveis de GFAP nesta região. A descoberta de múltiplas espécies de GFAP, com diferentes pontos isoelétricos porém pesos moleculares similares, é provavelmente o reflexo da presença de diferentes níveis de modificações pós-translacionais desta proteína. O nível de expressão de GFAP é modulado por vários fatores sobre o desenvolvimento cerebral, incluindo citocinas, hormônios e fatores de crescimento (Johnston-Wilson et al., 2000).

Girardi e colaboradores (2004) induziram convulsões em ratos através da administração de ácido mercaptopropiônico e verificaram aumento da concentração de GFAP no hipocampo e córtex parietal entre 4-7 dias após os experimentos, sendo salientados alguns aspectos na discussão desta trabalho:

1. Este aumento pode ser explicado pela dissociação de filamentos gliais ao redor do edema ou por um aumento da síntese de GFAP.
2. No hipocampo o número de astrócitos não sofreu alterações nos ratos tratados, porém a área das células astrogliais foi significativamente maior; enquanto que no córtex cerebral ocorreu hiperplasia astrogliar e aumento da área dos astrócitos.
3. Isto pode ser devido a um aumento na divisão celular ou a um aumento das células positivas à GFAP.

Em modelo de “*kindling* hipocampal”, induzido por eletrodos, foi observado um aumento no RNAm para GFAP, sendo que o mesmo ocorreu também após uma única convulsão; é especulado que o aumento possa ocorrer pela difusão de uma substância que afete a expressão gênica em estruturas vizinhas (Girardi et al., 2004). Por outro lado, estudos realizados por Cotter et al. (2001) mostraram redução da densidade das células gliais no córtex frontal e no tamanho neuronal em pacientes com depressão maior e sabe-se que as células gliais são mais numerosas do que os neurônios no córtex e cruciais ao funcionamento dos neurônios (Cotter et al., 2001). Em modelos animais de ECS, o grau e a duração do dano neuronal refletem no grau e na duração da astrogliose (Ross et al., 2003). Estudo realizado por Steward (1994) demonstrou que convulsões induzidas por ECS aumentam os níveis de RNAm GFAP, sendo estes dados consistentes com estudos prévios que indicam que a expressão de GFAP é regulada positivamente após convulsões (Steward, 1994). Orzi et al. (1990) encontrou, após aplicação de ECS repetidos em ratos, um aumento de GFAP no hipocampo, particularmente no giro denteado. Este aumento não foi encontrado após uma única aplicação de ECS (Orzi et al., 1990). Takamiya e colaboradores (1988) encontraram níveis aumentados de GFAP ao redor da lesão no córtex por três dias após estresse em ratos (Takamiya et al., 1988).

Dwork e colaboradores (2004) realizaram estudos aplicando ECT em primatas (*Macaca mulatta*), não sendo observada perda celular ou dano cerebral. O aumento de GFAP no hipocampo, amígdala e giro frontal superior, observado nos primeiros dias,

declinando após estes, sugere uma reação transitória à excitação neuronal (Dwork et al, 2004). Estudos prévios têm descrito que um único ECS induz a expressão de GFAP nos astrócitos, no giro denteado do hipocampo. A expressão de GFAP pode ser induzida como resultado da maior expressão do fator de crescimento, que também ocorre como resultado de outros tipos de convulsões. Trabalho realizado por Steward e colaboradores (1997) mostrou *up-regulation* da expressão de GFAP por inibição da síntese proteica 5 minutos antes ou 12 horas após um único ECS. A perda de neurônios não é um pré-requisito para o estabelecimento do estado epiléptico e convulsões de curta duração não causam, necessariamente, morte neuronal (Steward, Kelley & Schauwecker, 1997).

No *kindling*, os astrócitos são ativados por fatores não relacionados à degeneração neuronal, mas a uma atividade neuronal anormal (Khurgel et al, 1995). Hansen e colaboradores (1990) estudaram o efeito do *kindling* hipocampal e marcadores gliais, encontrando um aumento de GFAP e de Enolase Neurônio Específica (NSE) no hipocampo, córtex piriforme e amígdala; isto indica, respectivamente, gliose reativa e aumento do metabolismo anaeróbico. Também foi observada uma redução do número de Moléculas de Adesão das Células Neurais (N-CAM) , indicando degeneração neuronal (Hansen et al., 1990).

Os níveis de GFAP estão diminuídos em certas condições, como encefalopatia hepática e uso de álcool (Guo-Ross et al., 1999). A transcrição gênica da GFAP no núcleo neocortical humano pode ser inibida por concentrações nanomoleculares de

alumínio; também foi descrita a diminuição dos níveis de GFAP após tratamento com alumínio em culturas de astrócitos do córtex cerebral de ratos (Guo-Ross et al., 1999). Não são conhecidos os efeitos do choque eletroconvulsivo sobre a expressão de GFAP no cérebro de ratos. A investigação deste tema foi iniciada com os experimentos ao longo do presente trabalho.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar os níveis de Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) em tecidos cerebrais de ratos submetidos ao Choque Eletroconvulsivo (ECS).

Específicos

1. Adaptar técnica de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) descrita por Herrmann et al. (2000) para detecção de GFAP em tecidos cerebrais de ratos.
2. Comparar os níveis de GFAP no hipocampo, cerebelo e córtex de ratos submetidos a uma sessão de ECS (agudo) e controles.
3. Comparar os níveis de GFAP no hipocampo, cerebelo e córtex de ratos submetidos a oito sessões de ECS (crônico) e controles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajtai BM, Kálmán M. 1998. Glial fibrillary acidic protein expression but no glial demarcation follows the lesion in the molecular layer of cerebellum. *Brain Research* 802:285-288.

Andrade C, Thyagarajan S, Vinod PS, Srikanth SN, Rao NSK, Chandra JS. 2002. Effect of stimulus intensity and number of treatments on ECS-related seizure duration and retrograde amnesia in rats. *The Journal of ECT*. 18(4):197-202.

Busnello JV, Agostinho F, Feier G, Martins MR, Quevedo J. Eletroconvulsoterapia. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. et al. 2004. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos* 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, cap. 13, p. 181-189.

Cerletti, Bini. 1938 apud Busnello JV, Agostinho F, Feier G, Martins MR, Quevedo J. Eletroconvulsoterapia. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. et al. 2004. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos* 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, cap. 13, p. 181-189.

Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. 2001. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry* 58:545-53.

Devanand DP, Dwork AJ, Hutchinson ER, Bolwig TG, Sackeim HA. 1994. Does ECT alter brain structure? *American Journal of Psychiatry* 151:957-970.

Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C. 2000. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological Psychiatry* 48:732-39.

Dwork AJ, Arango V, Underwood M, Ilievski B, Rosoklija G, Sackeim HA, Lisanby SH. 2004. Absence of histological lesions in primate models of ECT and magnetic seizure therapy. *American Journal of Psychiatry* 161:576-578.

Ellis P, Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists. 2004. Australian and New Zealand clinical practice guidelines for the treatment of depression. *Australian New Zealand Journal of Psychiatry* 38(6):389-407.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. 2000. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research* 25:1439-1451.

Flint AJ, Gagnon N. 2002. Effective use electroconvulsive therapy in late-life depression. *Canadian Journal of Psychiatry* 47(8):734-41.

Girardi E, Ramos AJ, Vanore G, Brusco A. 2004. Astrocytic response in hippocampus and cerebral cortex in an experimental epilepsy model. *Neurochemical Research* 29:371-377.

Guo-Ross SX, Yang EY, Walsh TJ, Bondy SC. 1999. Decrease of glial fibrillary acidic protein in rat frontal cortex following aluminum treatment. *Journal of Neurochemistry*. 73:1609-14.

Hainfellner JÁ, Voigtänder T, Ströbel T, Mazal PR, Maddalena AS, Aguzzi A, Budka H. 2001. Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 60(5):449-61.

Hansen A, Jørgensen OS, Olwig TG, Barry DI. 1990. Hippocampal kindling alters the concentration of glial fibrillary acidic protein and other marker Proteins in rat human. *Brain Research* 531:307-311.

Hausmann R, Rieß R, Fieguth A, Betz P. 2000. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *International Journal of Legal Medicine* 113:70-75.

Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, Brujin CHMM, Lamers KJB. 2000. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analysis of serum concentrations of protein s-100 B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31:2670-77.

Janicak PG, Davis JM, Gibbons RD, Ericksen S, Chang S, Gallagher P. 1985. Efficacy of ECT. A meta-analysis. *American Journal of Psychiatry* 142:297-302.

Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF et al. 2000. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Molecular Psychiatry* 5:142-49.

Khurgel M, Switzer RC, Teskey GC, Spiller AE, Racine RJ, Ivy GO. 1995. Activation of astrocytes during epileptogenesis in the absence of neuronal degeneration. *Neurobiology of Disease* 2:23-35.

Ladislav von Meduna. 1935 apud Busnello JV, Agostinho F, Feier G, Martins MR, Quevedo J. Eletroconvulsoterapia. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. et al. 2004. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos* 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, cap. 13, p. 181-189.

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu F, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-615.

Madsen TM, Yeh DD, Valentine GW, Duman RS. 2005. Electroconvulsive seizure treatment increases cell proliferation in rat frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 30:27-34.

Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A. 2000. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biological Psychiatry* 47:1043-1049.

McCall WV. 2001. Electroconvulsive therapy in the era of modern psychopharmacology. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 4:315-324.

Mukherjee S, Sackeim HA, Schnur DB. 1994. Electroconvulsive therapy of acute manic episodes: A review of 50 years' experience. *American Journal of Psychiatry* 151:169-176.

Norton WT, Aquino DA., Hozumi I, Chiu F.-C., Brosnan CF. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochemical Research* 17:877-885.

Orzi F, Zol M, Passarelli F, Ferraguti F, Fieschi C, Agnati LF. 1990. Repeated electroconvulsive shock increases glial fibrillary acidic protein, ornithine decarboxylase, somatostatin and cholecystinin immunoreactivities in the hippocampal formation of the rat. *Brain Research* 533:233-231.

Reisner AD. 2003. The electroconvulsive therapy controversy: evidence and ethics. *Neuropsychology Review* 13(4):199-218.

Rose D, Wykes T, Leese M, Bindman J, Fleischmann P. 2003. Patients' perspectives on electroconvulsive therapy: systematic review. *British Medical Journal* 326:1363-1367.

Ross GW, O'Callaghan JPO, Sharp DS, Petrovitch H, Miller DB, Abbott RD, Nelson J, Launer LJ, Foley DJ, Burchfield CM, Hardman J, White LR. 2003. Quantification of regional glial fibrillary acidic protein levels in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* 107:318-323.

Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Hyder F, Ciarcia JJ, Ostroff RB, Berman RM, Krystal JH. 2003. Increased cortical GABA concentrations in depressed patients receiving ECT. *American Journal of Psychiatry* 160(3):577-79.

Schloss P, Henn FA. 2004. New insights into the mechanisms of antidepressant therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 102:47-60.

Steward O. 1994. Electroconvulsive seizures upregulate astroglial gene expression selectively in the dentate gyrus. *Molecular Brain Research* 25:217-224.

Steward O, Kelley MS, Schauwecker EP. 1997. Signals that regulate astroglial gene expression: induction of GFAP mRNA following seizures or injury is blocked by protein synthesis inhibitors. *Experimental Neurology* 148:100-9.

Stringer JL. 1996. Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus. *Brain Research* 717:147-153.

Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Tsukada Y. 1988. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Developmental Brain Research* 38:201-210.

The UK ECT Review Group. 2003. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361:799-808.

Toimela TA, Tähti H. 1995. Effects of mercury, methylmercury and aluminium on Glial Fibrillary Acidic Protein expression in rat cerebellar astrocyte cultures. *Toxicology In Vitro* 9:317-325.

Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ. 2004. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *The Journal of Neuroscience* 24(24):5603-10.

Vaidya VA, Siuciak JA, Du F, Duman RS. 1999. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience*. 89(1):156-66.

Zachrisson OCG, Balldin J, Ekman R, Naesh O, Rosengren L, Ågren H, Blennow K. 2000. No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Research* 96:157-165.

ARTIGO EM INGLÊS

Structure-related glial fibrillary acidic protein expression after electroconvulsive shocks in rat brain

Keila Maria Ceresér, M.Sc.¹, Benício Noronha Frey, M.Sc.^{1,3}, Fernanda Bley Bernardes¹, Sabrina Correa da Costa¹, Ana Cristina Andreazza¹, Gustavo Feier², Daniela Fraga de Souza³, Fernando Kratz Gazalle, M.Sc.¹, Carlos Alberto Gonçalves, Ph.D.³, Flávio Kapczinski, M.D.,Ph.D.¹ and João Quevedo., Ph.D.²

¹Laboratório de Psiquiatria Experimental, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil;

²Laboratorio de Neurotoxicologia, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil; and

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

The aim of the present study was to assess the effect of electroconvulsive shock (ECS) in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat brain. Rats were given either a single (acute) or a series of eight (chronic) ECS. Brain regions were isolated and levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the brain tissue (cortex, hippocampus, and cerebellum) were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We showed that GFAP expression is reduced in the hippocampus within 48 h and seven days after acute ECS. GFAP levels are increased in the cerebellum immediately after acute and chronic ECS. No changes were observed in cerebral cortex. Our findings showed a differential effect of acute and chronic ECS in astroglial response in rat brain. The effects of convulsions were structure-related, which may be related to the therapeutic or adverse effects of ECT in humans.

Key Words: electroconvulsive shock; glial fibrillary acidic protein; depression; ECT; GFAP

Introduction

Electroconvulsive therapy (ECT) is a procedure in which an electrical stimulus is used to induce a brain seizure (Rose et al., 2003). ECT has been used as a treatment for mental disorders since 1930s, and it is still an important alternative in the treatment of severe depression (The UK ECT Review Group, 2003). The precise mechanism of action of ECT is currently unknown, but it may be related to brain changes induced by a series of sequential convulsions (Barichello et al., 2004a). Electroconvulsive shock (ECS) has been extensively used as an animal model of ECT and has contributed to explain the therapeutic and side effects of ECT (Barichello et al., 2004b; Newman et al., 1998).

Postmortem studies have demonstrated decreased glial and neuronal cells in multiple sites of the prefrontal cortex and hippocampus of patients with mood disorders (Bennes et al., 1998; Öngur et al., 1998; Rajkowska et al., 1999; Bennes et al., 2001; Cotter et al., 2001). Two recent studies demonstrated that ECS promotes proliferation of oligodendrocytes in the rat frontal cortex (Uranova et al., 2001) and hippocampus (Wennström et al., 2003). This ECS-induced glial cell proliferation may be, at least in part, related to the therapeutic action of ECT. In addition, Steward et al (Steward, 1994; Steward et al., 1997) demonstrated that ECS increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA expression in the hippocampal dentate gyrus, and the administration of protein synthesis inhibitors

reversed this effect. However, the astroglial response after ECS stimulus is poorly studied.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the major protein of astrocytic intermediate filaments and is a specific marker for mature astrocytes (Laping et al., 1994; Eng et al., 2000). GFAP expression is essential for normal white matter architecture and blood-brain barrier integrity (Liedtke et al., 1996). Several different types of cerebral events, such as brain injury (Hausmann et al., 2000), stroke (Herrmann et al., 2000), or induced seizures (Stringer, 1996), can promote reactive hypertrophy and proliferation of astroglial cells, a process known as astrogliosis. At the molecular level, this reactive gliosis is demonstrated by enhanced expression of GFAP. The aim of the present study was to assess the effect of acute and chronic electroconvulsive shocks in GFAP expression in the rat cortex, hippocampus, and cerebellum.

Materials and Methods

Animals and study design

Adult male Wistar rats (250-300 g) were obtained from our own breeding colony. They were caged in groups of 5 with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The experiments were performed between 2 p.m. and 5 p.m.

The rats were divided in two protocols: acute and chronic treatment. In acute treatment the animals received a single ECS while in chronic treatment, animals received eight ECS every other day. In both protocols the animals were sacrificed by decapitation at different times after the last ECS: immediately after, 48 hours, 7 and 30 days (n=15 animals per group). The tissues were dissected out immediately after the rat was sacrificed, and storage at -80°C .

The electroconvulsive shock was applied via bilateral ear clip electrodes. The stimulus parameters were 150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds. Each stimulation elicited tonic-clonic seizures. We performed two control groups: acute and chronic sham-shock groups were handled identically to the ECS-treated rats except that no current was applied.

Measurement of GFAP

Preparation of brain tissue samples. Rats were killed by decapitation and brain structures (hippocampus, cortex and cerebellum) were dissected on ice within 3 min. Brain slices were homogenized in an ice-cold tris buffer saline solution (25 mM Tris/ 500 mM NaCl) containing 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and 1 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride). Protein was determined by Lowry's method, using bovine albumin as standard (Lowry et al, 1951).

ELISA for GFAP. Microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted (in TBS) to give a final amount of 400 ng of protein. Standard curve ranged from 0.5 to 30 ng of GFAP (from Calbiochem) supplemented with albumin to give a final amount of 400 ng/well. Then, plates were washed three times with TBS and blocked with 2% bovine serum albumin for 2 h at room temperature. After blocking, polyclonal anti-GFAP rabbit antibody (from DAKO) diluted 1:1000 in 0.2% albumin/TBS was incubated for 2 hours at 30° C. After washing with 0.05% Tween-20/TBS, a second incubation with anti-rabbit antibody peroxidase conjugated (from Amersham) diluted 1:1000 for 1h at 30° C was carried out. After washing twice with 0.05% Tween-20/TBS and once with TBS, 0.2 mL of peroxidase substrate (Sigma Fast OPD) was added and incubated for 30 min in the dark. The reaction was stopped by addition of 50 μ L 3N HCl and absorbance was read at 492 nm on a Microtiter plate reader (Tecan-Spectra, Japan). A single band of 50 kDa was observed in immunoblots of rat brain homogenates developed with polyclonal anti-GFAP rabbit antibody (data not shown).

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Differences among experimental groups in experiments evaluating GFAP levels were determined by ANOVA. Multiple comparisons were performed by a Tukey test. In all experiments, P values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Figure 1 a and b illustrate GFAP expression in the hippocampus after acute and chronic ECS, respectively. A single ECS significantly decreased GFAP levels in hippocampus 48 hours after the seizure and this alteration persisted for 7 days. No significant changes were observed after chronic ECS in this brain region.

GFAP expression in the cerebellum after acute and chronic ECS is illustrated in figure 2 a and b, respectively. Both acute and chronic ECS induced an increase in GFAP levels in cerebellum immediately after the last seizure. GFAP levels returned to normal levels 48 hours after the stimulus and remained unchanged thereafter. No significant changes were observed in GFAP expression after either acute or chronic ECS in rat cortex. Table 1 illustrate GFAP levels in the cerebellum, cortex and hippocampus after acute and chronic ECS.

Discussion

As far as we are aware, this is the first study showing an increase in GFAP levels in cerebellum after ECS. Both acute and chronic ECS increased GFAP expression in the cerebellum immediately after the last seizure, but this effect was not observed after 48 hours. This finding suggests a transient astroglial response (astrogliosis) in this brain region after ECS. Indeed, it has been hypothesized that

the cerebellum may play a role in mood regulation (Soares et al., 1997), and this effect may be associated to the therapeutic or side effects observed with the use of ECT.

A single electroconvulsive seizure decreased GFAP expression in the hippocampus 48 hours after the stimulus and this effect is sustained until, at least, 7 days. This is an unexpected finding, since previous study has demonstrated an increase in GFAP mRNA levels in dentate gyrus 1-4 days after a single ECS (Steward, 1994). However, this decrease in GFAP expression in the hippocampus may be an adaptive response in gene expression caused by ECS. Tsankova et al (Tsankovsa et al., 2004) have recently demonstrated that both acute and chronic ECS promote different long-term alterations (up and down regulation) on gene activity in this brain region. We also demonstrate that GFAP expression returned to basal levels after repetitive (chronic) ECS, suggesting that chronic ECS may have different effects in GFAP gene activity than acute ECS. Further studies are necessary to elucidate GFAP gene regulation after acute and chronic ECS.

No alterations were observed after either acute or chronic ECS in rat cortex. This finding is in accordance to a previous study that observed no changes in GFAP mRNA levels after acute ECS in cerebral cortex (Steward 1994). The present study contains some limitations: one is the use of sine wave stimulation in this animal model, as brief pulse stimulation is currently the state of art method in the clinical setting. Secondly, the use of homogenized tissues may reflect the

summation of differential alterations in GFAP across subregions, given that some evidence has demonstrated that GFAP changes are highly localized (e.g. to subregions of hippocampus).

In conclusion, our results demonstrate that the ECS effect is structure-dependent, since hippocampal, cerebellar, and cortical GFAP expression are differentially regulated after a widespread (generalized tonic-clonic) seizure. Additional studies are needed to further identify the intra and intercellular signaling pathways involved in astroglial response after ECS.

Acknowledgements

This research was supported by grants for CNPq/MCT-Brazil, CAPES-Brazil, FINEP-Brazil, UNESC-Brazil and FUNCITEC-Brazil.

Statement of interest

None.

References

Barichello T, Bonatto F, Agostinho FR, Reinke A, Moreira JCF, Dall-Pizzol F, Izquierdo I, Quevedo J. (2004a). Structure-related oxidative damage in rat brain after acute and chronic electroshock. *Neurochemical Research* 9,1749-1753.

Barichello T, Bonatto F, Feier FG, Martins MR, Moreira JCF, Dall-Pizzol F, Izquierdo I, Quevedo J. (2004 b). No evidence for oxidative damage in the hippocampus after acute and chronic electroshock in rats. *Brain Research* 1014,177-783.

Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS. (1998). A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic-depressives. *Biological Psychiatry* 44,88-97.

Benes FM, Vincent SL, Todtenkopf MS. (2001). The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biological Psychiatry* 50,395-406.

Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. (2001). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry* 58,545-53.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP- Thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research* 25,439-451.

Hausmann R, Rieß R, Fieguth A, Betz P (2000). Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *International Journal of Legal Medicine* 113,70-75.

Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, Brujin CHMM, Lamers KJB. (2000). Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analysis of serum concentrations of protein s-100 B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31,2670-77.

Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE. (1994). Glial Fibrillary Acidic Protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathology* 1,259-275.

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL., Chiu F, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine, CS. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-15.

Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.*193,265-75.

Newman ME, Gur E, Shapira B, Lerer B. (1998). Neurochemical mechanism of action of ECS: evidence from *in vivo* studies. *Journal of ECT*;14,153-171.

Öngur D, Drevets WC, Price JL. (1998).Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13290-5.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological Psychiatry* 45,1085-1098.

Rose D, Wyker T, Leese M, Bindman J, Fleischmann P. (2003). Patients' perspectives on electroconvulsive therapy: systematic review. *British Medical Journal* 326,1-5.

Soares JC, Mann JJ. (1997). The anatomy of mood disorders - review of structural neuroimaging studies. *Biological Psychiatry* 41,86-106.

Steward O, Kelley MS, Schauwecker PE. (1997). Signals that regulate astroglial gene expression: induction of GFAP mRNA following seizures or injury is blocked by protein synthesis inhibitors. *Exp Neurol* 148:100-9.

Steward O. (1994). Electroconvulsive seizures upregulate astroglial gene expression selectively in the dentate gyrus. *Molecular Brain Research* 25,217-24.

Stringer GL. (1996). Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus (1996). *Brain Research* 717,147-153.

The UK ECT Review Group. (2003). Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2361,799-808.

Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ. (2004). Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *Journal of Neurosciences* ;24,5603-5610.

Uranova N, Orlovskaya D, Vikhreva O, Zimina I, Kolomeets N, Vorstrikov V. (2001). Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Researches Bule* 55,597-610.

Wennström M, Hellsten J, Ekdahl CT, Tingström A. (2003).
Electroconvulsive seizures induce proliferation of NG-2-expressing glial cells in
adult rat hippocampus. *Biological Psychiatry* 254,1015-1024.

Ethical considerations

The experimental procedures were carried out according to the National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee.

Figures

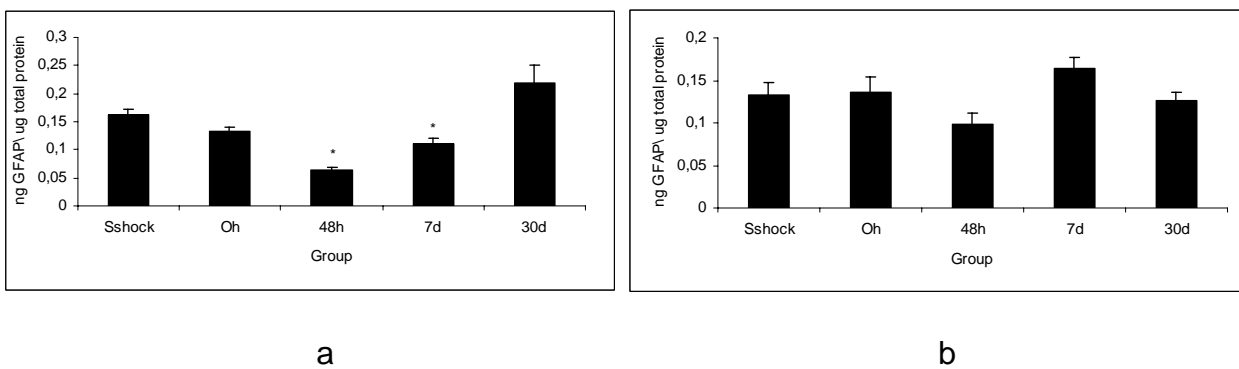


Figure 1: GFAP levels in the hippocampus after acute (a) and chronic (b) ECS.
*Different from sham (control), $P < 0.05$

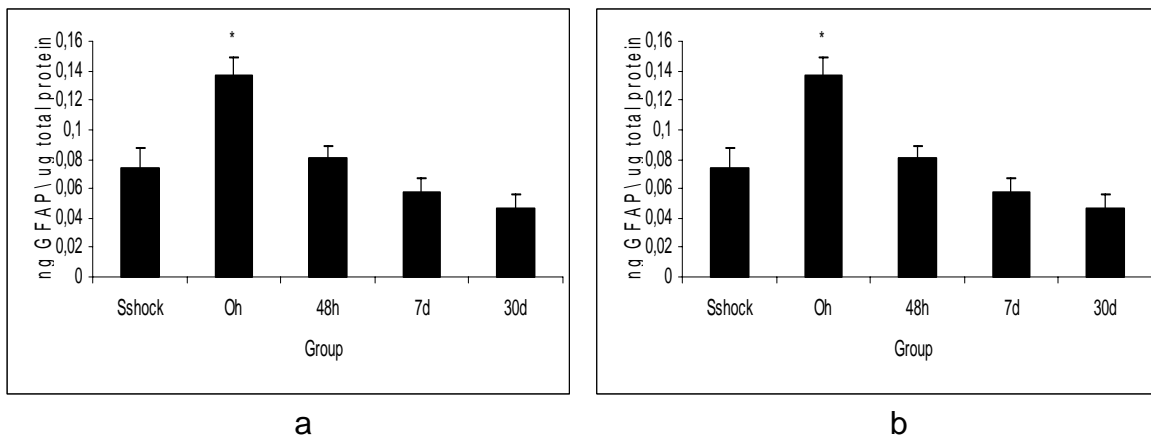


Figure 2: GFAP levels in the cerebellum after acute (a) and chronic (b) ECS.
*Different from sham (control), $P < 0.05$

Table

Table 1. Levels of GFAP (ng GFAP/ μ g total protein) in brain structures – Acute (Ac) and Chronic (Ch) treatment (means \pm SEM)

	Cerebellum (Ac)	Cortex (Ac)	Hippocampus (Ac)	Cerebellum (Ch)	Cortex (Ch)	Hippocampus (Ch)
<i>SShock</i>	0,0743 \pm 0,013	0,1581 \pm 0,024	0,1633 \pm 0,010	0,0743 \pm 0,013	0,0797 \pm 0,007	0,1328 \pm 0,014
<i>0 hours</i>	0,1361 \pm 0,012*	0,1349 \pm 0,018	0,1321 \pm 0,009	0,1462 \pm 0,016*	0,0790 \pm 0,008	0,1367 \pm 0,017
<i>48 hours</i>	0,0805 \pm 0,009	0,1242 \pm 0,019	0,0630 \pm 0,006*	0,0697 \pm 0,011	0,0612 \pm 0,008	0,0990 \pm 0,011
<i>7 days</i>	0,0570 \pm 0,010	0,1676 \pm 0,025	0,1102 \pm 0,016*	0,0571 \pm 0,012	0,0976 \pm 0,009	0,1636 \pm 0,014
<i>30 days</i>	0,0469 \pm 0,009	0,2078 \pm 0,025	0,2295 \pm 0,032	0,0837 \pm 0,009	0,0544 \pm 0,007	0,1257 \pm 0,010

* Values significantly different from controls (SShock) by Tukey test ($p < 0.05$)

ARTIGO TRADUZIDO

**Expressão da proteína ácida fibrilar glial relacionada à estrutura
após choque eletroconvulsivo em cérebro de ratos**

**Keila Maria Ceresér, M.Sc.¹, Benício Noronha Frey, M.Sc.^{1,3}, Fernanda Bley Bernardes¹,
Sabrina Correa da Costa¹, Ana Cristina Andreazza¹, Gustavo Feier², Daniela Fraga de Souza³,
Fernando Kratz Gazalle, M.Sc.¹, Carlos Alberto Gonçalves, Ph.D.³, Flávio Kapczinski,
M.D.,Ph.D.¹ and *João Quevedo., Ph.D.^{2*}**

*¹Laboratório de Psiquiatria Experimental, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil;*

*²Laboratorio de Neurotoxicologia, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000
Criciúma, SC, Brasil; e*

*³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.*

Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do choque eletroconvulsivo (ECS) sobre a expressão da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) em cérebro de rato.

Métodos: Cada rato foi submetido a uma única (aguda) ou a uma série de oito (crônico) ECS. As regiões cerebrais foram isoladas e os níveis de Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) em tecidos cerebrais (córtex, hipocampo e cerebelo) foram medidos usando o método de imunoenensaio conhecido por ELISA. .

Resultados: Nós mostramos que a expressão da GFAP é reduzida no hipocampo entre 48 horas e 07 dias após ECS agudo. Níveis de GFAP estão aumentados no cerebelo imediatamente após ECS agudo e crônico. Não foram observadas alterações no córtex.

Conclusões: Nossos achados mostraram um efeito diferenciado do ECS agudo e crônico sobre a resposta astrogliar no cérebro de rato. Os efeitos das convulsões foram estruturalmente relacionados, o que pode ser ligado ao efeito terapêutico da ECT em humanos.

Palavras Chaves: choque eletroconvulsivo; proteína ácida fibrilar glial; depressão; ECT; GFAP

Introdução

Eletroconvulsoterapia (ECT) é um procedimento no qual um estímulo elétrico é usado para induzir uma convulsão cerebral (Rose et al., 2003). ECT tem sido usada como tratamento para distúrbios mentais desde aproximadamente 1930, e é ainda uma importante alternativa no tratamento da depressão severa (The UK ECT Review Group, 2003). O mecanismo de ação exato da ECT é atualmente desconhecido, mas ele pode estar relacionado a alterações cerebrais induzidas por uma série de convulsões seqüenciais (Barichello et al., 2004a). O choque eletroconvulsivo (ECS) tem sido extensivamente usado como um modelo animal de ECT e tem contribuído para explicar os efeitos terapêuticos e adversos da ECT (Barichello et al., 2004b; Newman et al., 1998).

Estudos *postmortem* têm demonstrado uma diminuição das células gliais e neuronais em múltiplos sítios do córtex pré-frontal e hipocampo de pacientes com transtornos do humor (Bennes et al., 1998; Öngur et al., 1998; Rajkowska et al., 1999; Bennes et al., 2001; Cotter et al., 2001). Dois estudos recentes demonstraram que ECS promove a proliferação de oligodendrócitos no córtex pré-frontal de ratos (Uranova et al., 2001) e no hipocampo (Wennström et al., 2003). Esta proliferação de células gliais induzida por ECS pode ser, ao menos em parte, relacionada à ação terapêutica da ECT. Além disso, Steward *et al* (Steward, 1994; Steward et al., 1997) demonstraram que ECS aumenta a expressão do RNAm da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no giro denteado hipocampal, e a administração

de inibidores da síntese protéica reverte este efeito. Contudo, a resposta astrogliar após ECS é pobremente estudada.

Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é a proteína majoritária dos filamentos intermediários dos astrócitos e é um marcador específico para astrócitos maduros (Laping et al., 1994; Eng et al., 2000). A expressão da GFAP é essencial à arquitetura normal da substância branca e integridade da barreira hematoencefálica (Liedtke et al., 2000). Vários tipos de diferentes eventos cerebrais, como um estresse cerebral (Hausmann et al., 2000), pancadas (Herrmann et al., 2000), ou convulsões induzidas (Stringer, 1996), podem levar à hipertrofia reativa e a uma proliferação de células astrogliais, um processo conhecido como astrogliose. A nível molecular, a gliose reativa é demonstrada pela expressão aumentada de GFAP. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do choque eletroconvulsivo sobre a expressão de GFAP no córtex, hipocampo e cerebelo de ratos.

Materiais e Métodos

Animais e desenho do estudo

Ratos Wistar machos e adultos (250-300 g) foram agrupados em grupos de cinco com livre acesso à alimentação e água e foram mantidos sob um ciclo de 12

horas luz/escuro (as luzes ligam-se às 07:00 h), a uma temperatura de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os experimentos foram realizados entre 14-17 h.

Os ratos foram divididos em dois protocolos: tratamento agudo e crônico. No tratamento agudo, os animais receberam um único ECS, enquanto no tratamento crônico, os animais receberam oito ECS em dias alternados. Em ambos protocolos, os animais foram sacrificados por decapitação em diferentes tempos após o último ou o único ECS: imediatamente após, e, respectivamente, após 48 horas, 7 horas e 30 dias (n=15 animais por grupo). Os tecidos foram dissecados imediatamente após os ratos serem sacrificados, sendo estocados a -80°C . Os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme o *The National Institutes of Health Guidelines* e aprovados pelo comitê de ética local.

Estimulação electroconvulsiva

O choque eletroconvulsivo foi aplicado via bilateral. Os parâmetros de estímulo foram 150 V, 60 Hz, ondas sinusoidais, durante dois segundos. Cada estímulo elicitou uma convulsão tônico-clônica. Nós utilizamos dois grupos controles: sham-shock (agudo e crônico), que foram tratados identicamente aos ratos tratados com ECS, exceto com relação à não passagem de corrente.

Medida de GFAP

Preparação das amostras de tecido cerebral. Os ratos foram decapitados e as estruturas cerebrais (hipocampo, córtex e cerebelo) foram dissecadas sobre gelo em 3 minutos. Os pedaços de tecido foram homogeneizados em uma solução-tampão salina, sob gelo (25 mM Tris/ 500 mM NaCl) contendo 1 mM EGTA, 1 mM EDTA e 1 mM PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonila). Proteínas foram determinadas pelo Método de Lowry, usando albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

ELISA para GFAP. Microplacas (96 poços) foram revestidas por 24 horas com as amostras diluídas (em TBS) a um conteúdo final de 400 ng de proteína. Foi feita uma curva padrão entre 0,5 e 30 ng de GFAP (da Calbiochem), suplementada com albumina a uma quantidade final de 400 ng/poço. Então, as placas foram lavadas três vezes com TBS e bloqueadas com 2% de albumina sérica por 2 h à temperatura ambiente. Após bloqueio, anticorpo policlonal anti-GFAP rabbit (da DAKO) diluído 1:1000 em 0,2% albumina/TBS foi incubado por 2 horas a 30°C. Após lavagem com 0.05% Tween-20/TBS, uma segunda incubação com anticorpo anti-rabbit conjugado a peroxidase (da Amersham) diluído 1:1000 por 1h a 30°C foi realizada. Após lavagem duas vezes com 0.05% Tween-20/TBS

e uma vez com TBS, 0,2 mL substrato-peroxidase (Sigma Fast OPD) foi adicionado e incubado por 30 minutos no escuro. A reação foi cessada pela adição de 50 μ L de HCl 3 N e a absorvância foi determinada a 492 nm em um leitor de microplacas (Tecan-Spectra, Japan). Uma banda única de 50 kDa foi observada em *immunoblots de homogenados de cérebros de rato desenvolvidos com anticorpo anti-GFAP rabbit* (dados não mostrados).

Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. Diferenças entre grupos experimentais nos experimentos, avaliando níveis de GFAP, foram analisadas por ANOVA. Múltiplas comparações foram realizadas pelo Teste de Tukey. Em todos os experimentos, os valores de P inferiores a 0,05 foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

Resultados

A figura 1 a e b mostra a expressão de GFAP no hipocampo após ECS agudo e crônico, respectivamente. Uma única aplicação de ECS diminuiu significativamente os níveis de GFAP no hipocampo 48 horas após a convulsão e esta alteração persistiu durante 07 dias. Não foram observadas alterações significativas após ECS crônico nesta região cerebral. A expressão de GFAP no cerebelo após ECS agudo e crônico é ilustrada na figura 2 a e b, respectivamente.

Ambos, ECS agudo e crônico, induziram um aumento dos níveis de GFAP no cerebelo imediatamente após a convulsão. Os níveis de GFAP retornaram ao normal 48 horas após o estímulo, permanecendo inalterados. Não foram observadas alterações significativas na expressão de GFAP após ECS agudo ou crônico em córtex de ratos.

A tabela 1 ilustra os níveis de GFAP no cerebelo, córtex e hipocampo após ECS agudo e crônico, respectivamente.

Discussão

Conforme visto, este é o primeiro estudo mostrando um aumento dos níveis de GFAP no cerebelo após ECS. Ambos, eletrochoque agudo e crônico, aumentam a expressão da GFAP no cerebelo imediatamente após a convulsão, porém este efeito não é observado após 48 horas. Este achado sugere uma resposta astrogliosa transitória (astroglíose) nessa região cerebral após ECS. Além disso, tem sido hipotetizado que o cerebelo pode ter um papel fundamental na regulação do humor (Soares et al., 1997), e este efeito pode estar associado aos efeitos terapêuticos da ECT. Uma convulsão após um único eletrochoque diminuiu a expressão de GFAP no hipocampo 48 horas após o estímulo e este efeito é sustentado até, ao menos, 7 dias. Este é um resultado inesperado; estudos prévios têm demonstrado um aumento dos níveis do RNAm da GFAP no giro denteado 1-4 dias após um único ECS (Steward, 1994). Contudo, este decréscimo na expressão de GFAP no hipocampo pode ser uma resposta adaptativa sobre a

expressão gênica causada pelo ECS. Tsankovsa et al (Tsankovsa et al., 2004) recentemente demonstraram que ambos, ECS agudo e crônico, produzem diferentes alterações a longo prazo (*up e down regulation*) sobre a atividade gênica nesta região cerebral. Nós também demonstramos que a expressão da GFAP retornou aos níveis basais após ECS repetitivos (crônico), sugerindo que ECS crônico possa ter diferentes efeitos sobre atividade gênica da GFAP em relação ao ECS agudo. Estudos posteriores são necessários para elucidar a regulação gênica da GFAP após ECS agudo ou crônico.

Não foram observadas alterações no córtex dos ratos após ECS agudo ou crônico (dados não mostrados). Este achado está de acordo com um estudo prévio que não demonstrou alterações nos níveis de RNAm GFAP após ECS agudo no córtex cerebral (Steward 1994). O presente estudo contém algumas limitações: uma é o uso de estimulação por onda sinusoidal neste modelo animal, um estímulo leve pulsátil é atualmente o método considerado o “estado da arte” no contexto clínico. Em segundo lugar, o uso de tecidos homogeneizados pode refletir a somação de diversas alterações na GFAP sobre sub-regiões, tendo algumas evidências demonstrado que alterações na GFAP são altamente localizadas (isto é, em sub-regiões do hipocampo).

Concluindo, nossos resultados demonstraram que os efeitos do ECS são dependentes de certas estruturas, a expressão da GFAP no hipocampo, cerebelo e córtex é regulada de modo diferente após uma convulsão generalizada (tônico-clônica generalizada)

Considerações éticas

Os procedimentos ocorreram conforme o guidelines do *National Institutes of Health* e com aprovação do Comitê de Ética local.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio dos seguintes órgãos: CNPq/MCT-Brasil, CAPES-Brasil, FINEP-Brasil, UNESC-Brasil e FUNCITEC-Brasil.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

Barichello T, Bonatto F, Agostinho FR, Reinke A, Moreira JCF, Dall-Pizzol F, Izquierdo I, Quevedo J. (2004a). Structure-related oxidative damage in rat brain after acute and chronic electroshock. *Neurochemical Research* 9,1749-1753.

Barichello T, Bonatto F, Feier FG, Martins MR, Moreira JCF, Dall-Pizzol F, Izquierdo I, Quevedo J. (2004 b). No evidence for oxidative damage in the hippocampus after acute and chronic electroshock in rats. *Brain Research* 1014,177-783.

Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS. (1998). A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic-depressives. *Biological Psychiatry* 44,88-97.

Benes FM, Vincent SL, Todtenkopf MS. (2001). The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biological Psychiatry* 50,395-406.

Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I. (2001). Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry* 58,545-53.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP- Thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research* 25,439-451.

Hausmann R, Rieß R, Fieguth A, Betz P (2000). Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *International Journal of Legal Medicine* 113,70-75.

Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, Brujin CHMM, Lamers KJB. (2000) .Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analysis of serum concentrations of protein s-100 B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31,2670-77.

Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE. (1994). Glial Fibrillary Acidic Protein: regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathology* 1,259-275.

Liedtke W, Edelman W, Bieri PL., Chiu F, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine, CS. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-15.

Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.*193,265-75.

Newman ME, Gur E, Shapira B, Lerer B. (1998). Neurochemical mechanism of action of ECS: evidence from *in vivo* studies. *Journal of ECT*;14,153-171.

Öngür D, Drevets WC, Price JL. (1998).Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13290-5.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. (1999) Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological Psychiatry* 45,1085-1098.

Rose D, Wyker T, Leese M, Bindman J, Fleischmann P. (2003). Patients' perspectives on electroconvulsive therapy: systematic review. *British Medical Journal* 326,1-5.

Soares JC, Mann JJ. (1997). The anatomy of mood disorders - review of structural neuroimaging studies. *Biological Psychiatry* 41,86-106.

Steward O, Kelley MS, Schauwecker PE. (1997). Signals that regulate astroglial gene expression: induction of GFAP mRNA following seizures or injury is blocked by protein synthesis inhibitors. *Exp Neurol* 148:100-9.

Steward O. (1994). Electroconvulsive seizures upregulate astroglial gene expression selectively in the dentate gyrus. *Molecular Brain Research* 25,217-24.

Stringer GL. (1996). Repeated seizures increase GFAP and vimentin in the hippocampus (1996). *Brain Research* 717,147-153.

The UK ECT Review Group. (2003). Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2361,799-808.

Tsankova NM, Kumar A, Nestler EJ. (2004). Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *Journal of Neurosciences* ;24,5603-5610.

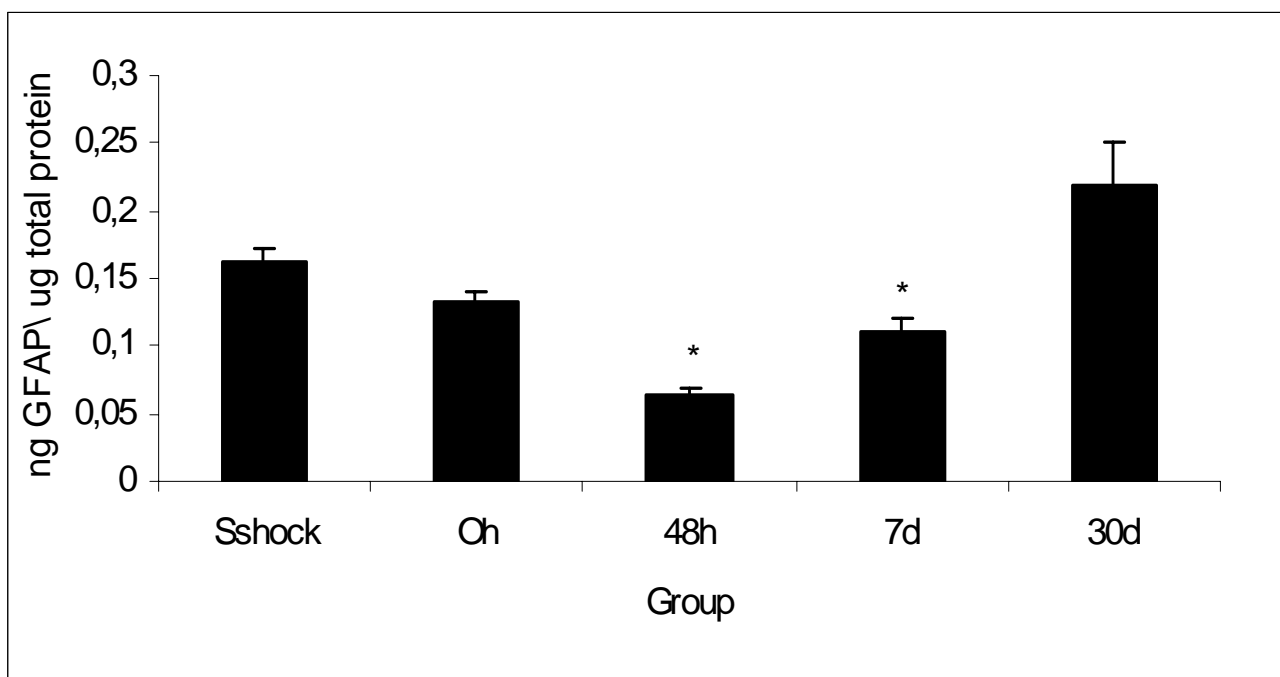
Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vorstrikov V. (2001). Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Researches Bule* 55,597-610.

Wennström M, Hellsten J, Ekdahl CT, Tingström A. (2003). Electroconvulsive seizures induce proliferation of NG-2-expressing glial cells in adult rat hippocampus. *Biological Psychiatry* 254,1015-1024.

Figuras

Figura 1: Níveis de GFAP no hipocampo após ECS agudo (a) e crônico (b).

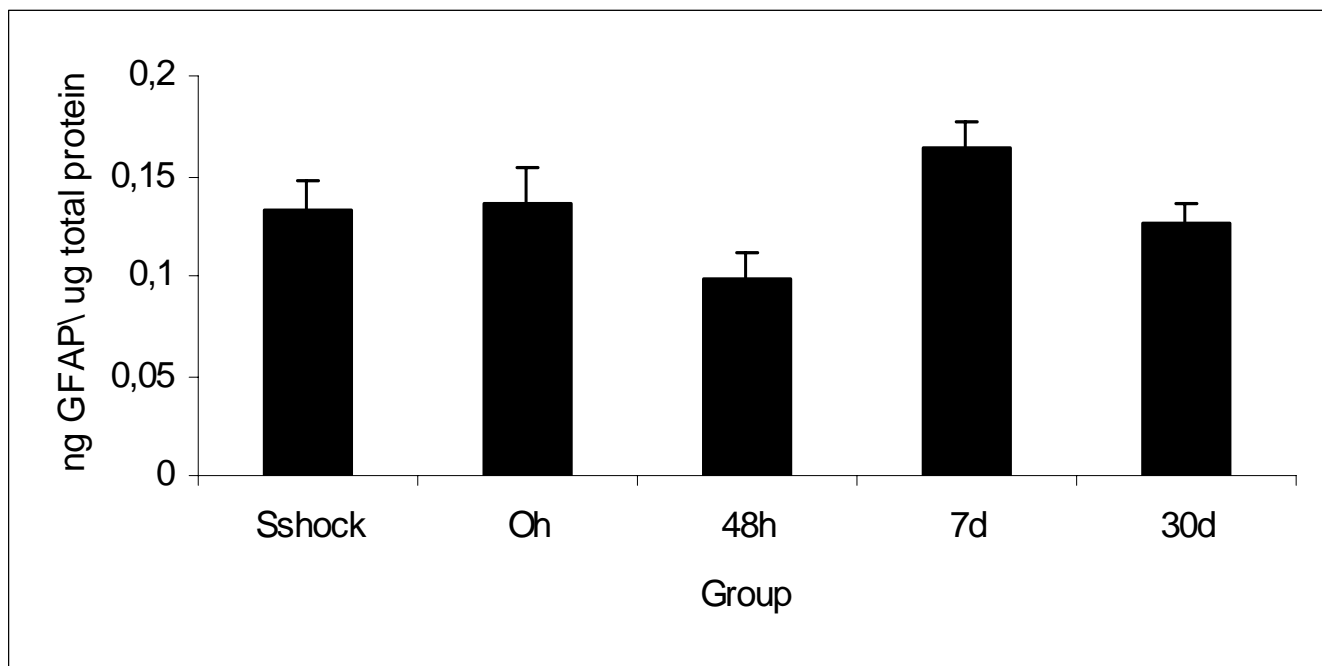
*Diferença do "sham" (controle), $P < 0,05$



A

Figura 1: Níveis de GFAP no hipocampo após ECS agudo (a) e crônico (b).

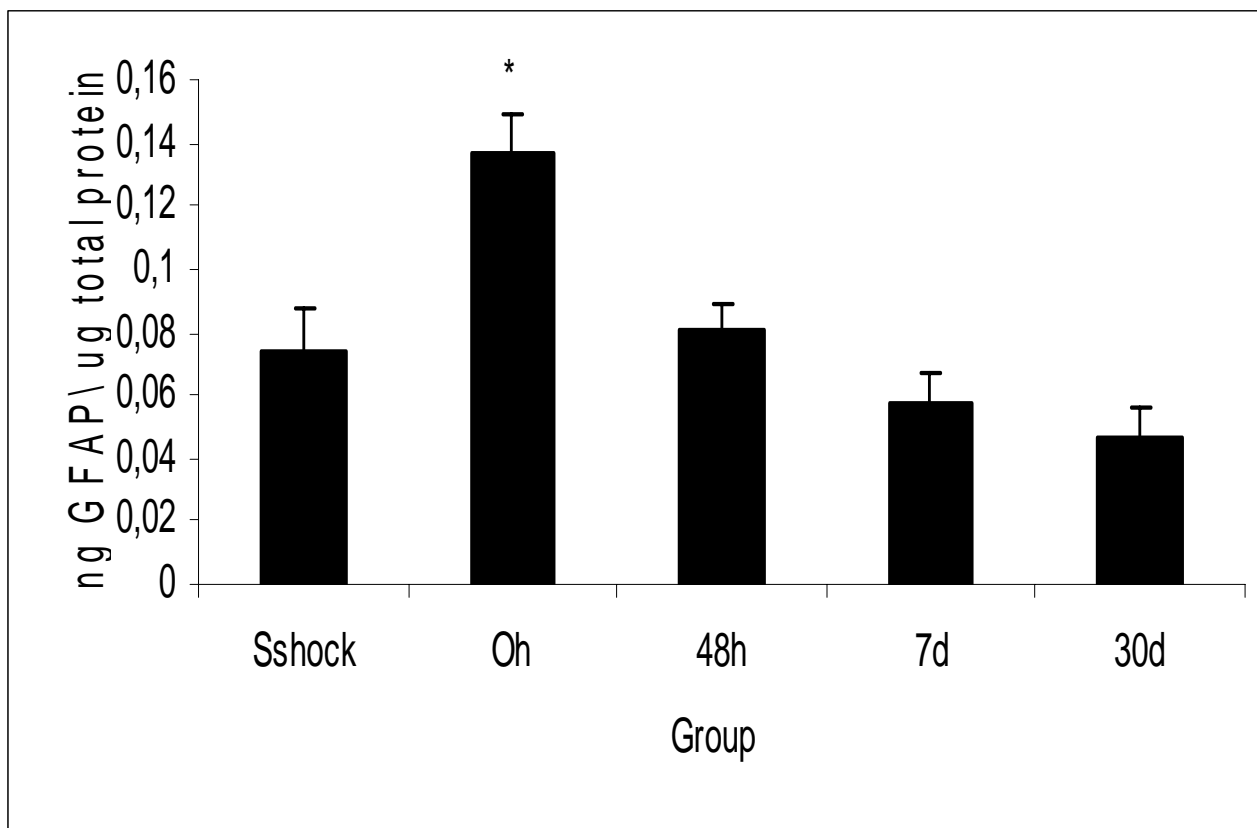
*Diferença do "sham" (controle), $P < 0,05$



B

Figura 2: Níveis de GFAP no cerebelo após ECS agudo (a) e crônico (b).

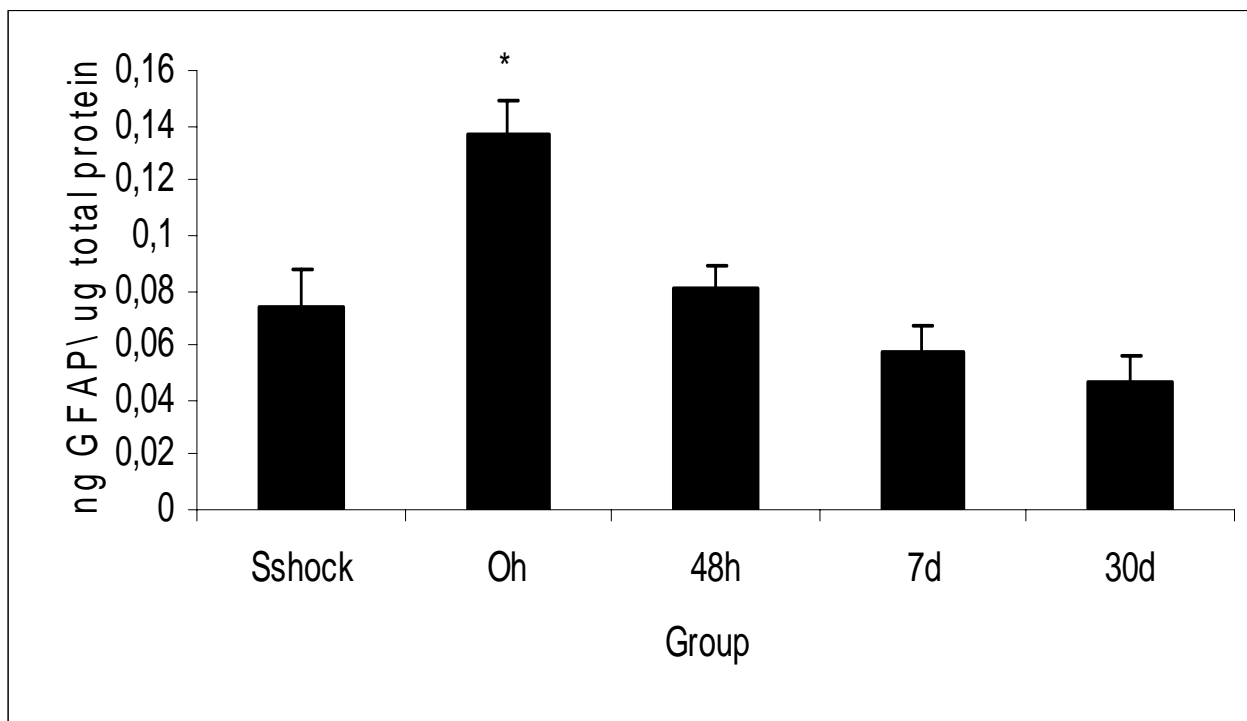
*Diferença do "sham" (controle), $P < 0,05$



A

Figura 2: Níveis de GFAP no cerebelo após ECS agudo (a) e crônico (b).

*Diferença do "sham" (controle), $P < 0,05$



B

TABELA

Tabela 1. Níveis de GFAP (ng GFAP/ μ g proteína total) em estruturas cerebrais –
Tratamento Agudo(Ag) (médias \pm EPM)

	Cerebelo (Ag)	Córtex (Ag)	Hipocampo (Ag)
<i>SShock</i>	0,0743 \pm 0,013	0,1581 \pm 0,024	0,1633 \pm 0,010
<i>0 h</i>	0,1361 \pm 0,012*	0,1349 \pm 0,018	0,1321 \pm 0,009
<i>48 h</i>	0,0805 \pm 0,009	0,1242 \pm 0,019	0,0630 \pm 0,006*
<i>7 dias</i>	0,0570 \pm 0,010	0,1676 \pm 0,025	0,1102 \pm 0,016*
<i>30 dias</i>	0,0469 \pm 0,009	0,2078 \pm 0,025	0,2295 \pm 0,032

* Valores significativamente diferentes dos controles (SShock) pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 2. Níveis de GFAP (ng GFAP/ μ g proteína total) em estruturas cerebrais – Tratamento Crônico (Cr) (médias \pm EPM)

	Cerebelo (Cr)	Córtex (Cr)	Hipocampo (Cr)
<i>SShock</i>	0,0743 \pm 0,013	0,0797 \pm 0,007	0,1328 \pm 0,014
<i>0 h</i>	0,1462 \pm 0,016*	0,0790 \pm 0,008	0,1367 \pm 0,017
<i>48 h</i>	0,0697 \pm 0,011	0,0612 \pm 0,008	0,0990 \pm 0,011
<i>7 dias</i>	0,0571 \pm 0,012	0,0976 \pm 0,009	0,1636 \pm 0,014
<i>30 dias</i>	0,0837 \pm 0,009	0,0544 \pm 0,007	0,1257 \pm 0,010

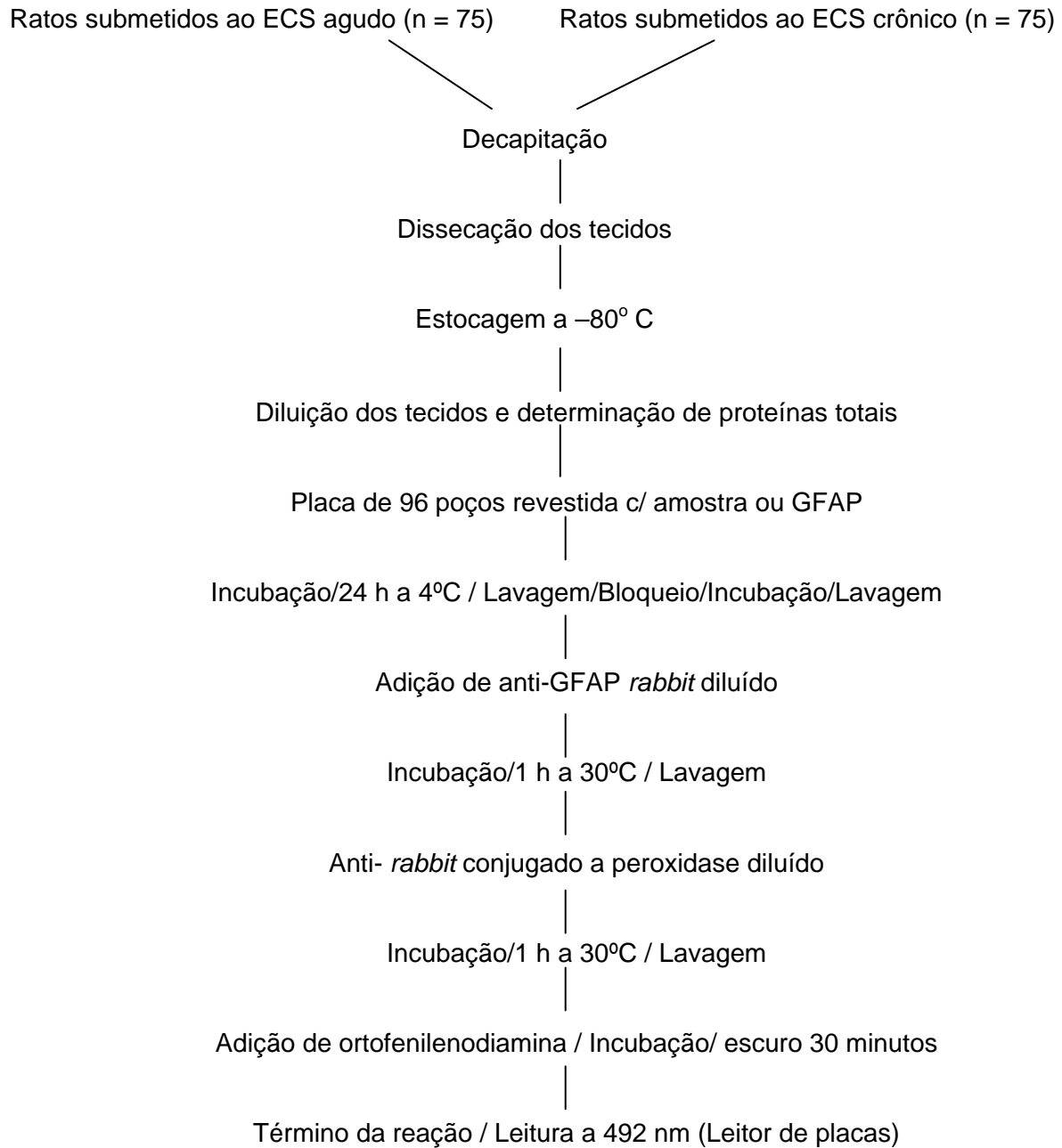
* Valores significativamente diferentes dos controles (SShock) pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

ANEXOS

ANEXO 1

TÉCNICA PARA DOSAGEM DE GFAP ADAPTADA

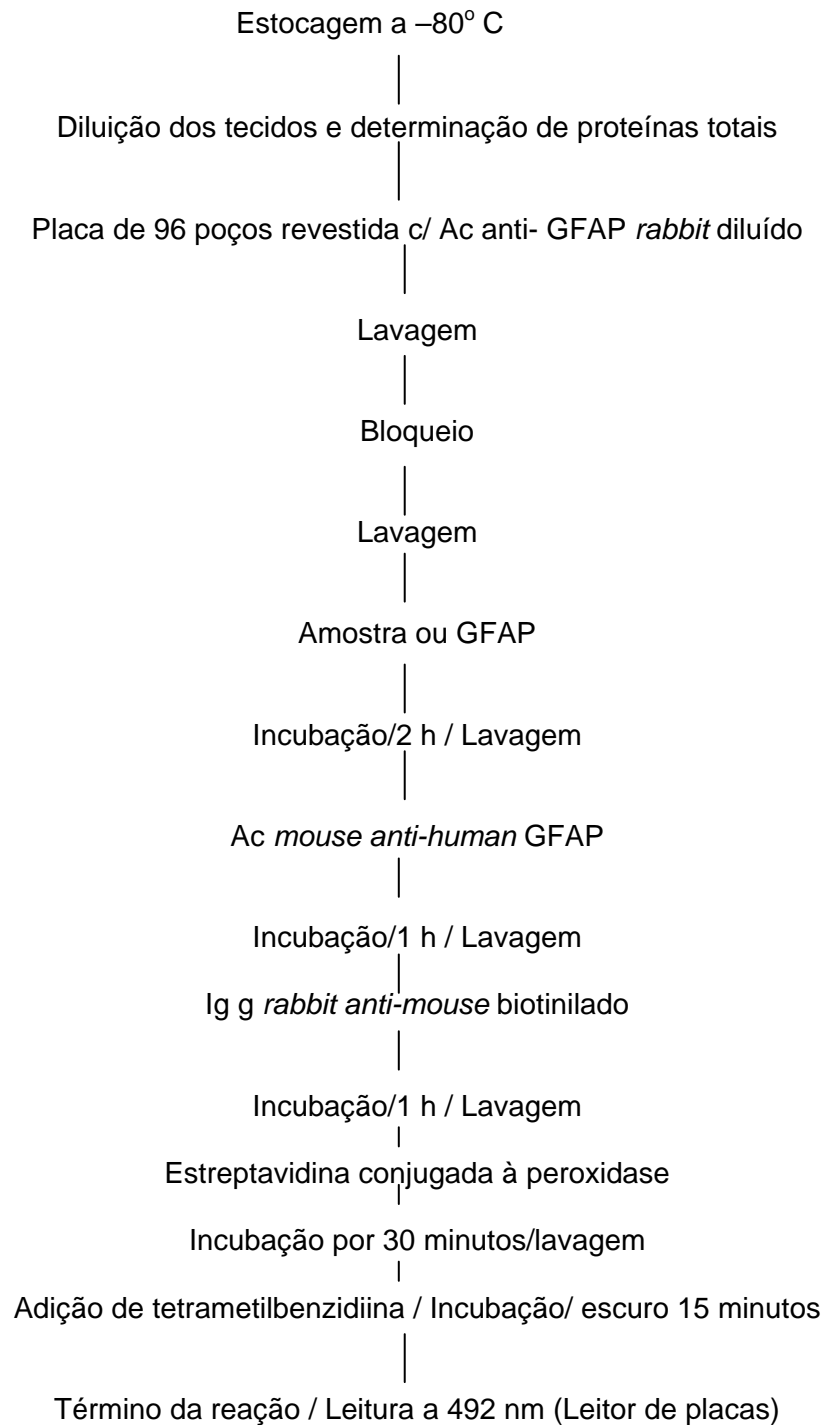
Para dosagem de GFAP foi aplicado o método de ELISA por captura, conforme descrito por Herrmann et al., 2000, com modificações introduzidas por Ceresér (2004), conforme esquematizado a seguir:



Este método é baseado na imobilização de um dos reagentes em fase sólida, enquanto outro pode ser ligado a uma enzima com preservação da atividade enzimática e imunológica. O substrato forma um produto colorimétrico, sendo a alteração de cor monitorada colorimetricamente, determinando a relação entre a intensidade da cor e a concentração do que está sendo analisado na amostra.

ANEXO 2

TÉCNICA DE HERRMANN PARA DOSAGEM DE GFAP



*Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, Brujin CHMM, Lamers KJB. 2000. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analysis of serum concentrations of protein s-100 B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31:2670-77.

ANEXO 3

PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DAS TÉCNICAS PARA DOSAGEM DE GFAP

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 01
TÍTULO: Diluição de tecidos		Página: 01/01
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

1 OBJETIVO

Determinar procedimento para a diluição de tecidos.

2 REAGENTES

PMSF 100 mM

PMSF 0,0017 g

Isopropanol 1 mL

Diluir em vórtex.

3 PROCEDIMENTO

A diluição dos tecidos deve ser feita em PMSF + TBS:

PMSF 200 µL

TBS 20 mL

Coloca-se 500 µL da solução de PSMF/TBS em cada eppendorf e procede-se a diluição com uma seringa de insulina (cerca de 4x).

Por fim acrescenta-se mais 500 µL da solução para completar o volume de 1 mL.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 02
TÍTULO: Dosagem de proteínas – Método de Peterson		Página: 01/04
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

1 OBJETIVO

Determinar procedimentos para a dosagem de proteínas totais.

2 REAGENTES

CTC (Cobre-tartarato-carbonato)

Solução 1: Carbonato de sódio
 Na_2CO_3 20 g
 H_2O qsp.....100 mL

Solução 2: Sulfato de Cobre
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
 H_2O qsp.....100 mL

Solução 3: Tartarato duplo de sódio e potássio
 $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g
 H_2O qsp.....40 mL

Misturar as soluções 2 e 3 e completar com água até 100 mL. Misturar esta solução com a solução 1 sob agitação. É importante que seja nesta ordem. Armazenar em frasco âmbar coberto com papel alumínio à temperatura ambiente. Esta solução será válida por 2 meses.

FOLIN 0,4

Reativo de Folin 2 N..... 10 mL
 H_2O qsp.....100 mL

Ou outra diluição 1:5.

Armazenar em frasco âmbar coberto com papel alumínio à temperatura ambiente.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 02
TÍTULO: Dosagem de proteínas – Método de Peterson		Página: 02/04
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

SDS 10%

SDS 99% 10 g
H₂O qsp.....100 mL

Armazenar à temperatura ambiente.

NaOH 1 N

NaOH % 4 g
H₂O qsp.....100 mL

Armazenar sob refrigeração.

LOWRY

CTC 10 mL
SDS 10% 10 mL
NaOH 1 N..... 8 mL
H₂O 12 mL

Armazenar em frasco âmbar coberto com papel alumínio à temperatura ambiente.
Esta solução será válida por 2 semanas.

ALBUMINA 1mg/mL

Albumina bovina 0,01 g
H₂O qsp.....10 mL

Aliquotar em 50 µL e congelar.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE			
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		Nº POP: 02
TÍTULO: Dosagem de proteínas – Método de Peterson			Página: 03/04
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:	Versão: 01 Emissão: Abr/2004

3 PROCEDIMENTO

Aplica-se de 5 a 20 μL * da amostra (concentrada) na placa.

- * - Amostras de culturas jovens (13 dias): 15 a 20 μL
- Amostras de culturas velhas (30 dias): 10 μL
- Amostras de tecido: 5 a 10 μL

Esquema de curva e volumes

Padrão de Albumina mg/mL (μL)	Água Mili-Q (μL)	Reagente de Lowry (μL)		Reagente de Folin 0,4 N (μL)		
0	100	100	Aguardar 10 minutos	50	Aguardar 30 minutos	Ler em 620 nm
2	98	100		50		
5	95	100		50		
10	90	100		50		
15	85	100		50		
20	80	100		50		
25	75	100		50		
30	70	100		50		
35	65	100		50		
40	60	100		50		

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 02
TÍTULO: Dosagem de proteínas – Método de Peterson		Página: 04/04
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

4 CÁLCULOS

1. Plotar os valores das absorvâncias da curva e calcular:
 - média
 - média menos o branco (m-B): terá o valor médio da absorvância de cada amostra
 - fator de calibração (FC):

$$\boxed{FC = C/A}$$

Onde: C: concentração da amostra
A: absorvância da amostra

- fator de calibração médio (FCM)
2. Plotar os valores das absorvâncias das amostras
 3. Para cada amostra diminui-se o branco, multiplica-se pelo FCM e divide-se pelo volume de amostra aplicada por poço (20 ou 30 µL):

$$\boxed{(A-B)*FCM/vol. da amostra (20 ou 30 \mu L)}$$

4. Divide-se o valor de proteína total aplicada por poço (0,4 µg) pelo resultado anterior. Estes valores serão aplicados na placa de Elisa (volume equivalente a 400 ng de proteína). A saturação do poço ocorre a 500 ng.

OBS: Para realizar o ensaio de Elisa diluir as amostras 10x:

10 µL da amostra + 90 µL de TBS.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 03
TÍTULO: Curva de GFAP		Página: 01/01
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

1 OBJETIVO

Traçar um padrão de GFAP

2 PROCEDIMENTO

Após as amostras terem sido aplicadas na placa fazer a curva de GFAP:

1. Aplica-se o padrão de GFAP nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 20 (μL) em duplicata.
2. Aplica-se Albumina para que cada poço da curva fique com o volume de 40 μL .

GFAP (μL)	ALBUMINA (μL)
0,5	39,5
1	39
2	38
5	35
10	30
15	25
20	20

Completar com TBS o volume de 100 μL .

Na curva, como já tem 40 μL adicionar mais 60 μL .

Nos demais poços onde contém as amostras completar o volume a 100 μL com TBS.

Deixar a placa armazenada em geladeira por 48 horas.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 04
TÍTULO: Dosagem de GFAP por Elisa		Página: 01/06
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

1 OBJETIVO

Dosar GFAP através da técnica de Elisa.

2 REAGENTES

TBS

Trisma base..... 3,75 g
 NaCl..... 29,24 g
 Diluir em 1000 mL de água mili-q.
 Acertar o pH em 7,5 com \pm 4 mL de HCl fumegante.
 Armazenar em geladeira.

M-TBS

Para preparar 1 placa	Para preparar 2 placas
Leite em pó*0,6 g	Leite em pó.....1 g
TBS.....30 mL	TBS.....50 mL

* O leite deve ser Molico desnatado e sem Cálcio.

Deve ser preparado na hora.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 04
TÍTULO: Dosagem de GFAP por Elisa		Página: 02/06
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

Solução de Lavagem

Para preparar 1 placa

TBS.....76 mL
M-TBS.....4 mL
Tween 20.....40 µL

Para preparar 2 placas

TBS.....152 mL
M-TBS.....8 mL
Tween 20.....80 µL

Primeiro Anticorpo

Anti-GFAP rabbit diluído 1:1000 em M-TBS 0,2% (para 1 placa):

Anticorpo..... 10 µL
TBS..... 9 mL
M-TBS..... 1 mL

Segundo Anticorpo

Anti-rabbit conjugado à peroxidase diluído 1:1000 em M-TBS 0,2% (para 1 placa):

Anticorpo..... 10 µL
TBS..... 9 mL
M-TBS..... 1 mL

Albumina 1 ng/µL

Diluir 1000x a Albumina estoque utilizada como padrão para a dosagem de proteína (1µg/µL).

Se necessário pode-se utilizar diretamente a Albumina do estoque.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 04
TÍTULO: Dosagem de GFAP por Elisa		Página: 03/06
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

Substrato

Em um tubo Falcom de 50 mL colocar \pm 10 mL de água mili-q e dissolver 1 comprimido de uréia (envelope dourado). A dissolução é difícil, feita em vórtex.

Depois de dissolver a uréia acrescentar 1 comprimido de o-fenilenodiamina (OPD) (envelope prateado) e dissolver em vórtex.

Completar o volume com água mili-q até 21 mL.

Para 2 placas: 2 comprimidos de uréia, 2 comprimidos de OPD e 42 mL.

OBS: para a manipulação do OPD usar luvas.

HCl 3N

Em uma proveta coloca-se cerca de 30 mL de água

Adiciona-se 12,5 mL de HCl R (12N)

Completar o volume com água até 50 mL

Agitar com bastão de vidro

Cálculo:

$$N_1V_1=N_2V_2$$

$$3N \times 50 \text{ mL} = 12N \times V_2$$

$$V_2 = 12,5 \text{ mL}$$

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 04
TÍTULO: Dosagem de GFAP por Elisa		Página: 04/06
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

3 PROCEDIMENTO

Após 48 horas de incubação das amostras e da curva realizar os seguintes procedimentos:

1º) Lavar a placa 3x com 200 µL de solução de lavagem;

2º) Bloquear com 100 µL de M-TBS 2%;

3º) Incubar por 1 hora à temperatura ambiente;

4º) Lavar a placa 1x com 200 µL de solução de lavagem;

5º) Aplicar 100 µL do primeiro anticorpo (anti-GFAP rabbit diluído 1:1000 em M-TBS 0,2%);

6º) Incubar por 2 horas a 30° C;

7º) Lavar a placa 3x com 200 µL de solução de lavagem;

8º) Aplicar 100 µL do segundo anticorpo (anti-rabbit conjugado à peroxidase diluído 1:1000 em M-TBS 0,2%);

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 04
TÍTULO: Dosagem de GFAP por Elisa		Página: 05/06
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

9º) Incubar por 1 hora a 30° C;

10º) Lavar a placa 2x com 200 µL de solução de lavagem e 1x com 200 µL de TBS;

11º) Adicionar 200 µL do substrato (uréia + OPD);

12º) Incubar por 30 min no escuro (caixinha preta com papel alumínio);

13º) parar a reação com 50 µL de HCl 3 N;

14º) Ler a 492 nm.

OBS: Se não parar a reação ler em 450 nm.

4 CÁLCULOS

1. Plotar os valores das absorbâncias da curva e calcular:

- média
- média menos o branco (m-B): terá o valor médio da absorbância de cada amostra
- fator de calibração (FC):

$$FC = C/A$$

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 04
TÍTULO: Dosagem de GFAP por Elisa		Página: 06/06
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Abr/2004

Onde: C: concentração da amostra

A: absorbância da amostra

- fator de calibração médio (FCM)

2. Plotar os valores das absorbâncias das amostras;

3. Para cada amostra diminui-se o branco, multiplica-se pelo FCM e divide-se pelo volume de proteínas aplicada por poço (40 ng):

$$\frac{(A-B) \cdot \text{FCM}}{\text{vol. de proteínas (40 ng)}}$$

4. Calcula-se a média das absorbâncias;

5. Calcula-se o erro:

$$\frac{\text{Desvio padrão (A)}}{\text{Raiz (n)}}$$

Onde: n: nº total de amostras.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE		
PADRÃO TÉCNICO	TIPO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	Nº POP: 05
TÍTULO: Leitor de placas de Elisa		Página: 01/01
PREPARAÇÃO: Fernanda Bley Bernardes Keila Maria Ceresér	APROVAÇÃO:	REVISÃO:
		Versão: 01 Emissão: Mai/2004

1 OBJETIVO

Fazer a leitura da placa de Elisa.

2 PROCEDIMENTO

- ligar o aparelho e a impressora
- colocar folha na impressora
- pressionar a tecla → até “quick meas”
- pressionar a tecla ↵
- pressionar a tecla → até o comprimento de onda desejado
- pressionar a tecla ↵ 2X
- colocar a placa
- pressionar a tecla ↑
- esperar imprimir
- pressionar a tecla ↑
- desligar o aparelho e a impressora.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)